



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA E RECURSOS NATURAIS

ANA LAYS BRAGA

Efeito antimicrobiano e composição química do óleo essencial de
Piper regnellii* (Miq.) C. DC. e potencial antifúngico de *Baccharis
***milleflora* (Less.) DC.**

CRATO – CE
2021

ANA LAYS BRAGA

**Efeito antimicrobiano e composição química do óleo essencial de
Piper regnellii (Miq.) C. DC. e potencial antifúngico de *Baccharis
milleflora* (Less.) DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Coorientadoras – Dra. Débora Lima Sales e Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga.

**CRATO – CE
2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Braga, Ana Lays.

B813e Efeito antimicrobiano e composição química do óleo essencial de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. e potencial antifúngico de *Baccharis milleflora* (Less.) DC/ Ana Lays Braga. – Crato-CE, 2021.

64p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientadora: Prof.^a Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

1. Antifúngico, 2. Análise química, 3. Transição morfológica, 4. Óleo essencial, I. Título.

CDD: 615.32

ANA LAYS BRAGA

**Efeito antimicrobiano e composição química do óleo essencial de
Piper regnellii (Miq.) C. DC. e potencial antifúngico de *Baccharis
milleflora* (Less.) DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM _21_ / _05_ / 2021_____

BANCA EXAMINADORA

Fabíola F. Galvão Rodrigues

Prof.^a Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues URCA- CE - Orientadora

Fabíola F. Galvão Rodrigues

Prof.^a Dr. Alysson Pontes Pinheiro – URCA – CE – Avaliador interno
(Avaliador interno)

Alysson Pontes Pinheiro

Prof^o Dr. Luiz Everson da Silva – UFPR -PR – Avaliador externo

Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga URCA -CE(Coorientadora)

**CRATO – CE
2021**

Dedico esse trabalho a meus pais Iranilda e Francisco, que sempre me incentivaram a estudar e a buscar através da educação transformar minha realidade. Desde o dia que me deixaram na salinha da alfabetização até a conclusão desse mestrado, eles estão ao meu lado me incentivado e motivando. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter preparado o momento certo e as pessoas certas para conclusão desse sonho que tanto pedi em oração.

Agradeço a minha família. Meus pais: Iranilda e Francisco, vocês são minha base, a minha irmã Ana Thaís que uma vez conversando me incentivou demais a buscar entrar em um mestrado. Meu irmão Heleno Neto que está sempre ao meu lado, me apoiando e me enchendo de amor. A minha sobrinha Isabela que veio me fazer a titia mais feliz do mundo.

Agradeço ao meu anjinho que escreveu parte desse trabalho comigo, e foi o momento em que mais me senti motivada a concluir esse curso. Você não ficou com a mamãe, mas o pouco tempo que passamos juntos me transformou em uma pessoa melhor.

A minha orientadora Dra. Fabíola Fernandes por todas as contribuições para com este trabalho. A coorientadora Dra. Débora Lima sempre muito solícita e disposta a contribuir e esclarecer dúvidas e questionamentos.

Agradeço a coorientadora Dra. Flaviana Morais por ter acreditado em mim, por ter me ajudado, por ter tido paciência de me explicar cada detalhe da rotina do laboratório. E por me ensinar através do exemplo como ser um melhor pesquisador e docente. Além da competência técnica impecável, a senhora é um ser humano que espalha luz e amor.

Aos colegas de laboratório: Victor Juno, Luciene Lima, Taís Gusmão, Rosilaine Honorato e Josefa Carolaine, por toda amizade e acolhimento. Vocês tornaram os dias no laboratório mais leves. Agradeço especialmente a Thassya Lucas, por toda generosidade, ajuda e incentivo para conclusão desse trabalho.

Aos meus colegas de turma de mestrado por toda amizade e companheirismo.

A Universidade Regional do Cariri e todo o corpo docente do mestrado, que tanto contribuíram para meu crescimento acadêmico.

Minha gratidão a todos, sozinha eu não conseguiria!

RESUMO

Os produtos naturais contêm compostos derivadas de seu metabolismo secundário, que podem apresentar atividade antimicrobiana. Diversas espécies de vegetais são utilizadas na medicina popular para tratamento de afecções que acometem a saúde humana. Infecções ocasionadas por bactérias e fungos são de difícil tratamento, especialmente quando ocasionadas por micro-organismos resistentes a fármacos já utilizados. Considerando a possível atividade antimicrobiana de espécies vegetais este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. e potencial antifúngico de *Baccharis milleflora* (Less.) DC. O óleo essencial de *Piper regnellii* foi analisado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Foi verificada atividade antibacteriana e antifúngica do referido produto mediante microdiluição em caldo, sendo visto ação intrínseca do óleo essencial e associada a fármacos de referência. Foi verificado a ação antifúngica intrínseca e associada a fármacos do óleo essencial de *Baccharis milleflora* utilizando microdiluição em caldo. A ação mediante inibição de um fator de virulência fúngica foi verificada para ambos os produtos, utilizando microcultivo em câmaras úmidas com medição de hifas e análise estatística. O resultado da análise química mostrou a predominância de fenilpropanóides, tendo como majoritário o apiol (70,79%). A atividade antimicrobiana isolada do óleo essencial de *Piper regnellii*, não demonstrou atividade clinicamente relevante, quando associado aos fármacos fluconazol e gentamicina observou-se possível sinergismo frente a *Candida tropicalis* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. O óleo essencial de *Baccharis milleflora* apresentou atividade intrínseca irrelevante frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A associação com o fluconazol resultou em possível sinergismo frente a *Candida tropicalis*. Ambos os óleos essenciais inibiram a formação de hifas das espécies de *Candida*. Dessa forma, a ação dos produtos naturais evidenciou um potencial antifúngico, com efeito sobre um dos fatores de virulência. Pode-se considerar que os óleos essenciais possuem atividade promissora frente ao desenvolvimento de fármacos para tratamento de infecções fúngicas por espécies de *Candida*.

Palavras chaves: Antifúngico. Análise química. Transição morfológica. Óleo essencial.

ABSTRACT

Natural products contain compounds derived from their secondary metabolism, which may have antimicrobial activity. Several species of vegetables are used in folk medicine to treat conditions that affect human health. Infections caused by bacteria and fungi are difficult to treat, especially when caused by microorganisms resistant to drugs already used. Considering the possible antimicrobial activity of plant species, this work aimed to evaluate the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. and antifungal potential of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. The essential oil of *Piper regnellii* was analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). Antibacterial and antifungal activity of the product was verified by microdilution in broth, with intrinsic action of essential oil being seen and associated with reference drugs. The intrinsic antifungal action associated with drugs of the essential oil of *Baccharis milleflora* was verified using microdilution in broth. The action by inhibiting a fungal virulence factor was verified for both products, using microculture in moist chambers with hyphae measurement and statistical analysis. The result of the chemical analysis showed the predominance of phenylpropanoids, with apinol as the major factor (70.79%). The antimicrobial activity isolated from the essential oil of *Piper regnellii*, did not demonstrate clinically relevant activity, when associated with the drugs fluconazole and gentamicin a possible synergism was observed against *Candida tropicalis* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The essential oil of *Baccharis milleflora* showed irrelevant intrinsic activity against strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The association with fluconazole resulted in possible synergism against *Candida tropicalis*. Both essential oils inhibited the formation of hyphae of *Candida* species. Thus, the action of natural products showed an antifungal potential, with an effect on one of the virulence factors. It can be considered that essential oils have promising activity in the face of the development of drugs for the treatment of fungal infections by *Candida* species.

Key words: Antifungal. Chemical analysis. Morphological transition. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.....18
- Figura 2:** *Baccharis milleflora* (Less.) DC.....19

MANUSCRITO 1

- Figura 1:** Ação moduladora do óleo essencial de *Piper regnellii* associado aos antibióticos norfloxacina, gentamicina e eritromicina.....38
- Figura 2: A e B** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPR (óleo essencial de *Piper regnellii*) contra estirpes de *Candida albicans*. **C e D** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ), associado ao OEPR (óleo essencial de *Piper regnellii*) contra estirpes de *Candida tropicalis* (CT).....39
- Figura 3 A e B** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper regnellii* (OEPR) sobre o crescimento micelial de estirpes de *Candida albicans*. **C e D** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper regnellii* (OEPR) sobre o crescimento micelial de estirpes de *Candida tropicalis* (CT).....40

MANUSCRITO 2

- Figura 1:** Partes aéreas da espécie *Baccharis milleflora*.....54
- Figura 2: A e B** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPM (óleo essencial de *Baccharis milleflora*) contra estirpes de *Candida albicans* (CA). **C e D** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ), associado ao OEPM (óleo essencial de *Baccharis milleflora*) contra estirpes de *Candida tropicalis* (CT).....58
- Figura 3:** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Baccharis milleflora* (OEPM) sobre o crescimento micelial de estirpes de *Candida albicans*. **C e D** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Baccharis milleflora* (OEPM) sobre crescimento micelial de *Candida tropicalis*.....60

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Piper regnellii*.....37

Tabela 2 – Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC50) (µg/mL) do óleo essencial de *Piper regnellii* frente a diferentes estirpes de *Candida*.....39

MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC50) (µg/mL) do óleo essencial de *Bacharis milleflora* frente a diferentes estirpes de *Candida*.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/mL}$ - Micrograma por mililitro

ASD - *Ágar Sabouraud Dextrose*

ATCC- *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion Broth*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CA - *Candida albicans*

CT - *Candida tropicalis*

ASD - *Caldo Sabouraud Dextrose*

DMSO - Dimetilsulfóxido

HIA - *Heart Infusion Ágar*

IC50 - Concentração capaz de inibir 50% das células

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRcal – Índice de retenção calculado

EM - Espectrometria de Massas

LMAC - Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 PLANTAS MEDICINAIS E METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS VEGETAIS | 14 |
| 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS | 15 |
| 2.3 GÊNERO <i>Piper</i> L. E ESPÉCIE <i>Piper regnellii</i> | 17 |
| 2.4 GÊNERO <i>Baccharis</i> E ESPÉCIE <i>Baccharis milleflora</i> | 19 |
| 2.5 AGENTES PATOGÊNICOS – FUNGOS E BACTÉRIAS | 20 |
| 2.5.1 Fungos do gênero Candida: Virulência e mecanismos de resistência..... | 20 |
| 2.5.2 Bactérias Staphylococcus aureus e Escherichia coli | 22 |
| 3 MATERIAS E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL..... | 25 |
| 3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS | 26 |
| 3.3 CEPAS MICROBIANAS | 26 |
| 3.4 PREPARO DOS INÓCULOS | 27 |
| 3.5 DROGAS DE REFERÊNCIA | 27 |
| 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) | 27 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA-CFM | 28 |
| 3.8 VERIFICAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DO ÓLEO ESSENCIAL COM FÁRMACOS | 28 |
| 3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A VIRULÊNCIA FÚNGICA | 28 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 29 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 30 |
| 4.1 MANUSCRITO 1: ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER REGNELLII (MIQ.) C. DC.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO | 30 |
| 4.2 MANUSCRITO 2: <i>BACHARIS MILLEFLORA</i> (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA..... | 52 |
| 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 70 |
| REFERÊNCIAS GERAIS | 71 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vasta riqueza em biodiversidade, sendo um campo promissor para estudos que visam explorar o conhecimento científico acerca da capacidade medicinal das plantas, onde se busca entender como propriedades específicas presentes nos vegetais podem contribuir para melhoria da saúde da população (REMPEL *et al.*, 2019). Pesquisas que envolvem o estudo das espécies vegetais são consideradas relevantes, pois permitem conhecer e identificar metabólitos secundários e compostos bioativos específicos presentes nas plantas e sua utilização constitui uma opção de baixo custo que produz menor efeito colateral quando comparada a medicamentos sintéticos (CUNHA *et al.*, 2016).

Os vegetais possuem mecanismos para obtenção de funções vitais, tais como; fotossíntese, respiração e absorção de nutrientes, que são advindos do metabolismo primário, onde a partir de energia e moléculas geradas neste processo, as plantas passam a produzir metabólitos secundários, do qual derivam uma grande variedade de compostos químicos (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Os estudos que avaliam efeitos de produtos obtidos do metabolismo secundário de espécies vegetais têm constatado que estes demonstram capacidade antimicrobiana, frente aos mais diversos patógenos (ALMEIDA *et al.*, 2017). A identificação de novas substâncias antimicrobianas derivadas de produtos naturais tem sido importante no controle de patógenos, sendo relevante conhecer e identificar a presença de compostos bioativos que podem ter ação contra micro-organismos especialmente devido ao aumento de casos de resistência a antimicrobianos convencionais (SWAMY; AKHTAR; SINNAH, 2016; BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017).

O aumento generalizado de infecções resistentes trouxe a necessidade de busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana advinda de compostos naturais (SILVA; AQUINO, 2018). Óleos essenciais obtidos a partir de plantas vem demonstrando importante ação contra micro-organismos e podem ser considerados possíveis fontes para desenvolvimento de novos medicamentos tendo em vista a presença de diversos constituintes químicos que podem inibir ou retardar o crescimento de patógenos (SANTOS; PICOLLI; TEBALDI, 2017).

O surgimento de resistência microbiana tem levado pesquisadores a exploração de óleos essenciais visando o controle de micro-organismos patogênicos resistentes e

combate a doenças infecciosas, tendo em vista que o uso de produtos químicos sintéticos para esta ação apresenta limitações, como toxicidade e risco ambiental. (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016).

Bactérias e fungos estão entre os principais agentes causadores de infecções no organismo humano (REMPEL *et al.*, 2019). As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, ocasionando infecções de difícil tratamento com conseqüente morbidade elevada, justificando assim, a necessidade de busca por alternativas terapêuticas que possam reduzir esta resistência (VELOSO; CAMPELO, 2017). Os fungos patogênicos são capazes de afetar o organismo humano podendo causar infecções invasivas, que são em geral, associadas a alta mortalidade. As células fúngicas apresentam semelhanças com as células humanas, pois ambas são eucariontes, dessa forma moléculas que podem inibir o crescimento de fungos também podem ser tóxicas para humanos. Outro fator que impacta no tratamento de infecções fúngicas é o aumento da resistência intrínseca ou adquirida a antifúngicos já utilizados, trazendo assim a necessidade da busca por novas moléculas com potencial antifúngico (MC ALISTER; SHAPIRO, 2019; JANBON *et al.*, 2019.)

A busca por compostos bioativos obtidos de plantas medicinais destaca-se como uma importante área de pesquisa, contribuindo para o desenvolvimento de produtos biomédicos e naturais, com maior eficácia e menor possibilidade de desenvolvimento de resistência contra fármacos já utilizados (CASANOVA; COSTA, 2017; MARDARE; MALUTAN, 2019).

Espécies do gênero *Baccharis*, são utilizadas na medicina popular para tratamento de várias doenças e vêm sendo estudadas, devido apresentarem diversos metabólitos secundários, principalmente óleos essenciais, sendo consideradas importantes fontes de novos compostos ativos (MORAIS; CASTANHA, 2011).

A espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC. é conhecida popularmente como carqueja-do-lajeado, com ocorrência predominante nas regiões Sul e Sudeste apresentando-se na forma de arbustos eretos e glabro, é descrito seu uso na medicina popular como antidiurético e anti-inflamatório e sintomas associados ao trato gastrointestinal (HEIDEN, 2015; PEREIRA *et al.*, 2017).

O gênero *Piper L.* também é referido como fonte de potencial farmacológico e propriedades etnomedicinais, diversas classes de metabólitos secundários de espécies de *Piper* possuem propriedades antimicrobianas (ALVES *et al.*, 2016).

A espécie *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. é conhecida popularmente como pariparoba, pode ser encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina, estando presente no Brasil nos estados: Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. São arbustos de um a três metros de altura, com caules muito ramificados, entrenós superiores glabros, engrossados e lenticelados, seus metabólitos secundários apresentam potencial antibacteriano e antifúngico, e tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de irritações e ferimentos na pele (PESSINI *et al.*, 2003; RUSCHEL, 2004; SALEHI *et al.*, 2019).

