



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

VANESSA MARQUES MECCATTI

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO RESULTANTE DA
COMBINAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS SOBRE *Candida* spp.**

2021

VANESSA MARQUES MECCATTI

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO RESULTANTE DA COMBINAÇÃO DE
EXTRATOS DE PLANTAS SOBRE *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Meccatti, Vanessa Marques

Análise do potencial antifúngico resultante da combinação de extratos de plantas sobre *Candida* spp. / Vanessa Marques Meccatti. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Candida*. 2. Biofilme. 3. Sinergismo. 4. Fitoterapia. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Marília Gabriela de Oliveira Lopes

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências e Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 29 de julho de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Fernando José Meccatti.

Conquistei o título de Cirurgiã-Dentista dedicando a minha mãe, Marli Marques de Souza Meccatti (in memoriam) e chego no final dessa jornada para conquistar meu tão sonhado título de Mestre dedicando a você, pai.

Sabemos o quanto a vida foi dolorida quando perdemos a mamãe e a saudade muitas vezes me fez questionar tantas coisas sobre nossa família. Hoje vejo com clareza a pessoa fenomenal que Deus me deu como pai. Um homem forte diante das adversidades, resiliente, engraçado, companheiro e mesmo sem saber como lidar com duas adolescentes e todas suas emoções femininas, você se dedicou e ainda se dedica ao máximo às suas filhas.

Hoje vejo com clareza todo seu esforço, garra e dedicação a nós. Percebo seu amor e carinho. Essa conquista também é sua e da mamãe. Vocês me impulsionaram até aqui.

Obrigada por tanto pai. Te admiro muito hoje e sempre.

Amo você.

AGRADECIMENTOS

A Deus por Seu amor e proteção e à Nossa Senhora de Fátima a qual tenho muita fé e sinto seu cuidado em cada detalhe na minha vida.

Aos meus pais Fernando José Meccattí e Marli Marques de Souza Meccattí, novamente agradeço por todo esforço e carinho comigo. Serei eternamente grata a vocês. Agradeço também a minha irmã Viviane Marques Meccattí (mena).

Ao meu sogro Paulo Roberto Moraes Domiciano e minha sogra Rosely Lopes Rodrigues Domiciano que se preocupam, zelam e oram por mim como se fosse filha. Já me considero como tal! Obrigada por todos os conselhos e cuidados.

Ao meu noivo Fábio Rodrigues Domiciano por ser essa pessoa tão zelosa comigo que me suporta, incentiva, abraça minhas lutas interiores e exteriores e olhando nos meus olhos diz: estou contigo! Você é o melhor namorado, companheiro, noivo, amigo do mundo! Admiro muito sua empatia e cuidado com o próximo. Essa conquista também é sua. Amo você.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho. Em tempos tão difíceis, a sabedoria e o discernimento de vocês na condução de toda comunidade unespiana do ICT foi fundamental. Muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado durante todo meu curso (01/02/2019 - 31/07/2021).

*À minha eterna orientadora, Profa. Assoc. **Luciane Dias de Oliveira** que desde o meu primeiro contato com a docência e a pesquisa foi uma exímia incentivadora. Creio que esse seja o verdadeiro papel do professor e você o desempenha com excelência. Obrigada profa. por ser tão paciente com minhas questões, tão sensível com minhas dificuldades e tão presente mesmo com tantas funções a desempenhar. Você é digna de admiração. E pode ter certeza que tem a minha.*

*À Profa. Assoc. **Juliana Campos Junqueira** que toda vez que vou procurá-la apresentando um novo projeto, me recebe de braços abertos, sempre com muita paciência, educação e disposta a me ajudar. Excelente professora e pesquisadora, me espelho em você profa Juliana. Obrigada mais uma vez por fazer parte dessa etapa tão importante para mim.*

*À Profa Dra. **Marília Gabriela de Oliveira Lopes** por prontamente aceitar o convite para fazer parte desse momento. E o fez com tamanha docilidade e entusiasmo. Uma pessoa extraordinária que é sempre tão receptiva com seus alunos, até mesmo os virtuais, como eu! Obrigada profa.*

*Ao meu amigo Dr. **Jonatas Rafael de Oliveira** que me guiou na prática da pesquisa e me aconselha até hoje diante das questões científicas. Obrigada por tudo Jô.*

*À minha amiga **Lívia Mara Alves Figueiredo Godói** que sempre esteve por perto me ensinando novas metodologias científicas de maneira tão calma e dedicada. Obrigada por ser minha parceira de laboratório com entusiasmo mesmo quando eu já havia perdido o meu. Desejo todo sucesso a você, Lívia!*

*Aos meus amigos de laboratório **Thaís Cristine Pereira** e **Lucas de Paula Ramos**, quando as coisas se tornaram complicadas, prontamente vocês estavam por perto e conseguimos realizar o que precisávamos com cooperação e docilidade. Tha, você foi fundamental em grande parte de todo esse processo. Lu, seus conselhos são valiosos demais para todos nós! Obrigada amigos!*

*Às minhas queridas amigas **Sabrina Ferreira dos Santos Líberato** e **Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos**, nossas tardes no LANA foram sempre tão agradáveis! Obrigada por toda forma de ajuda que vocês empregaram durante esse caminho que percorri.*

*Às minhas colegas **Patrícia Michelle Nagai de Lima**, **Ellen Roberta Lima Bessa** e **Ana Luíza do Rosário Palma** vocês tornaram tudo mais leve e divertido. Obrigada por compartilharem essa jornada comigo!*

"Surprender-se consigo, cavar e fazer vir à luz o inédito que em si repousa. Reinventar-se, desbravar os territórios de seus limites e possibilidades. Porque o que nos faz viver é o eterno descobrir-se".

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Produtos vegetais	17
3.2 Leveduras	17
3.3 Atividade antimicrobiana dos extratos	17
3.3.1 Preparo do inóculo.....	17
3.3.2 Atividade antifúngica dos extratos isolados	18
3.3.3 Avaliação do efeito sinérgico dos extratos vegetais	18
3.3.4 Análise da ação antifúngica das combinações sobre biofilmes.....	20
3.4 Análise estatística	22
4 RESULTADO	23
4.1 Determinação da CIM e CFM dos extratos isolados sobre <i>Candida</i> spp	23
4.2 Efeito das combinações dos extratos vegetais sobre <i>Candida</i> spp.....	26
4.3 Efeito das combinações dos extratos vegetais sobre biofilme	29
4.3.1 Combinação nº 1 (rosas e cúrcuma)	29
4.3.1.1 <i>Candida albicans</i>	29
4.3.1.2 <i>Candida dubliniensis</i>	31
4.3.1.3 <i>Candida tropicalis</i>	34
4.3.2 Combinação nº 2 (Alecrim e romã)	37
4.3.2.1 <i>Candida albicans</i>	37
4.3.2.2 <i>Candida dubliniensis</i>	40
4.3.2.3 <i>Candida tropicalis</i>	43
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS.....	63

Meccatti VM. Análise do potencial antifúngico resultante da combinação de extratos de plantas sobre *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas nosocomiais e o estudo da fitoterapia e sinergismo de substâncias são considerados potenciais alternativas para controle dessas infecções. Com isso, o presente estudo propôs avaliar *in vitro*: a atividade antifúngica dos extratos de *Curcuma longa* L. (cúrcuma) e *Rosa centifolia* L. (rosas brancas), bem como *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Punica granatum* L. (romã) isolados e combinados sobre *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*; ação antibiofilme das combinações aditivas sobre biofilmes monomicrobianos de *Candida* spp. com diferentes tempos de contato: 5 min, 30 min e 24 h. Inicialmente foram feitas análises da ação antifúngica dos extratos isolados por meio do teste de microdiluição em caldo (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Baseado nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) obtidas, foi analisado o potencial antifúngico das combinações por meio da técnica “checkerboard” e adotado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF). As CIMs e as concentrações aditivas foram analisadas sobre biofilmes formados por 48 h em poços de microplacas para posterior determinação da viabilidade celular por meio do teste MTT. Para análise estatística, os dados foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn com nível de significância de 5%. Todos os extratos vegetais apresentaram ação fungistática e fungicida; os extratos de cúrcuma e rosas brancas juntos apresentaram uma combinação aditiva para cada espécie de *Candida* e a mistura dos extratos de alecrim e romã resultaram em três combinações aditivas para *C. albicans* e quatro para as espécies não-*albicans* (ICIF > 0,5 e ≤ 1,0). Sobre biofilmes, as combinações e os extratos isolados apresentaram reduções com diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Conclui-se que os extratos vegetais de cúrcuma e rosas brancas bem como alecrim e romã apresentam ação antifúngica e antibiofilme, tanto isolados quanto combinados, contra *Candida* spp. em diferentes concentrações e tempos de ação.

Palavras-chave: *Candida*. Biofilme. Sinergismo. Fitoterapia.

Meccatti VM. Analysis of the antifungal potential resulting from the combination of plant extracts on Candida spp. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The Candida genus is responsible for about 80% of nosocomial fungal infections and the study of herbal medicine and substance synergism are considered potential alternatives to control these infections. Thus, the present study proposed to evaluate *in vitro*: the antifungal activity of extracts of Curcuma longa L. (turmeric) and Rosa centifolia L. (white roses), as well as Rosmarinus officinalis L. (rosemary) and Punica granatum L. (pomegranate) isolated and combined on Candida albicans, Candida dubliniensis and Candida tropicalis; antibiofilm action of additive combinations on monomicrobial biofilms of Candida spp. with different contact times: 5 min, 30 min and 24 h. Initially, analyzes of the antifungal action of the isolated extracts were performed using the broth microdilution test (Clinical and Laboratory Standards Institute). Based on the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) obtained, the antifungal potential of the combinations was analyzed using the checkerboard technique and the fractional inhibitory concentration (FIC) index was adopted. MICs and additive concentrations were analyzed on biofilms formed for 48 h in microplate wells for further determination of cell viability using the MTT test. For statistical analysis, data were analyzed by ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn tests with a significance level of 5%. All plant extracts showed fungistatic and fungicidal action; turmeric and white rose extracts together presented an additive combination for each Candida species and the mixture of rosemary and pomegranate extracts resulted in three additive combinations for C. albicans and four for non-albicans species ($FIC > 0.5$ e ≤ 1.0). Regarding biofilms, the combinations and the isolated extracts showed reductions with statistical difference in relation to the control ($p < 0.05$). It is concluded that the plant extracts of turmeric and white roses as well as rosemary and pomegranate have antifungal and antibiofilm action, both isolated and combined, against Candida spp. at different concentrations and times of action.

Keywords: Candida. Biofilm. Synergism. Phytotherapy.

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. são micro-organismos oportunistas que, sob certas circunstâncias, são capazes de causar infecções nas mucosas do hospedeiro resultando em um comprometimento limitado nesses tecidos, infecções locais na mucosa e pele ou infecções disseminadas extremamente graves com altos índices de mortalidade (Perlroth et al., 2007; Polke et al., 2015; Aikawa et al., 2016). Cerca de 80% das infecções fúngicas nosocomiais são provocadas por espécies do gênero *Candida* (Ramage et al., 2005). Com o surgimento do novo coronavírus (Sars-Cov-2) em 2019 e rápida disseminação em escala global, no dia 11 de março de 2020, foi decretado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pandemia da COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus). Tal acontecimento foi e está sendo de grande impacto na esfera da saúde, sobrecarregando hospitais, médicos, enfermeiros, profissionais afins e todo sistema de saúde. Sabe-se que o novo coronavírus é provido de “estratégias” para desregular os mecanismos imunológicos e com isso há aumento no risco de coinfeção por patógenos oportunistas principalmente em pacientes hospitalizados. A candidose oral tem sido constantemente diagnosticada em pacientes com COVID-19 em estado crítico, principalmente aqueles que já tinham uma condição predisponente e que estavam sendo medicados com antibióticos (Riad et al., 2021a). Contudo, além da condição em pacientes debilitados, pacientes em estado não grave acometidos pela COVID-19 estão apresentando candidose orofaríngea com curso mais longo de infecção devido ao uso indiscriminado de antibióticos (Riad et al., 2021b).

Essas leveduras possuem a capacidade de formar biofilme e tubos germinativos, apresentam proteínas de adesão e enzimas nas extremidades das hifas que contribuem para sua difusão pelo tecido invadido (Ganguly et al., 2011). Esses micro-organismos se organizam em comunidades conhecidas como biofilmes, ocorrendo um aumento da resistência das células dessa estrutura tridimensional contra a terapia antifúngica e as defesas do hospedeiro (Thein et al., 2006; Kernien et al., 2017). Biofilmes orais são polimicrobianos, podendo ser constituídos por várias espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* dentre outras diferentes espécies de micro-organismos (Vidotto et al., 2003).

C. albicans ainda é o principal agente causador da candidose oral, sendo responsável por até 95% dos casos. Esta espécie possui um repertório notável de fatores de virulência que facilitam sua transição de um estado comensal para patogênico. Sua principal característica com implicações clínicas significativas consiste na capacidade de formação de biofilme. Seus atributos para evasão da defesa do hospedeiro como degradação de anticorpos também são relevantes (Vila et al., 2020). A característica do dimorfismo é a essência da patogênese desta espécie (Shapiro et al., 2009; Silva et al., 2011). Ainda, possui a capacidade de crescer em anaerobiose, podendo contribuir para infecções periodontais e endodônticas (Razina et al., 2017; Bernal-Treviño et al., 2018).

Apesar de *C. albicans* ser a principal espécie, verificou-se que a colonização da cavidade bucal por espécies não-*albicans* tem um aumento considerável após os 80 anos de idade. Dentre as espécies encontradas na cavidade bucal dos idosos estão *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* por apresentaram uma suscetibilidade reduzida ao fluconazol (Benito-Cruz et al., 2016). É importante ressaltar que esses pacientes possuem diversas comorbidades, tornando o quadro clínico ainda mais complexo. *C. dubliniensis* é um patógeno emergente que compartilha muitas características fenotípicas com *C. albicans*. Segundo Mäkinen et al. (2018) *C. dubliniensis* é a espécie não-*albicans* mais detectada nos isolados de pacientes com câncer bucal e de acordo com Loreto e colaboradores (2010) é a espécie não-*albicans* mais prevalente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). *C. tropicalis* é uma espécie que apresenta alta capacidade de adesão e formação de biofilme (Negri et al., 2010). A colonização por *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes xerostômicos pós-radioterapia é significativamente aumentada quando comparada a pacientes saudáveis e a espécie não-*albicans* mais prevalente é *C. tropicalis* (Tarapan et al., 2019). Tal radiação utilizada no tratamento de tumores de cabeça e pescoço pode provocar aumento da virulência de *C. tropicalis* por alterações morfológicas e fisiológicas e, por isso, pacientes tratados por radioterapia podem ser mais susceptíveis à colonização por esta espécie (Silva et al., 2017). Estudos longitudinais têm demonstrado que uma proporção considerável de pacientes estão desenvolvendo infecções fúngicas por espécies de *Candida* não-*albicans* (Pfaller et al., 2010, 2011; Castanheira et al., 2017; Chowdhary et al., 2018). Além disso, casos de resistência à terapia antifúngica

comumente utilizada, como as equinocandinas e os azólicos, têm sido relatados (Sanguinetti et al., 2015; Prigent et al., 2017). Algumas espécies de *Candida* têm apresentado uma plasticidade no genoma que configura um mecanismo de resistência adicional. Ainda, devido ao ambiente favorável para formação de biofilme e aos níveis sub-terapêuticos do fármaco que chegam na cavidade bucal, esta apresenta-se como um ambiente propício para o desenvolvimento de resistências (Morio et al., 2017). Diversos estudos recentes têm apontado para resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos convencionais como os azóis, equinocandinas e poliênicos e dentre as espécies mais citadas estão: *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Perlin et al., 2017; Chowdhary et al., 2018; Khan et al., 2018; Prasad et al., 2019).

A necessidade de se investigar novas alternativas terapêuticas é emergente. As plantas medicinais são uma fonte renovável de estruturas químicas novas e complexas que poderiam ser investigadas (Fabricant et al., 2001). Alguns vegetais são constituídos de uma variedade de moléculas efetoras capazes de desempenhar diversos papéis farmacológicos. Resultados promissores do potencial antifúngico das plantas sobre *Candida* spp. são encontrados na literatura. Extratos de diferentes espécies de *Salvia* apresentaram efeitos inibitórios contra isolados clínicos de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. glabrata* (Salari et al., 2016; de Oliveira et al., 2019). O extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) também diminui a viabilidade de biofilmes de *C. albicans* (Oliveira et al., 2017). Extrato de *Guapira graciliflora*, um arbusto encontrado no bioma da caatinga semiárida do Nordeste do Brasil, mostrou atividade antifúngica moderada contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, e forte atividade contra *C. dubliniensis* (Almeida et al., 2018).

Curcuma longa L., conhecido também como cúrcuma ou açafrão-da-terra é utilizado como ingrediente na culinária asiática há séculos. O extrato de cúrcuma contém vários componentes como a curcumina (3-5%), arabinose livre (1%), óleo essencial (2-7%) e ácidos glicanos por exemplo (Kim et al., 2012). A cúrcuma tem sido amplamente estudada quanto ao seu potencial no tratamento da osteoartrite (Perkins et al., 2017), ação antimicrobiana (Irshad et al., 2018), anti-inflamatória (Governa et al., 2018), antidepressiva (Zhang et al., 2018), antitumoral (Li et al., 2018), nefroprotetor (Akinyemi et al., 2018) e antioxidante (Akter et al., 2019). Com relação ao potencial antifúngico do extrato avaliado isoladamente, Samadi et al.

(2019) avaliaram quinze extratos de plantas quanto a atividade antifúngica sobre cepas clínicas de *C. albicans* e o extrato de *C. longa* L. esteve entre os cinco fitoterápicos que apresentaram o melhor efeito inibitório e potencial para controlar o crescimento desta levedura.

