



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

NAIARA RAISSA SOUZA SANTOS

**TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DA CAATINGA FRENTE A PATÓGENOS ORAIS**

Recife

2018

NAIARA RAISSA SOUZA SANTOS

**TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DA CAATINGA FRENTE A PATÓGENOS ORAIS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Cruz Câmara

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Sheila Higino

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário: Elaine Freitas, CRB4:1790

S237t Santos, Naiara Raissa Souza.  
Toxicidade e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da caatinga frente a patógenos orais/ Naiara Raissa Souza Santos. – Recife: o autor, 2018.  
80f.

Orientador: Andréa Cruz Câmara.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia.  
Inclui referências e anexos.

1. Fitoterapia. 2. Extratos vegetais. 3. Saúde bucal. 4. Microbiologia. I. Câmara, Andréa Cruz (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 159)

NAIARA RAISSA SOUZA SANTOS

**TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DA CAATINGA FRENTE A PATÓGENOS ORAIS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada

Aprovada em: 25/06/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Cruz Câmara (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. José Thadeu Pinheiro (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivone Ântonia de Souza (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os professores que se dedicaram desde o meu ensino infantil até o momento atual da minha carreira.

A minha família, Marcelo, Valéria, Cristiane, Nelson, Olívia, Evandro e Ricardo por todo exemplo, garra e insistência em acreditar que através do esforço e estudo conseguimos sempre uma vida de plenitude, além de terem suportado minhas ausências devido a dedicação à pesquisa e trabalho.

As minhas irmãs, Talia e Jade, que sempre acreditaram e me apoiaram em diversos momentos da vida e que me encham de alegria.

Ao meu companheiro e amigo, Bruno, que com toda paciência e carinho foi um grande parceiro em toda a jornada do Mestrado e construção do projeto.

A minha equipe de trabalho da Unidade de Saúde da Família, Renata, Débora, Rosângela e Gorete, muito obrigada! Eu só consegui este feito porque vocês me ajudaram e apoiaram.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Cruz Câmara, por aceitar orientar este projeto, pelas orientações valiosas, e pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada pelo apoio e tranquilidade.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jane Sheila Higino por todos os ensinamentos, pelas horas de suporte no laboratório, pela compreensão das minhas limitações e pela amizade.

Às professoras do departamento de antibióticos da UFPE, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Manoella de Souza Lima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete Magali, por serem profissionais tão dedicadas e por ter me dado a oportunidade de pesquisar e estudar com excelência em uma área interdisciplinar e permitir a realização desta pesquisa.

Ao Prof Dr<sup>o</sup> Ricardo Brandão pelos ensinamentos em uma relevante etapa da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim pelos ensinamentos e por ter cedido o Laboratório de Produtos naturais da Faculdade de Farmácia da UFPE e permitir realizar uma etapa da pesquisa.

Aos profissionais do departamento de Antibióticos Amanda, Marcela e Fátima por todo o acolhimento, paciência e dedicação durante as horas e horas no laboratório de Microbiologia. Meninas, obrigada por tudo! E aos profissionais Alana e Luiz por toda a ajuda e dedicação.

Aos colegas e alunos do Laboratório de Genética do Departamento de Antibióticos por todos os ensinamentos e pela paciência. Um prazer conhecer alunos tão dedicados.

Obrigada aos meus colegas de Mestrado, Cecília e Augusto pelo companheirismo e pelas orientações e ajuda em minha pesquisa.

Obrigada a todos os meus amigos de Mestrado, por serem seres humanos maravilhosos e poder ter aprendido com a convivência.

As minhas amigas Kássia e Suellen por terem me apoiado nos momentos difíceis e cruciais dessa jornada.

Ao guia do Vale do Catimbau, Genivaldo, pela oportunidade de ter aprendido sobre plantas medicinais e por todo cuidado e ajuda na coleta do material vegetal para a pesquisa.

Aos amigos Rafael Moreira e Emerson Fernandes pela torcida e companheirismo, sempre!

A Todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa de vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, em nome do Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em nome da coordenadora Prof. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho, por proporcionar mais uma etapa na minha vida;

Aos funcionários da pós-graduação em Odontologia, Oziclere, Tamires e Dona Tânia, por toda paciência e ajuda.

Aos integrantes da banca na qualificação, pré-banca e defesa da Dissertação, pela contribuição e auxílio.

Aos Professores da pós-graduação pelos ensinamentos, pela amizade e pela construção de conhecimentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado

## RESUMO

É crescente o número de problemas associados às doenças infecciosas e à resistência microbiana, o que tornou a descoberta de novos medicamentos um objetivo fundamental, inclusive na área da fitoterapia. A investigação de fitoterápicos para a área odontológica é escassa o que impulsionou a necessidade de pesquisas com o tema. O presente estudo objetivou identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos brutos das cascas das plantas *Albizia polycephala* (Benth.) Killip, *Anandenthera colubrina* Vell (Brenan), *Libidibia ferrea*, *Myracrodruon urundeuva* e *Ximenia americana* L. e partes aéreas da *Lippia grata* (Shauer), selecionadas de acordo com o uso tradicional em comunidades do semiárido nordestino brasileiro. Os extratos vegetais foram testados frente às leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* e às bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Para determinar a atividade antimicrobiana, foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) realizada pelo método de difusão em poço. A padronização do inóculo das cepas avaliadas foi obtida através da comparação da turbidez ao tubo padrão correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente foi realizada a leitura da densidade óptica no espectrofotômetro (Bioespectro SP-220) com o comprimento de onda de 625 nm para bactérias e 530 nm para leveduras. Também foi determinada a toxicidade dos extratos brutos vegetais frente aos náuplios da *Artemia salina* L mediante à análise da CL50 pela análise Probit. Os extratos brutos da *X. americana* L., *L. ferrea* e *M. urundeuva* obtiveram atividade antifúngica frente à *C. albicans* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 62,5 µg/mL. *C. glabrata*, foi sensível ao extrato bruto da *L. ferrea* (CIM = 125 µg/mL). Nenhum dos extratos obteve atividade antifúngica para a espécie *C. tropicalis*. Com relação às bactérias avaliadas, *S. aureus* foi sensível aos extratos brutos de *L. ferrea*, *M. urundeuva* e *X. americana* (CIM = 125 µg/mL). O extrato que obteve melhor resultado para *E. faecalis* foi o extrato bruto da *X. americana* (CIM de 250 µg/mL) e para *S. mutans* foi o extrato bruto da *L. grata* Shauer (CIM = 125 µg/mL). No ensaio de toxicidade frente a *A. salina* L., o extrato bruto da *M. urundeuva* foi atóxico, com uma Concentração Letal Mediana (CL50) de 1203 µg/mL, seguido do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip com CL50 de 801,7 µg/mL (pouco tóxico). Como conclusão, o estudo revelou que plantas provenientes e adaptadas ao

semiárido do Nordeste brasileiro possuem atividade antimicrobiana contra a maioria das espécies de micro-organismos avaliadas, com exceção da *C. tropicalis*.

**Palavras-chave:** Fitoterapia. Extratos vegetais. Saúde bucal. Microbiologia

## ABSTRACT

The number of problems associated with infectious diseases and microbial resistance, is increasing making the discovery of new medicines essential. In addition, investigation of herbal remedies for the dental field is scarce, giving importance to this research. The present study aims at identifying - in vitro - antimicrobial activity of crude extracts from the bark plants *Albizia polycephala* (Benth), *killip*, *Anandenthera colubrina* Vell (Brenan), *Libidibia ferrea*, *Myracrodruon urundeuva* and *Ximenia americana* L. and aerial part of *Lippia grata* (Shauer). These plants selected based on traditional use in communities of the semiarid region of the Brazilian Northeast. The plant extracts were tested for the detection of antimicrobial activity to yeasts *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida tropicalis*, and the bacteria *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. To determine the antimicrobial activity, there was valued the minimum inhibitory concentration (MIC) carried out by well diffusion test. The turbidity of the inoculum was compared visually to the standard tube 0.5 of the McFarland scale ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) and was read in the spectrophotometer (Biospectro SP-220). In addition to the determination of the toxicity for the *Artemia salina* by probit analysis. The crude extracts of *X. americana*, *L. ferrea* and *M. urundeuva* they obtained antifungal activities against *C. albicans* with MIC = 62.5 µg/ml. *Candida glabrata* was sensibility to the crude extract of *L. ferrea* (MIC = 125 µg/mL). None of the extracts had antifungal activity against the *Candida tropicalis*. Evaluated bacteria, *S. aureus* was sensibility to the crude extracts of *L. ferrea*, *M. urundeuva* and *X. americana*. (MIC = 125 µg/mL). The extract that obtained the best results against *E. faecalis* was the crude extract of the *X. americana* with MIC = 250 µg/ml, and the extract that had the best activity against *S. mutans* was the crude extract of *L. grata* Shauer with CIM of 125 µg/ml. In the toxicity test against the *A. salina* L., the nontoxic extract was the one of the *M. urundeuva*, with a LC50 of 1203 µg/ml, followed by the crude extract of *A. polycephala* (Benth) Killip with LC50 of 801.7 µg / mL (low toxicity). As a conclusion, the study revealed that plants from the semiarid region of the Brazilian Northeast have antimicrobial activity against all species of microorganisms evaluated, except for *C. tropicalis*.

**Key words:** Phytotherapy. Plant extracts. Oral health, Microbiology

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Espécie <i>A.colubrina</i> (Vell.)Brenan.....	19
Figura 2 -	Flores da <i>A.colubrina</i> (Vell.)Brenan .....	19
Figura 3 -	Espécie <i>Libidibia ferrea</i> .....	20
Figura 4 -	Espécie <i>Lippia grata</i> (Shauer).....	22
Figura 5 -	Espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> .....	23
Figura 6 -	Flores da <i>Myracrodruon urundeuva</i> .....	23
Figura 7 -	Espécie <i>Albizia polycephala</i> (benth.) killip.....	25
Figura 8 -	Espécie <i>Ximenia Americana</i> L.....	26
Figura 9 -	Mapa da região do PARNA do Catimbau .....	28
Figura 10 -	Coordenadas, período de coleta, número de tombamento e botânicos identificadores das espécies.....	29
Figura 11 -	Teste de atividade microbiana: Placa de Petri com ponteiras e com orifícios para extratos.....	32
Figura 12 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>L.ferrea</i> em <i>S.aureus</i> – em duplicata.....	36
Figura 13 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>L.ferrea</i> em <i>E. faecalis</i> – em duplicata .....	36
Figura 14 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>L.ferrea</i> em <i>C. albicans</i> – duplicata.....	37
Figura 15 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>L.ferrea</i> em <i>C. glabrata</i> – em duplicata.....	37
Figura 16 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>L.grata</i> Shauer em <i>S. aureus</i> em duplicata.....	38
Figura 17 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>L.grata</i> Shauer em <i>S.mutans</i> em duplicata.....	38
Figura 18 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>M.urundeuva</i> em <i>S.aureus</i> em duplicata.....	39
Figura 19 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>M.urundeuva</i> em <i>E.faecalis</i> em duplicata.....	39
Figura 20 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>M.urundeuva</i> em <i>C. albicans</i> - duplicata.....	40

Figura 21 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto <i>A. polycephala</i> em <i>S.aureus</i> em duplicata.....	40
Figura 22 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>A. polycephala</i> (Benth) Killip em <i>E. faecalis</i> em duplicata.....	41
Figura 23 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto <i>A. polycephala</i> em <i>C.albicans</i> em duplicata.....	41
Figura 24 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>X.americana</i> L. em <i>S.aureus</i> em duplicata.....	42
Figura 25 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>X.americana</i> L. em <i>E. faecalis</i> em duplicata.....	42
Figura 26 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>X.americana</i> L. em <i>C. albicans</i> em duplicata.....	43

#### QUADRO

Figura 1 -	Coordenadas, período de coleta, número de tombamento e botânicos identificadores das espécies.....	52
Figura 2 -	Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>L. ferrea</i> em <i>C. glabrata</i> em duplicata.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos em $\mu\text{g/ml}$ .....	44
Tabela 2 -	Concentração letal mediana (CL50) dos extratos brutos em $\mu\text{g/ml}$ .....	48

## ARTIGO

Tabela 1 -	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos em $\mu\text{g/ml}$ .....	56
Tabela 2 -	Concentração letal mediana (CL50) dos extratos brutos em $\mu\text{g/ml}$ .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	CELSIUS
cm	CENTÍMETRO
CFM	CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA
CIM	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA
CLSI	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE
CL50	CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA
DANTI	DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
DNA	DEOXYRIBONUCLEIC ACID
EUCAST	EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING
HIV	HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
IPA	INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO
LAPETOX	LABORATÓRIO DE PESQUISAS TOXICOLÓGICAS
m	METRO
mg	MILIGRAMA
mL	MILILITRO
µg	MICROGRAMA
nm	NANÔMETRO
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PARNA	PARQUE NACIONAL
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA
UFPEDA	UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO- DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
w	WATTS

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	PATOLOGIAS ORAIS ASSOCIADAS A INFECÇÕES MICROBIANAS.....	17
2.2	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA.....	18
<b>2.2.1</b>	<b>Plantas medicinais do Semiárido brasileiro</b> .....	19
2.2.1.1	Anadenanthera colubrina (Vell) Brenan.....	19
2.2.1.2	Libidibia ferrea.....	20
2.2.1.3	Lippia grata Schauer.....	22
2.2.1.4	Myracrodruon urundeuva.....	23
2.2.1.5	Albizia polycephala (Benth) Killip.....	24
2.2.1.6	Ximenia americana L.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	28
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	29
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
4.4	DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS FRENTE ARTEMIA SALINA L.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35