Com base nesse contexto, este estudo propõe identificar os componentes químicos do óleo essencial de folhas das espécies *Piper regnellii* bem como a ação antimicrobiana intrínseca e combinada a fármacos, frente a bactérias e fungos e potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis milleflora* além do efeito mediante fator de virulência fúngica de ambos os óleos essenciais. Espera-se que a produção deste conhecimento contribua evidenciando a possível ação antimicrobiana frente aos referidos patógenos, o que pode vir a contribuir para estudos futuros referentes a moléculas com atividade terapêutica frente a bactérias e fungos patogênicos.

A pesquisa apresenta-se dividida em capítulos que trazem inicialmente o referencial teórico mediante revisão de literatura e, posteriormente, a pesquisa em si com metodologia, resultados e discussões descritos em dois manuscritos, sendo o primeiro referente à espécie *Piper regnellii*, abordando a constituição química do óleo essencial e seus efeitos em fungos e bactérias de interesse clínico e o segundo que apresenta os resultados do potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis milleflora*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS VEGETAIS

O uso de plantas para fins terapêuticos é evidenciado desde tempos remotos, sendo uma prática comum entre os seres humanos, especialmente em populações da zona rural, onde a comunidade tem maior contato com a natureza e o conhecimento acerca do uso medicinal para tratamento de sintomas primários vai sendo repassado a cada geração. Porém, é importante que estudos científicos possam analisar as propriedades terapêuticas, forma e manuseio, superdosagem de compostos e toxicidade de espécies vegetais, pois através destas análises a funcionalidade de plantas medicinais poderá ser compreendida, gerando métodos alternativos e com recomendações científicas no tratamento de algumas doenças (GOMES *et al.*, 2018; REMPEL, *et al.*, 2019).

A utilização de vegetais para tratamento de sintomas relacionados á saúde humana, inclui: o uso fitoterápico, quando ocorre utilização exclusiva de alguma espécie de planta medicinal, e fitofármaco, quando envolve o uso de alguma substância específica extraída a partir de vegetais. O estudo da ação de produtos naturais pode evidenciar uma ampla variedade de propriedades físico-química associadas a possíveis ações terapêuticas (SIMÕES, 2010).

A pesquisa envolvendo plantas medicinais tem sido explorada nas últimas décadas, com estudos que visem conhecer propriedades intrínsecas dos vegetais, direcionando assim o desenvolvimento de novas moléculas que atuem contra micro-organismos patogênicos (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). A investigação da possível atividade de plantas contra micro-organismos, envolve a extração, fracionamento e purificação de seus componentes químicos, para a partir daí investigar a ação dos compostos bioativos (CASANOVA; COSTA, 2017).

Através da fotossíntese, as plantas integram carbono a matéria viva dando assim origem a diversos compostos orgânicos essenciais a vida, tais como: carboidratos, proteínas e lipídeos, este processo é denominado metabolismo primário que resulta em pequenas moléculas precursores do metabolismo secundário, de onde advém uma variedade de compostos com diferentes características químicas e funcionais (ESQUINCA; MORENO, 2017).

Os vegetais têm a capacidade de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta a manutenção de suas exigências fundamentais. Esse conjunto metabólico é denominado metabolismo secundário, e seus compostos derivados têm despertado o interesse para pesquisas onde possam ser evidenciadas novas moléculas com atividade terapêutica (SIMÕES, 2010). Produtos naturais como: lignanas, flavonóides, terpenos, dentre outros, podem ser obtidos por meio das vias biossintéticas de metabólitos secundários de plantas específicas (VALLI; BOLZANI, 2019).

As plantas possuem inúmeros mecanismos de detecção de estresse, e esta capacidade de reconhecimento atua aumentando a produção de compostos químicos, são exemplos de condições estressantes para espécies vegetais: estresse ambiental e fatores climáticas, como seca, temperaturas extremas, luz, irradiação, deficiência de nutrientes e contaminação do solo (ISAH, 2019). O sistema de defesa dos vegetais e a resposta ao estresse, são estímulos que provocam mudanças metabólicas, resultando na biosíntese de derivados do metabolismo secundário. O metabolismo secundário das plantas atua proporcionando interação entre a espécie vegetal e o fitopatógeno, dessa forma, estimula-se o sistema de defesa da planta hospedeira contra os patógenos (CUNHA *et al.*, 2016).

Derivados do metabolismo secundário das plantas são produtos de reações enzimáticas, envolvidos nas funções de atração, defesa ou sinalização, presentes principalmente no óleo essencial e extrato de vegetais. As moléculas derivadas desse processo não desempenham papel significativo na vida primária das plantas, porém, tais substâncias apresentam uma ampla variedade biológica, incluindo atividade antimicrobiana (KHAW *et al.*, 2017; ISAH, 2019; FLORES VILLA *et al.*, 2020).

Compostos orgânicos voláteis são sintetizados por via do metabolismo secundário em diversas partes dos vegetais, englobando uma variedade de moléculas químicas, que podem apresentar potencial promissor em relação a bioatividade destes compostos (WANI, *et al.*, 2020).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de diversos compostos orgânicos voláteis e hidrofóbicos, sintetizados pelos vegetais podendo estar presente em

diversas partes da planta, incluindo: raízes, folhas, cascas, flores, sementes e plantas inteiras. A constituição química dos óleos essenciais advém do metabolismo secundário das plantas, onde podem estar presentes diversas classes de compostos, tais como: fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos (QUIQUI *et al.*, 2019; WANI *et al.*, 2020).

Estes compostos são líquidos voláteis, de cor límpida, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos que têm densidade inferior à da água, são moléculas orgânicas com alta pressão de vapor e volatilidade, mesmo em condições de pressão e temperatura normais (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016; REHMAN *et al.*, 2016). As propriedades bioativas podem apresentar atividade antimicrobiana onde a inibição de crescimento de micro-organismos está relacionada a composição química do óleo essencial, concentração, interação entre os compostos e vulnerabilidade do agente patogênico (WANI *et al.*, 2020). As propriedades físico-químicas destes produtos podem possuir ação antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatória e antiviral (AZIZ *et al.*, 2018).

A maioria dos compostos voláteis são constituídos de fenilpropanóides ou de terpenóides (SIMÕES, 2010). A estrutura química básica de terpenóides envolve duas unidades de isopreno (2 metilbutadieno) (C₅). A unidade ativa do isopreno C₅, isopentil pirofosfato e seu isômero dimetilalil pirofosfato são os precursores universais da biossíntese de todos os terpenóides. A classificação dos terpenos encontrados em óleos essenciais baseia-se nas cadeias homólogas de unidade de isopreno em sua estrutura, podendo ser: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (REHMAN *et al.*, 2016). Os fenilpropanóides, se originam a partir do ácido chiquímico, que formam unidades básicas do ácido cinâmico, sendo este o principal precursor da síntese de compostos classificados como fenilpropanóides, que se caracterizam pela presença de uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático (SIMÕES, 2010).

A biossíntese de compostos hidrofóbicos presentes em óleos essenciais pode ocorrer em qualquer parte da planta, sendo posteriormente armazenados em membranas tilacóides ou cutículas, dutos e resinas e envolve genes e enzimas específicas (REHMAN *et al.*, 2016; ISAH, 2019).

A presença de constituintes químicos específicos em espécies de vegetais depende de fatores como: genótipo, fisiologia, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (ISAH, 2019). Dentre os componentes químicos de óleos essenciais,

normalmente um composto destaca-se em relação a outros por apresentar-se em maiores concentrações, e esta quantificação poderá variar entre as diferentes partes da planta. Muitos fatores podem estar associados a variação na composição química de óleos essenciais, resultando em caracterização de compostos diferentes, mesmo em produtos naturais extraídos da mesma espécie. Alguns desses fatores são: geografia de cultivo, época da colheita do vegetal, parte da planta, condições e tempo de armazenamento (CHOUHAN, *et al.*, 2017; MISHRA *et al* 2020).

Os óleos essenciais são uma alternativa relevante para o estudo de produtos naturais que possam ser base no desenvolvimento de novas medicações. Tendo em vista que são fontes potenciais de compostos com propriedades antimicrobianas (TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013). Esta atividade contra micro-organismos sofre influência da variação química dos metabólitos secundários, que pode ocorrer por ação de um composto majoritário isolado, ou pelo sinergismo entre todos os componentes do óleo essencial (MILLEZI *et al.*, 2013).

Os gêneros *Piper* L. e *Baccharis*, possuem boa capacidade oleífera, e suas espécies apresentam potencial relevante para produção de óleos essenciais, dessa forma os metabólitos secundários presentes nos referidos gêneros, podem apresentar ações bioatividade, sendo um campo importante para pesquisa (PESSINI *et al.*, 2003; TROMBIN-SOUZA *et al.*, 2017; QUIQUI *et al.*, 2019).

2.3 GÊNERO *Piper* L. E ESPÉCIE *Piper regnellii*

O gênero *Piper* L. faz parte da família Piperaceae e tem origem nativa, porém não é endêmico do Brasil. Contém em torno de 289 espécies, amplamente distribuídas em todo o território nacional, sendo considerado um dos gêneros de maior diversidade. Pode ser encontrado no território brasileiro com predomínio na região amazônica, mas também presente em domínios geográficos, tais como: caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal. Suas espécies podem apresentar-se como arbusto, subarbusto, árvore, erva e trepadeira (MELO; ALVES, 2019; QUEIROZ; MEDEIROS, 2020;).

Muitas espécies de *Piper* são utilizadas pela população com funções medicinais, sendo um gênero com importante potencial terapêutico e atividade farmacológica, com capacidade importante para produção de óleos essenciais. (QUIQUI *et al.*, 2019).

Estudos biológicos que se propõem a avaliar as propriedades fitoquímicas presentes nestas espécies têm encontrado atividades neurofarmacológicas, anti-proliferativas e anti-inflamatórias. Pesquisas por atividades biológicas de espécies do gênero *Piper* revelam o acúmulo de diversas classes de metabólitos, com propriedades contra diversos micro-organismos de natureza bacteriana e fúngica (SALEHI *et al.*, 2019).

Piper regnellii é conhecida popularmente como pariparoba, pode ser encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina, sendo que no Brasil tem registro de ocorrência nos estados: Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. São arbustos de um a três metros de altura, com caules muito ramificados, entrenós superiores glabros, engrossados e lenticelados (RUSCHEL, 2004). As folhas são alternas, pecioladas, codiformes, inteiras, de base simétrica, e que quando adultas podem medir de 12,0cm a 14,0cm de largura, e 10,0cm a 12,0cm de comprimento. A referida espécie possui grande potencial oleífero devido a presença de glândulas peroladas que contém substâncias produtoras de óleos essenciais (PESSINI *et al.*, 2003).

Figura 1: *Piper regnellii* (Miq) C. D.



Fonte: Wanderlei do Amaral

Os constituintes químicos das espécies de *Piper* têm sido considerados relevantes, com uma diversidade de compostos químicos que demonstram atividade biológica. *Piper regnellii* mostra acúmulo de fenilpropanóides, com descrição de atividade antibacteriana e antifúngica (LONGATO *et al.*, 2011).

2.4 GÊNERO *Baccharis* E ESPÉCIE *Baccharis milleflora*

O gênero *Baccharis* inclui em torno de 500 espécies, que podem ser encontradas em países do continente americano: Argentina, Paraguai e Brasil. Em território brasileiro, encontra-se uma média de 179 espécies, estando distribuídas em regiões que incluem os seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (HEINDEN, 2015; SOUZA *et al.*, 2017).

Espécies do gênero *Baccharis* têm sido identificadas observando seus ductos secretores, sendo verificados que estes possuem capacidade para produção de óleos essenciais. Suas espécies são estudadas devido relevância farmacológica e etnobotânica (ZUCCOLOTTO, 2019).

Estudos relativos ao gênero *Baccharis* têm demonstrado a presença de diversos compostos químicos, que podem estar relacionados a atividade antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2016). É eventualmente utilizada na medicina popular para ação diurética e anti-inflamatória (IGANCI; MACIAS, 2009). O óleo essencial desta espécie é composto principalmente por sesquiterpenos hidrocarbonados e por uma mistura de monoterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos (PEREIRA *et al.*, 2017).

Muitas espécies deste gênero apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES *et al.*, 2016; TROMBIN-SOUZA *et al.*, 2017), com relatos de uso na medicina popular para tratamento de doenças, especialmente relacionadas a sintomas gástricos e em processos inflamatórios, o que contribui para relevância econômica e ambiental do gênero *Baccharis*, sendo este promissor quanto a descoberta de novos compostos com atividade biológica (RAMOS CAMPOS *et al.*, 2016).

Pesquisas com espécies de *Baccharis* são relevantes e necessários, pois apesar de sua importância econômica e da frequente utilização em tratamento de doenças, somente 30% das espécies do referido gênero foram estudadas quanto a propriedades químicas e biológicas (TROMBIN-SOUZA *et al.*, 2017).

A espécie *Baccharis milleflora* é nativa e endêmica do Brasil, apresenta -se na forma de arbustos eretos e glabros que formam populações densas especialmente em solos rasos e úmidos, com substratos rupículas e terrículas. Sua ocorrência se dá nas regiões Sul e Sudeste, sendo popularmente conhecida como carqueja-do-lajeado (HEINDEN, 2015).

Figura 2. *Baccharis milleflora* (Less.) DC.



Fonte: Wanderlei do Amaral

Baccharis milleflora tem importante potencial oleífero, tendo óleo essencial com predomínio de sesquiterpenos (SIMÕES, 2005). Esta classe de compostos apresentam potencial atividade antimicrobiana, incluindo a atividade antifúngica onde ação contra micro-organismos patogênicos pode ser atribuídas a presença desta classe de componentes químicos (ABAD; BERMEJO, 2007; TROMBIM -SOUZA et al., 2017).

2.5 AGENTES PATOGÊNICOS – FUNGOS E BACTÉRIAS

2.5.1 Fungos do gênero *Candida*: Virulência e mecanismos de resistência

Fungos são micro-organismos patogênicos que estão envolvidos na manifestação de infecções no organismo humano e diversos fungos têm potencial agressor contra a saúde humana que podem variar em acometimentos superficiais até infecções sistêmicas de difícil tratamento e com elevada mortalidade (SHAHABUDIN; AZMI, 2020).

Dentre as espécies com potencial infeccioso *Candida albicans* apresenta-se como a principal responsável pela manifestação de infecções da corrente sanguínea, porém é crescente o número de pesquisas que demonstram a patogenicidade de espécies

de *Candida não-albicans* com destaque para *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (ZHANG *et al.*, 2019). As espécies de *Candida* são parte da microbiota natural humana, estando presentes na cavidade oral, vagina e trato digestivo. Porém estes fungos são classificados como patógenos oportunistas, onde condições específicas que envolvem redução da imunidade do organismo, oferecem um ambiente propício para infecções por *Candida* (SHAHABUDIN; AZMI, 2020; LEE *et al.*, 2020).

As espécies de *Candida*, mesmo pertencentes ao mesmo gênero podem desenvolver respostas diferentes em relação a susceptibilidade a agentes antimicrobianos (ALMEIDA, *et al.*, 2017). O aumento de infecções fúngicas ocorre devido a fatores como: o uso indiscriminado e frequente de antibióticos, especialmente os de amplo espectro, distúrbios metabólicos e aumentos de casos de patologias que deprimem o sistema imunológico (SEYOUM *et al.*, 2020).

Dentre os fungos causadores de infecções a espécie *Candida albicans* destaca-se como um patógeno comensal, com grande capacidade de ocasionar infecções fúngicas invasivas, quando se oferece condições propícias para que sua forma comensal passe para forma patogênica. Esta transição pode ocorrer por vias genéticas via mecanismos de penetração ativa e endocitose. Fatores associados ao aumento da patogenicidade e virulência de *Candida albicans* incluem: transição morfológica com formação de hifas e pseudohifas via expressão de genes específicos, fenótipo, comutação, secreção de enzima hidrolítica, aspectos morfológicos da parede celular, aderência, produção de exoenzimas e formação de biofilmes (DADAR *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020).