Rosa centifolia L., popularmente conhecida como rosas brancas, é uma espécie de flor da família *Rosaceae*, proveniente de hibridismo de *Rosa gallica* L., *Rosa Moschata* Herrm., *Rosa Canina* L. e *Rosa Damasceno* Mill (Kumar et al., 2015). Tal planta apresenta vasta aplicação terapêutica popular na medicina tradicional indiana e apesar disso, ainda são poucos os estudos experimentais e clínicos sobre suas atividades biológicas dentro da literatura científica. Entre as atividades biológicas da *R. centifolia* descritas estão: capacidade de promover relaxamento fisiológico e psicológico, efeitos analgésicos e anti-ansiedade (Mohebitabar et al., 2017), potencial agente anti-inflamatório e anti-artrítico (Kumar et al., 2015; 2017), atividade anti-HIV (Palshetkar et al., 2020) e ação antifúngica sobre *C. albicans* e *C. tropicalis* (Gauniyal, Teotia, 2015). Neste último estudo, O extrato de *R. centifolia* foi preparado a partir das pétalas e analisado quanto a sua composição sendo identificados alcalóides, flavonóides, glicosídeos, taninos, terpenóides, saponinas que estão relacionados à atividade antimicrobiana.

Rosmarinus officinalis L. popularmente chamado de alecrim é encontrado amplamente distribuído nas regiões da Europa, Ásia e África, e tem sido cultivada por um longo tempo no Brasil (Machado et al., 2009). Esta planta é utilizada na indústria de cosméticos e há muito tempo vem sendo utilizada na culinária, principalmente por sua essência aromática. Os fitocompostos mais descritos com atividades terapêuticas incluem ácido caféico, rosmarínico, ursólico, carnósico e o carnosol. Estes dois últimos são comumente estudados sobre a atividade anti cancerígena (Pérez-Sánchez et al., 2019), neuroprotetiva (Kayashima, Matsubara, 2012) e recentemente demonstraram potencial para inibir o quórum sensing da virulência de *Staphylococcus aureus* (Nakagawa et al., 2020). Ainda, o extrato de alecrim apresenta propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (Bozin et al., 2007; Silva et al., 2015). Sobre *Candida* spp. pode-se encontrar diversos relatos sobre sua ação antifúngica em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (Chifiriuc et al., 2012; Gauch et al., 2014; Akroum, 2020).

Punica granatum L. conhecido no Brasil como romã é um fruto circular com

sementes e cheio de um líquido adocicado. Originária da Ásia, a romanzeira tem sido cultivada em maior escala em regiões tropicais e subtropicais (Lorenzi, Matos, 2008). O extrato de romã tem apresentado forte potencial antimicrobiano e antibiofilme (Xu et al., 2017; Almeida N. et al., 2018), anticâncer e anti-inflamatório (Turrini et al., 2015; Baradaran et al., 2020), antioxidante e neuroprotetivo (Forouzanfar et al., 2013). Sobre *Candida* spp. alguns estudos comprovam a ação antifúngica da romã e seus compostos bioativos (Li et al, 2017; Lavaee et al., 2018; Kumar et al., 2020) cujo mecanismo de ação envolve danos à parede celular, ruptura da levedura, alterações na morfologia entre outros. Esta planta apresenta propriedades antimicrobianas devido à presença de taninos, flavonóides, numerosos alcalóides e compostos polifenólicos (Anibal et al., 2013; Lavaee et al., 2018).

O estudo de combinações entre compostos tem sido descrito como alternativa terapêutica promissora. Com uso sinérgico de substâncias, sejam elas sintéticas ou naturais, é possível diminuir as doses e os efeitos tóxicos, além de aumentar a eficácia do tratamento e diminuir a possibilidade de resistência antimicrobiana (Azevedo et al., 2015; Liu et al., 2014). A curcumina apresentou sinergismo junto a anfotericina B potencializando a ação antifúngica (Tsao, Yin 2000). A combinação dupla de ácido caprílico com carvacrol ou timol (componentes ativos extraídos de vários óleos essenciais) gerou um sinergismo capaz de produzir rompimentos da membrana celular e inibir a bomba de efluxo de *C. albicans* (Bae et al., 2019). O sinergismo alcançado na aplicação dos extratos de romã e alecrim em conjunto com antibiótico alcançaram a maior erradicação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sendo considerada a terapia mais eficaz quando comparada às outras monoterapias avaliadas no estudo (Abu El-Wafa et al., 2020). São robustas as evidências sobre a ação biológica de tais plantas quando analisadas isoladamente. Recentemente, a comunidade científica tem voltado a atenção para os resultados surpreendentes que a combinação de derivados de plantas e a associação destes produtos naturais com fármacos convencionais podem produzir. Diante do exposto, há grande relevância na busca por alternativas terapêuticas frente às infecções resistentes, principalmente alternativas que atuam sobre biofilmes. São poucos os estudos encontrados na literatura que analisam a sinergia de extratos vegetais sobre *Candida* spp. e a escassez é mais evidente com relação a estudos sobre as espécies não-*albicans*.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica da combinação dupla dos extratos de *Curcuma longa* L. (cúrcuma) e *Rosa centifolia* L. (rosas brancas) ou *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Punica granatum* L. (romã) sobre biofilmes de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a ação antifúngica isolada de cada extrato vegetal;
- b) Investigar, por meio da técnica *checkerboard*, o sinergismo que as combinações duplas produziram sobre culturas planctônicas de *Candida* spp.
- c) Analisar a ação antibiofilme das combinações que foram sinérgicas ou aditivas sobre biofilmes monomicrobianos das espécies de *Candida* com diferentes tempos de exposição: 5 minutos, 30 minutos e 24 horas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produtos vegetais

Todos os extratos são glicólicos e foram adquiridos na concentração de 200 mg/mL. O extrato de *C. longa* L. (cúrcuma) foi obtido utilizando-se os rizomas (Seiva Brazilis, SP) com devidos laudos e especificações do produtor (Anexo A). O extrato de *R. centifolia* L. (rosas brancas) foi obtido utilizando-se as flores, o extrato de *R. officinalis* (alecrim) as folhas e o extrato de *P. granatum* (romã) a casca, todos possuem os devidos laudos e especificações do produtor (Mapric, SP) (Anexos B, C e D).

3.2 Leveduras

Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. dubliniensis* (ATCC MYA 646) e *C. tropicalis* (ATCC 13803) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP.

3.3 Atividade antimicrobiana dos extratos

3.3.1 Preparo do inóculo

Candida spp. foram cultivadas (37°C/24 h) em ágar Sabouraud-dextrose (SD - Kasvi, Brasil) em seguida, foram realizadas as preparações das suspensões microbianas onde colônias das respectivas espécies de *Candida* foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e homogeneizado em Vortex por 10 s para posterior padronização conforme a necessidade de cada protocolo.

3.3.2 Atividade antifúngica dos extratos isolados

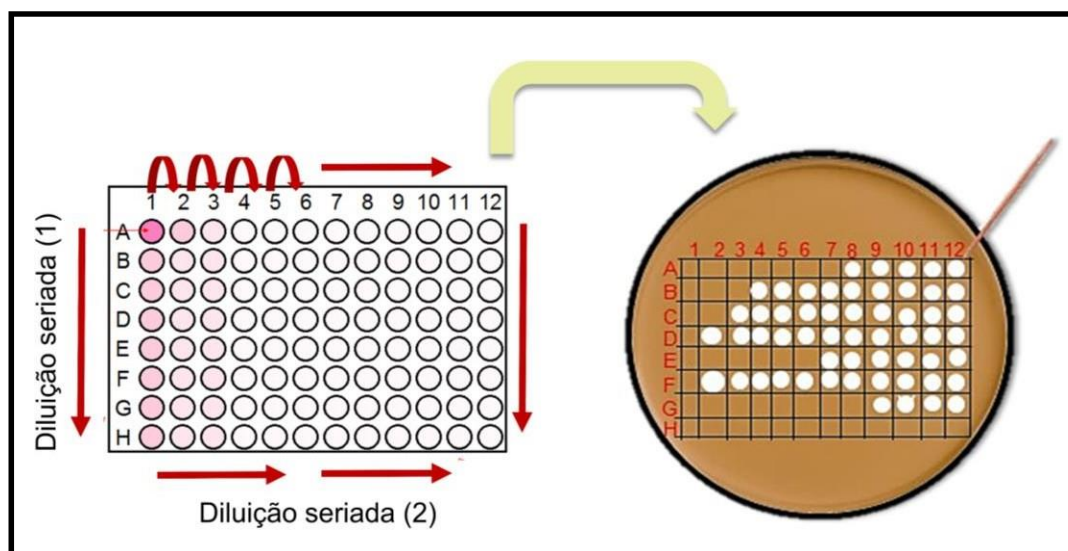
Foi aplicado o método de microdiluição em caldo, baseado na norma M27-S4 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, para determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) dos extratos sobre as cepas fúngicas. Após preparo do inóculo, conforme item 3.3.1, foi realizada a padronização em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284, resultando em uma suspensão padrão de 1×10^6 células de leveduras por mililitro. Em diferentes microplacas (Kasvi K12-096), foram realizadas 10 diluições seriadas (1:2) dos extratos em caldo RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (INLAB). Após, foi acrescentado o inóculo ajustado e as microplacas foram levadas para incubação (37°C/48 h). Com isso, a CIM de cada extrato foi determinada, a olho nu, no primeiro poço sem turvação, seguinte ao poço com aparente crescimento microbiano. Ainda, foram realizadas análises do veículo (propilenoglicol) a fim de verificar se este produz interferências na ação antimicrobiana dos extratos vegetais. Para determinação da CMM, foi semeado em ágar SD (Kasvi) o conteúdo do poço de onde foi determinada a CIM e do poço anterior a este. Após incubação (37°C/48 h), a CMM foi determinada em placas sem crescimento de colônias.

3.3.3 Avaliação do efeito sinérgico dos extratos vegetais

Foi utilizada a técnica “tabuleiro de xadrez” (*checkerboard*) segundo Moreno et al. (2020) com modificações, este método é baseado no teste de microdiluição em caldo. O meio utilizado foi o RPMI 1640 e a suspensão fúngica padronizada em solução salina (1×10^6 células/mL). O experimento iniciou com as concentrações de cada extrato que foram capazes de inibir o crescimento fúngico na etapa anterior (CIM de cada extrato). Em microplacas de 96 poços, as colunas das extremidades foram utilizadas como controle (C- solução salina e controle de esterilidade). Da fileira A até a fileira G (colunas de 2 a 9), os poços receberam 50 µL de meio e,

apenas na fileira A, foi acrescentado 50 μL do extrato nº 1 (rosas brancas ou alecrim). A partir de então, foram feitas diluições seriadas, sendo que a fileira B recebeu 50 μL do conteúdo dos poços da fileira A e assim sucessivamente até a fileira G. Em seguida, todos os poços receberam 50 μL do extrato nº 2 (cúrcuma ou romã) diluído seriadamente em microtubos (cada coluna recebeu uma concentração correspondente a um microtubo). Por fim, foram adicionados 100 μL do inóculo preparado, conforme item 3.3.1, e padronizado em espectrofotômetro em 1×10^6 , totalizando 200 μL /poço. A placa foi levada para incubação a $37\text{C}^\circ/48 \text{ h}$ para posterior leitura visual. Na figura 1 pode-se visualizar uma ilustração da técnica.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da técnica “tabuleiro de xadrez”



Fonte: Pereira, 2018.

Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos, foi adotado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. O ICIF é calculado através da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) ou “CIM combinada” do 1º extrato mais a CIF do 2º extrato dividido pela CIM dos extratos isolados como mostra a figura 2.

Figura 2 – Ilustração do cálculo do ICIF

$$\frac{\text{CIM combinada}}{\text{CIM extrato 1 isolado}} + \frac{\text{CIM combinada}}{\text{CIM extrato 2 isolado}}$$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma combinação será considerada sinérgica quando $\text{ICIF} \leq 0,5$, aditiva quando $\text{ICIF} > 0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando $\text{ICIF} > 1$ e ≤ 4 e antagonista em $\text{ICIF} > 4,0$. A mesma fórmula será utilizada para calcular o índice de concentração fungicida fracionária (ICFF), usando valores CFM em vez de CIM (Moreno et al., 2020).

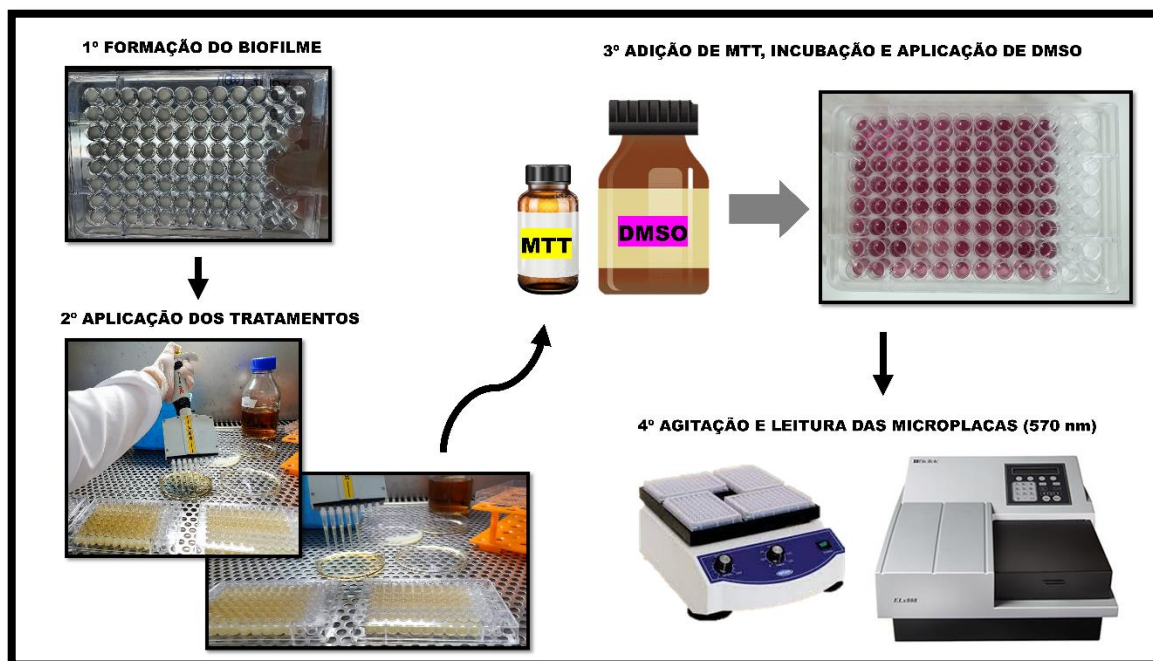
3.3.4 Análise da ação antifúngica das combinações sobre biofilmes

Após preparo das suspensões de *Candida* spp., conforme item 3.3.1, foi realizada a padronização em espectrofotômetro, para obtenção de 10^7 células/mL. Posteriormente, foram adicionados em microplacas 200 μL /poço da suspensão ajustada de *Candida*, que foi levada para incubação ($37^\circ\text{C}/90$ min), para a adesão inicial das células fúngicas ao poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado caldo BHI (Brain Heart Infusion - Kasvi). A incubação procedeu por 48h para formação do biofilme, com substituição do caldo após 24h de incubação. Depois da formação do biofilme, os mesmos foram expostos por 5 min, 30 min ou 24h as concentrações que se mostraram aditivas ou sinérgicas na análise anterior da combinação de extratos vegetais (cúrcuma e rosas brancas), (alecrim e romã) pré-determinadas pela técnica do *checkerboard*. Meio de cultura e nistatina (suspensão oral 100.000 UI/mL – GERMED) foram utilizados como controles negativo e positivo respectivamente. Cada grupo experimental foi composto por $n=10$. Após exposição às combinações dos extratos, foi adicionada solução salina e

a mesma foi descartada, no intuito de lavar os poços e eliminar células não aderentes que sofreram com os tratamentos. Foi realizado o teste de viabilidade celular das células fúngicas no qual foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, Brasil) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1h. Passado o período de incubação a solução de MTT foi retirada seguido pela adição de 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sob agitação constante por 10 minutos. Em seguida foi obtida as densidades ópticas (DO) por meio de uma leitora de microplaca em 570 nm (Figura 3) e as DO obtidas foram convertidas, através da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células fúngicas.

% Redução de Viabilidade = 100 - (DO Poço Tratado x 100 / Média de DO Controle Negativo)

Figura 3 - Metodologia seguida para análise dos biofilmes por meio do teste de MTT

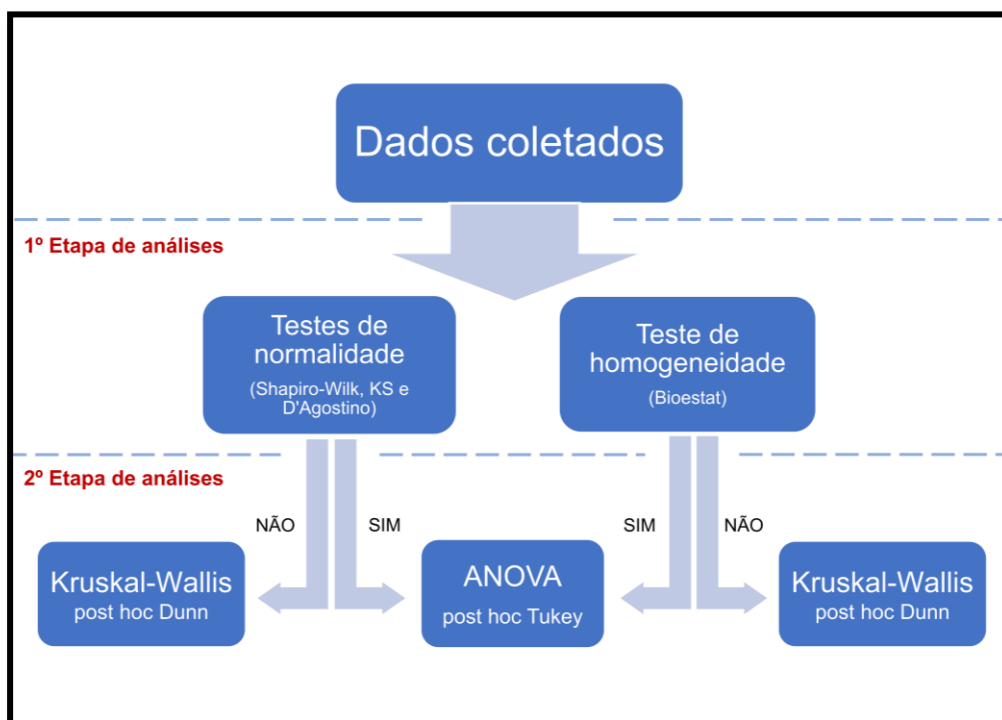


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente, avaliados quanto a normalidade por meio dos testes: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson omnibus e quanto a homogeneidade por meio do software Bioestat 5.0. Se os dados apresentaram normalidade e homogeneidade foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey, caso contrário, pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn como ilustrado no fluxograma das etapas (Figura 4). Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, considerando-se nível de significância de 5%.