5.1	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
5.1.1	<b>Atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>Libidibia ferrea</i>.....</b>	36
5.1.2	<b>Atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>Lippia grata</i> Shauer.....</b>	38
5.1.3	<b>Atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>M. urundeuva</i> Alemão...</b>	39
5.1.4	<b>Atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>A. polycephala</i> (Benth) Killip.....</b>	40
5.1.5	<b>Atividade antimicrobiana do extrato bruto da <i>Ximenia americana</i> L....</b>	42
5.2	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM).....	43
5.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>A. SALINA</i> L.....	47
5.4	ARTIGO – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CL50 DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE ÀS ESPÉCIES <i>CANDIDA ALBICANS</i> , <i>CANDIDA GLABRATA</i> E <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	49
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	60
	<b>ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>A. COLUBRINA</i>.....</b>	69
	<b>ANEXO B - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES <i>L. FERREA</i> E <i>X. AMERICANA</i> L.....</b>	70
	<b>ANEXO C - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>LIPPIA GRATA</i> SCHAUER.....</b>	71
	<b>ANEXO D - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>A. POLYCEPHALA</i> (BENTH.) KILLIP.....</b>	72
	<b>ANEXO E - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>M. URUNDEUVA ALLEMÃO</i> .....</b>	73
	<b>ANEXO F - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES CIENTÍFICAS - ICMBIO.....</b>	74

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças na cavidade oral como cárie dental, doença periodontal e lesões na mucosa oral, como também doenças oportunistas relacionadas aos pacientes HIV positivos, entre elas a candidíase oral, estão entre os principais problemas de saúde pública no mundo.<sup>1</sup> A candidíase se manifesta, inclusive, em crianças e adolescentes portadores do vírus HIV.<sup>2</sup>

Uma variedade de micro-organismos está relacionada a estas doenças como os *Streptococcus mutans* e o seu envolvimento com a cárie dentária.<sup>3</sup> *Candida albicans* e outras espécies não albicans estão relacionadas ao desenvolvimento de candidíase oral.<sup>4</sup> Além dessas, outras infecções orais são causadas pelo *Staphylococcus aureus* que está relacionado com doenças como queilite angular e parotidite,<sup>5</sup> enquanto que o *Enterococcus faecalis*, em relação às infecções em cavidade oral, está associado à dificuldade de tratamento de infecções endodônticas e necessidade de retratamento dos canais radiculares.<sup>6; 7</sup>

Ademais, com o expansivo aumento de uma população de pacientes imunocomprometidos, a frequência da candidíase tem aumentado nas últimas décadas, tornando-se uma das infecções nosocomiais mais frequentes.<sup>8</sup> Portanto, a possibilidade de se obter fármacos mais naturais e com menor custo é de grande importância.<sup>9</sup>

A Organização Mundial de Saúde (OMS) está plenamente consciente da importância de medicamentos à base de plantas em todo o mundo e apoia o uso adequado desses medicamentos. Essa Organização incentiva o uso de remédios que já possuem eficácia comprovada cientificamente, entretanto, também valoriza a utilização de outros fitoterápicos e plantas medicinais de uso popular. Por consequência, ela apoia novas pesquisas sobre o tema com a finalidade de se obter um uso racional e adequado desses produtos. Além disso, medicamentos com base em plantas têm sido reconhecidos como um recurso valioso para os cuidados primários em saúde.<sup>10</sup> As pesquisas nesta área envolvem a investigação científica da atividade biológica de variadas espécies de plantas, principalmente pelo uso popular dessas de forma medicinal.<sup>11</sup> Entretanto, não somente a utilização de plantas

medicinais, mas também a pesquisa e fabricação de fitoterápicos estão sendo pesquisados.<sup>12</sup>

Desta maneira, ensaios preliminares com plantas medicinais para avaliar a atividade antimicrobiana contra micro-organismos de relevância clínica são fundamentais,<sup>11</sup> principalmente devido à resistência aos antimicrobianos utilizados atualmente.<sup>13; 14</sup> Na realidade brasileira, as plantas medicinais são um importante alicerce para a medicina popular <sup>15</sup> e, dada essa vasta experiência na terapêutica através de plantas, observou-se uma necessidade de se aprimorar os estudos sobre fitoterapia e plantas medicinais com fins terapêuticos.

Diante do exposto, esse trabalho se propôs a avaliar extratos brutos das plantas *Albizia polycephala* (Benth) Killip, *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva* e *Ximenia americana* L. que são típicas ou adaptadas ao semiárido brasileiro, frente às espécies de *S.mutans*, *S.aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *C.glabrata* e *C. tropicalis*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PATOLOGIAS ORAIS ASSOCIADAS A INFECÇÕES MICROBIANAS

O contexto das doenças orais apresenta uma variabilidade de agentes etiológicos, geralmente multifatoriais e polimicrobianos, sendo necessário constante aprimoramento das pesquisas para o tratamento dessas patologias.<sup>16; 17</sup> Dentre essas patologias há uma alta prevalência de cárie dentária, sendo a doença cárie um problema de Saúde Pública.<sup>1; 18</sup> A cárie dentária é uma doença complexa, multifatorial e que depende de fatores individuais, fatores socioeconômicos, culturais e fatores relacionados aos micro-organismos presentes no biofilme dental. Esse biofilme apresenta uma variedade microbiológica, particularmente estreptococos orais, contidos numa matriz de polímeros de origem salivar e bacteriana. Quando a homeostase microbiana na cavidade bucal entra em desequilíbrio (devido, por exemplo ao excesso e frequente consumo de açúcar), patógenos oportunistas podem crescer seletivamente para dominar biofilmes dentários e resultar na cárie dentária. *Streptococcus mutans* é um dos patógenos mais relacionados ao desenvolvimento de cárie e adere à superfície do dente, fermentando carboidratos e liberando ácidos que provocam a desmineralização do esmalte dentário.<sup>3; 19</sup>

*Candida albicans* também pode estar relacionada com biofilme dental e evolução da cárie, além de também estar envolvida com outras patologias na cavidade oral como candidíase oral,<sup>4; 20; 21</sup> sendo a espécie de cândida mais abundante em seres humanos.<sup>4</sup> É normalmente um fungo comensal que coloniza a saliva e a mucosa oral, entretanto, pode se tornar um patógeno em condições específicas.<sup>22</sup>

Em indivíduos portadores de doenças imunossupressoras como câncer e AIDS, nos quais os mecanismos de defesa imunológica apresentam-se deficientes, 80 a 90% da microbiota fúngica nos indivíduos é constituída por *Candida albicans*, o restante é atribuído a outras espécies, sendo as mais comuns *C. glabrata* (9% a 15% dos casos) e a *C. tropicalis* (até 15% dos casos).<sup>23</sup> Esses indivíduos são mais susceptíveis à candidíase, inclusive à orofaríngea.<sup>24</sup> Além disso, dados epidemiológicos recentes sugerem o aumento da incidência de cepas de Cândida não-albicans com susceptibilidade reduzida a azoles, tornando a terapia profilática nos doentes imunocomprometidos, muitas vezes, crítica <sup>25</sup>.

Outras infecções orais podem ser causadas por diversos micro-organismos. Entre eles estão o *Staphylococcus aureus*, considerado o principal causador de infecções de feridas cirúrgicas em pacientes imunocomprometidos ou em pacientes com feridas associadas a corpos estranhos incluídos, sendo uma das principais causas de bacteremia em pacientes internados.<sup>26</sup> A espécie está relacionada a doenças como queilite angular e parotidite.<sup>5</sup> O estudo de Farmahan *et al.* (2014) verificou que *S. aureus* são bactérias com grande envolvimento em infecções dos espaços aéreos em região de cabeça e pescoço.<sup>27</sup> Além disso, há evidências que sugerem que os estafilococos podem ser frequentemente isolados da cavidade oral de grupos específicos de pacientes, como crianças, idosos e alguns grupos com doença sistêmica, como os doentes terminais e pacientes com artrite reumatoide.<sup>5</sup> Em relação ao *Enterococcus faecalis*, deve ser destacado que a espécie está envolvida em grande variedade de infecções nos humanos, inclusive em região oral.<sup>28</sup> Embora haja pouca associação do mesmo a infecções endodônticas primárias, o mesmo está relacionado à dificuldade de tratamento de infecções endodônticas, a lesões periapicais e necessidade de retratamento dos canais radiculares.<sup>6; 7</sup> A dificuldade de tratamento das infecções relacionadas a esse micro-organismo se deve a resistência a agentes antimicrobianos, aos seus fatores de virulência e à capacidade de sobrevivência quando expostos a estresse ambiental.<sup>29</sup>

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

A falta de eficácia dos agentes antimicrobianos para patologias diversas, associada aos efeitos adversos de antimicrobianos e resistência, despertam a atenção na busca de drogas mais efetivas.<sup>16</sup> Ao ser observada a necessidade de desenvolvimento de novas terapias medicamentosas, pesquisas com fitoterápicos estão sendo desenvolvidas para obtenção de fármacos mais seguros, eficientes, padronizados e, por vezes, com melhor custo benefício.<sup>9</sup>

Fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) obtidos a partir de plantas, e utilizados para o tratamento de várias doenças. Inúmeras são as vantagens para o uso terapêutico, como o baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda.<sup>11</sup> Além disso, o uso de plantas medicinais não está relacionado à resistência e em geral causam efeitos adversos de menor extensão e intensidade.<sup>30; 31</sup> Quanto à utilização de extratos vegetais, não é

raro que pesquisas que avaliam atividade antimicrobiana concluam que um determinado extrato vegetal obteve maior atividade do que um composto isolado, o que pode ser explicado por interações benéficas entre fitocompostos.<sup>32</sup> Além deste fato, no Brasil, as plantas medicinais são um importante alicerce para a medicina popular<sup>15</sup> e soma-se a isso uma necessidade de se ampliar os estudos sobre fitoterapia e plantas medicinais.<sup>12</sup>

### 2.2.1 Plantas medicinais do Semiárido brasileiro

A Caatinga brasileira é marcada por uma seca acentuada e suas plantas têm a capacidade de desenvolver características químicas únicas, o que resulta em uma excelente fonte de bioativos e compostos antibacterianos. De fato, muitas plantas da Caatinga são usadas na medicina tradicional. Algumas espécies são típicas ou adaptadas ao semiárido brasileiro como por exemplo a *Anadenanthera Colubrina* (Vell.) Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L., focos deste estudo.<sup>33</sup>

#### 2.2.1.1 *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, conhecida no Nordeste do Brasil como "angico" ou "angico-branco", pertence à família Fabaceae e é amplamente distribuída na Caatinga, bioma do semiárido brasileiro. Possui altura de 12 a 15 metros, com tronco de 30 a 50 cm de diâmetro, suas flores são de cor branca.<sup>34</sup> É uma das espécies botânicas com propriedades medicinais mais citadas pela população que mora nas proximidades, onde a espécie é endêmica.<sup>35</sup>

Figura 1 – *A. colubrina* (Vell.) Brenan



Fonte: [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan8.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan8.html)

Figura 2- Flores de *A. colubrina* (Vell.) Brenan



Fonte : Siqueira Filho (2012)

Essa espécie tem sido usada na medicina tradicional para tratar desordens respiratórias e inflamações,<sup>36; 37</sup> além de destacarem o angico como depurativo, adstringente e homeostático.<sup>37</sup> Ao analisar o potencial antifúngico de diversas plantas, outros autores verificaram que o extrato obtido a partir da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foi o mais ativo, que contava com polifenóis (taninos) como substâncias ativas, capazes de formar complexos com proteínas e polissacarídeos e de inativar enzimas essenciais para o crescimento de fungos.<sup>38</sup>

#### 2.2.1.2 *Libidibia ferrea*

A *Libidibia ferrea*, espécie da família Leguminosae-Caesalpinioideae, anteriormente chamada de *Caesalpinia ferrea* Mart até o ano de 2009, quando foi reclassificada para *Libidibia ferrea*. A árvore cresce até 15 m e seu tronco é tipicamente curto, com 40 a 60 cm de diâmetro. As folhas são bipinadas compostas, com 15 a 19 cm de comprimento e suas flores são amarelas brilhantes, típicas das Caesalpinioideae, onde aparecem inflorescências terminais ou axilares. As sementes são castanhas escuras, duras e contidas em uma vara plana.<sup>34</sup>

Figura 3 - *Libidibia ferrea*.



É popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, comumente encontrada na Caatinga e bastante utilizada para fins medicinais. A literatura reporta que infusões de *L.ferrea* são usadas com finalidades anti-inflamatórias.<sup>39</sup> Outros estudiosos avaliaram

demonstraram atividade antimicrobiana do extrato de frutos da *Libidibia ferrea*, que inibiu o crescimento *in vitro* de patógenos em modelos de biofilme de patógenos orais.<sup>40</sup> Ademais, o extrato bruto hidro alcoólico dos frutos da *L.ferrea* demonstrou atividades antimicrobianas contra várias cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas multirresistentes<sup>33</sup>. Atividade bacteriana, moderada, do extrato aquoso das cascas do tronco desta espécie frente ao *Enterococcus faecalis* também foi encontrada.<sup>41</sup>

Em relação à atividade antifúngica, foi verificada a relevante atividade antimicrobiana dos extrato bruto aquoso e hidro alcoólico (50%) da casca do tronco contra fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*, responsáveis por doenças dermatológicas.<sup>42; 43</sup> Pesquisas demonstraram também a atividade antiproliferativa, apoptótica e antioxidante do extrato bruto dos frutos dessa espécie em células provenientes do câncer colorretal e identificaram atividades anticancerígenas importantes, inibindo o processo da carcinogênese em câncer colorretal.<sup>43</sup> Ainda no âmbito das propriedades anticarcinogênicas, Ohira *et al.*(2013) isolaram duas chalconas diméricas chamadas Pauferrol B e Pauferrol C do extrato de partes do tronco, que apresentaram potente atividade de inibição contra a DNA Topoisomerase II humana via a indução a apoptose das células da leucemia promielocítica humana (HL-60).<sup>44</sup> Já a calchona trimérica Pauferrol A, foi associada à atividade hipoglicemiante em ratos. <sup>45</sup>

Outros pesquisadores avaliaram a necessidade de caracterizar e quantificar os compostos do extrato etanólico bruto da *L.ferrea* e verificar a mutagenicidade do extrato. Na análise fitoquímica, foram encontrados de forma predominante taninos hidrolisáveis (principalmente ácido gálico) e ácido elágico e não houve atividade mutagênica associada ao extrato no estudo.<sup>46</sup> O estudo de Araújo *et al.* (2014) sugere que devido a presença de ácido gálico e catequinas, são encontradas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e analgésicas nesta espécie.<sup>41</sup>

### 2.2.1.3 *Lippia grata* Schauer

O gênero *Lippia* (Verbanaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de plantas, distribuídas em áreas tropicais do continente africano, América do Sul e América Central.<sup>47</sup> Este gênero tem sido demonstrado em variados trabalhos científicos pelo uso na medicina e seus efeitos farmacológicos como: sedativos, analgésicos e anti-inflamatórios.<sup>47; 48</sup>

A espécie *Lippia grata* Schauer é um arbusto nativo do Nordeste do Brasil, que é utilizado na medicina popular para dor e inflamação.<sup>49</sup> Com nomes populares como Alecrim de tabuleiro ou Alecrim de chapada, essa espécie é pouco estudada no aspecto químico e farmacológico se comparada às outras espécies de *Lippia*. Recentemente, pesquisadores demonstraram que o óleo essencial da folha da *Lippia grata* é rico em terpenos e produzem analgesia em região orofacial.<sup>50; 51</sup>

Figura 4 - *Lippia grata* Shauer.