A maioria das infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* envolvem *Candida albicans*, porém cada vez mais outras espécies vêm emergindo como potenciais invasores e com patogenicidade elevada. Dentre estas, destaca-se *Candida tropicalis* (HAMMED *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; SEYOUM *et al.*, 2020). Em termos de virulência *Candida tropicalis* tem mostrado-se como segunda espécie de *Candida* com maior capacidade para provocar infecções após *Candida albicans*, com um amplo potencial para formação de biofilmes, adesão a células endoteliais e epiteliais, secreção de enzimas líticas e transição morfológica, fatores estes que contribuem para o aumento de virulência e mecanismos de resistência (ZUZA- ALVES, *et al.*, 2017).

É de relevância clínica que se busque identificar agentes causadores de infecções fúngicas, a sua forma de manifestação e seus meios de sobrevivência no organismo, para que o tratamento de pacientes acometidos com esta patologia seja direcionado na busca por mais resolutividade (NAKAMURA *et al.*, 2013).

Pesquisas sobre esse patógenos já apresenta considerável conhecimento, porém é preciso mais estudos que possibilitem um melhor combates desses agentes infecciosos com identificação de alvos celulares que possam ser atingidos por antimicrobianos, sem causar danos ao hospedeiro (JANBON *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020).

2.5.2 Bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A resistência bacteriana, constitui um elevado risco a saúde humana, pois resulta em infecções graves, com opções de tratamento limitadas, fazendo com que haja aumento de morbidade e mortalidade, especialmente em ambientes hospitalares (DA COSTA; JÚNIOR, 2017). Dentre as bactérias que vêm demonstrando mecanismos de resistência a antimicrobianos estão: *Staphylococcus aureus*, e *Escherichia coli* (WHO, 2015).

Staphylococcus aureus são bactérias Gram-positivas que pertencem a microbiota do organismo humano, presente na pele e membranas mucosas, mas que podem ocasionalmente desenvolverem patologias tais como: feridas, furúnculos, septicemia, pneumonia e intoxicação alimentar, são micro-organismos de alta capacidade patológica, associados a uma considerável resistência a antibióticos, o que gera dificuldades no tratamento de infecções decorrentes destas bactérias (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012). Algumas características específicas desta espécie contribuem para sua capacidade de ocasionar infecções, como a habilidade de crescer em condições de alta pressão osmótica e baixa umidade, o que justifica a presença deste micro-organismo de forma comensal na cavidade nasal e na pele. A invasão de tecidos com capacidade de danificá-los está associada a produção de toxinas, que predispõe a infecções graves com resistência a antimicrobianos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; PARLET *et al.*, 2019).

Fatores como alta capacidade de transmissão e variabilidade de infecções, mecanismos patogênicos intrínsecos, e especialmente a crescente resistência de *Staphylococcus aureus* a diversos fármacos fundamentam a necessidade de pesquisas sobre estes patógenos (GUSHIKEN *et al.*, 2016).

Dentre o grupo de bactérias classificadas como Gram-negativas *Escherichia coli* é um micro-organismo comensal encontrado no trato gastrointestinal dos seres humanos, especialmente no intestino grosso, sendo exposta ao ambiente através das fezes. Além das cepas comensais estas bactérias podem ocasionar uma variedade de doenças como: diarreias, colite hemorrágica e síndrome urêmica, condicionadas a manifestação de fatores de virulência e patogenicidade. Seu crescimento e sobrevivência depende de condições ideais de temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, competição com outros micro-organismos e formação de biofilmes (JANG, *et al.*, 2017).

Escherichia coli é um patógeno com um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos principalmente por meio de transferência horizontal de genes onde um micro-organismo atua como doador e como receptor de genes de resistência, fazendo que que possa adquirir e transmitir estes genes. Desta forma a resistência de *Escherichia coli*, é considerada um grande desafio para tratamento de infecções (POIREL *et al.*, 2018).

Bactérias Gram-positivas possuem maior sensibilidade a ação de antibióticos, em relação a Gram-negativas, este fato se dá devido a parede bacteriana que não impede a penetração de substâncias nocivas, enquanto as bactérias Gram-negativas possuem um sistema de barreira eficaz com fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas que dificultam a penetração dos compostos presentes em antimicrobianos, e consequente resistência aumentada a ação dos mesmos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Em estudo de revisão sobre os mecanismos de resistência de bactérias a antibióticos destaca-se como principais responsáveis por este fenômeno: Inativação enzimática do fármaco, modificação do alvo do antibiótico, bombas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e formação de biofilmes. Associado a estes fatores biológicos o uso indiscriminado de medicações vem contribuindo para o aumento dessa resistência, sendo importante a busca por novos metabólitos ativos que possam combater estes agentes patogênicos (DA COSTA; JÚNIOR, 2017).

O tratamento de infecções decorrentes de bactérias apresentou uma grande evolução nas últimas décadas devido a descoberta dos antibióticos, paradoxalmente ocorreu a evolução dos micro-organismos que ora sensíveis a determinados fármacos, foram se adaptando aos compostos químicos presentes nas medicações e então surgiu o problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos, fato este que tornou-se um crescente problema de saúde pública decorrente da dificuldade de combater agentes

patogênicos e consequente aumento da mortalidade devido a infecções (DA SILVA; AQUINO, 2018).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais foram cedidos pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná – UFPR – Brasil. Amostras da espécie *Piper regnellii* foram coletadas no município de Atalanta, Santa Catarina, sendo coletado em média dez exemplares. No campo foram localizados espécimes e realizado o registro das coordenadas, com: S 27° 28', W 49° 48' e altitude 548m. O material foi transportado até o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas Espírita, onde foram preparadas exsiccatas com registro MBM085153 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992).

Amostras da espécie *Baccharis milleflora* foram coletada município de Piraquara, Paraná. Os espécimes foram localizados no campo, com as coordenadas: latitude 25°32' S, longitude 49°03' W e altitude 985 (Figura 1). Logo após foram transportadas para o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas do Museu Botânico Municipal de Curitiba onde foram preparadas exsiccatas e herborizadas com o número HFIE 8.920 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992).

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação durante 2,5 horas em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50g de folhas secas em 1L de água destilada, com 3 repetições para minimizar erro experimental e homogeneizar as amostras (WASICKY, 1963). Para secar as folhas utilizou-se secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Para determinação do teor de umidade das folhas frescas no momento da extração foram coletadas amostras de 20g em triplicatas, submetidas à secagem em secador elétrico modelo FANEM -Mod. 320 SE com circulação de ar a 65°C até atingir peso constante. Após a extração, as amostras foram coletadas com pipeta de precisão e armazenadas em freezer.

O óleo essencial de *Piper regnellii* obteve atividade antimicrobiana verificada mediante ação intrínseca sobre bactérias e fungos e associado a fármacos de referência. Para o óleo essencial de *Baccharis milleflora* foi verificado a atividade antifúngica intrínseca e associado a fármaco de referência. A ação sobre um dos fatores de virulência fúngica foi verificada para ambos os óleos essenciais.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

A análise química ocorreu apenas com o óleo essencial de *Piper regnellii* onde após a extração foi submetido a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), para posterior quantificação e identificação dos seus constituintes.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso de marca Shimadzu modelo GC-17A, acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). As condições de operação como temperatura de injetor, interface e coluna programada foram adequadamente ajustadas, sendo verificada inclusive a necessidade de elevação de temperatura. Como gás de arraste foi utilizado o gás hélio, mantido ao fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 40 a 350 daltons pelo método de ionização por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70V e fonte de íons a 200 °C.

Os constituintes voláteis foram, em parte, identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional Wiley229 e pela determinação experimental dos índices de Kováts, aplicando-se uma série homóloga de n-alcanos nas mesmas condições usadas para a injeção dos óleos essenciais. Após a obtenção dos valores, estes foram comparados com os índices de Kováts. A identificação definitiva de alguns constituintes voláteis foi realizada por injeção concomitante de padrões químicos com os óleos essenciais. Apenas as identificações tendo como base os dados de espectrometria de massas associada à coinjeção dos óleos com analitos padrões foram considerados definitivas.

3.3 CEPAS MICROBIANAS

Para atividade antibacteriana do óleo essencial de *Piper regnellii* foram utilizadas bactérias de linhagem padrão e resistente obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10.

Para atividade antifúngica de ambos os óleos essenciais foram utilizadas cepas de fungos padrão e isolados clínicos das espécies *Candida albicans* CA INCQS 40006,

CA URM 4121 e *Candida tropicalis* CT INCQS 40042, CT URM 4262, obtidos da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS, e da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.4 PREPARO DOS INÓCULOS

Em um primeiro momento as referidas linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura (Ágar Sabourand Dextrose - ASD) para fungos e HIA (Heart Infusion Ágar) para bactérias e após um período de 24 horas na estufa foram mantidas sob refrigeração a 37 °C.

Os inóculos foram preparados em Placas de *Petri*, contendo 25 mL de ASD a 37 °C por 24 horas. Logo após, as amostras preparadas foram suspensas em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de solução salina a 0,9% estéril, tendo sua turbidez comparada segundo escala de Mc Farland (NCCLS, 2002).

3.5 DROGAS DE REFERÊNCIA

Foram utilizados os fármacos diluídos em água destilada e estéril, sendo para os testes antibacterianos: Norfloxacin, Gentamicina e Eritromicina com uma concentração inicial de 1.024 µg/mL. Para testes antifúngicos foi utilizado Fluconazol na concentração inicial de 4.096 µg/mL.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Foram preparados em *eppendorfs* 1.500 µL de solução, sendo 1.350 µL do meio de cultura e 150 µL do inóculo. Em seguida foi realizada a técnica de microdiluição em uma placa com 96 poços, sendo adicionado 100 µL da solução inicial em cada poço, logo após foi realizada a microdiluição do óleo essencial por coluna, para o inóculo que contém bactérias o teste foi realizado em triplicata com concentração no primeiro poço de 512 µg/mL e no último de 0,5 µg/mL. Para o inóculo que contém fungos foi realizada microdiluição em quadruplicata, com concentração no primeiro poço de 2.048 µg/mL, e 2 µg/mL no último.

Logo em seguida as placas foram mantidas na incubadora a 37 °C por 24 horas. Para leitura das placas bacterianas foi acrescentada 20 µL de rezaurina em cada poço com observações visual após uma hora (JAVADPOUR et al, 1996). Para a leitura de fungos utilizou-se espectrofotometria no aparelho de ELISA ((Termoplate ®), onde os dados obtidos foram trabalhados estatisticamente para gerar a curva de viabilidade celular e a CI₅₀. Foram preparados controle de diluição e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA- CFM

Este teste foi utilizado apenas para viabilidade fúngica. Segundo metodologia proposta por Ernest et al. (1999), com modificações, a partir do teste da CIM foi homogeneizado o meio contido em cada poço com haste estéril e subcultivado em Placa de *Petri* contendo meio de cultura ASD (*Sabourand Dextrose Ágar*). As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas onde verificou-se o crescimento ou supressão de colônias fúngicas.

3.8 VERIFICAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DO ÓLEO ESSENCIAL COM FÁRMACOS

Para este teste foi trabalhado a concentração subinibitória do óleo essencial com CIM/8 para bactérias e CFM/16 para fungos conforme proposto por Coutinho et al. (2008), com modificações. A solução contida nos tubos *eppendorfs* (produto natural + meio de cultura + inóculo) foi adicionada a cada poço de uma placa com 96 poços, sendo 100 µL em cada um deles, em seguida foi feita a microdiluição com 100 µL do fármaco de referência. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a leitura da placa com bactérias foi utilizado rezaurina enquanto a leitura de fungos foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Foram preparados controle de crescimento, de diluição do óleo e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A VIRULÊNCIA FÚNGICA

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis para observação das leveduras. Dentro de câmaras úmidas, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos 3mL de solução contendo meio de cultura e óleo essencial, nas concentrações CFM/2, CFM/4 e CFM/8. Após solidificação do meio foram traçadas duas estrias paralelas captadas do inóculo previamente preparado, logo após foi coberta com lamínula estéril. As câmaras em seguida foram levadas à incubadora e após 24 h (37 °C) onde após esse período ocorreu à visualização do cultivo em microscopia óptica utilizando objetiva de 40 X. Foi contornada toda a estria verificando se houve emissão ou inibição de hifas. Uma câmera fotográfica foi acoplada ao microscópio para captura de imagens. As imagens capturadas foram analisadas mediante a medição de hifas utilizando-se de The Zen 2.0 Software para identificar a quantidade ou inibição de substâncias (CARNEIRO *et al.*, 2019). Foi realizado controle para crescimento de leveduras.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos pela leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA de uma via por meio do teste post hoc de Tukey. Os valores de CIM foram obtidos por regressão não linear para a finalidade da interpolação de valores a partir de curvas padrão (usando o software Graphpad Prism, v. 7.0)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa constam nas subseções apresentadas a seguir, nos tópicos 4.1 e 4.2. no primeiro tópico está descrito o artigo intitulado: *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: Óleo essencial de *piper regnellii* (miq.) c. dc.: composição química e potencial antibacteriano e antifúngico, e encontra-se submetido à revista South African Journal of Botany, Percentil Qualis referência 67%, A3.

No segundo tópico está disposto o capítulo de livro intitulado: *Baccharis milleflora* (LESS.) D. C.: Efeitos contra fungos oportunistas e fator de virulência, que se encontra aceito para publicação no livro eletrônico: O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2, na editora Atena.

4.1 MANUSCRITO 1: ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO

Ana Lays Braga^a; Rafael Pereira da Cruz^a, Joara Nályda Pereira Carneiro^a; Antonia Thassya Lucas dos Santos^a; Débora Lima Sales^a; Camila Fonseca Bezerra^a, Victor Juno Alencar Fonseca^a, Janaina Esmeraldo Rocha^a; Thiago Sampaio de Freitas^a, Fábria Ferreira Campina^a, Maria do Socorro Costa^a; Wanderlei do Amaral^b, Ricardo Andrade Rebelo^c, Luiz Everson da Silva^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^a, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga^a

^aUniversidade Regional do Cariri, URCA, Cel Antônio Luis, 1161, 63105-000, Pimenta, Crato, CE, Brazil

^bUniversidade Federal do Paraná, UFPR, XV de Novembro, 1299, 80.060-000, Centro, Curitiba, PR, Brazil

^cUniversidade Regional de Blumenau, FURB, Antônio da Veiga, 140, 89030-903, Itoupava Seca, Blumenau, SC, Brazil.

* Corresponding Author:

E-mail address: flavianamoraisb@yahoo.com.br (M. F. B. Morais-Braga)

RESUMO

Os óleos essenciais de espécies vegetais são compostos voláteis e hidrofóbicos que podem apresentar atividade antimicrobiana. Mediante a incidência de infecções e a resistência microbiana, o uso de produtos naturais pode ser uma alternativa para inibição de crescimento e redução da patogenicidade de micro-organismos. Este trabalho objetivou investigar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. contra linhagens padrão e resistente de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. O óleo essencial foi analisado através da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antimicrobiana foi verificada através de microdiluição em caldo, observando-se a ação intrínseca do óleo essencial e associação com fármacos. A análise estatística ocorreu através do programa GraphPad Prisma 7.0. A inibição de um fator de virulência fúngica foi verificada por microcultivo em câmaras úmidas, medição de hifas e análise estatística. A composição química mostrou predominância de fenilpropanóides onde o majoritário foi o apiol (70,79%), seguido de dilapiol (15,05%). A atividade antibacteriana foi considerada clinicamente irrelevante e a associação com o fármaco gentamicina resultou em possível sinergismo frente a *E. coli*. A atividade antifúngica mostrou atividade a partir da concentração de 512 µg/mL sendo verificado também um suposto sinergismo com o fluconazol frente a isolado de *C. tropicalis*. A transição morfológica fúngica foi totalmente inibida em todas as concentrações testadas evidenciando potencial antimicrobiano, com necessidade de investigação que evidenciem mecanismos específicos de ação frente a este fator de virulência.

Palavras chaves: Piperaceae. Antimicrobiano. Fitoquímica. Anti-virulência.

1. INTRODUÇÃO

O aumento generalizado de infecções resistentes trouxe a necessidade de busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana advindas de compostos naturais (SILVA; AQUINO, 2018). Considerando a problemática da resistência de micro-organismos, a busca por alternativas naturais, com ênfase no isolamento, purificação e caracterização de plantas com atividade medicinal é fundamental para a descoberta de novas medicações com atividade antimicrobiana (MULAT; PANDITA; KHAN, 2019).