Figura 4 – Fluxograma das etapas da análise estatística



Fonte: Elaborado pelo autor.

4 RESULTADO

4.1 Determinação da CIM e CFM dos extratos isolados sobre *Candida* spp.

No teste de microdiluição em caldo, todos os extratos vegetais analisados apresentaram CIM e CFM para todos os micro-organismos. Também verificou-se que o veículo não produziu interferências na atividade antifúngica sobre todas as espécies. Como pode ser observado na tabela 1, o extrato de *C. longa* promoveu inibição de crescimento para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* com 50 mg/mL. Da mesma forma, foi constatada a inibição do crescimento em meio sólido (CFM) com a mesma concentração para as três espécies de *Candida*.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de *C. longa* para *Candida* spp.

Extrato Glicólico de <i>Curcuma longa</i> L.		
Micro-organismos	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>Candida albicans</i>	50	50
<i>Candida dubliniensis</i>	50	50
<i>Candida tropicalis</i>	50	50

Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato de *R. centifolia* também apresentou uma concentração inibitória e fungicida mínima de 50 mg/mL para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, já para *C. tropicalis* o valor foi de 25 mg/mL como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de *R. centifolia* para *Candida* spp.

Extrato Glicólico de <i>Rosa centifolia</i> L.		
Micro-organismos	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>Candida albicans</i>	50	50
<i>Candida dubliniensis</i>	50	50
<i>Candida tropicalis</i>	25	25

Fonte: Elaborado pelo autor.

Sobre *C. albicans*, a concentração de 25 mg/mL do extrato de *R. officinalis* foi capaz de promover ação fungistática e fungicida e para as outras duas espécies o extrato atuou na concentração de 50 mg/mL (tabela 3).

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de *R. officinalis* para *Candida* spp.

Extrato Glicólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.		
Micro-organismos	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>Candida albicans</i>	25	25
<i>Candida dubliniensis</i>	50	50
<i>Candida tropicalis</i>	50	50

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para *C. albicans*, o extrato de *P. granatum* apresentou valores de CIM e CFM menores que para as demais espécies. Os valores foram de 12,5 mg/mL para *C. albicans* e 25 mg/mL para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* como pode ser observado na tabela 4.

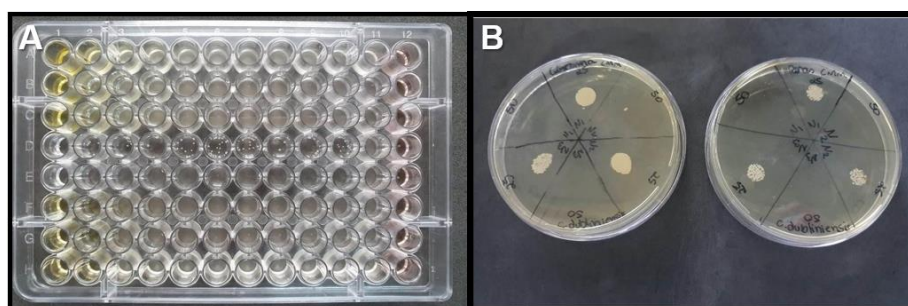
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de *P. granatum* para *Candida* spp.

Extrato Glicólico de <i>Punica granatum</i> L.		
Micro-organismos	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>Candida albicans</i>	12,5	12,5
<i>Candida dubliniensis</i>	25	25
<i>Candida tropicalis</i>	25	25

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 5 estão ilustrados os testes de microdiluição em caldo para avaliação da CIM e a semeadura para avaliação da CFM.

Figura 5 – Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima dos extratos de cúrcuma e rosas brancas avaliados isoladamente sobre *C. dubliniensis*



Legenda: a) microplaca empregada para análise da CIM dos extratos de cúrcuma (fileiras A, B e C) e rosas brancas (F, G e H) sobre *C. dubliniensis*. Nas fileiras D e E foram feitas análises do veículo (propilenoglicol) e na coluna 12, o controle de esterilidade; b) análise da CFM dos extratos após plaqueamento dos poços que não apresentaram turvação e poços adjacentes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da triagem promovida pelo teste de microdiluição em caldo, foram iniciados os testes para avaliação do sinergismo. As concentrações analisadas no teste do *checkerboard* foram baseadas nas concentrações inibitórias mínimas isoladas de cada extrato.

4.2 Efeito das combinações dos extratos vegetais sobre *Candida* spp.

A combinação dos extratos apresentaram valores aditivos para todas as espécies de *Candida*, de acordo com o cálculo de ICIF, como pode ser observado na tabelas 5 e 6. Com relação a combinação nº 1, cúrcuma e rosas brancas, pode-se verificar uma redução da metade dos valores da CIM de cada extrato (tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da combinação nº 1 (cúrcuma e rosas brancas) com valores do ICIF e quantas vezes foram reduzidas a CIM isolada de cada extrato

Combinação nº 1: <i>C. longa</i> (cúrcuma) e <i>R. centifolia</i> (rosas brancas)							
Espécie	Uso isolado CIM (mg/mL)		Combinação (mg/mL)		Valores ICIF	Redução da CIM	
	Cúrcuma	Rosas brancas	Cúrcuma	Rosas brancas		Cúrcuma	Rosas brancas
<i>C. albicans</i>	50	50	25	25	1,00	2x	2x
<i>C. dubliniensis</i>							
<i>C. tropicalis</i>	50	25	25	12,5	1,00	2x	2x

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já os extratos de alecrim e romã juntos apresentaram três combinações aditivas sobre *C. albicans* e quatro combinações aditivas sobre *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. As combinações promoveram reduções significativas da CIM isolada dos extratos, sendo que a mínima redução foi de 2 vezes, algumas 4 vezes e até reduções em 8 vezes o valor da CIM foram encontradas (tabela 6).

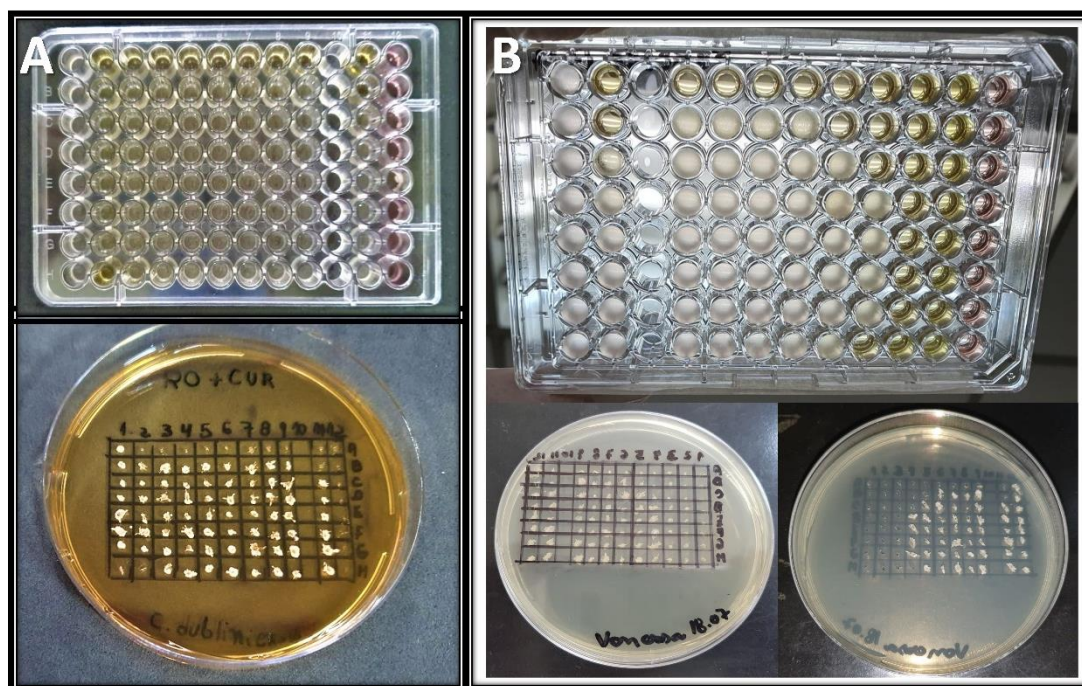
Tabela 6 - Resultados da combinação nº 2 (alecrim e romã) com valores do ICIF e quantas vezes foram reduzidas a CIM isolada de cada extrato

Combinação nº 2: <i>R. Officinalis</i> (alecrim) e <i>P. granatum</i> (romã)							
Espécie	Uso isolado CIM (mg/mL)		Combinação (mg/mL)		Valores ICIF	Redução da CIM	
	Alecrim	Romã	Alecrim	Romã		Alecrim	Romã
<i>C. albicans</i>	25	12,5	12,5	6,2	0,9	2x	2x
			6,2	6,2	0,6	4x	2x
			12,5	3,1	0,7	2x	4x
<i>C. dubliniensis</i>	50	25	25	12,5	1,0	2x	2x
			12,5	12,5	0,7	4x	2x
			25	6,2	0,7	2x	4x
			25	3,1	0,6	2x	8x
<i>C. tropicalis</i>	50	25	25	12,5	1,0	2x	2x
			12,5	12,5	0,7	4x	2x
			25	6,2	0,7	2x	4x
			25	3,1	0,6	2x	8x

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 6, pode-se visualizar as microplacas sendo empregadas para avaliação do sinergismo dos extratos de alecrim e romã (à direita) sobre *C. albicans* e cúrcuma e rosas brancas (à esquerda) sobre *C. dubliniensis*. Alíquotas foram semeadas para realização do cálculo ICFF (índice de concentração fungicida fracionária).

Figura 6 - Avaliação do sinergismo por meio da técnica *checkerboard*



Legenda: a) análise da combinação do extrato de rosas brancas e cúrcuma sobre *C. dubliniensis*; b) análise da combinação do extrato de alecrim e romã sobre *C. albicans*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Encontradas as combinações classificadas como aditivas que inibiram o crescimento e desenvolvimento das espécies de *Candida*, seguiu-se com as análises sobre biofilmes. Com relação a combinação nº 1 (cúrcuma e rosas brancas): foram analisadas a CIM isolada de cada extrato, bem como a concentração aditiva de 25 + 25 mg/mL para *C. albicans* e *C. dubliniensis* e 25 + 12,5 mg/mL dos extratos de cúrcuma e rosas respectivamente sobre *C. tropicalis*.

Com relação a combinação nº 2 (alecrim e romã): foram analisadas a CIM de cada extrato e as combinações 12,5 + 6,2 mg/mL; 6,2 + 6,2 mg/mL e 12,5 + 3,1 mg/mL de alecrim e romã respectivamente sobre biofilme de *C. albicans*. Sobre os biofilmes monomicrobianos de *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* as concentrações aditivas testadas foram: 25 + 12,5 mg/mL; 12,5 + 12,5 mg/mL; 25 + 6,2 mg/mL e 25 + 3,1 mg/mL de alecrim e romã respectivamente, além das CIM que também foram avaliadas para fins de comparação dos efeitos.

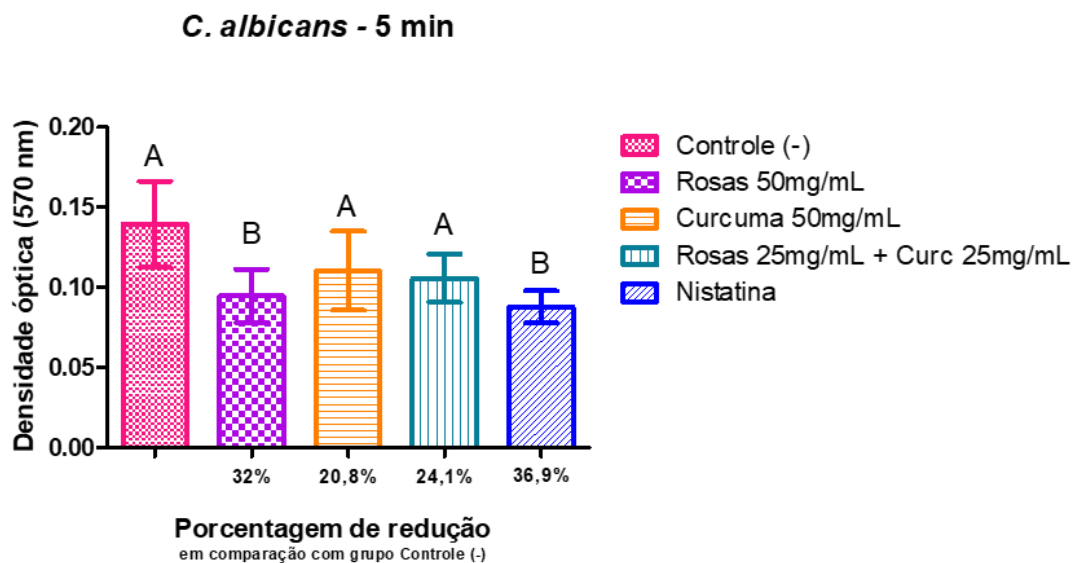
4.3 Efeito das combinações dos extratos vegetais sobre biofilme

4.3.1 Combinação nº 1 (rosas brancas e cúrcuma)

4.3.1.1 *C. albicans*

No tempo de exposição por 5 min sobre biofilme de *C. albicans*, apenas o extrato de rosas brancas isolado produziu redução semelhante a nistatina (sendo estatisticamente diferente do grupo controle negativo, $p < 0,05$) e a combinação dos extratos manteve-se semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 5 minutos

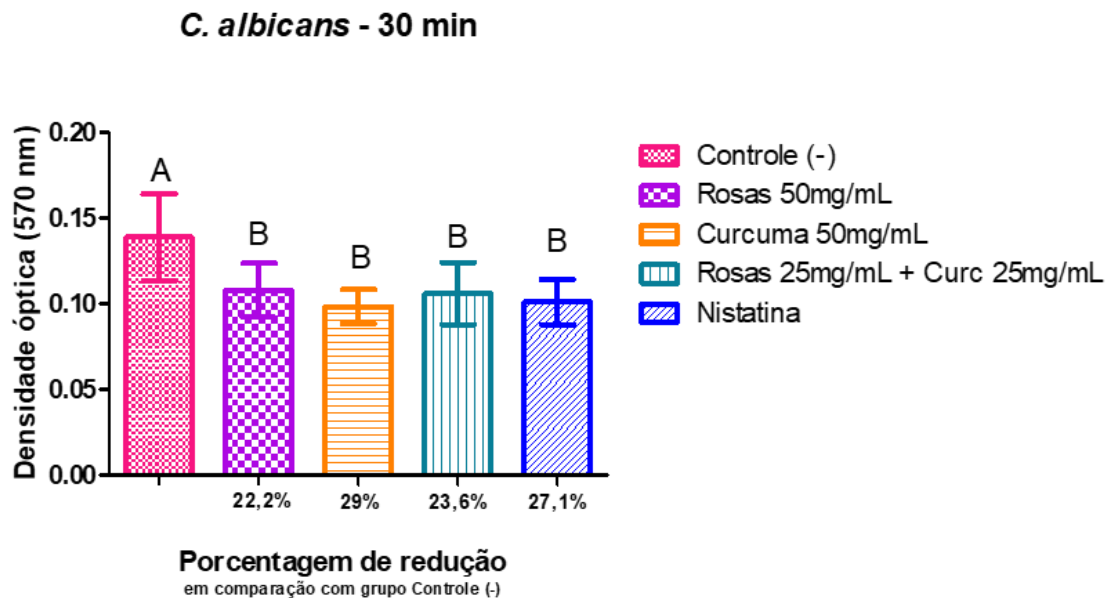


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 5 min (n = 10. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de exposição por 30 min, todos os tratamentos produziram reduções estatisticamente significante na viabilidade das células fúngicas em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), sendo que a aplicação do extrato de cúcuma isolado atuou de maneira superior a nistatina com porcentagens de redução de 29% e 27,1% respectivamente (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 30 minutos

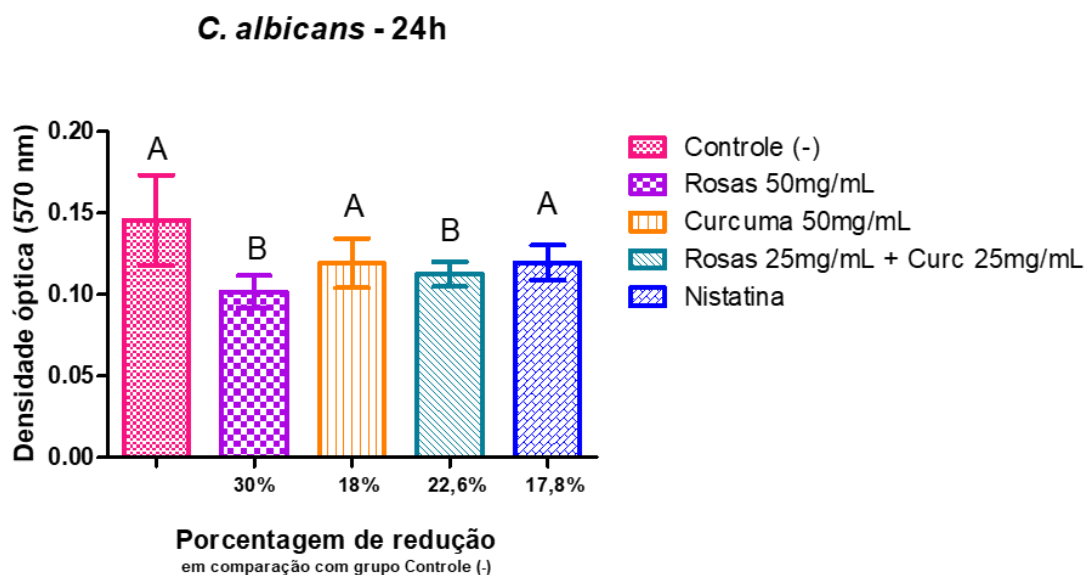


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 30 min ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 9, verifica-se que a combinação dos extratos vegetais promoveu 22,6% de redução do biofilme de *C. albicans* quando analisado o tempo de 24h, e a aplicação isolada do extrato de rosas promoveu o maior percentual de redução (30%) sendo que tais grupos diferiram estatisticamente do controle negativo e do grupo tratado com nistatina ($p < 0,05$).