#### 2.2.1.4 Myracrodruon urundeuva

A espécie *Myracrodruon urundeuva*, popularmente conhecida como "aroeira do sertão" é uma planta medicinal encontrada geralmente na Região Nordeste do Brasil. Apresenta de 6 a 14 metros, tanto no cerrado quanto na caatinga, com tronco de 50 a 80 cm de diâmetro.<sup>34</sup> Ela é tradicionalmente usada para tratamento de doenças gengivais e desordens ginecológicas.<sup>52; 53</sup> A aroeira do sertão é apontada como anti-inflamatória e cicatrizante no tratamento de ferimentos, gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites e hemorroidas.<sup>54</sup> Cartaxo, Souza e Albuquerque (2010) realizaram um levantamento etnobotânico de plantas com propriedades medicinais do semiárido do Nordeste brasileiro e, no estudo, os residentes dessa região indicaram a aroeira-do-sertão como terapêutico para infecções em geral, dor de cabeça, dor de dente, antisséptico e inflamação utilizando diversas partes da planta.<sup>15</sup>

Estudos químicos confirmaram a predominância de chalconas e de taninos na casca da aroeira.<sup>55; 56; 57</sup> Outros estudiosos também demonstraram que uma fração da casca do caule dessa planta apresentou efeitos anti-inflamatórios e antiulcerativos em ratos, em parte devido à sua ação antioxidante, proveniente da presença de polifenóis, incluindo taninos.<sup>55</sup>

Figura 5 - Espécie *M. urundeuva*.



Figura 6 - Flores da *M.urundeuva*



Fonte: (Maia-Silva *et al.*, 2012)

Um estudo de revisão sistemática teve como conclusão que o gel formulado com *Myracrodruon urundeuva* e *Lippia sidoides* apresentaram forte eficácia na proteção do periodonto com diminuição da destruição óssea por periodontite induzida em ratos.<sup>58</sup>

Em relação à atividade antimicrobiana, diversas pesquisas apontam que a espécie possui atividade biológica. Em um dos estudos foi identificado efeito antimicrobiano moderado do óleo essencial das folhas da *M.urundeuva* frente às espécies de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella Enteritidis*. Além do que, testes de citotoxicidade *in vitro* mostraram que o óleo não é tóxico e possui uma ligeira atividade antitumoral.<sup>59</sup> No estudo de Alves *et al.* (2009), esta espécie de planta obteve atividades antimicrobianas contra *S. mutans*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.<sup>60</sup> O estudo de Oliveira *et al.* (2017) demonstrou atividade antifúngica relevante do extrato etanólico da casca do caule da *M.urundeuva* em espécies de *Candida albicans*, entretanto, não houve atividade antifúngica em espécies de *Candida glabrata*. Nessa mesma pesquisa, os extratos etanólicos da casca e das folhas não apresentaram mutagênica e genotoxicidade, mas, em teste com ratos demonstraram ser citotóxicos e tóxicos. Todavia, esta pesquisa mostrou baixa toxicidade para macrófagos e eritrócitos humanos.<sup>61</sup>

#### 2.2.1.5 *Albizia polycephala* (Benth) Killip.

Da família Fabaceae e subfamília Mimosoideae, a *Albizia polycephala* (Benth) Killip., de nome popular angico monjolo, é encontrada geralmente em domínios fitogeográficos do Cerrado e Caatinga nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Espírito Santo, além das florestas latifoliadas da Bacia do Paraná. As árvores maiores atingem cerca de 25 m de altura e 0,60m de diâmetro à altura do peito na idade adulta. Apresenta tronco reto e acinzentado.<sup>62; 34</sup>

Figura 7: *Albizia polycephala* (Benth) Killip



Para a espécie *Albizia polycephala* (Benth) Killip, há escassos relatos na literatura sobre sua composição química e atividade farmacológica, bem como de outras atividades, incluindo a antimicrobiana, no entanto estudos de outras espécies do gênero *Albizia*, demonstraram atividades antimicrobianas contra *S.mutans*<sup>63; 64</sup> e *S.aureus*<sup>65</sup>.

#### 2.2.1.6 *Ximenia americana* L.

A *Ximenia americana*, da família Olacaceae, é uma planta encontrada em abundância na região da África Ocidental.<sup>66</sup> Todavia, é bem adaptada e encontrada em regiões do semiárido Nordestino e é conhecida popularmente como ameixa-domato e utilizada para fins medicinais.<sup>67</sup>

Figura 8 - *Ximenia americana* L.

Fonte: [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Ameixa/ximeniaamericana12.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Ameixa/ximeniaamericana12.html)

Moradores das comunidades rurais do município de Oeiras, semiárido piauiense, relatam que utilizam a casca do tronco dessa espécie para usos medicinais variados. Foram citados o uso com finalidade anti-inflamatória, cicatrizante, uso abortivo e para tratar de doenças como anemia, úlcera, câncer, infecção urinária, gastrite, queimaduras e desordens no trato gastrointestinal.<sup>68</sup> Em um estudo etnofarmacológico sobre as plantas medicinais vendidas nos mercados públicos do Nordeste brasileiro, foi relatado que as cascas e raízes da *Ximenia americana* L. são usadas para tratar a tosse, rouquidão, quadros de constipação, doenças sexualmente transmissíveis e osteoporose.<sup>69</sup> No continente africano a planta é bastante utilizada e, na Guiné-Bissau, por exemplo, a decocção das folhas é usada em tratamentos para tosse e como laxante. Já na Costa do Marfim a planta também é utilizada para tratar lesões na cavidade oral, doenças reumáticas e diarreia.<sup>70</sup>

Estudiosos sudaneses também avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas, casca do tronco e raízes da *X. americana* L. e o extrato bruto da raiz mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.<sup>71; 72</sup> Pesquisadores da Guiné-Bissau obtiveram resultados relevantes com o extrato metanólico da folha da *X. americana* L. contra *Candida albicans*.<sup>73</sup>

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade *in vitro* dos extratos brutos das espécies *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

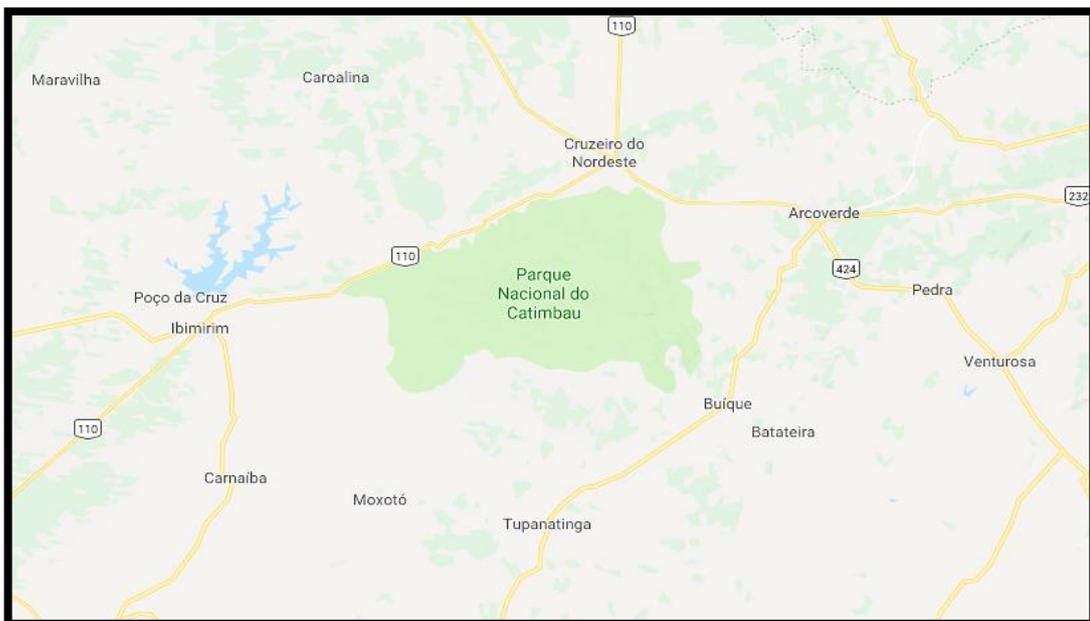
- Coletar as espécies e preparar o extrato bruto das plantas *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L.
- Verificar a atividade antimicrobiana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos das espécies *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L. frente às espécies de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *S. mutans* e às leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*;
- Determinar a toxicidade, através da Concentração Letal Mediana (CL50), dos extratos brutos da *M. urundeuva*, *A. colubrina* (Vell.) Brenan, *L. grata* Shauer, *X. americana*, *L.ferrea* e *A. polycephala* (Benth) Killip sobre os náuplios da espécie *Artemia salina* L.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram realizados no período de janeiro a dezembro de 2017, no LAPETOX (Laboratório de Pesquisas Toxicológicas) e no Departamento de Antibióticos (DANTI-UFPE), localizados na Universidade Federal de Pernambuco, na Cidade Universitária, Recife-PE. *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L. foram coletadas na região do semiárido, no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), localizado no Estado de Pernambuco, no Nordeste brasileiro.

Figura 9 - Mapa da região do PARNA do Catimbau



Fonte: <https://www.google.com.br/maps/@-8.5491167,-37.4466135,10z>

O material vegetal foi examinado e extraído sem sinais aparentes de degradação e contaminação por fungos, de acordo com o manual de boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de cascas<sup>74</sup>. Posteriormente, as espécies foram identificadas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e suas exsicatas tombadas no herbário do IPA- Dárdano de Andrade Lima. Os números de tombamento constam nos Anexos (A ao E)

Figura 10 - Coordenadas, período de coleta, número de tombamento e botânicos identificadores das espécies

<b>Espécies</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Períodos de Coleta</b>	<b>Número de Tombo</b>	<b>Identificada por</b>
<i>A.colubrina</i> (Vell) Brenan	<b>8°34'10.1"S</b> <b>37°14'38.5"W</b>	<b>Novembro/2016</b>	<b>91442</b>	<b>R. Pereira</b>
<i>M.urundeuva</i>	<b>8°33'13.1"S</b> <b>37°15'04.7"W</b>	<b>Novembro/2016</b>	<b>92517</b>	<b>O. Cano</b>
<i>Albizia policephala</i> (Benth) Killip.	<b>8°31'14.8"S</b> <b>37°14'28.0"W</b>	<b>Novembro/2016</b>	<b>91791</b>	<b>A. Bocage e F. Gallindo</b>
<i>L. grata</i> Shauer	<b>8°31'26.5"S</b> <b>37°14'28.8" W</b>	<b>Setembro/2017</b>	<b>91591</b>	<b>F. Gallindo</b>
<i>X.americana</i> L.	<b>8°31'25.3"S</b> <b>37°14'28.9"W</b>	<b>Setembro/2017</b>	<b>91787</b>	<b>O. Cano</b>
<i>L.ferrea</i> (Mart. ex Tul) L.P.Queiroz	<b>8°34'32.7"S</b> <b>37°14'48.5"W</b>	<b>Setembro/2017</b>	<b>91785</b>	<b>A. Bocage e F. Gallindo</b>

#### 4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

A preparação do extrato foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPE sob a supervisão e colaboração da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jane Sheila Higino. O método de extração foi realizado pela técnica de maceração a temperatura ambiente. Para obtenção do extrato bruto foram utilizadas amostras das cascas das espécies *Anadenanthera Colubrina* (vell). Brenan, *Libidibia ferrea*, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L. que foram previamente trituradas e homogeneizadas. Para a espécie *L. grata* Shauer foram utilizadas as partes aéreas. Os materiais vegetais foram colocados para secar à sombra em temperatura ambiente durante 24 horas e em seguida foram colocados na estufa a 33<sup>o</sup> C durante uma semana, sendo posteriormente triturados a pó em um moinho de facas com a abertura da malha de tamanho médio. Após serem triturados a pó, foi adicionado o álcool etílico absoluto (99,5%) para o processo de extração pelo método de maceração em um período de duas semanas a fim de obter-se o extrato bruto por filtração. Em seguida, o extrato foi colocado no evaporador rotativo, modelo (MA 120 – Marconi), e foi submetido a uma temperatura em média de 40°C até a secura total ou parcial. Após esta etapa, foram obtidos extratos secos de todas as espécies de plantas, com exceção do extrato da

espécie *Lippia grata* Shauer que foi pilular. Posteriormente, os mesmos foram divididos para os testes microbiológicos e pesados para a obtenção de uma solução mãe de 40 mg/mL.<sup>16</sup>

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Antibióticos da UFPE sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Manoella de Souza Lima em conjunto com a equipe de técnicos deste laboratório. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram testados seis isolados clínicos das espécies das bactérias: *Staphyococcus aureus* (02-UFPEDA), *Enterococcus faecalis* (69-UFPEDA) e *Streptococcus mutans* (766-UFPEDA) e leveduras: *Candida albicans* (1002-UFPEDA), *Candida glabrata* (6392-UFPEDA), *Candida tropicalis* (6947-UFPEDA).

Foram utilizados como meio de cultura o meio Mueller Hinton (KASVI, Itália) para manutenção das bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*. Para o *S. mutans* foi utilizado o Meio Broth Heart Infusion (KASVI, Itália) e Meio Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai) para a manutenção das leveduras.