A utilização de produtos naturais constitui uma opção de baixo custo e que produz menor efeito colateral quando comparada a medicamentos sintéticos. Desta forma, substâncias derivadas do metabolismo vegetal, constituem um conjunto de metabólitos secundários, que podem apresentar compostos químicos, com possível atividade antimicrobiana (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016; REMPEL et al., 2019).

A prevalência de resistência antimicrobiana tem levado pesquisadores à exploração de óleos essenciais proveniente de plantas, visando o controle de microorganismos patogênicos resistentes e combate a doenças infecciosas (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). Os óleos essenciais podem ser considerados uma alternativa ao uso de medicações convencionais, quando evidenciadas atividade antimicrobiana (SANTOS, PICOLLI, TEBALDI, 2017).

O gênero *Piper* faz parte da família Piperaceae, que possui como característica relevante a presença de conteúdo oleífero e propriedades terapêuticas (PESSINI et al., 2003; ALVES et al., 2016). Diferentes espécies de *Piper* têm demonstrado significativo número de atividades biológicas tais como ação antibacteriana e antifúngica (KOROISHI et al., 2008). A química do óleo essencial das diferentes espécies deste gênero tem sido bastante estudada, (ALVES et al, 2016; BERNUCI et al, 2016; MGBEAHURUIKE et al, 2017), porém ainda há muitas espécies que necessitam de maior investigação para determinação de compostos específicos. Os metabólitos isolados de algumas espécies têm demonstrado atividade antibacteriana e antifúngica (SALEHI, et al., 2019). O óleo essencial de espécies de *Piper* mostra-se como possível alternativa para desenvolvimento de medicações que busquem combater patógenos resistentes (BERNUCI, et al., 2016).

A espécie *Piper regnellii* (Miq.) C. DC., conhecida popularmente como pariparoba, apresenta-se na forma de arbusto, sendo utilizada como planta ornamental e medicinal, e com potencial para atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também para antifúngica contra espécies de *Candida* (PESSINI, et al., 2003). Na medicina popular tem sido utilizada para tratamento de feridas, edemas e irritações de pele (SALEHI, et al., 2019).

Baseado nesse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper regnellii*, individualmente e combinado com fármacos de referência, contra linhagens padrão e resistente de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e os patógenos oportunistas *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

A coleta do material vegetal para extração do óleo essencial foi realizada no município de Atalanta, Santa Catarina, sendo coletado em média dez exemplares. No campo foram localizados espécimes e realizado o registro das coordenadas, com: S 27° 28', W 49° 48' e altitude 548m. O material foi transportado até o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas Espírita, onde foram preparadas exsicatas com registro MBM085153 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992).

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação durante 2,5 horas em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50g de folhas secas em 1L de água destilada (WASICKY, 1963). Para secar as folhas utilizou-se secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Após a extração, as amostras foram coletadas com pipeta de precisão e acondicionadas em freezer onde permaneceram até o momento da análise.

2.2 Análise de compostos químicos

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso de marca Shimadzu modelo GC-17A, acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). As condições de operação como temperatura de injetor, interface e coluna programada foram adequadamente ajustadas, sendo verificada inclusive a necessidade de elevação de temperatura. Como gás de arraste foi utilizado o gás hélio, mantido ao fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 40 a 350 daltons pelo método de ionização por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70V e fonte de íons a 200 °C.

Os constituintes voláteis foram, em parte, identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional Wiley229 e pela determinação experimental dos índices de Kováts, aplicando-se uma série homóloga de n-alcanos nas mesmas condições usadas para a injeção dos óleos essenciais. Após a obtenção dos valores, estes foram comparados com os índices de Kováts. A identificação definitiva de alguns constituintes voláteis foi realizada por injeção concomitante de padrões químicos com os óleos essenciais. Apenas as

identificações tendo como base os dados de espectrometria de massas associada à coinjeção dos óleos com analitos padrões foram consideradas definitivas.

2.3 Cepas fúngicas e bacterianas

Foram utilizadas cepas de fungos padrão e isolados clínicos das espécies *Candida albicans* CA INCQS 40006, CA URM 4121 e *Candida tropicalis* CT INCQS 40042, CT URM 4262, obtidos da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS, e da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram utilizadas bactérias de linhagem padrão e resistente obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10.

2.4 Preparo dos inóculos

Em um primeiro momento as referidas linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura (Ágar Sabourand Dextrose - ASD) para fungos e HIA (Heart Infusion Ágar) para bactérias e após um período de 24 horas na estufa foram mantidas sob refrigeração a 37 °C.

Os inóculos foram preparados em Placas de *Petri*, contendo 25 mL de ASD a 37 °C por 24 horas. Logo após, as amostras preparadas foram suspensas em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de solução salina a 0,9% estéril, tendo sua turbidez comparada segundo escala de Mc Farland (NCCLS, 2002).

2.5 Drogas de referência

Foram utilizados os fármacos diluídos em água destilada e estéril, sendo para os testes antibacterianos: Norfloxacin, Gentamicina e Eritromicina com uma concentração inicial de 1.024 µg/ML. Para testes antifúngicos foi utilizado Fluconazol na concentração inicial de 4.096 µg/mL.

2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram preparados em *eppendorfs* 1.500 μL de solução, sendo 1.350 μL do meio de cultura e 150 μL do inóculo. Em seguida foi realizada a técnica de microdiluição em uma placa com 96 poços, sendo adicionado 100 μL da solução inicial em cada poço, logo após foi realizada a microdiluição do óleo essencial por coluna, para o inóculo que contém bactérias o teste foi realizado em triplicata com concentração no primeiro poço de 512 $\mu\text{g/mL}$ e no último de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Para o inóculo que contém fungos foi realizada microdiluição em quadruplicata, com concentração no primeiro poço de 2.048 $\mu\text{g/mL}$, e 2 $\mu\text{g/mL}$ no último.

Logo em seguida as placas foram mantidas na incubadora a 37 °C por 24 horas. Para leitura das placas bacterianas foi acrescentada 20 μL de rezasurina em cada poço com observações visual após uma hora (JAVADPOUR et al, 1996). Para a leitura de fungos utilizou-se espectrofotometria no aparelho de ELISA ((Termoplate ®), onde os dados obtidos foram trabalhados estatisticamente para gerar a curva de viabilidade celular e a CI_{50} . Foram preparados controle de diluição e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM

Este teste foi utilizado apenas para viabilidade fúngica. Segundo metodologia proposta por Ernest et al. (1999), com modificações, a partir do teste da CIM foi homogeneizado o meio contido em cada poço com haste estéril e subcultivado em Placa de *Petri* contendo meio de cultura ASD (*Sabourand Dextrose Ágar*). As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas onde verificou-se o crescimento ou supressão de colônias fúngicas.

2.8 Verificação do efeito combinado do óleo essencial com fármacos

Para este teste foi trabalhado a concentração subinibitória do óleo essencial com CIM/8 para bactérias e CFM/16 para fungos conforme proposto por Coutinho et al. (2008), com modificações. A solução contida nos tubos *eppendorfs* (produto natural + meio de cultura + inóculo) foi adicionada a cada poço de uma placa com 96 poços, sendo 100 μL em cada um deles, em seguida foi feita a microdiluição com 100 μL do fármaco de referência. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a leitura da placa com bactérias foi utilizado resazurina enquanto a leitura de fungos foi realizada

em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Foram preparados controle de crescimento, de diluição do óleo e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.9 Avaliação do efeito sobre a virulência fúngica

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis para observação das leveduras. Dentro de câmaras úmidas, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos 3mL de solução contendo meio de cultura e óleo essencial, nas concentrações CFM/2, CFM/4 e CFM/8. Após solidificação do meio foram traçadas duas estrias paralelas captadas do inóculo previamente preparado, logo após foi coberta com lamínula estéril. As câmaras em seguida foram levadas à incubadora e após 24 h (37 °C) onde após esse período ocorreu à visualização do cultivo em microscopia óptica utilizando objetiva de 40 X. Foi contornada toda a estria verificando se houve emissão ou inibição de hifas. Uma câmera fotográfica foi acoplada ao microscópio para captura de imagens. As imagens capturadas foram analisadas mediante a medição de hifas utilizando-se de Software para identificar a quantidade ou inibição de substâncias (CARNEIRO et al., 2019). Foi realizado controle para crescimento de leveduras.

2.10 Análise Estatística

Os dados obtidos pela leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA de uma via por meio do teste post hoc de Tukey. Os valores de CIM foram obtidos por regressão não linear para a finalidade da interpolação de valores a partir de curvas padrão (usando o software Graphpad Prism, v. 7.0)

3.RESULTADOS

O óleo essencial obteve rendimento de 0,85%, obtendo-se identificação química dos compostos por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotecas (WILEY, 1994; NIST, 2016) e por seus índices de retenção linear,

calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₇-C₂₆) e comparados com dados da literatura (Adams, 2007). Os compostos detectados, estão dispostas na Tabela 1, com identificação de 94,8% dos constituintes, sendo o majoritário o apiol (70,79%), seguido do dilapiol (15,05%), β-Eudesmol (2,98%), Bicycloterpeno (2,27%), α-Eudesmol (2,14%) e γ-Gurjunene (1,25%). Observou-se 85,84% de compostos fenilpropanóides e 8,6% de sesquiterpenos.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii*

| No | Componente | IRcal /KI | % |
|--------------|--------------------------------|------------------|--------------|
| 1 | Gurjunene γ- | 14831/477 | 1.25 |
| 2 | Bicycloterpeno | 1503/1500 | 2.27 |
| 3 | Dilapiol | 1636/1620 | 15.05 |
| 4 | Eudesmol β- | 1661/1650 | 2.98 |
| 5 | Eudesmol α- | 1664/1653 | 2.14 |
| 6 | Apiol | 1695/1678 | 70.79 |
| Total | | | 94,8 |

identificado

IRcal – Índice de retenção calculado

KI – índice de Kóvats

A Concentração Inibitória Mínima, CIM bacteriana, obteve resultado ≥ 1.024 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas, concluindo-se assim que o produto natural não foi capaz de induzir a inibição de crescimento dos micro-organismos, em concentração de relevância clínica (HOUGHTON et al., 2007).

Conforme Figura 1, a associação do óleo essencial com os antibióticos de referência apresentou, frente a estirpes multirresistentes de *S. aureus* efeito antagônico quando associado com os fármacos norfloxacin e gentamicina. Para a combinação com eritromicina não foi observado efeito estatisticamente relevante.

Frente às estirpes de *E. coli*, a junção do óleo essencial com o fármaco gentamicina mostrou efeito sinérgico, com redução da concentração do antibiótico. Para associação com norfloxacin foi observado antagonismo e os resultados com eritromicina foram considerados irrelevantes estatisticamente.

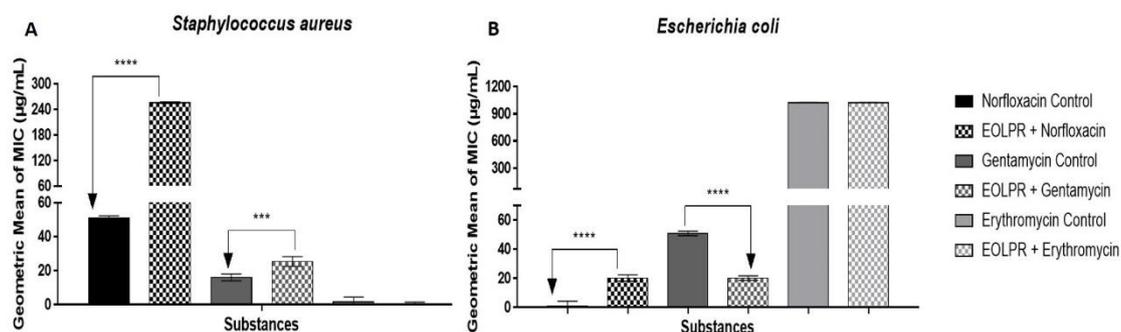


Figura 1: Ação moduladora do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* associado aos antibióticos norfloxacin, gentamicina e eritromicina. EOLPR: óleo essencial das folhas de *Piper regnellii*.

A figura 2 demonstra a viabilidade celular de *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo possível observar inibição de crescimento nas concentrações de 512 µg/mL e 1024 µg/mL para CA URM 4127 e CA INCQS 40006, respectivamente (Figura 2.A e B), enquanto para as linhagens de *C. tropicalis* (Figura 2.C e D), verificou-se efeito inibitório de crescimento em 2048 µg/mL.

A associação do óleo essencial com o Fluconazol, apresentou curva semelhante a ação do fármaco sozinho, frente as cepas de (CA INCQS 40006) e (CT INCQS 40042). Para (CA URM 4127) é possível observar um possível antagonismo nas concentrações de 64 µg/mL a 1024 µg/mL, onde a associação do óleo essencial com o fármaco resultou em aumento da concentração inibitória quando comparada a curva do fármaco sozinho. A combinação do óleo essencial com o fluconazol frente a cepa isolada (CT URM 4262), mostrou possível sinergismo, onde evidencia-se um efeito melhor do que a do Fluconazol sozinho, nas concentrações de 32 a 1024µg/mL.

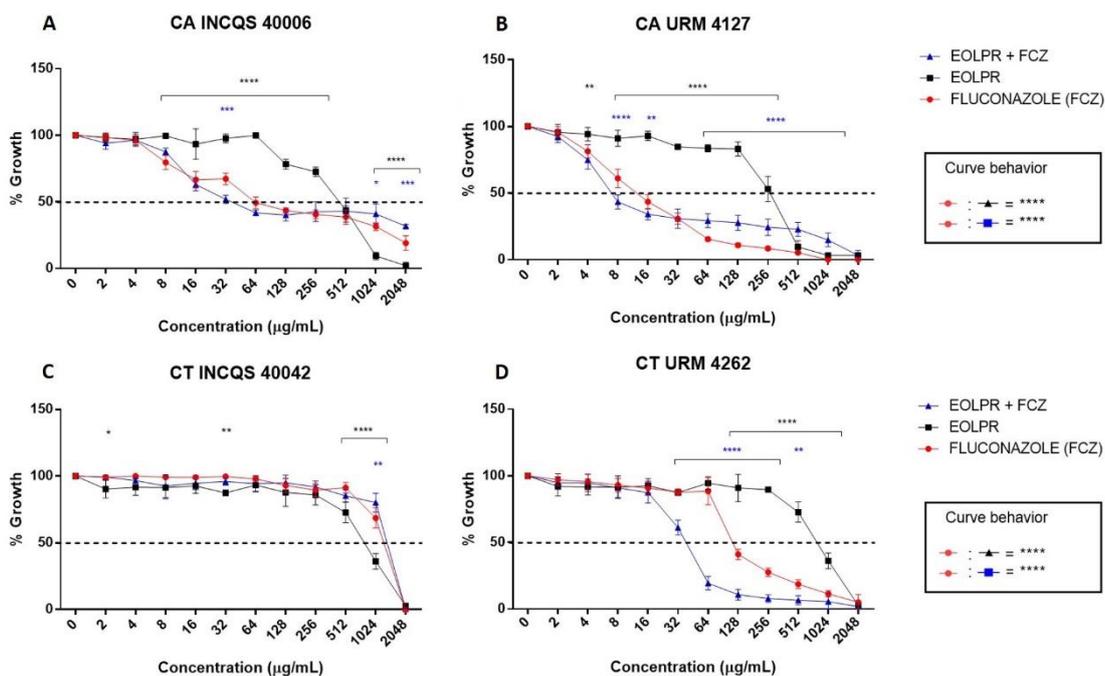


Figura 2: **A e B** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEFPR (óleo essencial das folhas de *Piper regnellii*) contra estirpes de *C. albicans* (CA). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. **C e D** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ), associado ao OELPR (óleo essencial de *Piper regnellii*) contra estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

Considerando a concentração necessária para inibir 50% das células fúngicas, a Tabela 2 demonstra que para as cepas CA INCQS 40006, CA URM 4127 e CT URM 4262, a junção do óleo essencial com o fármaco de referência obteve valores menores de IC₅₀, quando comparado ao fármaco isolado. Para a cepa CT INQS 40042, o valor de IC₅₀ foi maior que o do fluconazol.