Figura 9 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 24 horas



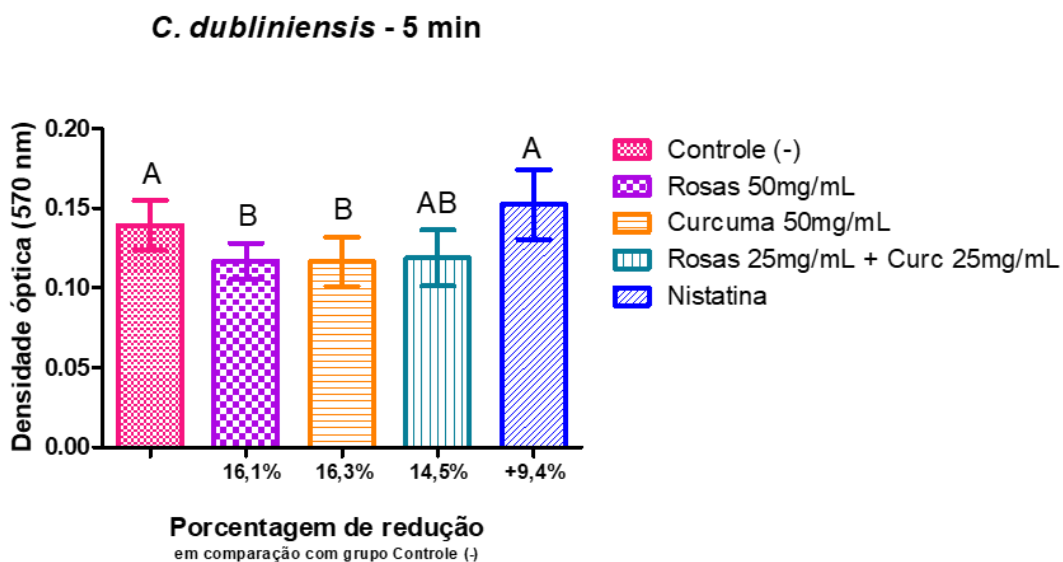
Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 24 h (n = 10. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.1.2 *C. dubliniensis*

No tempo de contato de 5 min sobre biofilme de *C. dubliniensis*, a aplicação dos extratos de rosas brancas e cúrcuma isoladamente produziram reduções com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Já a aplicação combinada dos produtos vegetais não diferiram do grupo controle (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 5 minutos

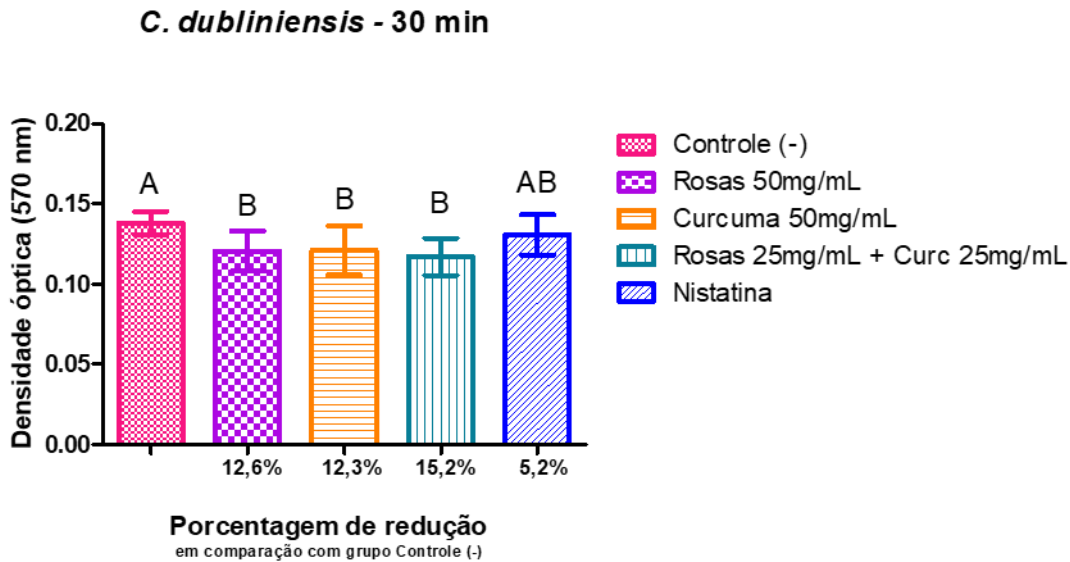


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. dubliniensis* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 5 min (n = 10. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação ao tempo de exposição por 30 min, todos os grupos experimentais analisados com os extratos vegetais, seja rosas brancas e cúrcuma isolados ou combinados na concentração aditiva, produziram reduções significativas de 12,6%, 12,3% e 15,2% respectivamente (Figura 11). Tais grupos diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle negativo.

Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 30 minutos

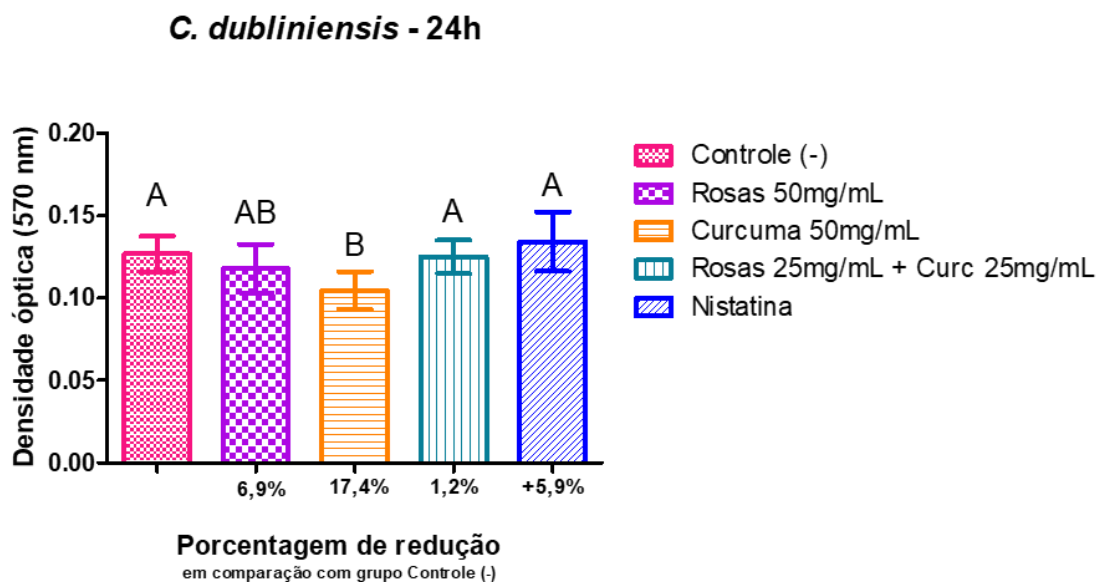


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 24 h (n = 10. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 12 observa-se que a combinação dos extratos vegetais não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) do grupo controle quando exposto por 24h sobre biofilme de *C. dubliniensis*. Apenas a aplicação do extrato de cúrcuma isolado foi capaz de produzir redução da viabilidade das células fúngicas de 17,4% ($p < 0,05$). Ainda, pode-se observar que *C. dubliniensis* apresentou resistência a ação da nistatina em todos os tempos de contato. Os grupos tratados com o antifúngico não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo em nenhum dos tempos de aplicação ($p > 0,05$).

Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 24 horas



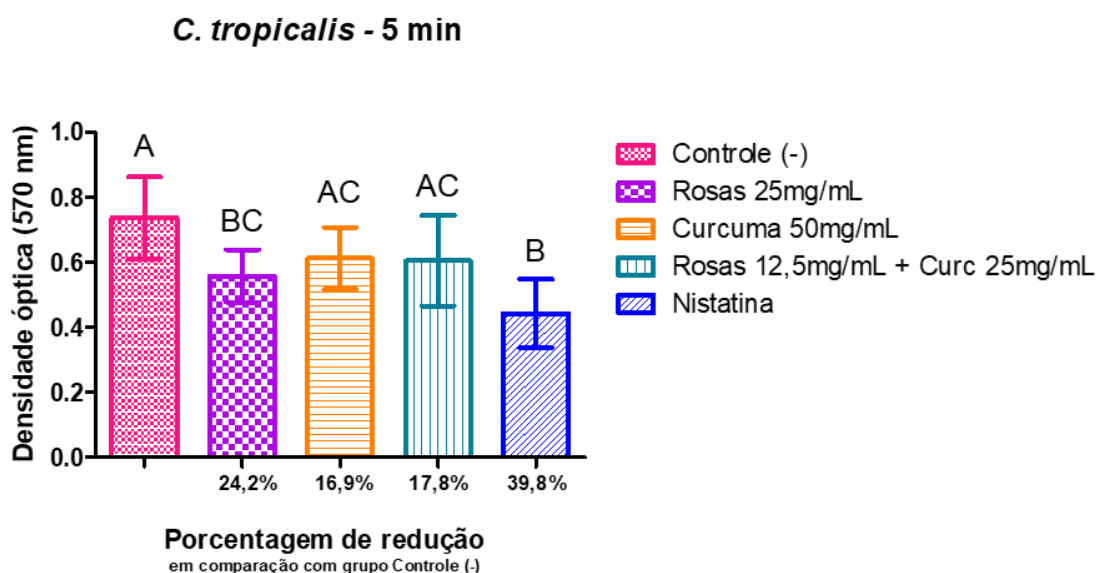
Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. dubliniensis* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 24 h (n = 10. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.1.3 *C. tropicalis*

Sobre biofilme de *C. tropicalis*, no tempo de exposição por 5 min, os grupos experimentais tratados com os produtos vegetais tiveram um desempenho semelhante entre si e o grupo tratado com o extrato de rosas brancas isoladamente foi semelhante ao grupo tratado com nistatina ($p > 0,05$) e ambos tratamentos diferiram estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$), como pode ser observado na figura 13.

Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 5 minutos

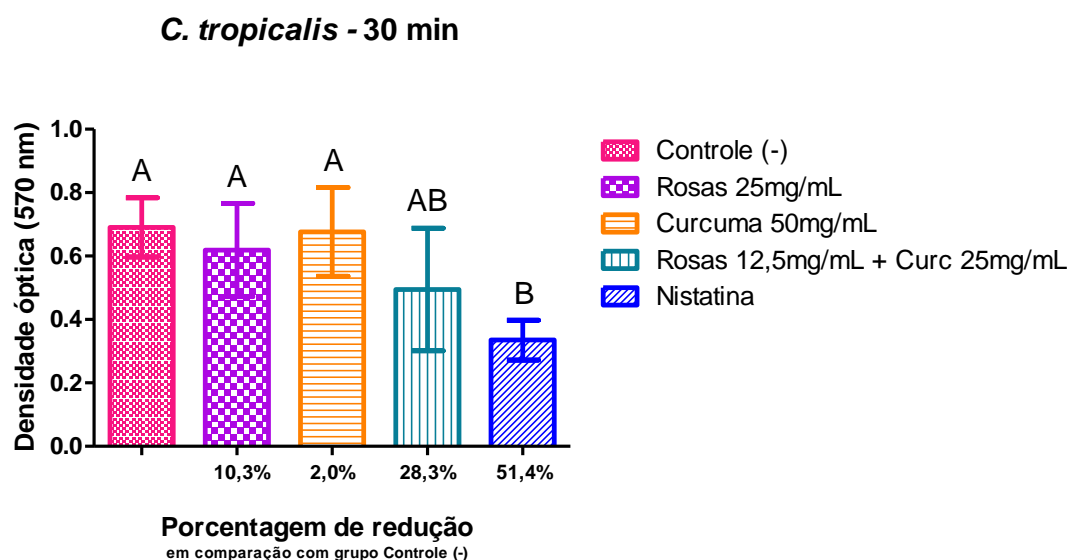


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 5 min (n = 10. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de contato de 30 min, houve semelhança estatística entre os grupos tratado com a combinação aditiva e o grupo tratado com nistatina ($p > 0,05$), contudo, apenas o tratamento com nistatina foi capaz de diferir estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$), produzindo redução de 51,4% da viabilidade celular (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 30 minutos

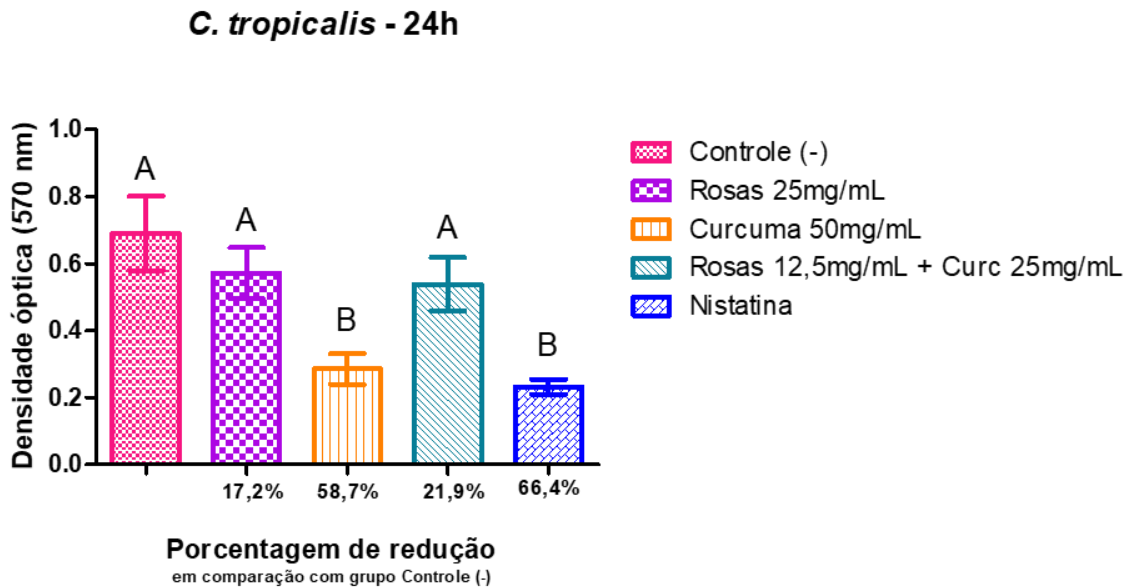


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 30 min (n = 10. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A aplicação isolada do extrato de cúrcuma produziu redução de 58,7% do biofilme de *C. tropicalis* quando em contato por 24h. Tal redução foi semelhante estatisticamente ($p > 0,05$) ao grupo tratado com a suspensão da nistatina (66,4%) e ambos grupos diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 15).

Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. centifolia* e *C. longa* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados na concentração aditiva por 24 horas



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (rosas brancas e cúrcuma) isolados e combinados por 24 h (n = 10. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

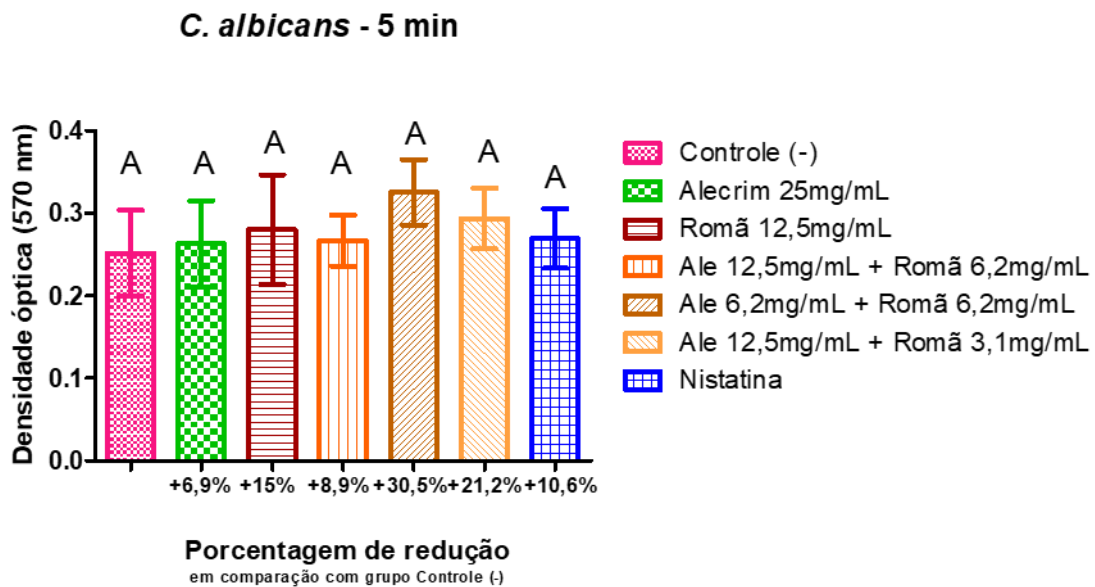
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Combinação nº 2 (alecrim e romã)

4.3.2.1 *C. albicans*

No tempo de contato de 5 min sobre biofilme de *C. albicans*, nenhuma das combinações aditivas de alecrim e romã diferiram estatisticamente do grupo controle. Ainda, o grupo tratado com nistatina também não diferiu ($p > 0,05$) quando comparado ao controle negativo (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 5 minutos

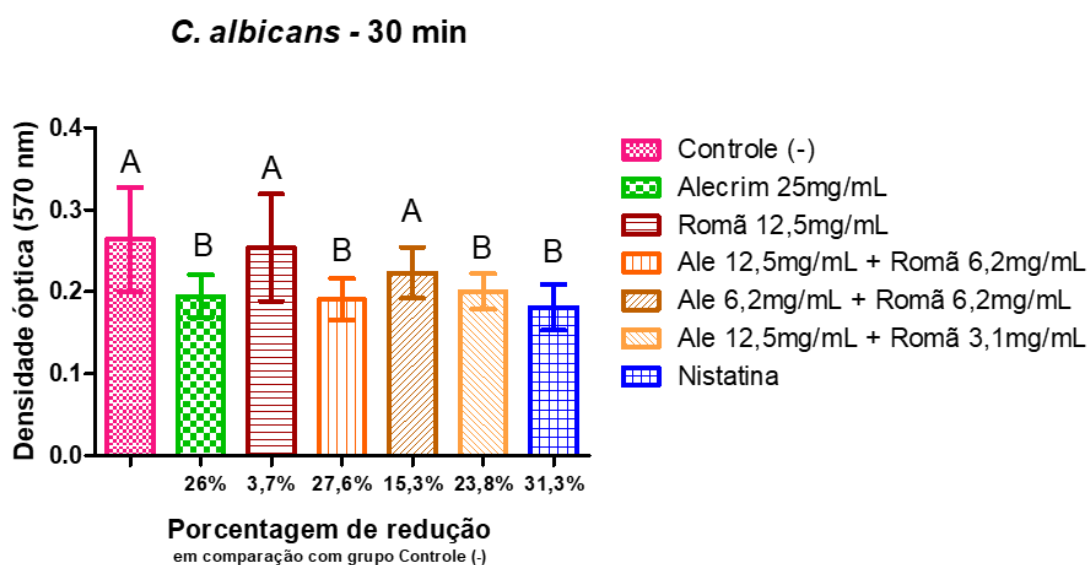


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 5 min ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de exposição de 30 min, quatro tratamentos produziram reduções significativas diferindo estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$), são eles: o extrato de alecrim aplicado isoladamente (percentual de redução de 26%), duas combinações aditivas (ale 12,5 mg/mL + romã 6,2 mg/mL e ale 12,5 mg/mL + romã 3,1 mg/mL com redução de 27,6% e 23,8% respectivamente) e o grupo tratado com nistatina (redução de 31,3%). A aplicação isolada do extrato de romã e a combinação de ambos os extratos na concentração de 6,2 mg/mL não diferiram estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 17).

Figura 17 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 30 minutos

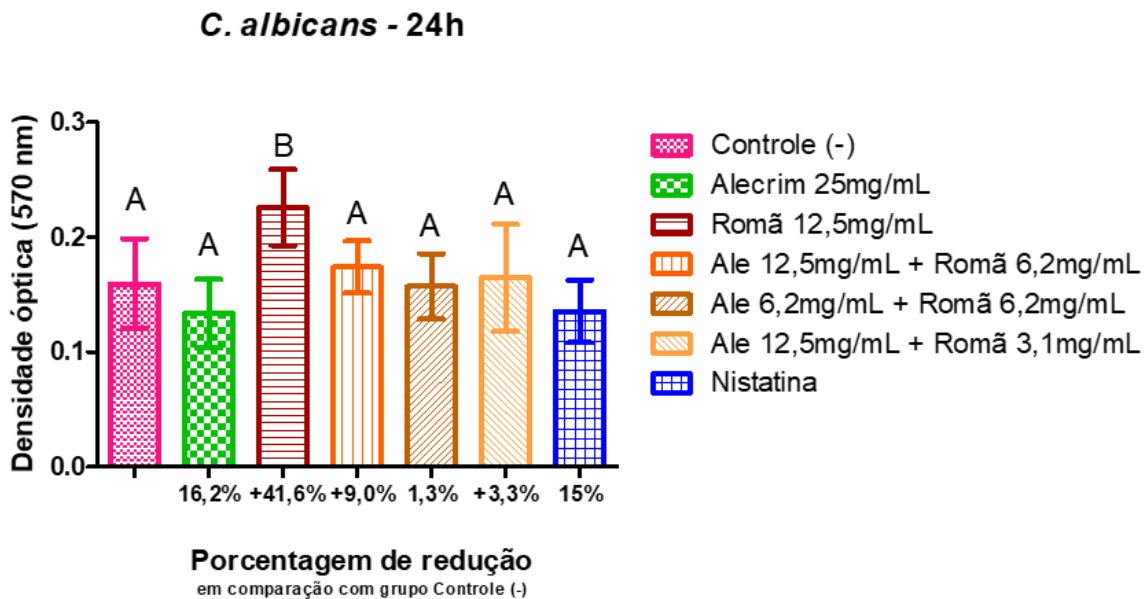


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 30 min ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 18, pode-se observar que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre grupos tratados com as combinações dos extratos, a aplicação do extrato de alecrim isoladamente e a aplicação da nistatina quando comparados ao grupo controle no tempo de exposição por 24h. O extrato de romã isolado produziu um aumento do percentual de viabilidade celular de 41,6% diferindo estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 18 - Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 24 horas



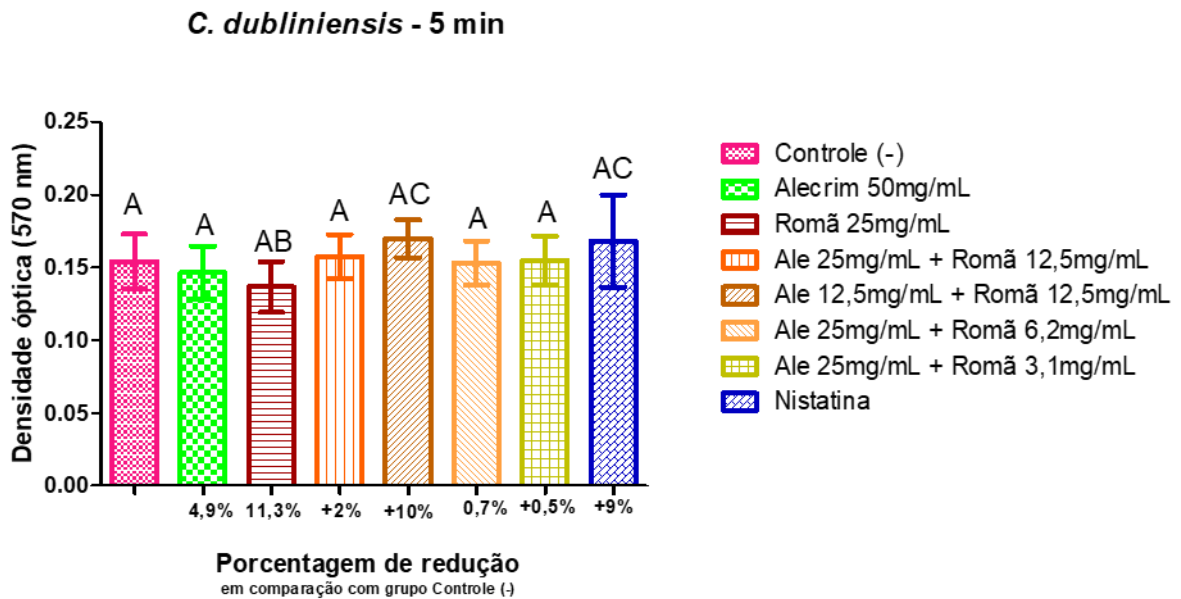
Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. albicans* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 24 h ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2.2 *C. dubliniensis*

Com relação ao biofilme de *C. dubliniensis*, nenhuma das quatro combinações aditivas de alecrim e romã no tempo de exposição por 5 min diferiram estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$). O grupo tratado com o extrato de romã isoladamente sofreu o maior percentual de redução da viabilidade celular (11,3%) diferindo dos outros tratamentos ($p < 0,05$) mas não do grupo controle. Ainda, a aplicação isolada do extrato de alecrim e o grupo tratado com nistatina também não diferiram quando comparado ao controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 19).

Figura 19 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 5 minutos

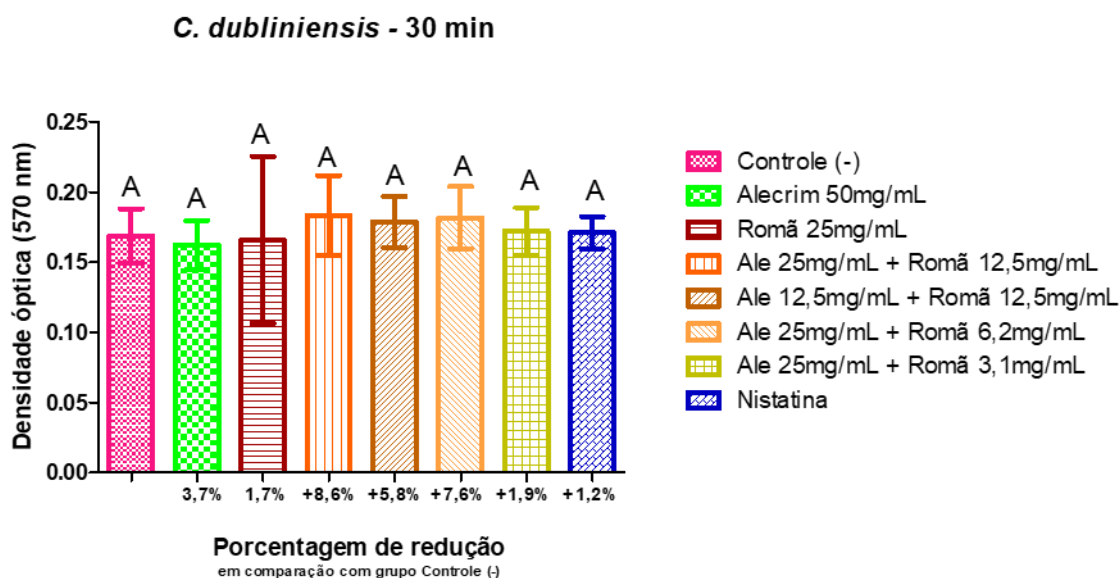


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. dubliniensis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 5 min ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de contato por 30 min, não houve diferença estatística significativa na comparação de qualquer um dos grupos experimentais ao grupo controle ($p > 0,05$), como pode-se observar na figura 20.

Figura 20 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 30 minutos

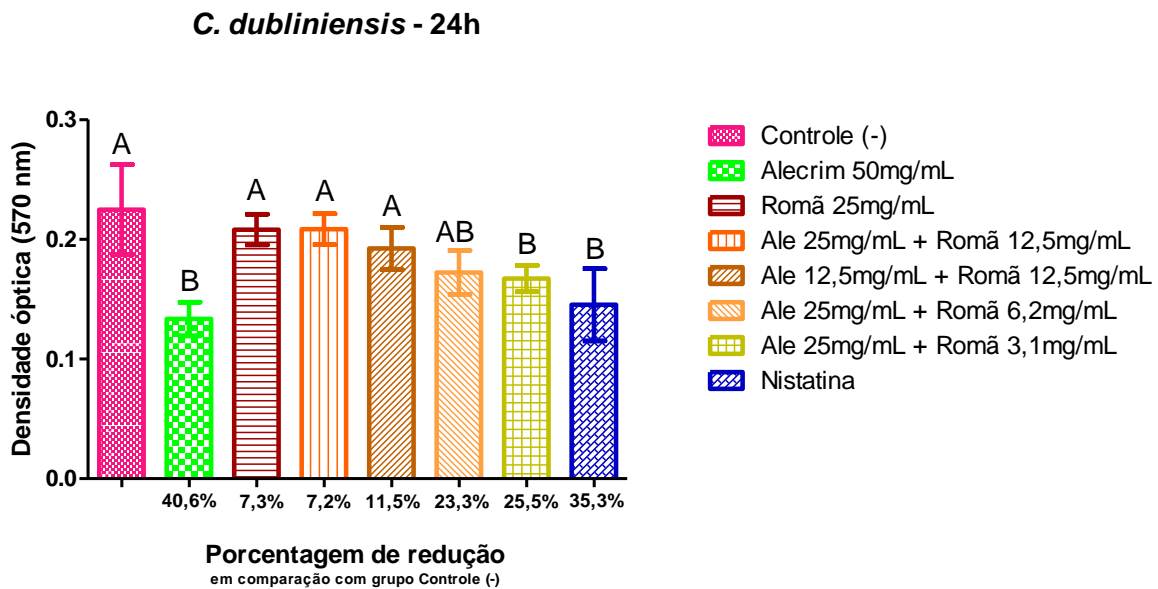


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. dubliniensis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 30 min ($n = 10$. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação ao tempo de exposição de 24h, pode-se verificar na figura 21 que o extrato de alecrim isolado apresentou o maior percentual de redução da viabilidade (40,6%), seguido pelo grupo tratado com nistatina (35,5%) e as combinações ale 25 mg/mL + romã 3,1 mg/mL e ale 25 mg/mL + romã 6,2 mg/mL com reduções de 25,5% e 23,3% respectivamente. Tais grupos diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Figura 21 - Avaliação da viabilidade celular de *C. dubliniensis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 24 horas



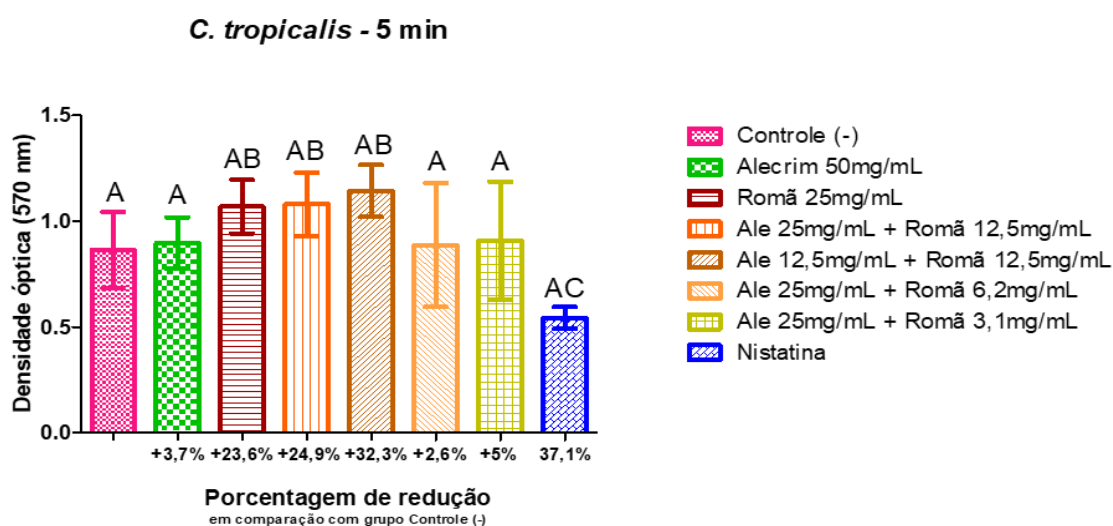
Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. dubliniensis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 24 h ($n = 10$. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2.3 *C. tropicalis*

Quatro combinações aditivas de alecrim e romã foram testadas sobre biofilme de *C. tropicalis* e no tempo de contato por 5 min, nenhuma das combinações diferiram do grupo controle ($p > 0,05$). Houve semelhança estatística entre os grupos: extrato de romã 25 mg/mL, ale 25 mg/mL + romã 12,5 mg/mL e ale 12,5 mg/mL + romã 12,5 mg/mL pois todos aumentaram a viabilidade celular de modo similar. O grupo tratado com nistatina (redução 37,1%) diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos ($p < 0,05$) mas não do grupo controle (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 5 minutos

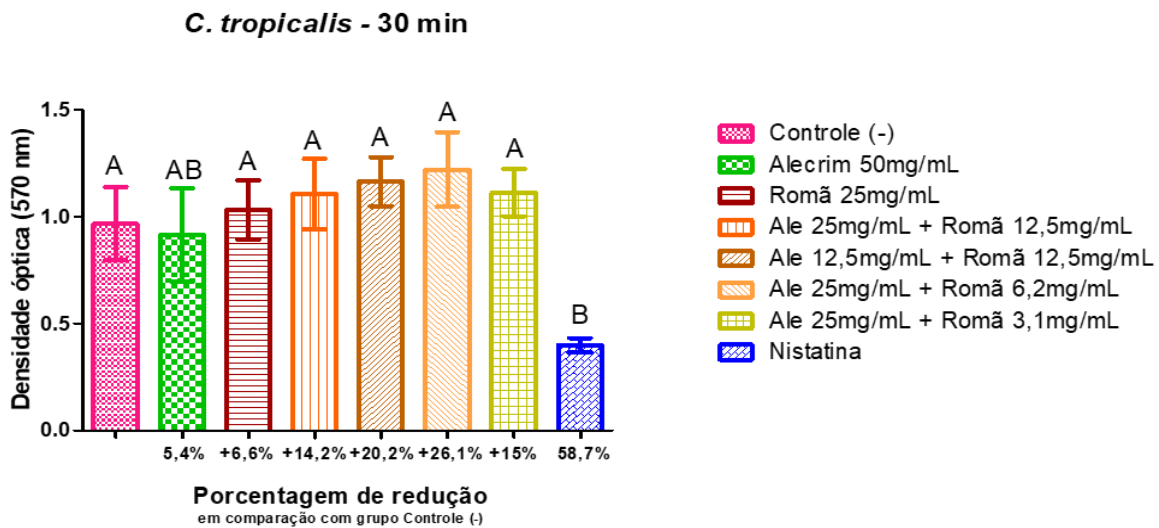


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 5 min ($n = 10$. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de exposição por 30 min, apenas o grupo que recebeu a suspensão de nistatina diferiu estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$) apresentando um percentual de redução da viabilidade de 58,7%. Quando comparado o grupo tratado com extrato de alecrim isolado e nistatina, houve semelhança entre eles, contudo o grupo extrato de alecrim foi semelhante ao controle negativo (Figura 23).