Na etapa de preparação do inóculo, foram selecionadas colônias isoladas de cultura jovem (24 horas de cultivo para bactérias e 48 horas para leveduras) e com auxílio de uma alça de transferência, as cepas foram imergidas em 5 mL de solução salina (NaCl a 0,9%). A turvação do inóculo foi comparada visualmente ao tubo padrão de 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) sendo, posteriormente, realizada a leitura no espectrofotômetro (Biospectro SP-220) com comprimento de onda de 625 nm para bactérias e 530 nm para leveduras.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foi realizado o teste para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a sensibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos é representada pela (CIM). Esse índice corresponde à menor concentração do agente capaz de inibir o desenvolvimento visível do micro-organismo.

Dessa maneira, a metodologia usada para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das plantas foi a difusão por poço. Essa metodologia é utilizada na Coleção de Micro-organismos do Departamento de

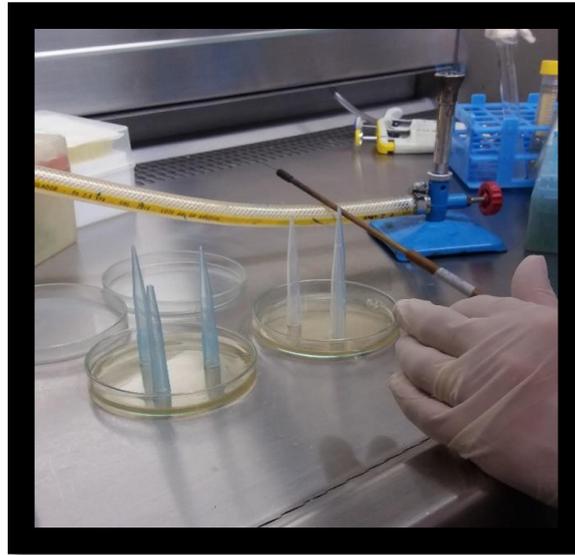
Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco para soluções e extratos vegetais que possuem dificuldade de difusão ou precipitam em meios de cultura em caldo, similar a metodologia realizada por Okeke, *et al.*(2001)<sup>75</sup> . Foram seguidas as recomendações do protocolo M02-A12 do Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), de forma adaptada.<sup>76</sup>

Em uma primeira etapa do teste foram utilizadas placas de Petri, nas quais foram vertidos um volume de 8 mL do meio ágar nutriente, a fim de formar uma superfície para a colocação de 6 ponteiras. Após a distribuição das ponteiras, foram dispensados 13uL do inóculo preparado na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ mL em tubos tipo falcon estéreis, os quais foram homogeneizados com 11,7 mL do meio semissólido Mueller Hinton (Himedia Laboratories, Mumbai) para bactérias, para que no final houvesse uma a concentração final do inóculo de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL. Para o teste com leveduras, foi utilizado o meio semissólido Mueller Hinton (Himedia Laboratories, Mumbai) adicionado a 2% de glicose + azul de metileno com uma concentração final do inóculo de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL.

Em seguida, os inóculos de cada espécie foram homogeneizados com os meios de cultura e vertidos nas placas de Petri correspondentes. Mais adiante, as ponteiras foram removidas, o que resultou em 6 poços na placa, correspondentes aos poços onde foram adicionados 25 µL dos extratos, nas concentrações dos extratos de 1000 µg/mL a 62,5µg/mL.

No meio da placa foi confeccionado um poço para o controle dos solventes de cada extrato. Para o controle positivo foram utilizadas as drogas Anfotericina B (1 µg/ mL) para leveduras e Gentamicina (4 µg/ mL) para bactérias. Todos os testes foram realizados em duplicata. Depois dessas etapas, as placas dos testes foram incubadas em uma estufa na temperatura de  $37 \pm 1$  C°, durante 24 horas para bactérias e  $30 \pm 1$  C°, durante 48 horas para leveduras.

Figura 11 - Teste de atividade microbiana:  
Placa de Petri com ponteiras e com orifícios  
para extratos.



Após o tempo de incubação, os resultados do teste de atividade antimicrobiana foram obtidos através da observação do halo de exibição formado, sendo verificadas as concentrações inibitórias mínimas de cada extrato, ou seja, as menores concentrações de cada extrato que foram capazes de inibir o crescimento microbiano.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS FRENTE AOS NÁUPLIOS DA ARTEMIA SALINA L.

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade através de *Artemia salina* L. foi baseada em Meyer *et al.* (1982); Araújo e Nascimento (1992) e normas do LAPETOX-UFPE <sup>77; 78; 79 80</sup>. Este método é considerado um pré-teste eficaz para testar a toxicidade de extratos vegetais com a vantagem de ser simples e barato e realizado em um tempo relativamente curto para testar vários tipos de extratos ao mesmo tempo. Grande quantidade de estudos em todo mundo utilizam o método e seus resultados correlacionam-se com os testes mais específicos para análise de toxicidade. <sup>81; 82; 83; 84; 85; 86</sup>

Na etapa da incubação, em um recipiente retangular de 11,0 x 8,0 x 3,0 cm, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura espaçados por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados 150 mL de

água do mar. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada incandescente de 40 w. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 35 mg de cistos de *Artemia salina* L., de forma que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia salina* L. foi coberto com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. Tal procedimento visa uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste. A incubação foi realizada por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, os ovos foram eclodidos e os organismos-testes (náuplios de *A.salina* L.) foram expostos às drogas de interesse por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio nos quais foram colocados, em cada, 10 náuplios de *Artemia salina* L., previamente selecionados. Os testes foram realizados em duplicata para cada concentração de cada composto.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada situada entre a maior concentração com 0% de mortalidade e a menor concentração com 100% de mortalidade dos nauplios. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite, de modo a obter a CL50 (concentração letal para 50% da população) do extrato testado.

As soluções dos extratos da *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L. foram preparadas em água do mar, com exceção da espécie *L.grata*, pois além da referida foi adicionada ao Twin 80 para uma re-suspensão adequada do extrato de modo que a concentração de modo que a concentração do Twin 80 resultou em 1%. O extrato da *A. colubrina* não foi testado para toxicidade, pois o mesmo não obteve resultados no teste de atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Os controles negativos foram estabelecidos para a confirmação de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* L. resultou da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação.<sup>87</sup>

Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem de náuplios vivos e mortos, e foram considerados vivos todos aqueles que apresentaram movimentação quando observados próximos a uma fonte luminosa. Foram considerados válidos os

testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico com utilização da análise Probit, pelo programa IBM SPSS Statistics v20, com intervalo de confiança de 95%, o que permitiu determinar os valores da CL50.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, para o teste de atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de difusão em ágar, pois durante ensaios preliminares, comparado com o método de microdiluição em caldo, houve maior difusão dos extratos e menor precipitação. Essas variações em extratos de plantas podem estar relacionadas à técnica aplicada, ao micro-organismo ou sua cepa, como também à origem da planta, época da coleta, da forma de obtenção do extrato bruto e da quantidade testada. Desta maneira, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.<sup>88</sup> Como alternativa para convencionar os testes, são usadas as farmacopeias de cada país e também guias como o da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ou ainda do EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) adaptados.<sup>89</sup>

### 5.1 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Do total de 3 cepas de bactérias: *S. aureus* (UFPEDA-02), *E. faecalis* (UFPEDA-69) e *S. mutans* (UFPEDA-766) e 3 cepas de leveduras: *C. albicans* (UFPEDA-1007), *C. glabrata* (6392-UFPEDA) e *Candida tropicalis* (UFPEDA-6947), todas foram sensíveis a pelo menos um dos extratos testados, com exceção do extrato bruto da casca da *A. colubrina* (Vell) Brenan, pois, o mesmo não expressou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas em nenhuma das cepas avaliadas. A espécie *Candida tropicalis* (UFPEDA-6947) não foi sensível a nenhum extrato dentre os avaliados.

### 5.1.1 Atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Libidibia ferrea*

Figura 12 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de *L. ferrea* em *S.aureus* - duplicata.

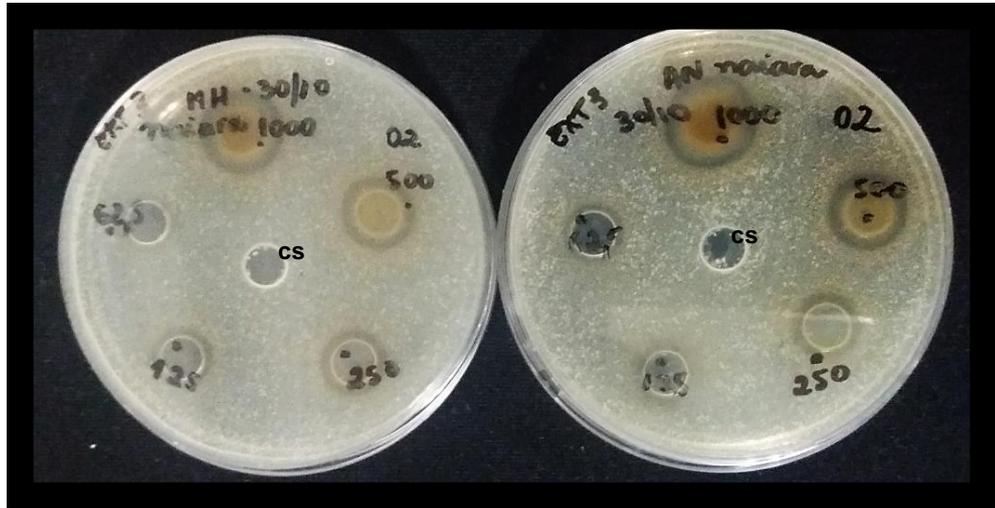


Figura 13 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *L. ferrea* em *E. faecalis* - duplicata.



Figura 14 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *L. ferrea* em *C. albicans* - duplicata.

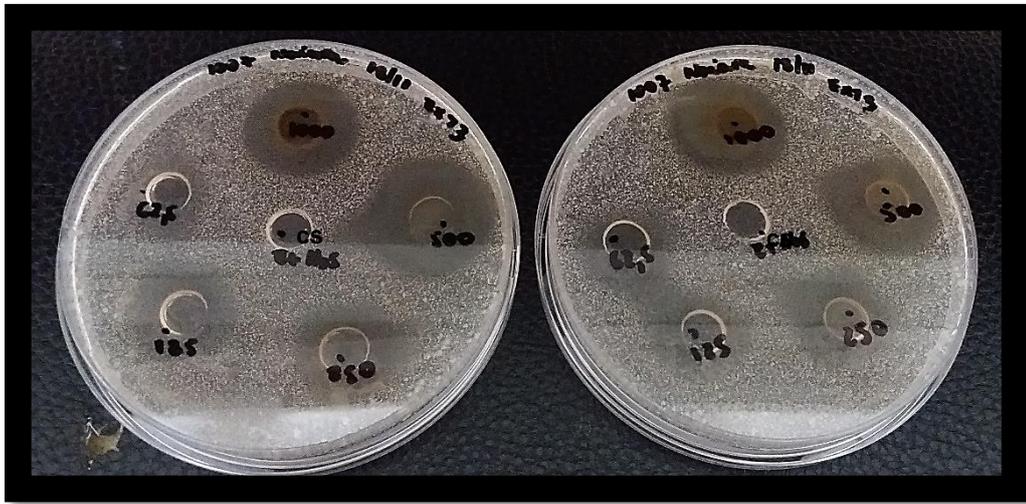


Figura 15- Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *L. ferrea* em *C. glabrata* - duplicata.



### 5.1.2 Atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Lippia grata* Shauer

Figura 16 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de *L. grata* em *S. aureus* - duplicata.

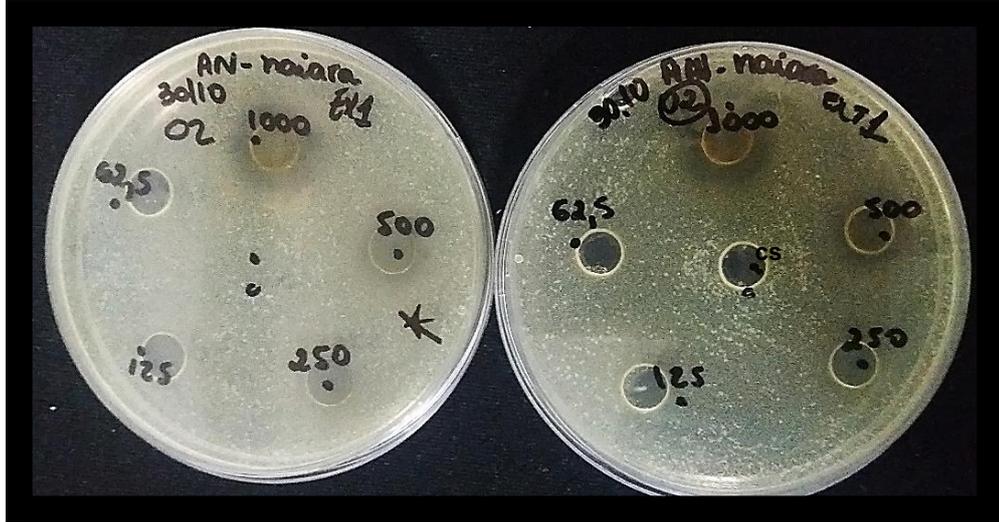


Figura 17 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *L. grata* em *S. mutans* - duplicata.



### 5.1.3 Atividade antimicrobiana do extrato bruto da *M. urundeuva* Alemão

Figura 18 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *M. urundeuva* em *S. aureus* - duplicata.



Figura 19 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *M. urundeuva* em *E. faecalis* - duplicata.



Figura 20 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *M. urundeuva* em *C. albicans* - duplicata.



#### 5.1.4 Atividade antimicrobiana do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip

Figura 21- Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip em *S. aureus* - duplicata.



Figura 22 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip em *E. faecalis* - duplicata.



Figura 23 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip em *C. albicans* - duplicata.