Tabela 2 – Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀) (µg/mL) do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* frente a diferentes estirpes de *Candida*

| | CA INCQS 40006 | CA URM 4127 | CT INCQS 40042 | CT URM 4262 |
|-------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| OEFPR | 419.94 | 263.82 | 802.95 | 804.39 |
| FLUCONAZOL | 74.07 | 12.51 | 1378.5 | 135.45 |
| OEFPR + FCZ | 32.77 | 7.25 | 1410.5 | 36.14 |

CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; FCZ: Fluconazol; OEFPR – Óleo essencial das folhas de *Piper regnellii*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Universidade Federal de Pernambuco.

Para análise da CFM foi considerada a concentração fungicida aquela em que houve impedimento do crescimento de colônias. Foi verificado efeito fungicida intrínseco frente às linhagens de *C. albicans* na concentração de 2.048 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto contra *C. tropicalis* a concentração fungicida foi $\geq 4096 \mu\text{g/mL}$. A associação do óleo essencial com Fluconazol obteve valores de CFM $\geq 4096 \mu\text{g/mL}$ para todas as linhagens, dessa forma o efeito fungicida do fármaco não foi potencializado, havendo antagonismo de CFM na associação contra linhagens de *C. albicans*.

A ação do óleo essencial sobre a morfologia fúngica foi testada nas concentrações CFM/2 = 1024 $\mu\text{g/mL}$, CFM/4= 512 $\mu\text{g/mL}$, CFM/8= 256 $\mu\text{g/mL}$, para as cepas de *Candida albicans* e CFM/2 = 2048 $\mu\text{g/mL}$, CFM/4= 1024 $\mu\text{g/mL}$, CFM/8= 512 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas de *Candida tropicalis*, (Figura 3), sendo possível observar a inibição total do crescimento de filamentos em relação ao controle, inibindo totalmente a transição morfológica fúngica.

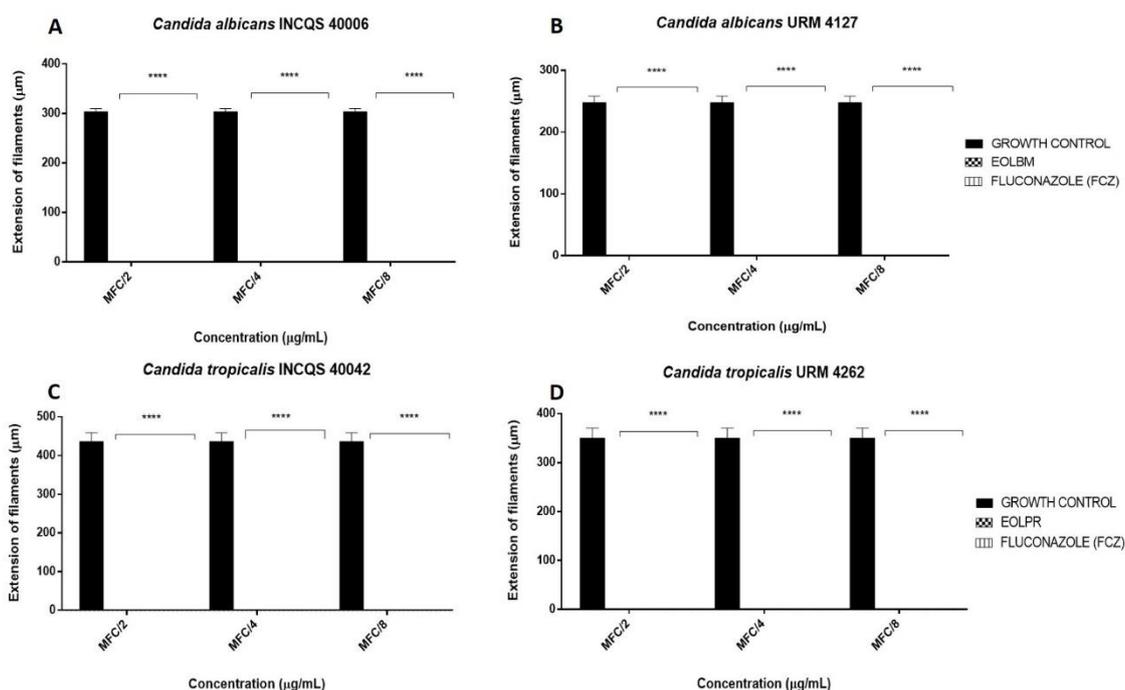


Figura 3: A e B Efeito inibitório do fluconazol e do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (OEFPR) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. albicans*. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. C e D Efeito inibitório do fluconazol e do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (OEFPR) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. tropicalis* INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

4. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são compostos por uma variedade de substâncias derivadas do metabolismo secundário do vegetal (QUIQUI et al, 2019). Em pesquisa de revisão sobre as espécies de *Piper*, Salehi et al., (2019), evidenciaram que das 130 espécies contempladas no estudo, apenas 16 tiveram informações detalhadas quanto a sua constituição química, e dentre estas não se inclui *P. regnellii*.

Em análise química do óleo essencial das folhas frescas *P. regnellii*, Pessini et al., (2003) obtiveram rendimento de 0,80%, valor próximo ao encontrado neste estudo (0,85%). Os óleos essenciais de uma forma geral costumam apresentar como constituintes principais compostos terpenos e seus derivados, sendo que as espécies de *P.* apresentam predomínio de monoterpenos e sesquiterpenos (BERNUCI et al, 2016; OWEN; LARDI, 2018). A classe de fenilpropanóides pode ser encontrada em grande proporção no óleo essencial das flores, folhas e caule de *P. regnellii*, podendo ser usada como marcador dessa espécie (SANTOS et al., 2014). Esta classe de compostos é amplamente distribuída nos vegetais sendo constituídas por um anel aromático, unido a uma cadeia de três carbonos, e derivados biossinteticamente do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2010).

Sobre o perfil químico, os dados obtidos divergem dos resultados encontrados por Pessini et al., (2003), onde os autores identificaram o β mirceno como componente majoritário do óleo essencial, com predomínio de 70% em relação aos outros compostos, divergindo do encontrado neste estudo, onde o apiol foi o composto mais abundante (70,79%), ressalta-se que apesar dos resultados diferentes, o óleo essencial de ambos os estudos foram extraídos das folhas de espécies coletadas no estado do Paraná, porém condições como clima, solo e fatores ambientais não foram idênticos, o que pode justificar as diferenças de compostos.

Os resultados encontrados neste estudo também divergem dos evidenciados por Constantin (2001), que avaliou o óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* coletadas no estado de São Paulo, sendo o constituinte principal β mirceno (52,6%), seguido de linalol (15,9%), β cariofileno (8,5%) e Bicyclgermacreno (2,9%). Nota-se que dentre os compostos citados apenas o Bicyclgermacreno, consta nos nossos resultados, porém em proporções menores (2,27%), o composto predominante apiol não foi relatado pelos autores.

Diferenças na composição química de óleos essenciais pode ser atribuída a fatores genéticos e ambientais, como clima e solo, além do desenvolvimento e idade da planta (BERNUCI et al., 2016; LUCENA et al., 2017). Em estudo sobre variação dos componentes voláteis do óleo essencial das folhas de *P. regnellii*, Anderson et al., (2018) observaram diferenças da composição química coletado em diferentes horários do dia (8h -12h-16h-20h), no mesmo dia, verificando assim que alterações do ciclo circadiano dos vegetais podem influenciar nos compostos químicos.

Conforme Quiqui et al., (2019), os metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais representam uma interface química entre a planta e o ambiente, e fatores como sazonalidade, meio e interações de uma forma geral, podem redirecionar a via metabólica e conseqüentemente produzir compostos diferentes. Salehi et al., (2019) evidenciam que os óleos essenciais podem variar seus constituintes a depender de qual órgão vegetal, será realizada a extração.

A possível atividade antimicrobiana dos óleos essenciais advém de suas características hidrofóbicas, o que pode levar a partição com lipídeos da membrana celular e mitocôndrias das bactérias, deixando-as mais permeáveis com conseqüente vazamento de moléculas essenciais a sua sobrevivência (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA NOVALES, 2012; DHIFI et al., 2016).

Na análise da ação intrínseca do óleo essencial de *P. regnellii* contra as cepas bacterianas não foi possível observar a inibição do crescimento de micro-organismos. Em estudo da atividade da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *P. regnellii*, Constantin et al. (2001) relataram ação antibacteriana contra cepas de *S. aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, porém a metodologia utilizada foi disco difusão e, além disso, o óleo essencial testado apresentou mirceno como composto majoritário (52,6%), diferentemente deste estudo que encontrou o Apiol (70%) como substância predominante. Embora a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais não seja atribuída a um único fator específico, seu mecanismo de ação depende em parte da variabilidade dos compostos químicos (FALLEH, et al., 2020).

As espécies de *Piper* são consideradas promissoras quanto a sua ação antimicrobiana, a exemplo, estudos com o extrato de *P. regnellii* demonstram ação relevante atuando na inibição de crescimento frente a bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (HOLETZ et al., 2002; PESSINI et al., 2003). Produtos obtidos de espécies de *Piper* podem ser utilizados como alternativa para tratamento de patógenos

resistentes, tendo demonstrado ação contra micro-organismos incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ALVES et al., 2016; MGBEAHURUIKE et al., 2017).

A aplicação sincrônica de óleo essencial e antibiótico frente a micro-organismos, é estudada, como alternativa para potencializar a ação dos fármacos (OWEN; LARDI, 2018).

A interação do óleo essencial de *Piper regnellii* com antibióticos resultou em efeito antagônico frente a *S. aureus*. As bactérias Gram-positivas são descritas como menos susceptíveis a ação de óleo essencial, devido características da parede celular, e o componente hidrofóbico do óleo (LIMA; BENJAMIN; SANTOS, 2017), além disso, considerando que os óleos essenciais são uma mistura complexa, com vasta ampla atividade biológica (FALLEH et al. 2020), as interações destes compostos com o fármaco podem estar associadas a diminuição de sua ação, prejudicando a atividade antimicrobiana.

A associação do óleo essencial com a gentamicina conseguiu reduzir a concentração do fármaco necessária para inibir o crescimento de *E. coli*. Sendo o referido patógeno uma bactéria Gram-negativa, características de sua parede celular, como a presença de uma camada externa de lipopolissacarídeos podem induzir a um aumento da susceptibilidade da ação de óleos essenciais (DHIFI et al., 2016). Considera-se ainda que, a interação das substâncias derivadas do metabolismo vegetal com o antibiótico, pode contribuir para redução da concentração do fármaco e para diminuição de cepas resistentes (SALES et al. 2017; LIMA et al. 2020). O sinergismo evidenciado no gráfico demonstra que a inibição de crescimento ocorreu na concentração de 20 µg/mL, porém de acordo com CLSI (2015), para que *E. coli* seja considerada sensível a ação da gentamicina, esse valor deve ser ≤ 4 µg/mL, dessa forma a interação da gentamicina com óleo essencial mesmo demonstrando sinergismo não foi capaz de reduzir de forma significativa o crescimento de *E. Coli*.

O óleo essencial de *Piper regnellii* obteve baixa atividade antifúngica contra espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, com altos valores de IC₅₀ e inibição de crescimento em concentrações elevadas, de acordo com Sartoratto (2004), o potencial antifúngico é considerado forte quando os valores da CIM são menores que 500 µg/mL. Em estudo de atividade antimicrobiana do óleo essencial da referida espécie, Constantim et al. (2001) relataram atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, porém conforme já relatado acima, o estudo diferiu quanto a metodologia e componentes químicos encontrados no óleo.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo, com outras espécies de *Piper* também evidenciaram baixa atividade antifúngica contra espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (BEZERRA et al. 2020; CARNEIRO et al. 2019). Estudos com extratos de *Piper regnellii* demonstram potencial antimicrobiano da espécie onde foi evidenciado atividade antifúngica, contra: *Candida albicans* (PESSINI et al, 2003) e *Candida krusei* (HOLETZ et al., 2002). As propriedades biológicas do gênero *Piper* estão diretamente relacionadas aos componentes químicos derivados de seus metabólitos secundários (BEZERRA et al., 2020).

O composto químico apiol, encontrado em maior quantidade no óleo essencial de *Piper regnellii*, é descrito como potencial antifúngico contra *Aspergillus flaus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium herbarum*. A atividade antimicrobiana foi atribuída aos efeitos lipofílicos e estéricos de fenilpropanóides, dentre eles o apiol, na membrana plasmática dos fungos, inibindo a síntese de ergosterol, levando ao extravasamento dos componentes celulares (DAS et al. 2020). A atividade antifúngica de *Piper aduncum* contra o fungo *Clinepellis perniciososa* foi atribuída a presença de grande quantidade de apiol no óleo essencial da espécie (ALMEIDA et al., 2009). Apesar do apiol e dilapiol terem sido encontrados em grande quantidade neste estudo, o produto natural não evidenciou alta atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, é preciso considerar que além das propriedades químicas do produto natural, características intrínsecas do micro-organismo podem dificultar a ação de antimicrobianos (BEZERRA et al. 2019).

A ação combinada do óleo essencial com o fluconazol apresentou possível sinergismo contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, resultando em diminuição da concentração da droga. O fluconazol é a droga de escolha para a maioria de infecções causadas por espécies de *Candida*, porém tem sido evidenciados mecanismo de resistência para fungos do referido gênero (MC ALISTER; SHAPIRO, 2019). Diante da limitação de antifúngicos disponíveis, a terapia combinada tem sido uma abordagem promissora, onde o estudo do sinergismo de produtos naturais com antifúngicos de referência podem contribuir para diminuição da resistência (KIOSHIMA, et. al., 2019; ANDRADE-NETO, et al., 2020; DO AV SÁ et al., 2020).

O sinergismo dos óleos essenciais com drogas terapêuticas pode estar associado a complexa mistura de componentes químicos presentes nestes óleos, que interagem entre si, e com o fármaco, dificultando os mecanismos de resistência do micro-organismo (BERNUCI et al. 2016; ANDERSON et al, 2018).

As espécies de *Candida* possuem mecanismos de virulência que estão associados ao grau de patogenicidade no organismo humano, a transição morfológica constitui um destes mecanismos, onde a célula passa de levedura a filamentos, contribuindo também para resistência microbiana (BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017; Mc ALISTER; SHAPIRO, 2019). A ação do óleo essencial de *Piper regnellii* inibiu totalmente a formação de hifas nas cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, resultados semelhantes foram encontrados por Carneiro et al, (2019), utilizando óleo essencial das espécies de *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium*, a inibição de hifas por espécies de *Candida* e por Bezerra et al. (2020) utilizando o óleo essencial de *Piper caldense*, porém em maiores concentrações (2.048 µg/mL). Oliveira et al. (2016) demonstraram ação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* na redução da emissão de hifas e pseudohifas em espécies de *Candida*

A capacidade de formação de hifas está associada ao aumento do potencial invasor de espécies de *Candida*, contribuindo para um maior risco de infecções generalizadas e aumento da mortalidade por infecções fúngicas (MC ALISTER; SHAPIRO, 2019; KORNITZ, 2019).

A transição morfológica de espécies de *Candida*, está associada a mecanismos celulares internos, acompanhados pela expressão de um grande número de genes, e fatores de transcrição, que podem induzir a transição de levedura para hifas, estando a inibição desta transição associada a capacidade de reprimir a expressão destes genes (ROCHA et al, 2001; CLOUTIER et al., 2003; KORNITZ, 2019). Embora não tenha sido evidenciado neste estudo qual mecanismo específico de ação do óleo essencial na inibição de hifas, pode-se supor que esteja relacionado a inibição de genes ou de proteínas que contribuem com a transição morfológica de espécies de *Candida*, entretanto são necessários estudos para elucidar as causas da inibição.

A capacidade de formação de hifas aumenta o potencial invasor de espécies de *Candida*, contribuindo para um maior risco de infecções generalizadas e aumento da mortalidade por infecções fúngicas (MC ALISTER; SHAPIRO, 2019; KORNITZ, 2019). Dessa forma destaca-se o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Piper regnellii*, tendo em vista que foi capaz de inibir totalmente o crescimento de hifas para cepas analisadas podendo ser por propriedades intrínsecas de algum constituinte do óleo essencial, como também a interação entre seus componentes químicos.