Figura 23 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 30 minutos

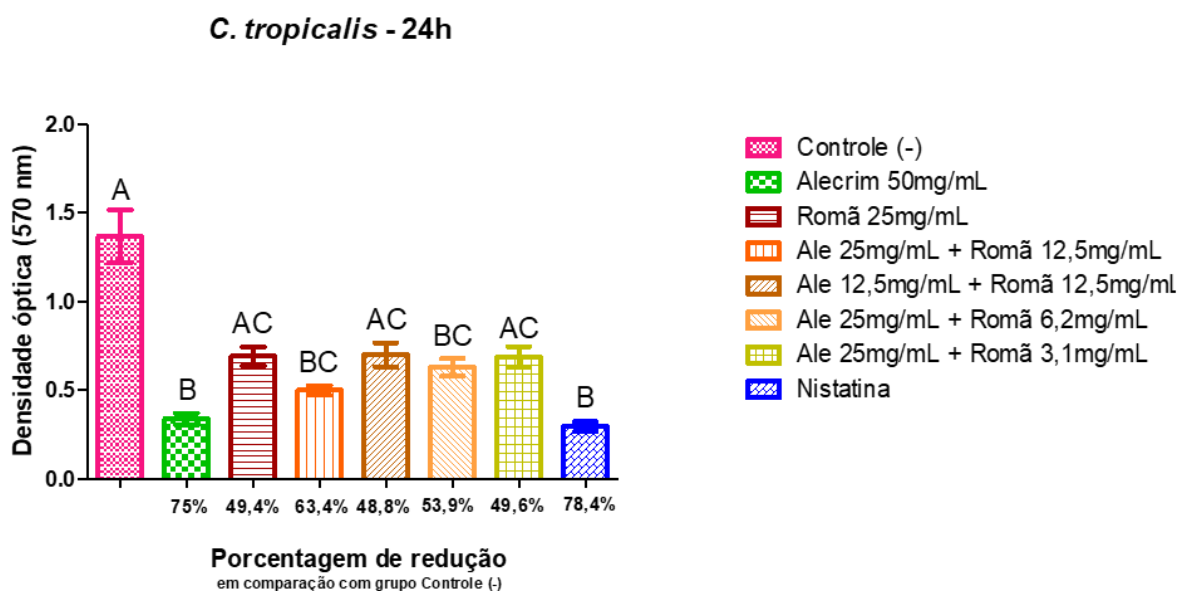


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 30 min ($n = 10$. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de exposição por 24h, pode-se observar significativas reduções no percentual de viabilidade das células fúngicas em todos os tratamentos quando comparados ao controle. O grupo tratado com a suspensão da nistatina sofreu o maior percentual de redução de 78,4% seguido pelo grupo tratado com extrato de alecrim isolado que sofreu redução de 75%. O extrato de romã isolado e as combinações de ale 12,5 mg/mL + romã 12,5 mg/mL e ale 25 mg/mL + romã 3,1 mg/mL não diferiram estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$). As combinações de ale 25 mg/mL + romã 12,5 mg/mL e ale 25 mg/mL + romã 6,2 mg/mL apresentaram percentuais de redução de 63,4% e 53,9% respectivamente, diferindo estatisticamente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 24).

Figura 24 - Avaliação da viabilidade celular de *C. tropicalis* em biofilme após o tratamento com os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *P. granatum* nas concentrações inibitórias mínimas isoladas e combinados nas concentrações aditivas por 24 horas



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios \pm desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *C. tropicalis* após exposição aos extratos vegetais (alecrim e romã) isolados e combinados por 24 h ($n = 10$. Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A busca por terapias alternativas é emergente. O estudo do sinergismo de substâncias pode ser uma alternativa de sucesso para combater tais infecções por micro-organismos resistentes (Azevedo et al., 2015) e a combinação de compostos naturais, como os extratos de plantas, são de grande interesse para o desenvolvimento de uma fitomedicina antifúngica eficiente. Dessa forma, o presente trabalho buscou elucidar a ação isolada e combinada de quatro extratos vegetais sobre *Candida* spp. na forma planctônica e biofilme. Os extratos de cúrcuma (*C. longa*) e rosas brancas (*R. centifolia*) apresentaram CIM e CFM de 50 mg/mL para todas as espécies de *Candida* exceto o extrato de rosas brancas sobre *C. tropicalis* que apresentou a CIM e CFM de 25 mg/mL. No estudo de Murugesh et al. (2019) foram analisadas a CIM e CFM do extrato alcoólico de *C. longa* contra *C. albicans* com a seguinte metodologia para produção do extrato: o pó seco medido em gramas de açafraão foi diluído em álcool absoluto e centrifugado. A solução límpida acima dos detritos do pó de cúrcuma foi utilizada para ação antimicrobiana. Assim os valores da CIM e CFM foram de 800 (0,1384 g de *C. longa*) e 1600 µl (0,2768 g de *C. longa*) respectivamente. Deve-se destacar que o uso do álcool como solvente pode ter possível interferência na atividade antimicrobiana enquanto o presente estudo fez a utilização de extratos formulados em propilenoglicol o qual foi testado e não apresentou qualquer interferência na atividade antifúngica.

Em estudo sobre a ação antifúngica do extrato de *R. centifolia* foi utilizando o método de difusão em ágar apresentando halo de inibição de 16 mm para *C. albicans* e 12 mm para *C. tropicalis* (Gauniyal, Teotia, 2015). Não foram encontrados na literatura consultada outros estudos sobre a ação antifúngica de *R. centifolia* contra *Candida* spp. No presente trabalho, quando as CIMs isoladas desses extratos (*C. longa* e *R. centifolia*) foram combinadas, verificou-se que as concentrações de cada extrato necessárias para produzir a inibição e morte das células fúngicas diminuíram pela metade. Uma concentração aditiva foi encontrada para cada espécie de *Candida* (ICIF > 0,5 e ≤ 1,0) e tal achado é relevante para as análises futuras sobre a toxicidade dos compostos vegetais. Não foram encontrados estudos de qualquer natureza sobre a combinação de *C. longa* e *R. centifolia* na literatura

consultada. Dessa forma, os dados obtidos são pioneiros até o presente momento.

Outras combinações de extratos de plantas foram exploradas quanto ao potencial biológico produzido a partir da sinergia, como a combinação de *Zuccagnia punctata* Cav. e *Larrea nitida* Cav. que são plantas comumente utilizadas na medicina tradicional no combate a infecções e foram avaliadas quanto a ação sinérgica sobre *C. albicans* e *C. glabrata*. Foram encontradas três combinações sinérgicas contra *C. albicans* e uma contra *C. glabrata* (Butassi et al., 2015). Diferentes plantas medicinais utilizadas por comunidades locais nas regiões áridas da Argentina foram avaliadas quanto a ação sinérgica contra cepas de leveduras isoladas de infecções vaginais como: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* e *C. krusei*. Um efeito sinérgico foi observado com a combinação de *Zuccagnia punctata* Cav. e *Larrea cunefolia* Cav. contra *C. albicans*, *C. glabrata* e entre os extratos de *Z. punctata* e *Larrea nitida* Cav. ou *Z. punctata* e *Larrea divaricata* Cav. contra *C. glabrata* (ICIF = 0,5). Um efeito aditivo foi observado com a combinação de *Z. punctata* e *L. cuneifolia* contra *C. tropicalis* e *Z. punctata* e *L. nitida* contra *C. albicans* e *C. tropicalis* com ICIF > 0,5 em ambos os casos (Moreno et al., 2020). Neste ponto, pode-se destacar a importância das análises de combinações, uma vez que estudos recentes têm descoberto sinergia entre extratos vegetais contra micro-organismos patogênicos, corroborando os resultados do presente estudo.

Quanto às análises dessa combinação nº 1 (cúrcuma e rosas brancas) sobre biofilmes, pode-se destacar os seguintes pontos: nas análises com o menor tempo de contato (5 min) apenas a ação isolada do extrato de rosas brancas foi significativa contra todas as espécies testadas e o extrato de cúrcuma foi capaz de atuar isoladamente apenas sobre *C. dubliniensis* ($p < 0,05$). Já no tempo de 30 min, as combinações foram bem-sucedidas promovendo reduções da viabilidade celular semelhante a suspensão de nistatina. Os extratos isolados também promoveram reduções significativas exceto no biofilme de *C. tropicalis*. Já no maior tempo de contato (24 h), sobre *C. albicans*, a combinação dos extratos e a aplicação de rosas brancas isoladamente produziram maiores reduções no biofilme do que a nistatina, diferindo estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$). Sobre *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* a aplicação isolada de cúrcuma foi capaz de promover reduções semelhantes e até superior a nistatina resultando em até 58,7% de redução do

biofilme. Salientando que, as concentrações isoladas testadas sobre biofilmes são as CIMs. Diante de tais pontos destacados, verificou-se que: em um curto tempo de contato (5 min) dos extratos vegetais ao biofilme de *Candida* spp. apenas os extratos isolados atuaram. Em um intervalo de tempo mediano (30 min), as combinações produziram reduções significativas. Já no período de contato prolongado (24h) a ação isolada de *C. longa* destacou-se sobre as espécies não-*albicans*, sendo esta uma descoberta interessante para posterior estudo desse extrato.

Novamente, não foram encontrados na literatura consultada qualquer relato sobre a combinação desses extratos vegetais atuando em biofilmes. Sobre o estudo da ação isolada de *C. longa* em biofilmes, o óleo essencial de *C. longa* foi capaz de inibir a formação de biofilmes de *S. mutans* em concentrações superiores a 0,5 mg/mL (Lee et al., 2011). Em outro estudo, constatou-se a inibição de biofilmes de *S. aureus* e *S. pneumoniae* usando nanopartículas de prata biossintetizadas associadas a *C. longa*. Tal combinação demonstrou uma potente atividade anti-biofilme (Kamble et al., 2018).

Sobre a ação de diferentes espécies vegetais combinadas atuando sobre biofilmes, três espécies de plantas da família Brassicaceae foram analisadas quanto ao efeito combinatório com a proteinase K. Os extratos de *Raphanus sativus* L. (rabanete), *R. sativus* var. *longipinnatus* (outra espécie de rabanete) e *Brassica oleracea* var. *acephala* (couve-de-folha) foram combinados com a proteinase K e avaliados em biofilme de *E. coli* O157: H7. Verificou-se que o efeito sinérgico do extrato de *R. sativus* var. *longipinnatus* e a proteinase K foi capaz de provocar a interrupção da divisão celular bacteriana e promover rupturas na estrutura do biofilme (Hu et al., 2020). Não há descrito no estudo o tempo de contato das combinações ao biofilme de *E. coli*.

Quanto às análises dos extratos de alecrim (*R. officinalis*) e romã (*P. granatum*), verificou-se que as CIMs e CFMs de ambos os extratos foram mais altas para as espécies não-*albicans* do que para *C. albicans*. A CIMs de alecrim para *C. albicans* foi de 25 mg/mL e para as outras espécies de 50 mg/mL. Já o extrato de romã apresentou potencial de inibição e eliminação das células fúngicas de *C. albicans* com 12,5 mg/mL e para as espécies não-*albicans*, 25 mg/mL. Diversos estudos na literatura elucidam o potencial antimicrobiano de tais plantas. Em estudo

anterior do nosso grupo de pesquisa, observou-se o potencial antifúngico do extrato de *R. officinalis* sobre diversas espécies de *Candida* em sua forma planctônica e biofilme. A CIM encontrada foi de 50 mg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*. Sobre biofilmes, o extrato da planta apresentou ação semelhante à nistatina quando aplicado nas concentrações de 100 e 200 mg/mL (Meccatti et al., 2020). É importante ressaltar as altas concentrações do extrato de *R. officinalis* que foram necessárias para atuação em biofilmes neste estudo anterior e, por isso, o presente trabalho explorou a possível sinergia de *R. officinalis* e *P. granatum* buscando a diminuição das concentrações. No estudo de Kumar et al. (2020) a ação antifúngica de *P. granatum* foi verificada sobre cepas clínicas de *C. albicans* através do método de difusão em ágar. Diferentes concentrações do extrato vegetal foram comparadas ao efeito do clotrimazol. A largura das zonas de inibição de *P. granatum* foram muito semelhantes à do antifúngico.

Com relação a combinação nº 2 (alecrim e romã) verificou-se grande êxito no objetivo de redução das concentrações, pois algumas combinações produziram a redução de até oito vezes o uso da CIM isolada dos extratos. Três combinações aditivas foram encontradas sobre *C. albicans* e quatro combinações aditivas sobre as espécies não-*albicans* (ICIF >0,5 e ≤1,0). Estes achados bem-sucedidos são de grande importância para o avanço dos estudos *in vivo*. No estudo de Abu El-Wafa et al. (2020) foram testados alguns extratos vegetais isolados e em combinação com antibióticos sendo eles: alecrim (*R. officinalis*), raízes de gengibre (*Zingiber officinale*), cascas de canela (*Cinnamomum verum*), folhas de tomilho (*Thymus vulgaris*), cascas de romã (*P. granatum*), flores de cravo (*Syzygium aromaticum*) e folhas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*). Os autores observaram que os extratos de alecrim e romã juntos apresentaram sinergismo (ICIF < 0,5) com os antibióticos (piperacilina, ceftazidima, imipenem, gentamicina ou levofloxacino) o que reduziu significativamente a CIM dos antimicrobianos contra uma cepa clínica de *P. aeruginosa* (redução de 1024, 1024, 1024, 512 e 512 µg/mL para 2, 4, 32, 2 e 2 µg/mL, respectivamente) e tal achado contribui para novas perspectivas sobre o combate da resistência microbiana, uma vez que doses menores desses compostos sintéticos serão necessárias quando associadas aos compostos naturais. A punicalagina é um tanino hidrolisável isolado da *P. granatum* e um dos principais

componentes desta planta com propriedades antimicrobianas. No estudo de Da Silva et al. (2020) avaliou-se a possível ação sinérgica desse composto a nistatina. A combinação aumentou a eficácia antifúngica, em comparação aos compostos testados isoladamente e eliminaram a citotoxicidade do composto sobre os queratinócitos *in vitro*.

Quanto às análises dessa combinação nº 2 (alecrim e romã) sobre biofilmes, pode-se destacar os seguintes pontos: em um curto tempo de contato (5 min) dos extratos vegetais ao biofilme de *Candida* spp. não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre a aplicação destes com o grupo controle negativo. Em um tempo intermediário de contato (30 min), apenas o biofilme de *C. albicans* sofreu reduções significativas com a aplicação do extrato de alecrim isolado (25 mg/mL, CIM) e com as combinações: alecrim 12,5 mg/mL + romã 6,2 mg/mL e alecrim 12,5 mg/mL + romã 3,1 mg/mL com percentuais de redução de 27,6% e 23,8% respectivamente além da nistatina (31,3%). Este tempo intermediário de contato foi o protocolo que apresentou melhores resultados sobre biofilme de *C. albicans*. As espécies não-*albicans* não apresentaram sensibilidade aos extratos vegetais combinados ou isolados em 30 min e apenas a suspensão da nistatina promoveu reduções significativas do biofilme de *C. tropicalis* (percentual de redução de 58,7%). Já no período de contato prolongado (24h), sobre *C. albicans* verificou-se um aumento da viabilidade celular de 41,6% no grupo tratado com extrato de romã (12,5 mg/mL, CIM) e não houve redução significativa nos outros grupos ($p > 0,05$). Ainda, verificou-se que a ocorrência do aumento da viabilidade celular repetiu-se em alguns grupos experimentais.

Não foram encontrados estudos na literatura que pudessem esclarecer tais achados de modo específico. Todavia, durante a realização dos experimentos, observou-se que quando o extrato de romã era diluído em caldo BHI, ocorria uma “precipitação” de maneira que o líquido resultante apresentava sedimentos em algumas horas. No estudo de Pramadita e Widyarman (2019) foi avaliada a ação do suco de romã, em diferentes concentrações diluído em caldo BHI, sobre biofilme de *Streptococcus sanguinis* e *Fusobacterium nucleatum*. Os autores observaram que, quando o suco de romã diluído era aplicado sobre biofilme de *S. sanguis*, ocorria um aumento da viabilidade celular de maneira gradativa com 3, 6 e 24 h de contato em comparação com o controle negativo. Os autores identificaram que a glicose é o

principal açúcar presente no romã e *S. sanguis* é capaz de metabolizar carboidratos para sobreviver. Em paralelo com o presente estudo, *Candida* spp. também são capazes de fermentar glicose e, de alguma maneira, a mistura do extrato de romã com caldo BHI pode ter disponibilizado uma quantidade superior de substratos a essas leveduras. Ainda, os extratos combinados resultaram em baixas concentrações necessárias para atuação em planctônicos e algumas dessas concentrações não atuaram de modo semelhante em biofilmes. Tal hipótese explicaria o aumento da viabilidade celular.