### 5.1.5 Atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Ximenia Americana* L.

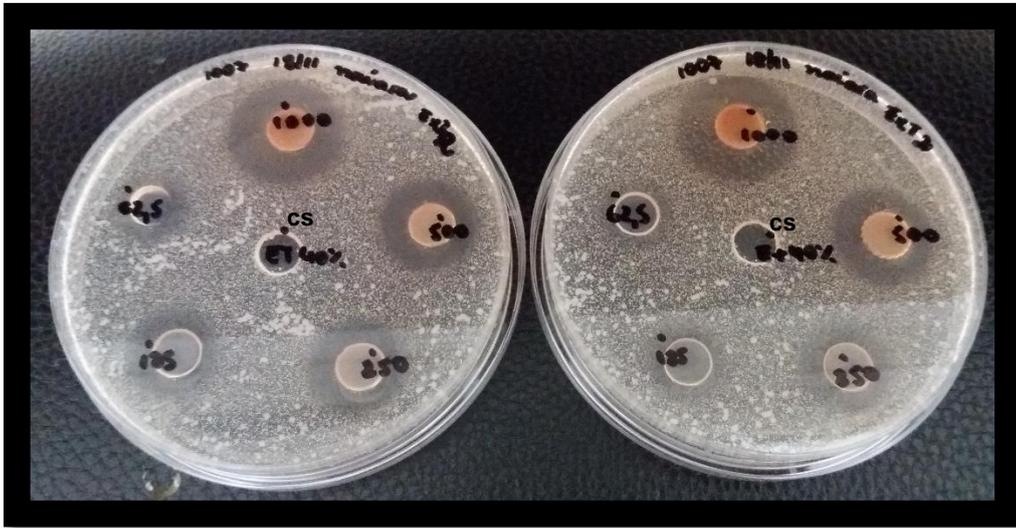
Figura 24 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto de *X. americana* L. em *S. aureus* - duplicata.



Figura 25 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *X. americana* L. em *E. faecalis* - duplicata.



Figura 26 - Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *X. americana* L. em *C. albicans* - duplicata.



## 5.2 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM)

Uma variedade de micro-organismos causam doenças e danos aos seres humanos, entretanto, há atualmente uma preocupação com a resistência aos medicamentos devido ao uso inadequado dos antibióticos,<sup>90</sup> tornando as plantas e fitoterápicos uma alternativa, cujo uso popular é milenar e se tornou fonte de pesquisa para estudiosos no mundo.<sup>91</sup> Este estudo buscou responder, em parte, à atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais brutos.

Para avaliarmos a atividade antimicrobiana destes extratos alguns autores classificam o grau de atividade dos extratos vegetais onde os mesmos são considerados com bom potencial inibitório se demonstrarem atividade em concentrações de até 100 µg/mL, atividade inibitória moderada de 100-500 µg/mL, atividade fraca de 500-1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL. No entanto, geralmente, a avaliação da atividade antimicrobiana é classificada de forma a considerar se os micro-organismos testados são resistentes ou sensíveis a determinado agente antimicrobiano.<sup>92; 93; 94</sup>

Dentre os resultados dos testes de atividade antimicrobiana, os micro-organismos que necessitaram de menores concentrações dos extratos para serem

inibidos foram os *S. aureus* com CIM de 125 µg/mL para os extratos brutos de *L. ferrea*, *M. urundeuva* e *X. americana* L. e a *Candida albicans* com CIM de 62,5 µg/mL para os mesmos extratos brutos citados anteriormente. O extrato que obteve melhor resultado para *E. faecalis* foi o extrato bruto da *X. americana* L. com CIM de 250 µg/mL e o extrato que obteve melhor atividade para *S. mutans* foi o extrato bruto da *L. grata* Shauer com CIM de 125 µg/mL.

CIM(µg/mL)		<i>A.colubrina</i>	<i>L.ferrea</i>	<i>L.grata</i>	<i>M.urundeuva</i>	<i>A.polycephala</i>	<i>X.americana</i> L.
Extratos brutos das plantas		Casca	Casca	Folhas\ partes aéreas	Casca	Casca	Casca
CEPAS	<i>S. aureus</i> (02UFPEDA)	R*	125 µg/mL	500 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL
	<i>E. faecalis</i> (69UFPEDA)	R*	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
	<i>S. mutans</i> (766UFPEDA)	R*	R*	125 µg/mL	R*	1000 µg/mL	R*
	<i>C. albicans</i> (1007UFPEDA)	R*	62,5 µg/mL	1000 µg/mL	62,5 µg/mL	250 µg/mL	62,5 µg/mL
	<i>C. glabrata</i> (6392UFPEDA)	R*	125 µg/mL	R*	R*	1000 µg/mL	R*
	<i>C. tropicalis</i> (6947 UFPEDA)	R*	R*	R*	R*	R*	R*

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos em µg/mL

\*Obs: R- Espécies resistentes nas concentrações até 1000 µg/mL

O extrato bruto da *L. grata* Shauer demonstrou atividade para *S. aureus* (CMI= 500 µg/mL) e o seu melhor resultado foi para *S. mutans* na concentração de 125 µg/mL. Esse resultado é inédito na literatura, pois não há relatos sobre a atividade antimicrobiana dessa espécie.<sup>50</sup> Entretanto, foi necessária uma concentração maior para inibir o crescimento do *E. faecalis* e *C.albicans* (CIM=1000 µg/mL). Embora não

haja muitos relatos sobre a espécie *L. grata* Shauer, existem estudos com outras espécies do gênero *Lippia* que apresentam uma série de resultados satisfatórios em relação a atividades antimicrobianas na literatura.<sup>47</sup> A espécie *Lippia adoensis* var. *adoensis*, por exemplo, demonstrou atividade contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans* (com CIM de 256 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL) respectivamente <sup>95</sup>, havendo ainda outros resultados promissores com as espécies de *Lippia alba* e *Lippia sidoides* contra o *S. mutans* apresentando CIM de 125 µg/mL do óleo essencial das folhas da *L. alba* e CIM de 62,5 µg/mL do o óleo essencial das folhas de *L. sidoides*.<sup>96</sup>

Ao analisar a atividade do extrato bruto da *M. urundeuva*, detectou-se que *S. aureus* e *E. faecalis* foram sensíveis a esse extrato, com CIM de 125 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. No entanto, o mesmo apresentou uma menor CIM (62,5 µg/mL) frente *C. albicans*. Ao confrontarmos o resultado inibitório para desse extrato com o estudo de Oliveira *et al.* (2017), foi possível verificar que na sua pesquisa também houve atividade antimicrobiana do extrato etanólico das cascas da *M. urundeuva* para *C. albicans*, com valores de CIM entre 16 µg/mL a 256 µg/mL, em 10 cepas de *C. albicans* avaliadas, Todavia, para *C. glabrata*, o extrato da *M. urundeuva* não obteve atividade , assim como neste estudo.<sup>61</sup>

Em outra pesquisa, realizada em 2015, na qual foi testada a atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, também houve um resultado satisfatório com o extrato hidroalcoólico das folhas da *M. urundeuva*, resultando em uma CIM de 125 µg/mL. Além disso, nesse mesmo estudo foram realizados testes com uma nanopartícula incorporada ao extrato, no qual a CIM foi reduzida para 15,62 µg/mL, o que sugere uma melhoria no resultado do extrato utilizando esta tecnologia.<sup>97</sup>

Em relação à planta *Albizia polycephala* (Benth) Killip, todos os micro-organismos testados foram sensíveis à espécie, com exceção da *C. tropicalis* que foi resistente. *S. aureus*, *E. faecalis*, *Candida albicans* foram sensíveis ao extrato bruto dessa planta e apresentaram CIM nos valores de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Contudo os resultados inibitórios para *S. mutans* e *C. glabrata* foram menos relevantes, com CIM de 1000 µg/mL para ambos. Para essa planta não existem muitos estudos na literatura sobre a atividade antimicrobiana, no entanto estudos de outras espécies do gênero *Albizia* demonstraram atividades antimicrobianas contra *S. mutans*<sup>63; 64</sup> e *S. aureus*<sup>65</sup>

Ao serem verificados os resultados do extrato bruto da *X. americana* L., percebeu-se que o *E. faecalis* foi mais sensível a esta espécie vegetal (CIM = 250 µg/mL), se compararmos com os outros extratos testados. Outras pesquisas também demonstraram atividade antimicrobiana da *X.americana* L. contra diversos micro-organismos, inclusive, *E. faecalis* <sup>70; 72; 98</sup>. Esse resultado se torna relevante, afinal, várias doenças são associadas ao *E. faecalis*, inclusive em região oral, como a associação da presença do micro-organismo ao insucesso do tratamento endodôntico.<sup>99; 100; 101</sup> Além dessa bactéria, *C. albicans* também foi associada a casos que necessitam de retratamento endodôntico<sup>99</sup> e, neste estudo, esta levedura também foi sensível ao extrato da *X.americana* L. (CMI = 62,5 µg/mL).

A atividade antimicrobiana da *X. americana* pode ser parcialmente atribuída a seus constituintes químicos, como os taninos, além da presença de polifenóis, indicativo de suas atividades anti-inflamatória, antialérgica, antibacteriana, antifúngica, além de seus efeitos vasoprotetores. <sup>102</sup>

Em outro estudo foi realizada a análise fitoquímica do extrato vegetal da casca do caule desta espécie e foram identificados vários compostos bioativos como alcaloides, antraquinonas, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos e terpenoides. <sup>66</sup>. Ademais, identificou-se que esse extrato obteve atividade antimicrobiana contra o *S. aureus*, corroborando com o presente estudo, pois o extrato bruto da casca do caule da *X. americana* L. expressou atividade moderada para *S. aureus* com uma CIM de 125 µg/mL.

Os taninos e flavonoides são, provavelmente um dos responsáveis pela resposta antimicrobiana deste extrato. O primeiro possui mecanismos de ação como inibição de enzimas microbianas extracelulares que podem prejudicar o desenvolvimento e multiplicação dos micro-organismos, também pode atuar na privação dos substratos e outros íons metálicos importantes para atividades fisiológicas dos micro-organismos, além da possível atuação da inibição da fosforilação oxidativa e por consequência não formação da Adenosina Trifosfato (ATP) para os mesmos, causando a morte desses. <sup>103</sup> Os flavonoides atuam promovendo absorção do ferro e vitaminas, agem como antioxidantes, além de possuírem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune.<sup>104</sup>

Segundo Fabry *et al.* (1998) os potenciais clínicos dos extratos brutos, como os do presente estudo, apresentam componentes que podem ter sinergia ou efeitos antagônicos.<sup>93</sup> Além disso, outros estudos sobre fitoterápicos demonstram que as atividades sinérgicas dos componentes dos extratos brutos são mais evidentes do que as frações ou componentes isolados<sup>105</sup>, o que demonstra a possibilidade de utilização desses extratos em outras etapas e análises complementares com testes fitoquímicos e estudos *in vivo*.

Avaliando de forma global, *C. tropicalis* foi o micro-organismo resistente a todas as concentrações testadas dos extratos, enquanto que *C. albicans* foi o micro-organismo mais sensível aos extratos brutos testados, ou seja, os extratos brutos da *L. ferrea*, *M. urundeuva* e *Ximenia americana* possuem boa atividade antifúngica contra essa levedura com uma CIM de 62,5 µg/mL, tornando-se interessante a verificação da toxicidade desses extratos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA L.

Para avaliar os valores da toxicidade através da CL50, consideramos que valores de CL50 >1000 µg/mL são considerados não tóxicos<sup>77</sup>. Valores entre 500 e 1000 µg/mL são considerados pouco tóxicos, aqueles entre 100 e 500 µg/mL como moderadamente tóxicos e aqueles com concentração <100 µg/mL como fortemente tóxicos.<sup>83</sup>

Dentre os resultados do teste para avaliação da CL50, o extrato que foi mais tóxico para os náuplios da *A. salina* L. foi o extrato bruto da *L. grata* Shauer, com a concentração letal mediana de 167,6 µg/mL e uma toxicidade moderada. O extrato que se apresentou menos tóxico para os náuplios na *A. salina* L. foram os extratos brutos da *Myracrodruon urundeuva* seguido do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip, com CL50 de 1203,0 µg/mL (não tóxico) e 801,7 µg/mL (pouco tóxico), respectivamente.

ESPÉCIES	PROBIT	95% Confidence Limits for Conc			95% Confidence Limits for log (Conc) <sup>a</sup>		
		Estimate (CL50)	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
<i>L. ferrea</i>	,500	324.8	254.9	396.3	2.512	2.406	2.598
<i>L. grata</i> Shauer	,500	167.6	136.8	202.9	2.224	2.136	2.307
<i>M.urundeuva</i>	,500	1203.0	770.2	2876.4	3.080	2.887	3.459
<i>A.polycephala</i> (Benth) Killip	,500	801.7	702.0	909.1	2.904	2.846	2.959
<i>X. americana</i>	,500	345.8	210.7	487.0	2.539	2.324	2.688

Tabela 2: Concentração letal mediana (CL50) dos extratos brutos em µg/MI

Logarítmo de base 10. Programa: IBM SPSS v 20 – Análise estatística Probit

Em relação aos extratos brutos da da *L. ferrea* e a *X. americana*, o resultado das CL50 foram de 324.8 µg/mL e 345.8 µg/mL, respectivamente, sendo considerados moderadamente tóxicos. No entanto, como a CIM desses extratos frente *C. albicans* foi de 62,5 µg/mL e de 125 µg/mL para *S.aureus*, observou-se uma margem de segurança, o que torna possível a utilização dos mesmos em testes in vivo para esses micro-organismos, tendo em vista que para inibi-los tivemos baixas Concentrações inibitórias.