5. CONCLUSÃO

O óleo essencial da espécie *Piper regnellii* apresenta composição química com a predominância de fenilpropanóides, sendo apiol e dilapiol os compostos encontrados em maior quantidade. A atividade antimicrobiana intrínseca do produto natural apresentou baixa atividade antibacteriana e antifúngica. A associação do óleo essencial com gentamicina e fluconazol resultou em possível sinergismo contra *E. coli* e *C. tropicalis*, respectivamente.

A transição morfológica de *C. albicans* e *C. tropicalis*, foi totalmente inibida pela ação do óleo essencial em todas as concentrações testadas, evidenciando um potencial antimicrobiano da espécie, com necessidade de investigação relacionando quais mecanismos específicos de ação sobre este fator de virulência. Ressalta-se que este estudo é pioneiro em avaliar a ação do óleo essencial de *Piper regnellii* sobre a morfologia fúngica.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream.
- Almeida, R. R. et al., 2009. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chemistry & biodiversity*, 6(9), 1427-1434.
- Alves et al., 2016. Atividade antimicrobiana de produtos obtidos de espécies de *Piper* (Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 21(2):168-180.
- Anderson, Roseli R. et al. 2018. Circadian variation and in vitro cytotoxic activity evaluation of volatile compounds from leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *regnellii* (C. DC.) Yunck (Piperaceae). *Natural product research*, v. 32, n. 7, p. 859-862.
- Andrade Neto J. B. et al., 2020. Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. Resistance to fluconazole. *Future Microbiology*, v. 15, n.3 p. 177-188.
- Bernici, K. Z. et al., 2016. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. *Molecules*, v. 21, n. 12, p. 1698.
- Bezerra, José Weverton Almeida et al., 2020. Antibiotic Potential and Chemical Composition of the Essential Oil of *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae). *Applied Sciences*, v. 10, n. 2, p. 631.
- Carneiro, N.P.C. et al., 2019. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. *Microbial Pathogenesis* 136 (2019) 103700.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Information Supplement, v.34. n.3, p.44.
- Cloutier R, M.; et al. 2003. The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*.

Constantin, Mara B. et al., 2001. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta medica*, v. 67, n. 08, p. 771-773.

Coutinho et al., 2008. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemother.*, 54:328–330.

Das, Somenath et al., 2020. Exploration of some potential bioactive essential oil components as green food preservative. *Food Science and Technology*, v. 137, p. 110498.

De Lima, Dijaci Santos et al., 2020. Atividade antibacteriana de citronelal e citronelol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. *Archives of Health Investigation*, v. 9, n. 3.

Del Quiqui, Erci Marcos et al., 2019. Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semideciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, v. 6, n. 5.

Dhifi, W. et al., 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medecines*, 3, 1-16.

Da Av S. et al., 2019. Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant *Candida* isolates. *Future Microbiology*. Nov. 14.

Ernst, E.J.; et al., 1999. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 33(2), 75-80.

Falleh, Hanen et al., 2020. Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative. *Food Chemistry*, p. 127268.

Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G., 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 391-400.

Javadpour, et al., 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 107–3113.

Kioshima, Erika Seki et al., 2019. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. *Biotechnology Letters*, v. 41, n. 12, p.1391-1401.

Kornitzer, D. 2019. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. *Journal of Fungi*, 5(1), 21.

Koroishi A. M., 2008. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* 117, p. 270–277.

Lawrence, G. H. M., 1951. *Taxonomia das Plantas Vasculares*, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 296p.

Lucena, B. F. et al., 2015. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1).

Maia, T. F., et al. 2015. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 17(1), 105-116.

Mgbeahuruike, Eunice Ego et al., 2017. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany*, v. 112, p. 54-69.

Morais-Braga, et al., 2016. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 1140-1152.

Mulat, Mulugeta; et al., 2019. Medicinal plant compounds for combating the multi-drug resistant pathogenic bacteria: A Review. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 183-196.

NCCLS Norma M27-A2.,2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4).

Pessini et al., 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira Farmacognosia* v. 13, supl., p. 21-24.

Rempel, Claudete et al., 2019. Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 10, n. 4, p. 57-82.

Rocha, C.R.; et al., 2001. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular Biology. Cell* 12 (11) 3631-3643..

Salehi et al, 2019. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*, 24, 1364.

Santos, C. H. S.; PICOLLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R., 2017. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. *Revista Instituto Adolfo Lutz*.76:e1719.

Sartoratto, A. et al., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n.4, p. 275-280.

Silva, J. A. et al., 2014. Antioxidant activity of *Piper arboreum*, *Piper dilatatum*, and *Piper divaricatum*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 3, p. 700-706.

Silva, O.; Aquino, S. 2018. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de epidemiologia controle de infecção*, p. 472-482.

Simões, C. M. O. et al. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 248-258.

Solórzano-Santos, F.; Miranda-Novales, M. G. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 136- 141.

Swamy, M. Q.; Mohd, S. A.; Sinniah, S. I, 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Wasicky, R. 1963. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-8.

Wiley Registry of Mass Spectral Data, 1994. 6th edn. Wiley Interscience, New York.

4.2 MANUSCRITO 2: *Bacharis milleflora* (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA

Ana Lays Braga

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/1253747031699243>

Rafael Pereira da Cruz

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/3675589918865790>

Joara Nályda Pereira Carneiro

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato - CE

<http://lattes.cnpq.br/6852258984414550>

Antonia Thassya Lucas dos Santos

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/4758519850222411>

Débora Lima Sales

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/7312046927599488>

Victor Juno Alencar Fonseca

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/7456639999894976>

Luciene Ferreira de Lima

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/8238587720435802>

Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri – URCA

Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/3199766197573928>

Luiz Everson da Silva

Universidade Federal do Paraná – UFPR
Matinhos - PR

<http://lattes.cnpq.br/4038338525106985>

Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga

Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/1557613482101211>

Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE

<http://lattes.cnpq.br/5902756093532709>

* Autor correspondente:

E-mails: flavianamoraisb@yahoo.com.br (M. F. B. Morais-Braga)

Data da submissão: 07 de abril de 2021.

RESUMO: Os óleos essenciais de espécies vegetais podem apresentar diversas atividades biológicas, considerando sua variedade de componentes químicos. A busca por alternativas naturais para tratamento de infecções fúngicas vem sendo explorada tendo em vista a resistência microbiana. Este trabalho objetivou analisar a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Baccharis milleflora* L. frente a *Candida albicans* (CA) e *Candida tropicalis* (CT). A atividade antifúngica foi investigada pelo método de microdiluição em caldo, sendo o óleo avaliado sozinho e em combinação com o fármaco fluconazol. Os dados foram analisados através do programa *Graphpad Prism*, v. 7.0. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada por subcultivo em placas de *Petri*. Efeitos na transição morfológica fúngica foram analisados por microcultivo das cepas em câmara úmida. Os testes antifúngicos do produto isolado não apresentaram ação clinicamente relevante. Porém a associação com o fármaco demonstrou sinergismo frente a *C. tropicalis*. O óleo apresentou efeito fungicida na concentração de 2.048 µg/mL frente a CA e efeito fungistático contra CT. A ação do óleo essencial sobre o fator de virulência, a transição morfológica, demonstrou inibição total do surgimento de estruturas filamentosas invasivas nas linhagens padrão e isolado clínico de *C. albicans*. Frente a *C. tropicalis* provocou inibição total para a linhagem padrão e porcentagens de inibição nas concentrações CFM/2 – 88,6 %, CFM/4 – 52,6 % e CFM/8 – 48,6 %, para isolado clínico foram obtidas. O óleo essencial de *Baccharis milleflora* pode contribuir para inibição de um dos mais importantes fatores de virulência de *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo necessários estudos que evidenciem os mecanismos específicos desta ação.

PALAVRAS-CHAVE: Asteraceae; sinergismo; anti-pleomorfismo; anti-*Candida*.

ABSTRACT: Essential oils of plant species can have several biological activities, considering their variety of chemical components. The search for natural alternatives to treat fungal infections has been explored with a view to microbial resistance. This work aimed to analyze the antifungal activity of the essential oil of *Baccharis milleflora* L. leaves against *Candida albicans* (CA) and *Candida tropicalis* (CT). The antifungal activity was investigated by the broth microdilution method, the oil being evaluated alone and in combination with the drug fluconazole. The data were analyzed using the Graphpad Prism program, v. 7.0. The Minimum Fungicide Concentration (CFM) was determined by subculture in Petri dishes. Effects on the fungal morphological transition were analyzed by microculture of the strains in a humid chamber. The antifungal tests of the isolated product did not present a clinically relevant action. However, the association with the drug showed synergism against *C. tropicalis*. The oil had a fungicidal effect at a concentration of 2,048 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against CA and a fungistatic effect against CT. The action of essential oil on the virulence factor, the morphological transition, demonstrated total inhibition of the appearance of invasive filamentous structures in the standard strains and clinical isolate of *C. albicans*. Against *C. tropicalis* it caused total inhibition for the standard strain and percentages of inhibition in the concentrations CFM / 2 - 88.6%, CFM / 4 - 52.6% and CFM / 8 - 48.6%, for clinical isolate were obtained. The essential oil of *Baccharis milleflora* can contribute to the inhibition of one of the most important virulence factors of *C. albicans* and *C. tropicalis*, being necessary studies that show the specific mechanisms of this action.

KEYWORDS: Asteraceae; synergism; anti-pleomorphism; anti-*Candida*.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e pesquisa de moléculas com potencial terapêutico para uso contra micro-organismos patogênicos tem tido lugar de destaque em estudos com vegetais, pois estes podem apresentar propriedades intrínsecas, com ação antimicrobiana (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). As plantas obtêm substâncias que são essenciais para sua sobrevivência por meio da fotossíntese, e o processo que envolve a síntese destes compostos é o metabolismo primário dos vegetais. A partir da síntese deste processo, advém uma ampla variedade de derivados, que são denominados metabólitos secundários, que inclui uma ampla variedade de componentes (ESQUINCA; MORENO, 2017).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de diversos compostos orgânicos voláteis e hidrofóbicos, advindos do metabolismo secundário dos vegetais e são uma mistura complexa de várias classes de compostos químicos, que podem ser encontrados em diversas partes dos vegetais, normalmente a constituição química pode

variar em plantas da mesma espécie, a depender da região da planta a ser realizada a extração do produto natural. As classes de compostos químicos encontrada com mais frequência nos óleos essenciais, incluem fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos (DEL QUIQUI et al., 2019; WANI et al., 2020).

Os constituintes químicos de óleos essenciais apresentam uma ampla variedade biológica, incluindo atividade antimicrobiana, podendo interferir no crescimento fúngico, com uma variedade de alvos de ação especialmente sobre a membrana e citoplasma de micro-organismos, podendo alterar completamente a morfologia das células (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017; FLORES VILLA et al., 2020).

O aumento da resistência aos antimicrobianos já existentes, justificam as pesquisas por fontes alternativas de tratamento, diversas espécies de vegetais têm apresentado potencial antimicrobiano promissor, sendo alvo de estudos que visam avaliar os possíveis compostos com eficácia contra os micro-organismos resistentes e que tenham baixa toxicidade para o hospedeiro (BONI et al., 2017). Os fungos são patógenos associados a infecções de difícil tratamento no organismo humano, fungos da espécie *Candida* são descritos como micro-organismos oportunistas, pois estão presentes no organismo humano de forma comensal, porém mediante condições de queda da imunidade apresentam aumento da patogenicidade e potencial invasor dos tecidos do hospedeiro (SEYOUM et al., 2020; SHAHABUDIN; AZMI, 2020).

A manifestação cada vez mais frequente de infecções fúngicas, ocorre simultaneamente à resistência elevada a agentes antimicrobianos, dessa forma é necessário a identificação de novos agentes terapêuticos e desenvolvimento de novas formulações, diante deste contexto, os produtos naturais destacam-se como uma fonte de estudo e pesquisa, mediante a possível atividade antimicrobiana presente nos derivados do metabolismo secundário (SILVA et al, 2019).

Espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para tratamento de várias doenças, e estão sendo estudadas, devido apresentar diversos metabólitos secundários, sendo consideradas importantes fontes de novos compostos ativos (MORAIS; CASTANHA, 2011). O referido gênero apresenta-se como o mais numeroso dentro da família Asteraceae, com ocorrência na América, é nativo do Brasil com predomínio na região Sudeste apresenta-se na forma de arbusto, subarbusto, árvore ou trepadeira tendo em torno de 179 espécies (HEIDEN, 2015).

A espécie *Baccharis milleflora* (Less.) D.C. é popularmente conhecida como carqueja-do-lajeado e ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil, crescendo como

arbustos eretos e glabros, que formam populações densas especialmente em solos rasos e úmidos, sendo eventualmente utilizada na medicina popular como antidiurético e anti-inflamatório (HEIDEN, 2015).

Este estudo objetivou avaliar o efeito antifúngico do óleo essencial das folhas de *Baccharis milleflora*, intrínseco e combinado a fármaco, na inibição do crescimento e da virulência de leveduras patogênicas oportunistas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Vegetal

A coleta do material vegetal para extração do óleo essencial foi realizada no município de Piraquara. Os espécimes foram localizados no campo, com as coordenadas: latitude 25°32' S, longitude 49°03' W e altitude 985 (Figura 1). Logo após foram transportadas para o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas do Museu Botânico Municipal de Curitiba onde foram preparadas exsicatas e herborizadas com o número HFIE 8.920 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992).

Figura 1. Partes aéreas da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC.



Fonte: Wanderlei do Amaral.

2.2 Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação durante 2,5 horas em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50g de folhas secas em 1L de água destilada, com 3 repetições para minimizar erro experimental e homogeneizar as amostras (WASICKY, 1963). Para secar as folhas utilizou-se secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Para determinação do teor de umidade das folhas frescas no momento da extração foram coletadas amostras de 20g em triplicatas, submetidas à secagem em secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 65°C até atingir peso constante. Após a extração, as amostras foram coletadas com pipeta de precisão e armazenadas em freezer.

2.3 Cepas Fúngicas

Foram utilizados fungos padrão e isolados clínicos das espécies *Candida albicans* e *Candida tropicalis* obtidos da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS, e da Micoteca URM (University Recife Mycology) da Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 Preparo dos Inóculos

Em um primeiro momento as referidas linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura (Ágar Sabourand Dextrose - ASD) para fungos e após um período de 24 horas na estufa foram mantidas sob refrigeração a 37 °C. Os inóculos foram preparados em Placas de *Petri*, contendo 25 mL de ASD a 37 °C por 24 horas. Amostras foram preparadas em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de solução salina a 0,9 % estéril, tendo sua turbidez comparada segundo escala de McFarland (NCCLS, 2002).

2.5 Drogas de Referência

Foi utilizado o antifúngico Fluconazol, sendo diluído em água estéril e destilada, na concentração inicial de 4.096 µg/mL.

2.6 Determinação da Curva de Viabilidade Celular e Concentração Inibitória de 50 % - CI₅₀

Foram preparados em *eppendorfs* 1.500 µL de solução, sendo 1.350 µL do meio de cultura e 150 µL do inóculo. Em seguida foi realizada a técnica de microdiluição em uma placa com 96 poços, sendo adicionado 100 µL da solução inicial em cada poço, logo após foi realizada a microdiluição do óleo essencial com concentração no primeiro poço de 2.048 µg/mL e 2 µg/mL no penúltimo, o último poço para controle de crescimento.

Logo em seguida as placas foram mantidas na incubadora a 37 °C por 24 horas. Para a leitura, utilizou-se espectrofotometria no aparelho de ELISA (Termoplate ®), onde os dados obtidos foram trabalhados estatisticamente para gerar a curva de viabilidade celular e a CI₅₀. Foram preparados controle de diluição e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima - CFM

Este teste foi utilizado para analisar a viabilidade fúngica após contato com o óleo na microdiluição. Seguiu-se a metodologia proposta por Ernest et al (1999), com modificações. A partir do teste da CIM foi homogeneizado o meio contido em cada poço com haste estéril sendo subcultivado em Placa de *Petri* contendo meio de cultura ASD (*Sabourand Dextrose Agar*). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas onde verificou-se o crescimento ou supressão de colônias fúngicas.