Sobre biofilme de *C. dubliniensis* no tempo de contato por 24 h, o extrato de alecrim isolado (50 mg/mL, CIM), as combinações alecrim 25 mg/mL + romã 3,1 mg/mL e alecrim 25 mg/mL + romã 6,2 mg/mL promoveram reduções significativas do biofilme (40,6%, 25,5% e 23,3% respectivamente) e o grupo tratado com nistatina também apresentou percentual de redução significativo de 35,3%, todos diferindo estatisticamente do grupo controle negativo ($p < 0,05$). Sobre tal espécie, o tempo de contato prolongado foi o melhor protocolo com maiores percentuais de redução.

Com relação ao tempo de contato de 24h sobre biofilme de *C. tropicalis*, nota-se percentuais de redução muito expressivos: grupo nistatina com 78,4%, seguido pelo grupo tratado com extrato de alecrim isolado (50 mg/mL, CIM) com 75% de redução e as combinações de alecrim 25 mg/mL + romã 12,5 mg/mL e alecrim 25 mg/mL + romã 6,2 mg/mL que apresentaram percentuais de redução de 63,4% e 53,9% respectivamente, todos diferindo estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$). Ainda, o extrato de romã isolado (25 mg/mL, CIM) e as combinações alecrim 12,5 mg/mL + romã 12,5 mg/mL e alecrim 25 mg/mL + romã 3,1 mg/mL também produziram percentuais de redução relevantes (49,4%, 48,8% e 49,6% respectivamente) mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Uma vez que *C. tropicalis* é uma espécie que apresenta alta capacidade de adesão e formação de biofilme (Negri et al., 2010), encontrar expressivos percentuais de redução é de grande relevância e demonstra que, a combinação dos extratos de alecrim e romã são dotados de potencial antifúngico potencialmente explorável.

Ainda sobre o estudo de Abu El-Wafa et al. (2020) a combinação de alecrim, romã e antibiótico alcançaram até 99,6% de erradicação do biofilme de *P.aeruginosa* apresentado o melhor resultado quando comparado a qualquer outra monoterapia avaliada no estudo. Uma combinação de compostos alcalóides

derivados da *Sida Cordifolia* L., popularmente conhecida como malva branca, com nistatina ou clotrimazol apresentaram efeito combinatório antifúngico contra diversas espécies de *Candida*. Os autores acreditam que esse efeito antimicrobiano combinatório pode estar relacionado à alteração da permeabilidade da membrana (Ouédraogo et al., 2012).

Diante dos resultados encontrados na literatura que foram percorridos e debatidos com os resultados do presente trabalho, verifica-se que este elucidou importantes descobertas sobre a ação antifúngica dos extratos de plantas em questão, revelando diferentes combinações aditivas com potencial explorável para formulação de novos compostos antifúngicos. Tais extratos isolados ou combinados apresentaram importante atividade antibiofilme em diferentes concentrações e tempos de ação, como por exemplo, *C. albicans* sofreu maiores reduções no tempo de 30 min e *C. tropicalis* no tempo de 24 h. Com isso, o presente estudo constata que o tempo de ação é uma questão significativa. Sabe-se que há um aumento expressivo das espécies não-*albicans* nas candidoses bucais e conhecer a cepa secundária predominante para melhor escolha do protocolo terapêutico é muito importante pois, para ação antibiofilme contra *C. tropicalis*, seria necessário o emprego de fármacos com liberação prolongada do princípio ativo, e tal fator poderia ser decisivo no sucesso do tratamento.

Considerando os resultados encontrados, acreditamos na possibilidade do desenvolvimento de diversos compostos para tratamento e auxílio no combate à candidose bucal, como por exemplo, o desenvolvimento de uma pomada à base de vegetais que apresente substantividade para aplicação nas mucosas afetadas, ou até mesmo, o desenvolvimento de uma solução desinfetante para próteses que ficassem mergulhadas durante 30 min por dia como método adjuvante de higienização. Para pacientes HIV+ e que frequentemente apresentam o predomínio de *C. dubliniensis* como cepa secundária nas lesões de candidose orofaríngea, o desenvolvimento de pomadas à base de alecrim ou cúrcuma parece promissor uma vez que *C. dubliniensis* apresentou grande resistência a ação da nistatina. Sabe-se que a capacidade de formação e desenvolvimento de biofilmes constitui um fator de resistência dos micro-organismos e no presente momento, estamos diante de promissoras combinações vegetais que são atuantes contra essas comunidades microbianas patogênicas.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- a) os extratos de *C. longa*, *R. centifolia*, *R. officinalis* e *P. granatum* apresentaram ação antifúngica frente às espécies de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* promovendo Concentrações Inibitória Mínima e Fungicida Mínima;
- b) os extratos de *C. longa* e *R. centifolia* juntos resultaram em uma combinação aditiva contra todas as espécies testadas e a mistura de *R. officinalis* e *P. granatum* resultou em três combinações aditivas sobre *C. albicans* e quatro combinações aditivas frente às espécies não-*albicans*;
- c) para ação antibiofilme contra *C. albicans*, o tempo de 30 min foi o melhor protocolo com ambas as combinações vegetais atuantes, sendo a mistura de *C. longa* e *R. centifolia* também efetiva em 24 h; contra biofilme de *C. dubliniensis*, a aplicação isolada dos extratos de plantas mostrou-se melhor alternativa sendo *R. officinalis* o mais ativo em 24 h; para ação antibiofilme contra *C. tropicalis*, a ação prolongada (24 h) parece ser fator decisivo, sendo a combinação de *R. officinalis* e *P. granatum* bem-sucedida e a atuação de *C. longa* isolada promissora.

REFERÊNCIAS*

- Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MA. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* [published online ahead of print, 2020 May 12]. *Braz J Microbiol.* 2020;10.1007/s42770-020-00284-3. doi:10.1007/s42770-020-00284-3
- Aikawa NE, Rosa DT, Del Negro GM, Moraes JC, Ribeiro AC, Saad CG, et al. Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF [Systemic and localized infection by *Candida* species in patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF therapy]. *Rev Bras Reumatol.* 2015 Aug 1;S0482-5004(15)00096-0. Portuguese. doi: 10.1016/j.rbr.2015.03.010.
- Akinyemi AJ, Faboya OL, Paul AA, Olayide I, Faboya OA, Oluwasola TA. Nephroprotective effect of essential oils from ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes against cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *J Oleo Sci.* 2018;67(10):1339-45. doi: 10.5650/jos.ess18115.
- Akroum S. Activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* sur les espèces du genre *Candida* et sur *Streptococcus pneumoniae* [Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* and *Zingiber officinale* extracts on the species of the genus *Candida* and on *Streptococcus pneumoniae*.] [published online ahead of print, 2020 Jun 18]. *Ann Pharm Fr.* 2020;S0003-4509(20)30076-6. doi:10.1016/j.pharma.2020.06.003.
- Akter J, Hossain MA, Takara K, Islam MZ, Hou DX. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019 Jan;215:9-17. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.09.002. Epub 2018 Sep 25.
- Almeida CM, Lima RF, Costa TKVLD, Sousa IMO, Cabral EC, Basting RT, et al. Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. *Braz Oral Res.* 2018 May 24;(32):e41. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0041. PubMed PMID: 29846389.
- Almeida NLM, Saldanha LL, da Silva RA, Pinke KH, da Costa EF, Porto VC, et al. Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*-and *Punica granatum*-enriched fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. *Biofouling.* 2018 Jan;34(1):62-73. doi: 10.1080/08927014.2017.1407408. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29250982.
- Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Höfling JF. Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de *Punica granatum* L. e avaliação das modificações morfológicas e estruturais de seus compostos nas células de *Candida* spp. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):839-48. Publicado 2013 dez 17. doi: 10.1590 / S1517 8382201300500006

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine: [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Azevedo MM, Teixeira-Santos R, Silva AP, Cruz L, Ricardo E, Pina-Vaz C, et al. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. *Front Microbiol.* 2015 Jul 3;6:669. doi:10.3389/fmicb.2015.00669. eCollection 2015. Review.

Bae YS, Rhee MS. Short-term antifungal treatments of caprylic acid with carvacrol or thymol induce synergistic 6-log reduction of pathogenic *Candida albicans* by cell membrane disruption and efflux pump inhibition. *Cell Physiol Biochem.* 2019;53(2):285-300. doi:10.33594/000000139.

Baradaran Rahimi V, Ghadiri M, Ramezani M, Askari VR. Antiinflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies. *Phytother Res.* 2020;34(4):685-720. doi:10.1002/ptr.6565

Benito-Cruz B, Aranda-Romo S, López-Esqueda FJ, de la Rosa-García E, Rosas-Hernández R, Sánchez-Vargas LO. A *Candida* oral isola e os padrões de suscetibilidade do fluconazol em mulheres mexicanas mais velhas. *Arco Gerontol Geriatr.* Jul-Ago 2016;65:204-10. doi: 10.1016/j.archger.2016.04.001.

Bernal-Treviño A, González-Amaro AM, Méndez González V, Pozos-Guillén A. [Frequência de *Candida* em canais radiculares de dentes com primário e persistente infecções endodônticas]. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(2):78-82. doi: 10.1016 / j.riam.2017.09.004. Epub 2018 Mar 28. PubMed PMID: 29605495.Espanhol.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem.* 2007 Sep 19;55(19):7879-85. doi: 10.1021/jf0715323. Epub 2007 Aug 21. PMID: 17708648.

Butassi E, Svetaz LA, Ivancovich JJ, Feresin GE, Tapia A, Zacchino SA. Synergistic mutual potentiation of antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav. and *Larrea nitida* Cav. extracts in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Phytomedicine.* 2015 Jun 1;22(6):666-78. doi: 10.1016/j.phymed.2015.04.004.

Castanheira M, Deshpande LM, Davis AP, Rhomberg PR, Pfaller MA. Monitoring antifungal resistance in a global collection of invasive yeasts and molds: application of CLSI epidemiological cutoff values and whole-genome sequencing analysis for detection of azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Sep 22;61(10):e00906-17. doi: 10.1128/AAC.00906-17

Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/Rosmarinus officinalis essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Res Lett.* 2012 Apr 10;7(1):209. doi: 10.1186/1556-276X-7-209.

Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris*

isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Apr 1;73(4):891-899. doi: 10.1093/jac/dkx480. PMID: 29325167.

da Silva RA, Ishikiriama BLC, Ribeiro Lopes MM, de Castro RD, Garcia CR, Porto VC, et al. Antifungal activity of Punicalagin-nystatin combinations against *Candida albicans*. *Oral Dis.* 2020 Nov;26(8):1810-19. doi: 10.1111/odi.13507. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32583467.

de Oliveira JR, Vilela PGDF, Almeida RBA, de Oliveira FE, Carvalho CAT, Camargo SEA, et al. Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *Gen Dent.* 2019 Jan-Feb;67(1):22-26. PubMed PMID: 30644826.

Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 2001;109(Suppl. 1):69–75.

Forouzanfar F, Afkhami Goli A, Asadpour E, Ghorbani A, Sadeghnia HR. Protective effect of *Punica granatum* L. against serum/glucose deprivation-induced PC12 cells injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:716730. doi: 10.1155/2013/716730. Epub 2013 Jul 7. PMID: 23935674; PMCID: PMC3723082.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(4):380-85.

Gauch LMR, Gomes FS, Esteves RA, Pedrosa SS, Gurgel ESC, Arruda AC, et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(3):389-91.

Gauniyal P, Teotia US. Antimicrobial activity of sixteen medicinal plants against oral flora and its efficacy comparison with 2% chlorhexidine. *Int J Multidisc Sci Emerg Res.* 2015;4(2):2349-6037.

Governa P, Marchi M, Cocetta V, De Leo B, Saunders PTK, Catanzaro D, et al. Effects of *Boswellia serrata* Roxb. and *Curcuma longa* L. in an in vitro intestinal inflammation model using immune cells and Caco-2. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018 Nov 20;11(4). pii: E126. doi: 10.3390/ph11040126.

Hu WS, Min Nam D, Kim JS, Koo OK. Synergistic anti-biofilm effects of Brassicaceae plant extracts in combination with proteinase K against *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep.* 2020 Dec 3;10(1):21090. doi: 10.1038/s41598-020-77868-4.

Irshad S, Muazzam A, Shahid Z, Dalrymple MB. *Curcuma longa* (Turmeric): An auspicious spice for antibacterial, phytochemical and antioxidant activities. *Pak J Pharm Sci.* 2018;31(6):2689-96.

Kamble SP, Shinde KD. Anti-biofilm activity against Gram-positive bacteria by biologically synthesized silver nanoparticles using *Curcuma longa*. *Pharm Nanotechnol.* 2018;6(3):165-70. doi: 10.2174/2211738506666180629142001.

Lee KH, Kim BS, Keum KS, Yu HH, Kim YH, Chang BS, et al. Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J Food Sci*. 2011 Nov-Dec;76(9):H226-30. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02427.x. PMID: 22416707.

Kayashima T, Matsubara K. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76:115–9.

Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC, Nett JE. The interface between fungal biofilms and innate immunity. *Front Immunol*. 2018 Jan 10;8:1968. doi: 10.3389/fimmu.2017.01968.

Khan Z, Ahmad S, Mokaddas E, Meis JF, Joseph L, Abdullah A, Vayalil S. Development of echinocandin resistance in *Candida tropicalis* following short-term exposure to caspofungin for empiric therapy. *Antimicrob agents chemother*. 2018 Mar 27;62(4):e01926-17. doi: 10.1128/AAC.01926-17.

Kim DS, Kim JY, Han Y. Curcuminoids in neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2012;7(3):184-204. doi:10.2174/157488912803252032

Kumar KSP, Samlin SS, Siva B, Sudharshan R, Vignesswary A, Divya K. *Punica granatum* as a salubrious superfruit in the treatment of oral candidiasis - An *in-vitro* study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24(1):188-89.

Kumar R, Nair V, Gupta YK, Singh S. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of aqueous extract of *Rosa centifolia* in experimental rat models. *Int J Rheum Dis*. 2017 Sep;20(9):10721078. doi: 10.1111/1756-185X.12625

Kumar R, Nair V, Singh S, Gupta YK. A. In vivo antiarthritic activity of *Rosa centifolia* L. flower extract. *Ayu*. 2015;36(3):341–45. doi: 10.4103 / 0974-8520.182753

Lavaee F, Motaghi D, Jassbi AR, Jafarian H, Ghasemi F, Badiie P. Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* isolates. *Curr Med Mycol*. 2018 Dec;4(4):20-4.

Li M, Yue GG, Tsui SK, Fung KP, Lau CB. Turmeric extract, with absorbable curcumin, has potent anti-metastatic effect in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2018 Jul 15;46:131-41. doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.065. Epub 2018 Apr 3.

Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu HG, Aibai S. Antifungal activity of gallic acid in vitro and in vivo. *Phytother Res*. 2017;31(7):1039-45. doi: 10.1002/ptr.5823. Epub 2017 May 19. PMID: 28524381.

Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 May;43(5):395-402. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009. Epub 2014 Jan 22. Review. PubMed PMID: 24503221.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008. 544 p. ISBN: 85-86714-28-3.

Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. Mycopathologia. 2010 Jun;169(6):431-43. doi:10.1007/s11046-010-9286-5.

Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009;33(4):642-50. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.004. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19286446.

Mäkinen A, Nawaz A, Mäkitie A, Meurman JH. Role of non-albicans *Candida* and *Candida albicans* in oral squamous cell cancer patients. J Oral Maxillofac Surg. 2018;76(12):2564-71. doi: 10.1016/j.joms.2018.06.012. Epub 2018 Jun 14. PMID: 30509395.

Meccatti VM, Oliveira JR, Figueira LW, Lagareiro Netto AA, Zamarioli LS, Marcucci MC, et al. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract has antibiofilm effect similar to the antifungal nystatin on *Candida* samples. An Acad Bras Cienc. 2021 Apr 30;93(2):e20190366. doi: 10.1590/0001-3765202120190366. PMID: 33950151.

Mohebitabar S, Shirazi M, Bioos S, Rahimi R, Malekshahi F, Nejabatkhsh F. Therapeutic efficacy of rose oil: A comprehensive review of clinical evidence. Avicenna J Phytomed. 2017;7(3): 206-13. PubMed PMID: 28748167; PubMed Central PMCID: PMC5511972.

Moreno MA, Zampini IC, Isla MI. Antifungal, anti-inflammatory and antioxidant activity of bi-herbal mixtures with medicinal plants from Argentinean highlands. J Ethnopharmacol. 2020 May 10;253:112642. doi: 10.1016/j.jep.2020.112642.

Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. Int J Antimicrob Agents. 2017;50(5):599-606. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.05.012

Murugesh J, Annigeri RG, Mangala GK, Mythily PH, Chandrakala J. Evaluation of the antifungal efficacy of different concentrations of *Curcuma longa* on *Candida albicans*: An *in vitro* study. J Oral Maxillofac Pathol. 2019 May-Aug;23(2):305. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_200_18. PMID: 31516248; PMCID: PMC6714268.

Nakagawa S, Hillebrand GG, Nunez G. *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence. Antibiotics (Basel). 2020;9(4):149. Published 2020 Mar 31. doi:10.3390/antibiotics9040149

Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized

patients. *Mycopathologia*. 2010;169:175–82. doi: 10.1007/s11046-009-9246-0.

Oliveira JR, de Jesus Viegas D, Martins APR, Carvalho CAT, Soares CP, Camargo SEA, et al. Thymus vulgaris L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch Oral Biol*. 2017 Oct;82:271-79. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.031. Epub 2017 Jun 27. PubMed PMID: 28683409.