## 5.4 ARTIGO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CL50 DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE ÀS ESPÉCIES CANDIDA ALBICANS, CANDIDA GLABRATA E CANDIDA TROPICALIS

#### RESUMO

É crescente o número de problemas associados às doenças infecciosas e resistência microbiana, tornando a descoberta de novos medicamentos essenciais. O presente estudo tem o objetivo de identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e toxicidade frente à *Artemia Salina* L. de plantas selecionadas de acordo com o uso tradicional em comunidades do semiárido nordestino brasileiro. Foram estudados Extratos brutos de cascas do tronco e parte aérea foram investigados para detecção da atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* e toxicidade frente à *Artemia salina* L. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de difusão em poço. Como resultados a *Ximenia americana* L., *Libidibia Ferrea* e *Myracrodrum urundeuva* obtiveram atividades antifúngicas frente à *Candida albicans* com Concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL. Para a *Candida glabrata*, o extrato que obteve atividade moderada foi o da *Libidibia ferrea*. (CIM = 125 µg/mL). Nenhum dos extratos obteve atividade antifúngica para a espécie *Candida tropicalis* nas concentrações testadas. No ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* L., o extrato menos tóxico foi o da *Myracrodrum urundeuva*, com uma CL50 de 1203 µg/mL, seguido do extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip com CL50 de 801,7 µg/mL (pouco tóxico). Desta maneira, o estudo revelou que plantas provenientes do semiárido do Nordeste brasileiro possuem atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*.

**Palavras chave:** Fitoterapia, Extratos vegetais, saúde Bucal, Microbiologia, *Candida*

## INTRODUÇÃO

A resistência aos medicamentos antifúngicos, incluindo espécies resistentes a multidrogas, torna-se cada vez mais importante para a escolha das medicações e gerenciamento do tratamento das infecções fúngicas, pois elas estão associadas a alta morbidade e mortalidade.<sup>13; 106</sup>

Em indivíduos portadores de doenças imunossupressoras como câncer e AIDS, nos quais, os mecanismos de defesa imunológica apresentam-se deficientes, 80 a 90% da microbiota fúngica nos indivíduos é constituída por *Candida albicans*, o restante é atribuído a outras espécies, sendo as mais comuns *C. glabrata* (9% a 15% dos casos) e a *C. tropicalis* (até 15% dos casos).<sup>23</sup> Esses indivíduos são mais susceptíveis à candidíase, inclusive à orofaríngea.<sup>24</sup> Este fato está associado à necessidade que esses pacientes, muitas vezes, precisam de um tratamento por longo período, facilitando a resistência aos derivados azólicos.<sup>107; 108</sup> A *C. albicans* é normalmente um fungo comensal que coloniza a saliva e a mucosa oral, entretanto pode se tornar patogênica em condições específicas.<sup>22</sup> Os pacientes diabéticos também demonstram ser até 4 vezes mais suscetíveis a desenvolverem candidíase oral do que não diabéticos.<sup>109</sup> Além disso, a espécie *Candida albicans* pode estar, também, relacionada com biofilme dental e evolução da cárie, bem como estar associada com a candidíase orofaríngea já citada anteriormente.<sup>4; 20; 21</sup> Dados epidemiológicos recentes sugerem o aumento da incidência de cepas de *Cândida* não-*albicans* com susceptibilidade reduzida a azoles, tornando a terapia profilática nos doentes imunocomprometidos, muitas vezes, crítica.<sup>2; 25</sup> Ademais, recentes pesquisas sugerem que mutações genéticas podem facilitar à resistência à *C. glabrata*, especificamente.<sup>110; 111</sup>

Ao ser observada a necessidade de desenvolvimento de novas terapias medicamentosas, pesquisas com fitoterápicos estão sendo concretizadas para obtenção de fármacos mais seguros, eficientes, padronizados e, por vezes, com melhor custo benefício.<sup>9</sup>

No Brasil, as plantas medicinais são um importante alicerce para a medicina popular.<sup>15</sup> Dessa maneira, medicamentos à base de plantas têm sido reconhecidos como um recurso valioso para os cuidados primários em saúde. Ademais, a OMS apoia pesquisas sobre a utilização de plantas medicinais, com a finalidade de se obter

um uso racional e adequado desses produtos.<sup>10</sup> À vista disso, o presente estudo propôs a avaliar a atividade antimicrobiana e toxicidade dos extratos brutos das plantas *Albizia polycephala* (Benth) Killip, *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva* e *Ximenia americana* L., espécies típicas ou adaptadas ao semiárido brasileiro, frente ao gênero *Candida*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período compreendido de janeiro a dezembro de 2017, no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas e no Departamento de Antibióticos (DANTI), localizados na Universidade Federal de Pernambuco, na Cidade Universitária, Recife-PE. As espécies *Myracrodruon urundeuva*, *Ximenia americana* L., *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer e *Albizia polycephala* (Benth) Killip no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), localizado no Estado de Pernambuco, no Nordeste brasileiro.

### Confecção do extrato

O material vegetal foi examinado e extraído sem sinais aparentes de degradação e contaminação por fungos, de acordo com o manual de boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de cascas<sup>74</sup>. As plantas foram identificadas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e exsiccatas foram tombadas no herbário do IPA - Dárdano de Andrade Lima.

O método de extração para a confecção dos extratos brutos foi realizado por maceração a temperatura ambiente. Para obtenção do extrato bruto foram utilizadas amostras das cascas das espécies *M. urundeuva*, *A. polycephala* (Benth) Killip, *X. americana* L., *L. ferrea* as quais foram previamente trituradas e homogeneizadas e posteriormente colocadas para secar à sombra em temperatura ambiente durante 24 horas. Para a espécie *L. grata* Shauer partes aéreas da planta foram utilizadas. Em seguida foram colocadas na estufa a 33<sup>o</sup> C durante uma semana triturados a pó em um moinho de facas com a abertura da malha de tamanho médio, em sequência, após serem triturados a pó, foi adicionado o álcool etílico absoluto (99,5%) para a extração. O processo de maceração foi realizado por duas semanas a fim de obter-se o extrato bruto por filtração. subseqüentemente, os extratos foram colocados no evaporador rotativo, modelo MA 120 da marca Marconi, com a temperatura em média de 40°C.

Foram obtidos extratos secos com exceção da *L. grata* Shauer, espécie a qual foi obtido o extrato pilular. Posteriormente os extratos foram divididos para os testes microbiológicos e pesados para a obtenção de uma solução mãe de 40 µg/mL.<sup>16</sup>

Figura 1 - Coordenadas, período de coleta, número de tombamento e botânicos identificadores das espécies

Espécies	Coordenadas	Períodos de Coleta	Número de Tombo	Identificada por
<i>M. urundeuva</i>	8°33'13.1"S 37°15'04.7"W	Novembro/2016	92517	O. Cano
<i>A. polycephala</i> (Benth) Killip	8°31'14.8"S 37°14'28.0"W	Novembro/2016	91791	A. Bocage e F. Gallindo
<i>L. grata</i> Shauer	8°31'26.5"S 37°14'28.8" W	Setembro/2017	91591	F. Gallindo
<i>X. americana</i> L.	8°31'25.3"S 37°14'28.9"W	Setembro/2017	91787	O. Cano
<i>L. ferrea</i>	8°34'32.7"S 37°14'48.5"W	Setembro/2017	91785	A. Bocage e F. Gallindo

#### Micro-organismos:

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram testados três isolados clínicos das espécies das leveduras: *Candida albicans* (1002-UFPEDA) e *Candida glabrata* (6392-UFPEDA) e *Candida tropicalis* (6947-UFPEDA). Para manutenção das leveduras foi utilizado o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose ((Himedia Laboratories, Mumbai)<sup>76</sup> Na etapa de preparação do inóculo, foram selecionadas colônias isoladas de cultura jovem (após cultivo por 48 horas) e com auxílio de uma alça de transferência, foram imergidas em 5 mL de solução salina (NaCl a 0,9%). A turvação do inóculo foi comparada visualmente ao tubo padrão de 0,5 da escala de McFarland (1,5x10<sup>8</sup>UFC/mL) e sequencialmente, realizada a leitura no espectrofotômetro (Bioespectro SP-220) com comprimento de onda de 530 nm para leveduras.

## Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos é representada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). Esse índice corresponde a menor concentração do agente capaz de inibir o desenvolvimento visível do micro-organismo.

A metodologia usada para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das plantas foi a difusão por poço adaptada pela Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade de Pernambuco para soluções e extratos vegetais que possuem dificuldade de difusão ou precipitam em meios de cultura em caldo, similar a metodologia realizada por Okeke *et al.* (2001).<sup>75</sup> Foram seguidas as recomendações do protocolo M07-A12 do Clinical and Laboratory Standards Institute (2015).<sup>76</sup>

O teste consistiu na utilização de placas de Petri, nas quais foram vertidos um volume de 8 mL do meio ágar nutriente, a fim de formar uma superfície para a colocação de 6 ponteiros. Após a distribuição das ponteiros, foram dispensados 13 uL do inóculo preparado na concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/ mL em tubos tipo falcon estéreis e homogeneizados com 11,7 mL do meio semissólido Mueller Hinton (HiMedia Laboratories, Mumbai) (adicionado a 2% de glicose + azul de metileno) onde a concentração final do inóculo foi de  $1,5 \times 10^3$  UFC/ mL.

Posteriormente, o inóculo com o meio de cultura foram vertidos na placa. Adiante, as ponteiros foram removidas, o que resultou em 6 poços na placa, correspondentes aos poços onde foram utilizadas as concentrações dos extratos de 1000 µg/mL a 62,5µg/ mL. No meio da placa foi confeccionado um poço para o controle dos solventes de cada extrato. Para o controle positivo foram utilizadas as drogas Anfotericina B (1 µg/mL).

Sequencialmente, as placas dos testes foram incubadas em uma estufa na temperatura  $30 \pm 1$  C°, durante 48 horas para em seguida serem avaliados os resultados.

Esses resultados foram obtidos através da observação do halo de exibição formado, sendo verificadas as concentrações inibitórias mínimas de cada extrato, ou

seja, as menores concentrações de cada extrato que foi capaz de inibir o crescimento microbiano.

Determinação da toxicidade dos extratos vegetais frente aos náuplios da *A. salina* L.

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade através da *Artemia salina* L. foi baseada em Meyer *et al.* (1982); Araújo e Nascimento (1992) e normas do LAPETOX-UFPE.<sup>77; 78; 80</sup> Na etapa de incubação foi utilizado um recipiente retangular de 11,0 x 8,0 x 3,0 cm, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura espaçados por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados 150 mL de água do mar. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada incandescente de 40 w. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 35 mg de cistos de *A. salina* L., de forma que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *A. salina* L. foi coberto com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. Tal procedimento visa uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste. A incubação foi feita por um período de 48 horas. Após o período de incubação, os ovos foram eclodidos e os organismos-testes (náuplios de *A. salina* L.) foram expostos às drogas de interesse por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio e cada um contendo 10 náuplios de *Artemia salina*, previamente selecionados. Os testes foram feitos em duplicata para cada concentração de cada composto.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada situada entre a maior concentração com 0% de mortalidade e a menor concentração com 100% de mortalidade dos náuplios. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite, de modo a obter a CL50 (concentração letal para 50% da população) do extrato testado. As soluções dos extratos da *Libidibia ferrea*, *Lippia grata* Shauer, *Myracrodruon urundeuva*, *Albizia polycephala* (Benth) Killip e *Ximenia americana* L. foram preparadas em água do mar, com exceção da espécie *L.grata*, pois além da referida foi adicionada ao Twin 80 para uma re-suspensão adequada do extrato de modo que a concentração de modo que a concentração do Twin 80 resultou em 1%.

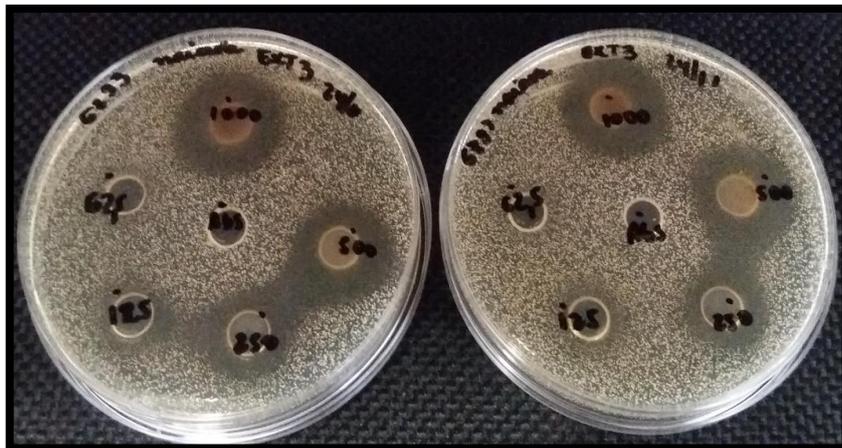
Os controles negativos foram realizados para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* L. fora resultante da toxicidade

aos compostos e não devido à falta de alimentação.<sup>87</sup> Após 24 horas de exposição, foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o Probit, o qual forneceu os valores de CL50 pelo programa IBM SPSS Statistics v20.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi utilizado o método de difusão em ágar, pois durante ensaios preliminares, comparado com o método de microdiluição em caldo, houve maior difusão dos extratos e menor precipitação. Dentre as leveduras, a *C. albicans* (UFPEDA-1007), *C. glabrata* (6392-UFPEDA) foram sensíveis a pelo menos dois dos extratos testados. A exceção foi o extrato bruto da espécie *Candida tropicalis* (UFPEDA-6947), pois o mesmo não foi sensível a nenhum extrato avaliado.

Figura 2: Teste de atividade antimicrobiana do extrato bruto da *L. ferrea* em *C. glabrata* - duplicata



Uma variedade de micro-organismos causam doenças e danos aos seres humanos, entretanto há, atualmente uma preocupação com a resistência aos medicamentos devido ao uso inadequado dos antibióticos.<sup>90</sup> Plantas e fitoterápicos, cujo uso popular é milenar se tornou fonte de pesquisa para estudiosos no mundo.<sup>91</sup>

Extratos de plantas são considerados com bom potencial inibitório se demonstrarem atividade em concentrações de até 100 µg/mL, atividade inibitória

moderada de 100-500 µg/mL, atividade fraca de 500-1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL. No entanto, geralmente, a avaliação da atividade antimicrobiana é classificada de forma a considerar se os micro-organismos testados são resistentes ou sensíveis a determinado agente antimicrobiano <sup>92; 93; 94</sup>

CIM(µg ml)		<i>L. ferrea</i>	<i>L. grata</i>	<i>M. urundeuva</i>	<i>A. polycephala</i>	<i>X.americana L.</i>
Extratos brutos das plantas		Casca do tronco	Folhas\ partes aéreas	Casca do tronco	Casca do tronco	Casca do tronco
CEPAS	<i>C. albicans</i> (1007UFPEDA)	62,5 µg/mL	1000 µg/mL	62,5 µg/mL	250 µg/mL	62,5 µg/mL
	<i>C. Glabrata</i> (6392UFPEDA)	125 µg/mL	R *	R*	1000 µg/mL	R*
	<i>C. tropicalis</i> (6947UFPEDA)	R *	R *	R*	R*	R*

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos em µg|ml

\*Obs: Micro-organismos resistentes nas concentrações até 1000 µg/mL.