2.8 Verificação do Efeito Combinado do Óleo Essencial com Fármacos

Para este teste foi trabalhada a concentração subinibitória do óleo essencial com CFM/16 conforme proposto por Coutinho et al. (2008), com modificações. A solução contida nos tubos *eppendorfs* (produto natural + meio de cultura + inóculo) foi adicionada a cada poço de uma placa com 96 poços, sendo 100 µL em cada um deles, em seguida foi feita a microdiluição com 100 µL do fármaco de referência. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a leitura do teste foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Foram preparados controle de

crescimento, de diluição do óleo e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.9 Avaliação do Efeito Sobre a Virulência Fúngica

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas/pseudohifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis para observação das leveduras. Dentro de câmaras úmidas, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos 3 mL de solução contendo meio de cultura e óleo essencial, nas concentrações CFM/2, CFM/4 e CFM/8. Após solidificação do meio foram traçadas duas estrias paralelas captadas do inóculo previamente preparado, logo após foi coberta com lamínula estéril. As câmaras em seguida foram levadas à incubadora e após 24 h (37 °C) onde após esse período ocorreu à visualização do cultivo em microscopia óptica (AXIO IMAGER M2 – 3525001980 – ZEISS - Germany) utilizando objetiva de 40 vezes. Foi contornada toda a estria verificando se houve emissão ou inibição de hifas. Uma câmera fotográfica foi acoplada ao microscópio para captura de imagens. As imagens capturadas foram analisadas mediante a medição de hifas utilizando-se de *Software The Zen 2.0* (CARNEIRO et al., 2019). Foi realizado controle para crescimento de leveduras.

2.10 Análise Estatística

Os dados obtidos pela leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA de uma via por meio do teste post hoc de Tukey, usando o software *Graphpad Prism*, v. 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antifúngica do óleo essencial foi estabelecida a partir da curva de viabilidade celular para a ação intrínseca do óleo essencial e mediante associação com fluconazol. A ação do óleo essencial demonstrou inibição de crescimento nas concentrações de 1024µg/mL para CA INCQS 40006 e de 128 µg/mL para CA URM 4127. Para cepas de *Candida tropicalis* a inibição de crescimento ocorreu na concentração de 2.048 µg/mL (Figura 2).

A associação do produto natural com o fluconazol, resultou em curva de inibição de crescimento semelhante à curva do fármaco sozinho frente a cepas CA INCQS 40006 e CA URM 4127. Para cepas CT INCQS 40042 e CT URM 4262, a associação resultou em possível sinergismo, com efeito de inibição de crescimento em menores concentrações quando comparadas a ação do fármaco sozinho.

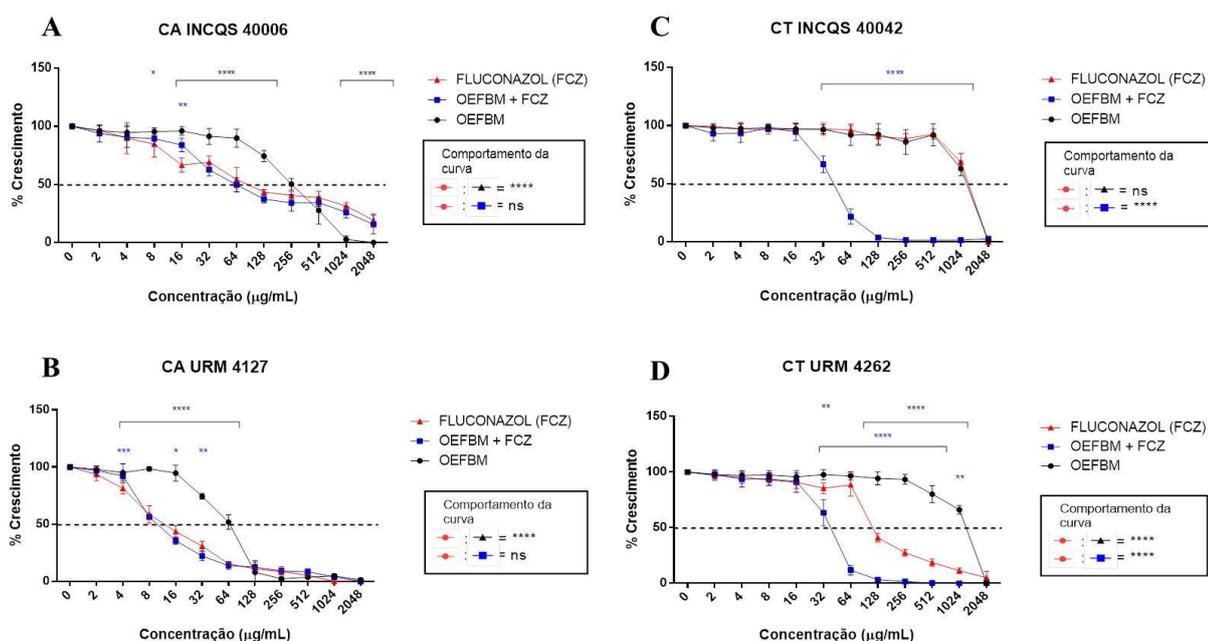


Figura 2: **A e B** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEFBM (óleo essencial das folhas de *Baccharis milleflora*) contra estirpes de *C. albicans* (CA). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Universidade Federal de Pernambuco. **C e D** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ), associado ao OEFBM (óleo essencial de *Baccharis milleflora*) contra estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco

Em relação a concentração necessária para inibir 50 % das células fúngicas, a Tabela 1 demonstra melhor resultado para associação do óleo essencial e fluconazol em relação a ação isolada do fármaco, frente a todas as cepas testadas.

Tabela 1. Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC50) (µg/mL) do óleo essencial de *Baccharis milleflora* frente a diferentes estirpes de *Candida*

| | CA | CA | CT | CT |
|------------|--------|-------|-------------|---------|
| | INCQS | URM | INCQS 40042 | URM |
| | 40006 | 4127 | 4262 | |
| OEBM | 275.08 | 59.05 | 1322.4 | 1241.02 |
| FLUCONAZOL | 90.71 | 12.10 | 1421.6 | 131.58 |

| | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| OEFBM + FCZ | 63.55 | 10.92 | 40.53 | 34.35 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|

CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; FCZ: Fluconazol; OEFBM – Óleo essencial de *Bacharis milleflora*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology. Universidade Federal de Pernambuco.

Neste teste foi observado o efeito do produto natural e fármaco, combinados e sozinhos, se foi fungicida ou fungistático nas concentrações avaliadas. Para as cepas de *C. albicans* houve inviabilização de crescimento na concentração de 2.048 µg/mL (efeito fungicida) e para as cepas de *C. tropicalis* os valores de CFM foram ≥ 4096 µg/mL (efeito fungistático no ensaio).

Os gráficos abaixo (Figura 3 A, B, C, D) evidenciam a ação do óleo essencial sobre um dos mecanismos de virulência de espécies de *Candida*, que se refere à transição morfológica para formação de hifas e pseudohifas. É possível observar que a ação do óleo essencial inibiu completamente a formação de estruturas filamentosas frente a cepas de *Candida albicans*. A inibição total também ocorreu para linhagem de CT INCQS 40042, para CT URM 4262 as porcentagens de inibição foram para CFM/2 – 88,6 %, CFM/4 – 52,6 % e CFM/8 – 48,6 %.

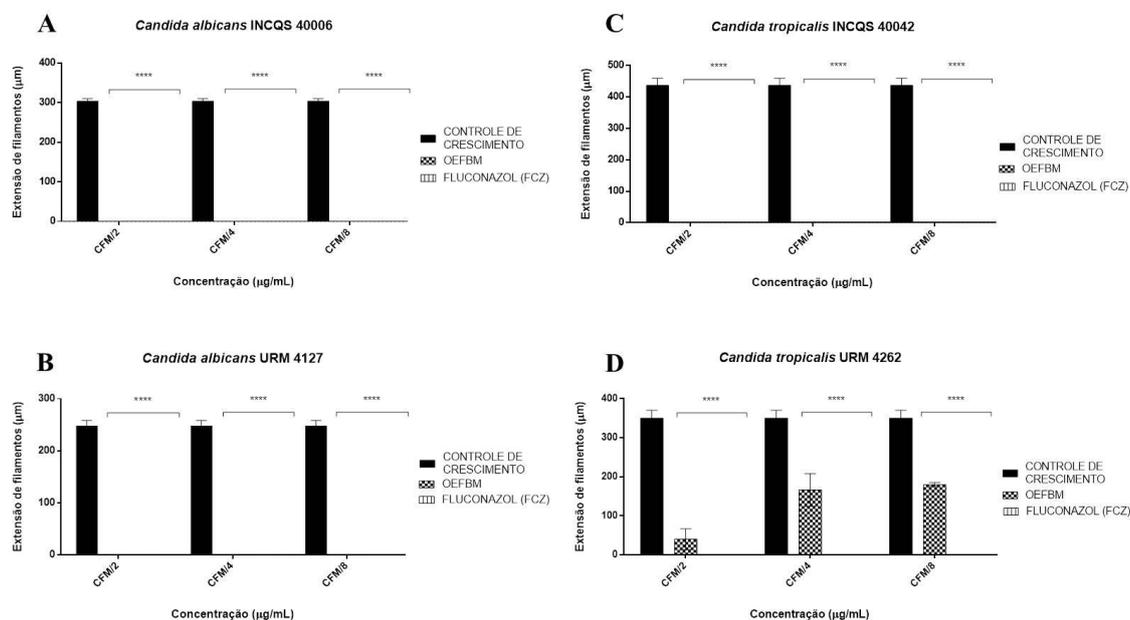


Figura 3: **A e B** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Bacharis milleflora* (OEFBM) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. albicans*. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco. **C e D** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Bacharis milleflora* (OEFBM) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco.

Óleos essenciais têm composição química complexa, devido a presença de muitas substâncias (REHAMN, et al., 2016), A amostra utilizada nesse estudo foi quimicamente avaliada por Do Amaral e colaboradores (2019), sendo possível detectar 50,6% de constituintes químicos, onde o composto majoritário foi o Viridiflorol, (18,6 %) seguido de Cis-beta-guaieno+biciclogermanecrene, (4,7 %) e Epi-alfa-murolol, (3,3 %). Cada composto foi identificado mediante comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotecas (Wiley, 1994) e por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₇-C₂₆) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Estudos acerca da composição química de *B. milleflora* demonstram a ocorrência de compostos químicos terpenos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos (AGOSTINI et al., 2005; MORAIS; CASTANHA, 2011; PEREIRA et al., 2017; TROMBIN- SOUZA et al., 2017).

Os compostos voláteis da espécie *B. milleflora* apresentam alta instabilidade em relação aos seus componentes químicos (BESTEN et al., 2014). Em estudo sobre o óleo essencial de folhas da referida espécie Agostini et al., (2005) encontraram diferenças na composição química de três amostras coletadas na mesma hora e local, obtendo como composto majoritário espatulenol em duas amostras e β – pineno na terceira amostra, tal ocorrência pode ser atribuída a presença de diferentes quimiotipos na espécie. Os compostos encontrados nas três amostras foram diferentes dos encontrados neste estudo que obteve viridiflorol (18,6 %) em maior quantidade quando comparados aos demais, seguido de Cis-beta-guaieno + biciclogermacreno (4,7 %).

Compostos sesquiterpenos foram descritos como majoritários no óleo essencial de *B. milleflora* por Simões et al. (2005), porém os componentes encontrados foram: gamagrjunene e alfa-selinene. O composto biciclogermanecreno foi evidenciado por Pereira et al., (2017), como majoritário no óleo essencial de cladódios de *B. milleflora* com porcentagem maior a encontrada neste estudo (12,6 %), considerando que a extração ocorreu a partir de cladódios e não de folhas, as diferenças químicas podem ser justificadas, tendo em vista que fatores como local, clima e partes de extração do produto natural, podem interferir na sua composição química (REHMAN et al., 2016).

Viridiflorol é um composto da classe dos sesquiterpenos oxigenados, espécies do gênero *Baccharis* apresentam grande quantidade de constituintes químicos que estão incluídos nesta classe de compostos e atividades biológicas de plantas desta espécie, incluindo ação antimicrobiana podem ser atribuídas a presença desta classe de

componentes químicos (ABAD; BERMEJO, 2007; TROMBIM -SOUZA et al., 2017). O viridiflorol também foi evidenciado como principal componente do óleo essencial de *B. milleflora*, por Trombim- Souza et al., (2017) ao analisarem a quantidade do composto extraído de cladódios e inflorescências de espécime masculina e feminina separadamente, porém foi encontrado diferença entre as espécimes, 33,22 % de viridiflorol em espécime masculina e apenas 2,11 % em feminina, demonstrando grande variação de constituintes químicos provavelmente devido ao estado de desenvolvimento morfológico que está relacionado a síntese de metabólitos secundários (BESTEN et al., 2014).

Espécies do gênero *Bacharis* são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, sendo um gênero de alto potencial para desenvolvimento de novos medicamentos. Algumas espécies de *Bacharis* são relatadas na literatura com atividade antimicrobiana, incluindo *B. milleflora*. (RODRIGUES et al., 2016). Os compostos bioativos presentes em produtos naturais podem potencializar a ação de medicações já utilizadas e contribuir para tratamento de acometimentos a saúde humana (MARDARE et al., 2019).

A atividade isolada do óleo essencial contra *C. albicans* e *C. tropicalis* demonstraram baixa atividade antimicrobiana. Resultado semelhante foi descrito por Pereira et al., (2016), que não evidenciou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM), clinicamente relevante ao analisar a ação do óleo essencial de *B. milleflora* contra *C. albicans*. Espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para tratamento de infecções fúngicas, e as características químicas dos produtos naturais derivados de espécies deste gênero sugerem possível atividade contra fungos patogênicos (ABAD; BERMEJO, 2007; PEREIRA et al., 2017). Foi evidenciada por Oliveira et al., (2015), atividade antifúngica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* contra cepas de *C. albicans* e atividade antifúngica da espécie *Baccharis pedunculata* é descrita por Verdi et al. (2005).

Espécies de *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções, tal fato associa-se a problemática da alta taxa de resistência a antifúngicos. O uso generalizado e mecanismos celulares intrínsecos contribuem para a resistência fúngica, diversos fungos patogênicos desenvolvem mecanismos de resistência ao fluconazol (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2018). A resistência a antimicrobianos inclui mecanismos de células fúngicas, que desenvolvem formas para reduzir a ação de antifúngicos disponíveis, dessa forma o uso de óleos essenciais pode

contribuir para descoberta de possíveis moléculas com atividade antifúngica (NAZZARO et al., 2017).

Estratégias terapêuticas, como terapias de associação podem ser uma alternativa para a redução da resistência antimicrobiana, sendo a mistura de compostos químicos advindas de óleos essenciais complexa e diversa, o sinergismo entre eles e os diferentes alvos de ação junto a células patogênicas podem resultar em inibição de crescimento do patógeno (WU et al., 2019; LEE et al., 2020).

Os óleos essenciais possuem uma variedade de alvos junto a micro-organismos patogênicos, e podem alterar a morfologia das células, especialmente com ação sobre a membrana plasmática e o citoplasma (KORNITZ et al., 2019). Foi possível observar neste estudo que o óleo essencial inibiu completamente a emissão de hifas das cepas de *C. albicans* e da cepa padrão de *C. tropicalis*, sendo, portanto, capaz de interferir reduzindo um dos aspectos de virulência fúngica. A resistência a antifúngicos já utilizados associados a manifestação de fatores de virulência, tais como: adesão celular, transição morfológica e formação de biofilmes, contribuem para o aumento da gravidade de infecções, refletindo em elevada taxa de morbidade e mortalidade. A investigação do uso de produtos naturais na inibição de fatores de virulência pode ser uma estratégia promissora (GUEDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2018).