Ouédraogo M, Konaté K, Lepengué AN, Souza A, M'Batchi B, Sawadogo LL. Free radical scavenging capacity, anticandidal effect of bioactive compounds from *Sida cordifolia* L., in combination with nystatin and clotrimazole and their effect on specific immune response in rats. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Dec 26;11:33. doi: 10.1186/1476-0711-11-33. PMID: 23268761; PMCID: PMC3576270.

Palshetkar A, Pathare N, Jadhav N, Pawar M, Wadhvani A, Kulkarni S, et al. In vitro anti-HIV activity of some Indian medicinal plant extracts. *BMC Complement Med Ther*. 2020 Mar 6;20(1):69. doi: 10.1186/s12906-020-2816-x. PMID: 32143607; PMCID: PMC7076815.

Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Ruiz-Torres V, Agulló-Chazarra L, Herranz-López M, Valdés A, et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract causes ROS-induced necrotic cell death and inhibits tumor growth in vivo. *Sci Rep*. 2019 Jan 28;9(1):808. doi: 10.1038/s41598-018-37173-7. PMID: 30692565; PMCID: PMC6349921.

Perkins K, Sahy W, Beckett RD. Efficacy of curcuma for treatment of osteoarthritis. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2017 Jan;22(1):156-65. Epub 2016 Mar 14.

Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):e383-e392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28774698.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007 Jun;45(4):321-46. doi: 10.1080/13693780701218689. PMID: 17510856.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Global antifungal surveillance group. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1366-77. doi: 10.1128/JCM.02117-09. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20164282; PMCID: PMC2849609.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:65–9.

Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015;91:139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002. Epub 2015 Feb 24. Review. PubMed PMID: 25911234.

Pramadita J, Widyarman AS. In vitro antibiofilm activity of pomegranate (*Punica granatum*) juice on oral pathogens. *JIDA*. 2019;2(1):15-20.

Prasad R, Nair R, Banerjee A. Emerging mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*. *Prog Mol Subcell Biol*. 2019;58:135-53. doi: 10.1007/978-3-030-13035-0_6. PMID: 30911892.

Prigent G, Aït-Ammar N, Levesque E, Fekkar A, Costa JM, El Anbassi S, et al. Echinocandin resistance in *Candida* species isolates from liver transplant recipients. *Antimicrob agents chemother*. 2017;61(2): e01229-16. doi: 10.1128/AAC.01229-16. Print 2017 Feb. PubMed PMID: 27855078; PubMed Central PMCID: PMC5278690.

Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol Med*. 2005;118:71-9.

Riad A, Gomaa E, Hockova B, Klugar M. Oral candidiasis of COVID-19 patients: Case report and review of evidence. *J Cosmet Dermatol*. 2021 Jun;20(6):1580-84. doi: 10.1111/jocd.14066. Epub 2021 Mar 21. PMID: 33713390.

Riad A, Gad A, Hockova B, Klugar M. Oral Candidiasis in non-severe COVID-19 patients: call for antibiotic stewardship. *Oral Surg*. 2020 Sep 21:10.1111/ors.12561. doi: 10.1111/ors.12561. Epub ahead of print. PMID: 33042219; PMCID: PMC7537301.

Razina IN, Chesnokova MG, Nedoseko VB. [The relevance of *Candida* spp. In chronic periodontal disease]. *Stomatologija (Mosk)*. 2017;96(4):4-6. doi: 10.17116/stomat20179644-6. Russian. PubMed PMID: 28858271.

Salari S, Bakhshi T, Sharififar F, Naseri A, Ghasemi Nejad Almani P. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *J Mycol Med*. 2016 Dec;26(4):323-30. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.06.003. Epub 2016 Aug 4. PubMed PMID: 27499461.

Samadi FM, Suhail S, Sonam M, Sharma N, Singh S, Gupta S, Dobhal A, Pradhan H. Antifungal efficacy of herbs. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019 Jan-Mar;9(1):28-32. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.06.002. Epub 2018 Jun 7.

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015 Jun;58 Suppl 2:2-13. doi: 10.1111/myc.12330. Review. PubMed PMID: 26033251.

Shapiro RS, Uppuluri P, Zaas AK, Collins C, Senn H, Perfect JR, et al. Hsp90 Orchestrates Temperature-Dependent *Candida albicans* Morphogenesis Via Ras1-PKA Signaling. *Curr Biol*. 2009 Apr 28;19(8):621-29.

Silva AM, Machado ID, Santin JR, de Melo IL, Pedrosa GV, Genovese MI, et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytother Res*. 2015 Jan;29(1):125-33. doi: 10.1002/ptr.5238. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25319517.

Silva EM, Mansano ESB, Miazima ES, Rodrigues FAV, Hernandez L, Svidzinski TIE. Radiation used for head and neck cancer increases virulence in *Candida tropicalis* isolated from a cancer patient. *BMC Infect Dis*. 2017;17:783. doi: 10.1186/s12879-017-2879-6.

Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(5):421–27.

Tarapan S, Matangkasombut O, Trachootham D, Sattabanasuk V, Talungchit S, Paemuang W, et al. Oral *Candida* colonization in xerostomic postradiotherapy head and neck cancer patients. *Oral Dis*. 2019 Oct;25(7):1798-08. doi: 10.1111/odi.13151. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31257663.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006 Aug;51(8):672-80.

Tsao SM, Yin MC. Enhanced inhibitory effect from interaction of curcumin with amphotericin B or fluconazole against *Candida* species. *J Food Drug*. 2000;8(3):208-12.

Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:938475. doi: 10.1155/2015/938475. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26180600; PMCID: PMC4477247.

Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Aoki S, et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* 2003;20:52-4.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jan 16;6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015. PMID: 31963180; PMCID: PMC7151112.

Xu Y, Shi C, Wu Q, Zheng Z, Liu P, Li G, et al. Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis*. 2017 May;14(5):282-87.

Zhang WY, Guo YJ, Han WX, Yang MQ, Wen LP, Wang KY, et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress. *Int Immunopharmacol*. 2018 Dec 10;67:138-44. doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.012.

ANEXO A – Informativo técnico do extrato glicólico de *Curcuma longa* L.



STD COMÉRCIO E EXPORTAÇÃO LTDA



EXTRATO GLICÓLICO DE AÇAFRÃO-CURCUMA

Nome Botânico: *Curcuma longa* L.;

Família: Zingiberaceae;

Sinonímia Botânica: *Curcuma domestica*;

Parte utilizada: Rizomas;

Nomes populares: Açafraão da terra, curcuma;

Tradução: Turmeric (inglês); curcuma (espanhol).

Informações Gerais:

Pertencente à ordem das Zingiberales e à família das Zingiberaceas, *Curcuma longa* se apresenta como uma herbácea perene e bulbosa, de pequeno porte, atingindo 1 metro de altura. O caule do tipo rizoma, subterrâneo, grosso e irregular; possui súber pardo-arroxeadado, apresentando internamente, coloração laranja-amarelada. As folhas basais, possuem pecíolos longos e suculentos, atingindo quase 1 metro de comprimento. A lâmina foliar, ovalada-lanceolada, apresenta coloração verde-escura e se apresentam levemente coriáceas.

As flores hermafroditas possuem corola tubular, de coloração que varia do branco ao rosa, passando pelo amarelo e o laranja. Estão reunidas em inflorescências centrais, pedunculadas, basais, escamiformes e de formato ovalado. De cada "escama" observamos a gênese de uma flor. Os dados sobre frutos e sementes não foram encontrados na bibliografia consultada, mas pudemos verificar que possui o rizoma como principal mecanismo de dispersão.

Originária do continente asiático apresenta a região sul e sudeste, mais precisamente, a Índia, como foco de origem e dispersão da espécie. Conhecida desde tempos remotos pelas populações locais, foram encontrados registros de cultivo Índia e China, datados de mais de 2 mil anos. De seu rizoma seco e pulverizado, é extraído o "açafraão-da-terra", condimento e corante. Seu preço é em média 8 vezes menor que o açafraão extraído de *Crocus sativus*. Atualmente é cultivada em praticamente todas as regiões tropicais do globo, sendo bastante difundida no velho continente (Europa e Ásia).

Típica de climas tropicais, prefere altas temperaturas (entre 20 e 35°C), sol pleno, e médias taxas de pluviosidade (1000 mm/ano). Altas taxas de pluviosidade podem danificar seu rizoma, acarretando redução foliar, desenvolvimento reduzido e baixa produtividade. Os solos de textura média (areno-argilosos ou argilo-arenosos), bem drenados e levemente ácidos, devem apresentar altas concentrações de matéria orgânica. O período de cultivo é rápido e num espaço de 8 a 10 meses já pode ser colhido. Para isso, secam-se as folhas e se desenterra o rizoma. Apresenta-se bastante rentável, à medida que os gastos de produção são baixos e as aplicações são variadas.

O principal produtor mundial é a Índia, com cerca de 90% da produção mundial. No Brasil, temos os estados de: Minas Gerais e Goiás; como principais produtores. O açafraão-da-terra (*Curcuma longa*) é amplamente como alimentar (tempero), texti (corante), perfumaria, medicinal e cosmético.



SELVA BRAZILIS

Ativos naturais

STD COMERCIO E EXPORTAÇÃO LTDA

Composição Química

A *Curcuma longa* apresenta dois princípios ativos principais: a curcumina, demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina; e um óleo essencial, a oleoresina. Além disso, encontra-se rica em: ar-tumerona, α -Tocoferol, β -Sitosterol, curcumina, flavonóides, terpineno, turmerona e zingibereno; o que acaba conferindo uma grande gama de propriedades medicinais e cosméticas. Além disso, apresenta boas taxas de vitaminas e sais minerais;

Principais Constituintes

1,8-Cineol;
 Acido Cafeico (5 ppm);
 Acido Cumarico (345 ppm);
 Acido Siringico;
 Acido Vanílico;
 Ar-Tumerona (740-5800 ppm);
 α -Felandreno (1945 ppm);
 α -Tocoferol (11-18 ppm);
 β -Caroteno;
 β -Sitosterol (510 ppm);
 Bisaboleno;
 Bisacurona (9 ppm);
 Campesterol (90 ppm);
 Curcumenol (56 ppm);
 Curcumina (9-58000 ppm);
 Curcuminóides (30000-80000 ppm);
 Ciclocurcumina (13.3-8000 ppm);
 D-Sabineno (20-4532 ppm);
 Flavonóides (90-95 ppm);
 Limoneno (80 ppm);
 Quercetina (90-95 ppm);
 Stigmasterol;

Terpineno;
 Turmerina (1000 ppm)
 Turmerona (1800-43200 ppm);
 Ukonano (33-8600 ppm);
 Zingibereno (750-18000 ppm);

Sais Minerais:

Cálcio (270-2898 ppm);
 Ferro (121-467 ppm);
 Fósforo (640-6307 ppm);
 Magnésio (3038-9800 ppm);
 Manganês (33-78 ppm);
 Potássio (4870-41271 ppm);
 Selênio (0.5-1.6 ppm);
 Sódio (30-4290 ppm);
 Zinco (22 ppm);

Vitaminas:

Vitamina C (0-293 ppm);
 Vitamina E (11-18 ppm);
 Vitamina B₁ (0-8 ppm);
 Vitamina B₃ (5-62 ppm);

Atividade Biológica e Farmacológica:

Herbácea pequeno/médio porte, a *Curcuma longa* pertence à família das Zingiberáceas, mesma do gengibre. O caule do tipo rizoma grosso e irregular, possui súber pardo-escuro e ceme macio de coloração amarelo-alaranjado. Típica de climas tropicais, prefere altas temperaturas e pluviosidades médias. A curcuma se apresenta similar ao açafrão verdadeiro. Porém com custo pelo menos 8 vezes menor.

Rico em: ar-tumerona, α -Tocoferol, β -Sitosterol, curcumina, flavonóides, terpineno, turmerona e zingibereno; possui grande aplicação na medicina tradicional e na indústria cosmética. Possui altas taxas de sais minerais (cálcio, magnésio e potássio); e de vitaminas (C, E e complexo B).

Na medicina tradicional, possui propriedades: adstringente, aperiente, anti-AGE, antibacteriana, anti-diarreica, anti-espasmódica, antiinflamatória, anti-séptica, anti-oxidante, antiviral, cicatrizante, colagoga, colerética, digestiva, emenagoga, estomáquica, hepatoprotetor, hipoglicêmica, hipotensor, laxativa, resolutive e vaso-dilatador. Sendo assim, é indicada na prevenção e no tratamento de diversos males, como: afecções estomacais, distúrbios intestinais, diabetes, alto colesterol, amenorréia, dismenorréia, distensões, contusões, cortes, feridas, queimaduras, úlceras, tumores, câncer, má circulação, afecções hepáticas, distúrbios renais, cálculos, pé de atleta, micoses, herpes, AIDS, afecções cutâneas, psoríase, sarampo e reumatismo.

Av. Brig.Faria Lima,558 3º andar – cj.32 Pinheiros – São Paulo – SP CEP: 05426-200
 F: (11) 3854-3432 Fax: (11) 3854-3428 E-mail: info@selvabrazilis.com.br



STD COMÉRCIO E EXPORTAÇÃO LTDA

Indicações de uso e Dosagens Recomendadas

Ação

As altas concentrações de compostos de ação anti-oxidante, como: α -Tocoferol (vitamina E), β -Caroteno, β -Sitosterol, flavonóides zingibereno; credenciam seu uso em cremes de ação anti-AGE e anti-sinais. As altas taxas de compostos de ação adstringente e anti-séptica; promovem regulação na secreção das glândulas sebáceas, controlando a oleosidade da pele e conseqüentemente, reduzindo o aparecimento da acne. Sendo assim entra na formulação de cremes de tratamento anti-acne; em loções adstringentes para limpeza profunda; e em xampus condicionadores para cabelos oleosos.

Dosagem/Modo de Usar

Cremes anti-acne: até 5% de extrato glicólico;
Cremes anti-AGE: até 5% de extrato glicólico;
Cremes anti-sinais: até 5% de extrato glicólico;
Loções adstringentes de limpeza profunda: até 5% de extrato glicólico;
Xampus para cabelos oleosos: até 5% de extrato glicólico;

Precauções de Armazenamento

Armazenar preferencialmente em recipiente âmbar, em ambiente seco e arejado, ao abrigo da luz solar.

ANEXO B - Informativo técnico do extrato glicólico de *Rosa centifolia* L.



EXTRATO GLICÓLICO DE ROSA BRANCA HG

Nome Científico: *Rosa centifolia* L. / Rosaceae

INCI: Rosa Centifolia Flower Extract

N° CAS: 84604-12-6

Parte Utilizada: Flores

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

A Rosa é rica em óleo essencial, óleo fixo, aminoácidos, flavonóides, ácidos orgânicos (málico, tartárico), taninos, glicídios, pró-vitamina A, vitamina C, sais minerais.

PROPRIEDADES E INDICAÇÕES

Adstringente, cicatrizante, antiinflamatório, anti-séptico, calmante, refrescante (óleo essencial, taninos). Emoliente, hidratante, amaciante, restaurador (aminoácidos, óleo fixo, sais minerais), anti-radicaís livres (vitaminas, flavonóides). Indicado para peles secas, sensíveis e acnêicas. Recomendado em loções tônicas, em formulações para massagem do corpo, e higiene pessoal.

Em cremes, géis e loções para o corpo - 3,0 a 8,0%. Em shampoos, condicionadores, sabonetes e tônicos - 1,0 a 5,0%. Em sabonetes em barra - 0,5 a 3,0%

Atenção: O Extrato Glicólico de Rosa Branca deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C. Uso externo.

ESTOCAGEM

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.
Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

ANEXO C - Informativo técnico do extrato glicólico de *Rosmarinus officinalis* L.



EXTRATO GLICOLICO DE ALECRIM (HG)

Nome Científico: *Rosmarinus officinalis* L. / Labiatae

INCI: Rosmarinus Officinalis Leaf Extract

Nº CAS: 84604-14-8

Parte Utilizada: Folha

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Óleo essencial constituído de derivados terpênicos (pineno, canfeno, borneol livre e como acetato, cineol, cânfora); sesquiterpenos; ácido oleanólico; pouco tanino; substâncias amargas; saponina ácida; e compostos glucosídicos.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Alecrim tem ação dermopurificante, tonificante, estimulante celular, antioxidante, protetor de tecidos e ativador da circulação periférica. Pode ser usado em preparações para o couro cabeludo, estimulando a circulação e o crescimento capilar. Tem ação anticaspa, previne a queda e confere brilho aos cabelos.

Usado também em preparações para pele acnêmica, comedogênica e atônica.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho, loção de limpeza e outros produtos cosméticos.

Atenção: O Extrato Glicólico de Alecrim deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

Indicado somente para uso externo em concentração - 0,5 a 10%.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

ANEXO D - Informativo técnico do extrato glicólico de *Punica granatum* L.



EXTRATO GLICÓLICO DE ROMÃ (HG)

Nome Científico: *Punica granatum* L. / *Punicaceae*

INCI: Punica Granatum Bark Extract

Nº CAS: 84961-57-9

Parte Utilizada: Casca

PRINCÍPIOS ATIVOS

Contêm alcalóides (como a pelieterina e isopelieterina) e os taninos gálicos.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

Possui efeito adstringente e anti-séptico proporcionado pelos taninos gálicos, sendo muito utilizado em produtos para o tratamento de acne e de seborréia, além de regular a oleosidade da pele e dos cabelos.

DOSAGEM

Em cremes, géis e loções – 2 a 10%.

Em shampoos, condicionadores e sab. – 1 a 5%

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balmé, F.; Plantas Medicinalis. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cravo, A.B.; Frutas e Ervas que Curam – Panacéia Vegetal. Ed. Helmus, 1995.

Encyclopédie des Plantes Médicinales. Ed. Larousse-Bordas, 1997.

Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.

Segredos e Virtudes das Plantas Medicinalis. Reader's Digest, 1998.