O extrato bruto das cascas da *L. ferrea* obteve atividade antimicrobiana com CIM de 125 µg/mL para *C. glabrata* e CMI de 62,5 µg/mL para *C. albicans*. Já o extrato bruto da *L. grata* Shauer somente obteve atividade antifúngica para *C. albicans* (CIM=1000 µg/mL). Embora não haja muitos relatos sobre a espécie *L. grata* Shauer, existem estudos com outras espécies do gênero *Lippia* que apresentam uma série de resultados satisfatórios em relação a atividades antimicrobianas na literatura.<sup>47</sup> A espécie *Lippia adoensis* var. *adoensis*, por exemplo, demonstrou atividade contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans* (com CIM de 256 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente.<sup>95</sup>

No presente pesquisa, *C. albicans* foi sensível ao extrato bruto da *M. urundeuva* mesmo (CMI = 62,5 µg/mL) e ao compararmos com o estudo de Oliveira *et al.*(2017) percebemos que há semelhanças com este no que concerne à boa atividade

antimicrobiana frente à *C. albicans*, pois o extrato etanólico das cascas da *M. urundeuva* obtiveram CIM entre 16 µg/mL a 256 µg/mL, nas 10 cepas de *C. albicans* avaliadas.<sup>61</sup> Entretanto, para *C. glabrata*, o extrato da *M. urundeuva* não obteve atividade, assim como neste estudo. Outra pesquisa, realizada em 2015, foi testada a atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, o qual também houve um resultado satisfatório com o extrato hidroalcoólico das folhas da *M. urundeuva*, resultando em uma CIM de 125 µg/mL. Além disso, no mesmo estudo foram realizados testes com uma nanopartícula incorporada ao extrato, no qual a CIM foi reduzida para 15,62 µg/mL, o que sugere uma melhoria no resultado do extrato utilizando esta tecnologia.<sup>97</sup>

O extrato bruto da *A. polycephala* (Benth) Killip obteve atividade antifúngica para *Candida albicans*, com CIM de 250 µg/mL e para *C. glabrata* com CIM de 1000 µg/mL. No entanto, não existem muitos estudos na literatura sobre a atividade antimicrobiana desta espécie.<sup>33</sup>

A Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto da *X. americana* L. em relação a *C. albicans* foi de 62,5 µg/mL. Essa atividade antimicrobiana da *X. americana* L., segundo a literatura, está associada aos seus constituintes químicos, como os taninos, além da presença de polifenóis, indicativo de suas atividades anti-inflamatória, antialérgica, antibacteriana, antifúngica bem como de seus efeitos vasoprotetores.<sup>102</sup> Em outra pesquisa, foi realizada a análise fitoquímica do extrato vegetal da casca do caule e foram identificados vários compostos bioativos como alcaloides, antraquinonas, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos e terpenoides.<sup>66</sup>

Avaliando de forma global, a *C. albicans* foi o micro-organismo que foi mais sensível aos extratos brutos testados, ou seja, os extratos brutos da *L. ferrea*, *M. urundeuva* e *Ximenia americana* L. possuem relevante atividade antifúngica contra essa levedura com uma CIM de 62,5 µg/mL, se tornando interessante a verificação da toxicidade desses extratos. Além disso, foi visto anteriormente o moderado resultado do extrato bruto da *L. ferrea* (CIM=125 µg/mL) para *C. glabrata*, corroborando a importância de realizar outros testes *in vitro*. Dessa forma ao verificarmos os resultados do ensaio preliminar de toxicidade frente à *Artemia salina* L., foi constatado que o extrato da *M. urundeuva* foi o menos tóxico, com uma CL50 de 1203 µg/mL, obtendo-se assim uma ampla margem de segurança na utilização do extrato como

antimicrobiano frente à *C. albicans*. os extratos da *L. ferrea* e a *X. americana* L. obtiveram CL50 de 324.8 µg/mL e 345.8 µg/mL, respectivamente, também obtendo boa margem para utilização em testes complementares *in vivo*.

ESPÉCIES	PROBIT	95% Confidence Limits for Conc			95% Confidence Limits for log (Conc) <sup>a</sup>		
		Estimate (CL50)	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
<i>L.ferrea</i>	,500	324.8	254.9	396.3	2.512	2.406	2.598
<i>L.grata</i> Shauer	,500	167.6	136.8	202.9	2.224	2.136	2.307
<i>M.urundeuva</i>	,500	1203.0	770.2	2876.4	3.080	2.887	3.459
<i>A. polycephala</i> (Benth) Killip	,500	801.7	702.0	909.1	2.904	2.846	2.959
<i>X.americana</i> L.	,500	345.8	210.7	487.0	2.539	2.324	2.688

Tabela 2: Concentração letal mediana (CL50) dos extratos brutos em µg/mL

a. Logarítimo de base 10. Programa: IBM SPSS v 20 – Análise estatística Probit

## 6 CONCLUSÃO

- Através da observação dos aspectos analisados, existe a possibilidade de novas alternativas farmacêuticas fitoterápicas no tratamento das infecções por *Cândida albicans* e não *albicans*, *E. Faecalis* e *S. aureus*.

- Este estudo preliminar reforça que extratos de plantas medicinais do Semiárido nordestino brasileiro podem ser alternativas para o tratamento ou serem coadjuvantes na terapêutica antimicrobiana, além de possibilitar um uso com menores efeitos colaterais e menor toxicidade.

- Outras pesquisas complementares a esta podem aprimorar as tecnologias referentes a terapêutica medicamentosa fitoterápica das infecções por leveduras e bactérias patogênicas na cavidade oral.

## REFERÊNCIAS

1. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661-9.
2. Pienaar ED, Young T, Holmes H. Interventions for the prevention and management of oropharyngeal candidiasis associated with HIV infection in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(11):Cd003940.
3. Nogueira MA, Diaz MG, Tagami PM, Lorscheide J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas (PDF Download Available). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009;28(1):93-7.
4. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J.* 2017;223(9):675-81.
5. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br Dent J.* 2003;195(12):701-3; discussion 694.
6. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endodontic Topics.* 2003;6(1):135-59.
7. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):85-94.
8. Badiie P, Alborzi A, Joukar M. Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *Eur J Intern Med.* 2011;22(6):611-5.
9. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia.* 2010;81(5):323-8.
10. WHO. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila: WHO Regional Office for Western Pacific; 1993. Available from: [http://www.wpro.who.int/publications/pub\\_9290611103.htm](http://www.wpro.who.int/publications/pub_9290611103.htm).
11. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(2):179-89.
12. Ashrafuzzaman M. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Multi Drug Resistant Human Pathogens; 2013. 1-24 p.
13. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017;216(suppl\_3):S445-S51.

14. Viens AM, Littmann J. Is Antimicrobial Resistance a Slowly Emerging Disaster? *Public Health Ethics*. 2015;8(3):255-65.
15. Cartaxo SL, Souza MM, de Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(2):326-42.
16. Melo AFMd, Santos EJV, Souza LFCd, Carvalho AdAT, Pereira MdSV, Higino JS. In vitro antimicrobial activity of an extract of *Anacardium occidentale* L. against *Streptococcus* species. *Rev bras farmacogn* [Internet]. 2006 2006; 16:[202-5 pp.]. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-570980>.
17. He X, Shi W. Oral Microbiology: Past, Present and Future. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2009; 1(2):[47-58 pp.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.4248/ijos.09029>.
18. Brasil. Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. . Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
19. Babbour EA, S & Angaji, Mahdi. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental Plaque (PDF Download Available). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3:132-7.
20. Chaves GM, Santos FP, Colombo AL. The persistence of multifocal colonisation by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):198-204.
21. Hebbar PB, Pai A, D S. Mycological and histological associations of *Candida* in oral mucosal lesions. *J Oral Sci*. 2013;55(2):157-60.
22. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res*. 2016;95(4):365-71.
23. Freitas FM, Carlos Henrique. Rivoire, Waldemar Augusto. Passos, Eduardo P. Livro Rotinas em Ginecologia | Artmed | Grupo A. 6ª ed2010.
24. Maurya V, Srivastava A, Mishra J, Gaiind R, Marak RS, Tripathi AK, et al. Oropharyngeal candidiasis and *Candida* colonization in HIV positive patients in northern India. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(8):608-13.
25. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):685-702.
26. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):362-86.
27. Farmahan S, Tuopar D, Ameerally PJ, Kotecha R, Sisodia B. Microbiological examination and antibiotic sensitivity of infections in the head and neck. Has anything changed? *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(7):632-5.

28. Agudelo Higueta NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
29. Zandoná J, Souza MA. Características microbiológicas, patogenicidade e viabilidade do *Enterococcus faecalis* e seu cultivo in vitro em pesquisas microbiológicas na área da Endodontia. *RFO UPF*. 2018;22(2):255-60
30. Chanda S, Rakholiya K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases.: *Microbiol Book Series* 2011. p. 520-9.
31. Chanda S, Dudhatra S, Kaneria M. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family. *Food Funct*. 2010;1(3):308-15.
32. van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies--methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med*. 2011;77(11):1168-82.
33. Silva LCda , Sandes JM, de Paiva MM, de Araújo JM, de Figueiredo RC, da Silva MV, et al. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*. 2013;27(16):1492-6.
34. Lorenzi H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 7.ed. ed2016.
35. Agra MdF, Universidade Federal da Paraíba JP, Brazil, Freitas PFd, Universidade Federal da Paraíba JP, Brazil, Barbosa-Filho JM, Universidade Federal da Paraíba JP, Brazil. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007;17(1):114-40.
36. Delgobo CL, Gorin PA, Jones C, Iacomini M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*. 1998;47(7):1207-14.
37. Alves JJA, Nascimento SSd. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do Cariri Paraibano. *Revista geografica academica*. 2010(2):73-85.
38. Carvalho DD, Alves E, Barbosa Camargos R, Ferreira Oliveira D, Soares Scolforo JR, de Carvalho DA, et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28(4):173-8.
39. Ferreira MR, Fernandes MT, da Silva WA, Bezerra IC, de Souza TP, Pimentel MF, et al. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacogn Mag*. 2016;12(Suppl 2):S285-91.

40. Sampaio FC, Pereira MoS, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MA. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2009;124(2):289-94.
41. Araújo AAde, Soares LA, Assunção Ferreira MR, de Souza Neto MA, Silva GRda, Araújo RFde, et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J Ethnopharmacol.* 2014;156:88-96.
42. Biasi-Garbin RP, Demitto FeO, Amaral RC, Ferreira MR, Soares LA, Svidzinski TI, et al. Antifungal Potential of Plant Species From Brazilian Caatinga Against Dermatophytes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58:18.
43. Guerra ACVA, Soares LAL, Ferreira MRA, Araújo AA, Rocha HAO, Medeiros JS, et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:696-706.
44. Ohira S, Takaya K, Mitsui T, Kido M, Kakumoto K, Hayashi K-i, et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. *Tetrahedron Letters.* 2013;54(37):5052-5.
45. Hassan SK, El-Sammad NM, Mousa AM, Mohammed MH, Farrag AeRH, Hashim ANE, et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2015;5(6):462-71.
46. Wyrepkowski CC, Costa DL, Sinhoin AP, Vilegas W, De Grandis RA, Resende FA, et al. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules.* 2014;19(10):16039-57.
47. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(3):201-14.
48. Ahmed F, M.S.T, Selim. , A. K. Das., M.S.K, Choudhuri. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia nodiflora* Linn (PDF Download Available). *Pharmazie.* 2004;59:329-30.
49. Viana GSB, Matos FF, Araujo WL, Matos FJA, Craveiro AA. Essential Oil of *Lippia grata*: Pharmacological Effects and Main Constituents. <http://dxdoiorg/103109/13880208109065203> [Internet]. 2008 27 Sep 2008. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880208109065203>.
50. Siqueira-Lima PS, Brito RG, Araújo-Filho HG, Santos PL, Lucchesi A, Araújo AAS, et al. Anti-hyperalgesic effect of *Lippia grata* leaf essential oil complexed with  $\beta$ -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:739-47.

51. Siqueira-Lima PS, Araújo AA, Lucchese AM, Quintans JS, Menezes PP, Alves PB, et al.  $\beta$ -cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice - evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;114(2):188-96.
52. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. *Phytomedicine*. 2004;11(6):516-22.
53. Glehn EAV, Rodrigues GPS. Antifungograma para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2012;14(3):435-8.
54. Lorenzi HM, Francisco J. Harri Lorenzi, Francisco J. Matos. Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas. *Cultura contemporânea e medicinas alternativas: Novos paradigmas em saúde no fim do século XX*. Rio de Janeiro: PHISIS: Rev Saúde Coletiva; 2005. p. 145-76.
55. Souza SM, Aquino LC, Milach AC, Jr., Bandeira MA, Nobre ME, Viana GS. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. *Phytother Res*. 2007;21(3):220-5.
56. Cunha FPd, Costa LJLd, Fernandes AJD, Souza TPd, Soares LAL. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009;52:647-52.
57. Viana GS, Bandeira MA, Matos FJ. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. *Phytomedicine*. 2003;10(2-3):189-95.
58. Freires IA, Santaella GM, de Cassia Orlandi Sardi J, Rosalen PL. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2018;87:196-203.
59. Rebouças de Araújo Í, Coriolano de Aquino N, Vêras de Aguiar Guerra AC, Ferreira de Almeida Júnior R, Mendonça Araújo R, Fernandes de Araújo Júnior R, et al. Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):419.
60. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MdSV. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. 2009.
61. Oliveira FA, Rorato VC, Almeida-Apolonio AA, Rodrigues AB, Barros AL, Sangalli A, et al. In vitro antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida* species. *An Acad Bras Cienc*. 2017:0.