Os resultados evidenciados sugerem que o óleo essencial de *B. milleflora* pode ter ação junto ao processo de transição morfológica fúngica das espécies de *Candida*, considerando que os fungos pertencentes a esta espécie estão entre os principais causadores de infecções fúngicas (HAMMED et al., 2018; ZHANG et al., 2018; SEYOUM et al., 2020), a redução de um de seus fatores de virulência, contribui para o desenvolvimento de terapêuticas inovadoras que possam reduzir os efeitos da invasão por patógenos fúngicos no organismo humano.

A transição morfológica de levedura para hifas aumenta o potencial invasor de fungos e consequentemente sua capacidade de causar infecções no hospedeiro (KORNITZ et al., 2019), dessa forma a inibição de hifas por um produto natural é um mecanismo que pode sugerir importante atividade antimicrobiana frente a estes micro-organismos. De acordo com Kornitz et al., (2019), a transição morfológica de espécies de *Candida albicans* advém de fatores externos e de sinais celulares internos que são capazes de modular a expressão de genes específicos responsáveis por este mecanismo. A transição de filamentos para hifas, requer a expressão de muitos genes e de fatores de transcrição, ativados por vias de sinalização específicos. Sugere-se assim que a ação do

óleo essencial através de mecanismos moleculares não elucidados, pode ter inibido a expressão e fatores de transcrição gênica, com consequente inibição total da emissão de hifas, o que reflete na redução de um dos mecanismos de virulência de espécies de *Candida*.

4. CONCLUSÃO

A atividade antifúngica do óleo essencial isoladamente apresentou ação clinicamente irrelevante. A associação do produto natural com o fluconazol demonstrou possível sinergismo frente a cepas de *Candida tropicalis*. O óleo essencial de *Baccharis milleflora* inibiu a transição morfológica das cepas fúngicas, demonstrando potencial antimicrobiano, pois foi capaz de inibir um dos fatores de virulência fúngica, podendo essa atividade estar relacionada a ação dos compostos terpenos e a inibição da expressão gênica que induzem formação de hifas. São necessários mais estudos para compreender os mecanismos específicos desta atividade.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 1, p. 76-96, 2007.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, 2007.

AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 215-219, 2005.

BESTEN et al. Chemical composition of essential oils from cladodes and inflorescences from male and female specimens of *Baccharis milleflora*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 5, p. 899-905, 2014.

BONI, G. C. et al. Purified bioactive compounds from *Mentha* spp. oils as a source of Candidosis treatment. A brief review. **Revista Fitos**, v. 11 - n 1, 2017.

CARNEIRO, N.P.C. et al. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial Pathogenesis** 136 (2019) 103700, 2019.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, 54:328–330, 2008.

DEL QUIQUI, E. M. et al. Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semideciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 5, 2019.

DO AMARAL, W., et al. Essential Oil of *Baccharis milleflora* in the Atlantic Rain Forest of the Paraná State in Brazil: Chemical Composition and Biological Evaluation. In **Natural Bio-active Compounds** (pp. 599-608). Springer, Singapore, 2019.

ESQUINCA, A. R. G.; MORENO, M. C. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. **Lacandonia**, v. 2, n. 1, p. 123-130, 2017.

FLORES-VILLA, E. et al. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 23, 2020.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

HEIDEN, G. *Baccharis* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5213>>. Acesso em: 09 jan. 2021.

HILLER, C. X. et al. Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. **Science of The Total Environment**, v. 685, p. 596-608, 2019.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medinal Chemistry**, 39, 107–3113, 1996.

KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 296p. 1951.

LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, 2020

MARDARE, G. et al. **Secondary Metabolites from Plants: The Thin Border Between Beneficent and Harmful**. 2019.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes-Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. SPE, p. 628-632, 2011.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**, 194, 1140-1152., 2016.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V.D. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

OLIVEIRA, C. F. et al. Evaluation of antifungal activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. against the yeast of the species *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 4, 2016.

PEREIRA, C. B. et al. Chemical composition and Biological activities of *Baccharis milleflora* essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**. 35 (10) 2225 – 33, 2016.

PEREIRA, C. B. et al. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214-221, 2017.

REHMAN, R. et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.

SEYOUM, E.; BITEW, A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SHAHABUDIN, S.; AZMI, N. S. *Candida*, the Opportunistic Human Pathogen. In: **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications Ltd, 2020.

SANTOS, C. H.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1719, 2017.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, p. 472-482, 2018.

SILVA, L. N. et al. Current Challenges and Updates on the Therapy of Fungal Infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 495-499, 2019.

SIMÕES, C. A. et al. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1, p. 23-32, 2005.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TROMBIN-SOUZA, M. et al. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 5, p. 400-406, 2017.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WANI, A. R. et al. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, p. 104620, 2020.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WU, S-C et al. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

ZHANG, W et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of *Candida albicans* vs. non-*albicans* candidaemia in adult patients in Northeast China. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A composição química do óleo essencial de *Piper regnellii* apresentou predomínio de fenilpropanóides o apiol seguido de dilapiol. Em relação a atividade antimicrobiana, o produto natural isoladamente não demonstrou atividade clinicamente relevante contra cepas de bactérias e fungos, porém a atividade combinada do óleo essencial de *Piper regnellii* resultou em possível sinergismo junto ao fluconazol frente a *Candida tropicalis*, e frente a *Escherichia coli* quando associado a gentamicina.

O potencial antifúngico intrínseco do óleo essencial de *Baccharis milleflora* não apresentou atividade clinicamente relevante, porém sua associação com fluconazol, resultou em possível sinergismo frente a isolados clínicos de *Candida tropicalis*.

Ambos os óleos essenciais foram capazes de inibir a transição morfológica de cepas fúngicas, evidenciando ação relevante frente a um dos fatores de virulência de espécies de *Candida*, sendo que o óleo essencial de *Piper regnellii* inibiu completamente a emissão de filamentos em todas as cepas testadas. O óleo essencial de *Baccharis milleflora*, obteve ação inibitória da transição morfológica para todas as cepas de *Candida albicans* e para cepa padrão de *Candida tropicalis*, para o isolado clínico de *Candida tropicalis* ocorreu inibição de crescimento de 88,6%, 52,6% e 48,6%, nas concentrações CFM/2, CFM/4 e CFM/8, respectivamente. Observou-se ação superior na inibição do polimorfismo fúngico do óleo essencial de *Piper regnellii*, em relação ao de *Baccharis milleflora*, como os mecanismos específicos de inibição do referido fator de virulência, não foram evidenciados, são necessários mais estudos que visem compreender a ação de compostos isolados, bem como mecanismos específicos de inibição de crescimento de hifas mediante ação dos produtos naturais testados.

REFERÊNCIAS GERAIS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, 2007.

ALMEIDA, L. F. D. *et al.* Atividade Inibitória de Óleos Essenciais Vegetais Frente à *Candida glabrata*, Resistente a Fluconazol. **Revista brasileira ciências da saúde**, p. 133-138, 2017.

ANDERSON, R. *et al.* Circadian variation and in vitro cytotoxic activity evaluation of volatile compounds from leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *regnellii* (C. DC.) Yunck (Piperaceae). **Natural product research**, v. 32, n. 7, p. 859-862, 2018.

ANDRADE NETO J. B. *et al.* Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. Resistance to fluconazole. **Future Microbiology**, v. 15, n.3 p. 177-188, 2020.

AZIZ, R. K. Toxicomicrobiomics: narrowing the gap between environmental and medicinal toxicogenomics. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 22, n. 12, p. 788-789, 2018.

BERNUCI, K. Z. *et al.* Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1698, 2016.

BEZERRA, J. W. A. *et al.* Antibiotic Potential and Chemical Composition of the Essential Oil of *Piper caldense* C. DC.(Piperaceae). **Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 631, 2020.

BONI, G. C. *et al.* Purified bioactive compounds from *Mentha* spp. oils as a source of Candidosis treatment. A brief review. **Revista Fitos**, 2017.

CARDOSO, J. C. *et al.* Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.

CARNEIRO, N.P.C. *et al.* *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial Pathogenesis** 136 (2019) 103700, 2019.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Information Supplement**, v.34. n.3, p.44.2015.

CLOUTIER, M.; *et al.* The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genetics Biology**.2003.

COSTANTIN, M. B. *et al.* Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta médica**, v. 67, n. 08, p. 771-773, 2001.

COUTINHO *et al.* Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemother.**, 54:328–330, 2008.

CUNHA, Amanda Lima *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

SILVA A. H. Atividade antimicrobiana de produtos obtidos de espécies de *Piper* (Piperaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, 2016.

DADAR, M. *et al.* *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DAS S. *et al.* Exploration of some potential bioactive essential oil components as green food preservative. **LWT**, v. 137, p. 110498, 2020.

LIMA, D. S. *et al.* Atividade antibacteriana de citronelal e citronelol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. **Archives of Health Investigation**, v. 9, n. 3, 2020.

DEL QUIQUI, E. M. *et al.* Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semideciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 5, 2019.

DHIFI, W. *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medecines**, 3, 1-16.2016.

DO AV S. *et al.* Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant *Candida* isolates. **Future Microbiol.** Nov. 14. 2019.

ENGELKIRK P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. Burton, **Microbiologia para as ciências da saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ESQUINCA, A. R. G.; MORENO, M. C. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. **Lacandonia**, v. 2, n. 1, p. 123-130, 2017.

FALLEH, Hanen *et al.* Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative. **Food Chemistry**, p. 127268,2020.

FLORES-VILLA, E. *et al.* Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 23, 2020.

MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

GOMES, E. M. C. *et al.* Efeito inibitório in vitro de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume no controle de *Cylindrocladium candelabrum*. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1559-1567, 2018.

GUIMARÃES, E.F.; QUEIROZ, G.A.; MEDEIROS, E.V.S.S. 2020. *Piper* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12835>>. Acesso em: 10 abr. 2021.

GUSHIKEN, C.Y. *et al.* Nasal carriage of resistant *Staphylococcus aureus* in a medical student community. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 1501-1509, Sept. 2016.

HAMEED, A.; ALI, S.; AHMED, L. Biological study of *Candida* species and virulence factor. **International Journal of Adversements in Research & Technology** v. 1, p. 8-16, 2018.

HEIDEN, G. *Baccharis* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5213>>. Acesso em: 09 mar. 2021.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of invitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, 110(3), 391-400, 2007.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.

JANBON, G. *et al.* Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. **Genes & Immunity**, v. 20, n. 5, p. 403-414, 2019.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JAVADPOUR, *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemichal**, 39, 107–3113, 1996.

KHAW, K.-Y. *et al.* Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1186, 2017.

KIOSHIMA, E. S. *et al.* Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p.1391-1401, dez. 2019.

KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 296p. 1951.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, 2020.

LUCENA, B. F., *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**, 20(1), 2017.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M.; Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MARDARE, G. *et al.* **Secondary Metabolites from Plants: The Thin Border Between Beneficent and Harmful**. 2019.

MELO, A.; ALVES M. Novos registros de espécies de Piper L.(Piperaceae) em estados da Amazônia brasileira. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2019.

MGBEAHURUIKE, E. E. *et al.* Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69, 2017.

MILLEZI, A. F. *et al.* Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, n. 3, p. 373-379, 2013.

MISHRA, A. P. *et al.* Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. **Lwt**, v. 133, p. 110116, 2020.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes-Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. SPE, p. 628-632, 2011.

MORAIS-BRAGA, *et al.* *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *J. of Ethnopharmacol.*, 194, 1140-1152., 2016.

MULAT M.; *et al.* Medicinal plant compounds for combating the multi-drug resistant pathogenic bacteria: A Review. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 183-196, 2019.

NAKAMURA, H. *et al.* Garcia de. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49-58, 2013.

NCCLS Norma M27-A2. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras**; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4).

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

PARLET, C. P.; *et al.* Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497-507, 2019.

PEREIRA, C. B. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214-221, 2017.

PESSINI, G. L. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

POIREL *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 289-316, 2018.

CAMPOS F. *et al.* Baccharis (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. **Chemistry & biodiversity**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2016.

REHMAN R. *et al.* Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.

REMPEL C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.

ROCHA, C.R.; *et al.* Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular biology of the cell** 2001.

RODRIGUES, Oscar *et al.* Actividad antibacteriana y antioxidante de Baccharis revoluta Kunth. **Nova**, v. 15, p. 57-65, 2016.

RUSCHEL, D. O gênero Piper (Piperaceae) no Rio Grande do Sul. 2004.

SALEHI B. *et al.* Piper species: a comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SANTOS, T. G. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de Piper malacophyllum (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.

SEYOUM, E.; BITEW A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SHAHABUDIN, S.; AZMI, N. S. *Candida*, the Opportunistic Human Pathogen. In: **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications Ltd, 2020.

SANTOS, C. H.; PICCOLI R. H; TEBALDI V. M. R.; Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1719, 2017.

SILVA, J. A. et al. Antioxidant activity of Piper arboreum, Piper dilatatum, and Piper divaricatum. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 700-706, 2014.

SILVA, Laura Nunes et al. Current Challenges and Updates on the Therapy of Fungal Infections. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 7, p. 495-499, 2019.

SILVA, Moisés Oliveira da; AQUINO, Simone. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de epidemiologia e controle de infecções**, p. 472-482, 2018.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136- 141, 2012.

SWAMY, M. K.; A. M. S. SINNIHAH U. R. ;Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**. 10 th ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.

TROMBIN-SOUZA, M. *et al.* Chemical composition of the essential oils of Baccharis species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. **Journal of EssEntial oil rEsEarch**, v. 29, n. 5, p. 400-406, 2017.

VALLI M.; BOLZANI V. S. Natural products: perspectives and challenges for use of Brazilian plant species in the bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

VELÔSO D. Silva; CAMPELO V.; DE SÁ, Thamys Layara Bandeira. Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de

um hospital de ensino. **REVISTA INTERDISCIPLINAR CIÊNCIAS E SAÚDE-RICS**, v. 4, n. 2, 2017.

VERDI *et al.* Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WANI A. R. *et al.* An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, p. 104620, 2020.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.

Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. **Wiley Interscience**, New York, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation**. Geneva: WHO, 2015.

WU S. C. *et al.* Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

ZHANG W. *et al.* Epidemiology, risk factors and outcomes of *Candida albicans* vs. non-*albicans* candidaemia in adult patients in Northeast China. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1927, 2017.

ANEXOS

Confirming submission to South: x Editorial Manager® x Caixa de entrada (42) - ppqb@ui: x (5) WhatsApp x +

editorialmanager.com/sajb/default.aspx

SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY

Editorial Manager

Role: Author Username: hdmcoutinho@gmail.com

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Submissions Being Processed for Author Henrique Douglas Coutinho

Page: 1 of 1 (3 total submissions)

Display 10 results per page.

| Action | Manuscript Number | Title | Initial Date Submitted | Status Date | Current Status |
|------------------------------|-------------------|---|------------------------|--------------|----------------|
| Action Links | SAJB-D-21-00714 | Piper regnellii (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance | Mar 24, 2021 | Apr 01, 2021 | Under Review |
| Action Links | SAJB-D-20-01862 | Phytochemical characterization and enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook.) and its major constituent beta-caryophyllene against efflux pump-carrying strains | Nov 30, 2020 | Mar 11, 2021 | Under Review |
| Action Links | SAJB-D-20-01689 | Amburana cearensis (Allemão) A.C.S.M. phytochemistry and biological activities: A review | Nov 05, 2020 | Mar 26, 2021 | Under Review |

Page: 1 of 1 (3 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Digite aqui para pesquisar

16:12 08/04/2021

DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "BACCHARIS MILLEFLORA (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA" de autoria de "ANA LAYS BRAGA, RAFAEL PEREIRA DA CRUZ, JOARA NÁLYDA PEREIRA CARNEIRO, ANTONIA THASSYA LUCAS DOS SANTOS, DÉBORA LIMA SALES, VICTOR JUNO ALENCAR FONSECA, LUCIENE FERREIRA DE LIMA, HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO, LUIZ EVERSON DA SILVA, MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA, FÁBIO FERNANDES GALVÃO RODRIGUES", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2" a ser divulgado em junho de 2021.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 07 de abril de 2021.

Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533
PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243
Certificado digitalmente por Atena Edição de Livros

Rua Jacob Nadal, 57, Jardim
Carvalho
PONTA GROSSA - PR - CEP:
84016-220

(42) 3323-5493
(42) 99955-2866
www.atenaeditora.com.br

Atena
Editora