62. Barneby RC, Grimes JW. Silk Tree, Guanacaste, Monkey's Earring: A Generic System for the Synandrous Mimosaceae of the Americas. Bronx, New York City: The New York Botanical Garden; 1996. Available from: [http://antbase.org/ants/publications/nybg/Abarema%20et%20al%20NY Botanical\\_gardens\\_Vol.%2074\\_1%20-%20Copy.pdf](http://antbase.org/ants/publications/nybg/Abarema%20et%20al%20NY%20Botanical_gardens_Vol.%2074_1%20-%20Copy.pdf).
63. Joycharat N, Limsuwan S, Subhadhirasakul S, Voravuthikunchai SP, Pratumwan S, Madahin I, et al. Anti-Streptococcus mutans efficacy of Thai herbal formula used as a remedy for dental caries. *Pharm Biol.* 2012;50(8):941-7.
64. Joycharat N, Thammavong S, Limsuwan S, Homlaead S, Voravuthikunchai SP, Yingyongnarongkul BE, et al. Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Arch Pharm Res.* 2013;36(6):723-30.
65. Banothu V, Neelagiri C, Adepally U, Lingam J, Bommareddy K. Phytochemical screening and evaluation of in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the indigenous medicinal plant *Albizia odoratissima*. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1155-61.
66. Maikai VA, Maikai BV, Kobo PI. Antimicrobial Properties of Stem Bark Extracts of *Ximenia Americana*. *Journal of Agricultural Science.* 2009;1:30-4.
67. Santos MO, Almeida BV, Ribeiro DA, Macedo DG, Macedo MJF, Macedo JGF, et al. The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceara, northeastern Brazil. *An Acad Bras Cienc.* 2017:0.
68. Oliveira FCS, Moita Neto JM. Medicinal plants used in rural communities from Oeiras Municipality, in the semi-arid region of Piauí State (PI), Brazil. *Rev bras plantas med.* 2010;12(3):282-301.
69. Bitu deCNV, Matias EF, de Lima WP, da Costa Portelo A, Coutinho HD, de Menezes IR. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2015;172:265-72.
70. Koné WM, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traoré D, Dosso M. Traditional medicine in north Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2004;93(1):43-9.
71. Maiga A, Diallo D, Fane S, Sanogo R, Paulsen BS, Cisse B. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1-2):183-93.
72. Omer ME, Elnima EI. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia.* 2003;74(1-2):122-6.
73. Sahar Traoré M, Baldé MA, Camara A, Baldé ES, Diané S, Diallo MS, et al. The malaria co-infection challenge: An investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2015;174:576-81.

74. Filizola BdCeS, Maurício, Bonesso. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas 2015. Available from: <http://www.ispn.org.br/arquivos/cartilha-cascas-web-FINAL.pdf>.
75. Okeke MI, Iroegbu CU, Eze EN, Okoli AS, Esimone CO. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2001;78(2-3):119-27.
76. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
77. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45(5):31-4.
78. Araújo MMdS, Nascimento IA. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 1999. p. 41 -7.
79. Jerry LM, Lingling LR, Jon EA. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal.* 1998;32(2):513-24.
80. Santos EMd, Marques GS, Melo, A.F.M de, Higino JS. Dossiê sobre bioensaio com *Artemia salina* Recife: LAPETOX-Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
81. Montanher PBAP, Moacir. An Application of the Brine Shrimp Bioassay for General Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Acta Farmaceutica Bonaerense;* 2002. p. 175-8.
82. Karchesy YM, Kelsey RG, Constantine G, Karchesy JJ. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *Springerplus.* 2016;5:510.
83. Nguta JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal;* 2012. p. 35-41.
84. Biradi M, Hullatti K. Screening of Indian medicinal plants for cytotoxic activity by brine shrimp lethality (BSL) assay and evaluation of their total phenolic content 2014; 5:[139–44. pp.].
85. Khatun A, Rahman M, Haque T, Rahman MM, Akter M, Akter S, et al. Cytotoxicity potentials of eleven Bangladeshi medicinal plants. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:913127.
86. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru.* 2015; 23:20

87. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2002; 17.
88. Fennell CW, Lindsey KL, McGaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(2-3):205-17.
89. Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, Silva ML, Martins CHG, et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova.* 2009;32:498-502.
90. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian journal of microbiology.* 2004;35(4):275-80.
91. Almeida MZ. *Plantas Medicinais.* Salvador: EDUFBA; 2011.
92. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol.* 1988;23(2-3):127-49.
93. Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1998;60(1):79-84.
94. Tanaka JCA, Universidade Estadual de Maringá M, Silva CCd, Universidade Estadual de Maringá M, Dias Filho BP, Universidade Estadual de Maringá M, et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Quím Nova.* 2005;28(5):834-7.
95. Teka A, Rondevaldova J, Asfaw Z, Demissew S, Van Damme P, Kokoska L, et al. In vitro antimicrobial activity of plants used in traditional medicine in Gurage and Silti Zones, south central Ethiopia. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:286.
96. Galvao LC, Furlletti VF, Bersan SM, da Cunha MG, Ruiz AL, de Carvalho JE, et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:751435.
97. Bonifacio BV, Ramos MA, da Silva PB, Negri KM, de Oliveira Lopes E, de Souza LP, et al. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:5081-92.
98. Costa EMMdB, Carvalho RAd, Dametto FR, Oliveira PTd, Arruda TAd, Barbosa AS, et al. In vitro antimicrobial activity of plant extracts against *Enterococcus faecalis*. *Jbraspatolmedlab.* 2010;46(3):175-80.
99. Gomes BPFdA, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian Dental Journal.* 2004;15:30-5.

100. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-8.
101. Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.
102. Brasileiro MT, Egito AAd, Lima JRd, Randau KP, Pereira GC, Rolim Neto PJ. *Ximenia americana* L.: Botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. *Rev Bras Farm [Internet].* 2008; 89(2):[164-7 pp.].
103. Lima CRdO. Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana: Universidade Federal de Goiás; 2010.
104. Chen H, Zhang M, Xie B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry.* 2005;90(1):17-21.
105. Casanova LM, Costa SS. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios 2017; 9.
106. Bassetti M, Peghin M, Timsit JF. The current treatment landscape: candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(suppl 2):ii13-ii22.
107. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1996;174(4):821-7.
108. Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine-Chalberg J, et al. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis.* 1994;18(2):240-2.
109. Bianchi CM, Bianchi HA, Tadano T, Paula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite Jr DP, et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58:17.
110. Glockner A, Cornely OA. *Candida glabrata*--unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses.* 2015;58(8):445-50.
111. Vandeputte P, Tronchin G, Larcher G, Ernoult E, Berges T, Chabasse D, et al. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3701-9.

## ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE A. COLUBRINA



Secretaria de  
Agricultura e  
Reforma Agrária

PERNAMBUCO  
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N° 98/2016

	N° de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
I	91442	Angico de caroço	Leg. Mim.	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	R. Pereira

**Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Naiara Raissa Souza Santos      tel.: 81 - 987541085  
**e mail:** socioodontonai@gmail.com

**Coletor:**

**Procedência:** PE - Buique - Sítio Pititi - Vale do Catimbau (Lat: - 8,569 e Lon: - 37,24)

**Determinada em:** 29/11/2016

Resultado encaminhado por e mail em 01/12/2016

Obs.: material botânico em estudo na UFPE para fim de dissertação de mestrado da aluna Naiara Raissa Souza Santos.

**Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA**  
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
Av. Gal. San Martin, 1371 - Bongi - 50761-000 - Recife - PE - C. P. 1022  
CNPJ 10.912.293/0001-37 - PABX: (81) 3184-7200 - Fax (81) 3184-7211  
Home Page: [www.ipa.br](http://www.ipa.br) / E-mail: [ipa@ipa.br](mailto:ipa@ipa.br)

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**

## ANEXO B - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES L. FERREA E X. AMERICANA L.



Secretaria de  
Agricultura e  
Reforma Agrária  
**PERNAMBUCO**  
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N° 01/2018

	N° de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	91785	Jucá 1	Leg. Caes.	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz	A. Bocage e F. Gallindo
2	91786	Jucá 2	Leg. Caes.	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz	A. Bocage e F. Gallindo
3	91787	Ameixa do mato	Olacaceae	<i>Ximenia americana</i> L.	O. Cano

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Naiara Raissa Souza Santos tel.: (81) 998984974

**Procedência:** PE - Buíque - Vale do Catimbau - próximo à trilha do Cachorro.

**Coletor:** a mesma em 07/01/2018

**Determinada em:** 23.01.2018

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE para fim de dissertação de Mestrado em Odontologia sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Jane Sheila Higino.

Resultado encaminhado por e-mail: [sociodontonai@gmail.com](mailto:sociodontonai@gmail.com) ou [odontonai@yahoo.com.br](mailto:odontonai@yahoo.com.br)

### Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022  
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211  
Home Page: [www.ipa.br](http://www.ipa.br) / E-mail: [ipa@ipa.br](mailto:ipa@ipa.br)

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**

## ANEXO C - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE LIPPIA GRATA SCHAUER



HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 46/2017

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	91591	Alecrim	Verbenaceae	<i>Lippia grata</i> Schauer	F. Gallindo
2	91592	Alecrim	Lamiaceae	* <i>Medusantha martusii</i> (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore	O. Cano

\* anteriormente denominada *Hyptis martusii* Benth.

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Naiara Raissa Souza Santos tel.: (81) 987541085

**Procedência:** PE - Buique - Vale do Catimbau

**Coletor:** Naiara Raissa Souza Santos em 13/08/2017.

**Determinada em:** 22.08.2017.

Resultado encaminhado por e mail: [odontonai@yahoo.com.br](mailto:odontonai@yahoo.com.br) em 22.08.2017.

Material botânico em estudo para fim de estudo no Programa de Mestrado em clínica integrada (odontologia) da UFPE, da aluna Naiara Raissa Souza Santos, sob co-orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Jane Sheila Higinó.

**Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA**  
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022  
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211  
Home Page: [www.ipa.br](http://www.ipa.br) / E-mail: [ipa@ipa.br](mailto:ipa@ipa.br)

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**

## ANEXO D - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE A. POLYCEPHALA (BENTH.) KILLIP



Secretaria de  
Agricultura e  
Reforma Agrária

**PERNAMBUCO**  
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N° 06/2018

	N° de Tombo	Nome popular	Familia	Nome Científico	Identificada por
1	91791	Angico	Leg. Mim.	<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip.	A. Bocage

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Naiara Raissa Souza Santos    tel.: (81) 998984974

**Procedência:** PE - Buíque - Vale do Catimbau - trilha da Serrinha.

**Coletor:** a mesma em 15/04/2018

**Determinada em:** 07.05.2018

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE para fim de dissertação de Mestrado em Odontologia sob a supervisão da coorientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Jane Sheila Higinio do Dept<sup>o</sup> de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPE.

Resultado encaminhado por e mail: [sociodontonai@gmail.com](mailto:sociodontonai@gmail.com) ou [odontonai@yahoo.com.br](mailto:odontonai@yahoo.com.br)

---

**Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA**  
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022  
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211  
Home Page: [www.ipa.br](http://www.ipa.br) / E-mail: [ipa@ipa.br](mailto:ipa@ipa.br)

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**

## ANEXO E - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE M. URUNDEUVA ALLEMÃO



### HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 31/2018

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	92517	Aroeira do Sertão	Anacardiaceae	Myracrodruon urundeuva Allemão	O. Cano

**Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Naiara Raissa Souza Santos      tel.: ( ) 987541085

**Procedência:** PE – Buíque – Vale do Catimbau. Trilha da Serra Branca.

**Coletor:** Genivaldo Constantino da Silva

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE para fim de dissertação de Mestrado em Odontologia sob a supervisão da coorientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Jane Sheila Higino do Dept<sup>o</sup> de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPE.



## ANEXO F - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES CIENTÍFICAS - ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 60777-1</b>	<b>Data da Emissão: 16/10/2017 19:13</b>	<b>Data para Revalidação*: 15/11/2018</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Naiara Raissa Souza Santos	CPF: 062.887.864-89
Título do Projeto: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de espécies do bioma caatinga	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE MATERIAL VEGETAL, IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES	10/2017	10/2018

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Ximения americana, Libidibia ferrea, Alpinia zerumbet, Piptadenia moniliformis, Lippia grata

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Frutos/estróbilos, Casca, Flor
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 77832188**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 60777-1	<b>Data da Emissão:</b> 16/10/2017 19:13	<b>Data para Revalidação*:</b> 15/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Naiara Raissa Souza Santos	CPF: 062.887.864-89
Título do Projeto: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de espécies do bioma caatinga	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 77832188**



Página 2/3





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 56728-2	<b>Data da Emissão:</b> 21/01/2018 13:15	<b>Data para Revalidação*:</b> 20/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Naiara Raissa Souza Santos	CPF: 062.887.864-89
Título do Projeto: Comparação do efeito antifúngico dos extratos brutos da <i>Myracrodruon urundeuva</i> e <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan frente às espécies de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i>	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa científica com coleta de material vegetal	11/2016	11/2018

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	Sem ressalvas
---	---------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Myracrodruon urundeuva</i> , <i>Anadenanthera colubrina</i>

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 14833771**



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 56728-2</b>	<b>Data da Emissão: 21/01/2018 13:15</b>	<b>Data para Revalidação*: 20/02/2019</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Naiara Raissa Souza Santos	CPF: 062.887.864-89
Título do Projeto: Comparação do efeito antifúngico dos extratos brutos da <i>Myracrodruon urundeuva</i> e <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan frente às espécies de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i>	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Caule, Casca
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 14833771**







Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 56728-2</b>	<b>Data da Emissão: 21/01/2018 13:15</b>	<b>Data para Revalidação*: 20/02/2019</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Naiara Raissa Souza Santos	CPF: 062.887.864-89
Título do Projeto: Comparação do efeito antifúngico dos extratos brutos da Myracrodruon urundeuva e Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan frente às espécies de Candida albicans, Candida glabrata e Candida tropicalis	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 14833771**



Página 4/4