



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

**Flávia Camila Maia**

**Efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-  
pedra) sobre células planctônicas e em biofilme de *Candida*  
*albicans***

**Piracicaba  
2020**

**Flávia Camila Maia**

**Efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) sobre células planctônicas e em biofilme de *Candida albicans***

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

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. José Francisco Höfling

Esse exemplar corresponde a versão final da dissertação defendida pela aluna Flávia Camila Maia, e orientada pelo Prof. Dr. José Francisco Höfling.

**Piracicaba**

**2020**

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

M28e Maia, Flávia Camila, 1993-  
Efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) sobre células planctônicas e em biofilme de *Candida albicans* / Flávia Camila Maia. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: José Francisco Hofling.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Candida albicans*. 2. Biofilmes. 3. Solução hidroalcoólica. 4. *Phyllanthus*. 5. Antifúngicos. I. Hofling, José Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* L. (Stone-breaker) on planktonic cells and on *Candida albicans* biofilm

**Palavras-chave em inglês:**

*Candida albicans*

Biofilms

Hydroalcoholic solution

*Phyllanthus*

Antifungal agents

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

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

**Banca examinadora:**

José Francisco Hofling [Orientador]

Marlise Inêz Klein Furlan

Antônio Pedro Ricomini Filho

**Data de defesa:** 23-10-2020

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

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1141-6661>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3968292178060276>



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de outubro de 2020, considerou a candidata FLÁVIA CAMILA MAIA aprovada.

PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. MARLISE INÊZ KLEIN FURLAN

PROF. DR. ANTÔNIO PEDRO RICOMINI FILHO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## EPÍGRAFE

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, **Adriana Cristina Menezes Maia**, que sempre incentivou e me ajudou em tudo o que eu precisei, me auxiliou e amparou, me deu apoio nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Sempre sendo meu exemplo, a minha fonte de inspiração, determinação e perseverança e principalmente Fé. Dedico a você: mãe, que não me deixou desistir e principalmente pelo inestimável Amor que você sempre me deu!

Dedico esse trabalho ao meu pai, **Anderson Maia** (*in memoriam*), que independente de qualquer motivo sempre me apoiou, me fez sorrir, e que me ajudou muito em minhas escolhas, sempre me incentivando e me dando forças para que eu nunca desistisse. Mesmo não estando presente fisicamente nesta etapa, sei que a torcida, guia e proteção foram constantes. A ele que sempre foi e sempre será meu exemplo de perseverança, criatividade e iniciativa, meu herói, minha inspiração e meu exemplo de vida e pelo Amor que nunca deixou de me dar!

Ao meu noivo, **Fábio Vinícius Borges Padilha**, meu companheiro e melhor amigo, que me acompanhou em todos momentos nessa caminhada, me descontraindo e suportando meus dias difíceis.

Aos meus irmãos, **Fernanda Caroline Romualdo** e **Rafael Henrique Romualdo**, meus amigos e exemplos de vida.

A todos que sempre torceram pelo meu desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional. Com muito amor lhes agradeço e dedico essa conquista a vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, pela força, sabedoria, disposição, coragem e determinação, por me ajudar a enfrentar todos desafios durante todo o período do mestrado e durante a elaboração deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, através do Reitor Prof. Dr. Marcelo Knobel, reconhecidamente a melhor da América Latina, e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, através do diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela oportunidade concedida em estudar nesta conceituada e bem estruturada Universidade.

A Coordenadoria da Pós Graduação, especialmente aos coordenadores do programa de Biologia Buco-Dental. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pois o presente trabalho foi realizado com seu apoio e também pela bolsa de mestrado outorgada.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling por se dispor e aceitar o desafio de me orientar, pela confiança creditada a mim, por sua dedicação e auxílio para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp (*in memoriam*) pela iniciação do meu mestrado, pela orientação, cooperação e pelos desafios proporcionados. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata de Oliveira Mattos-Graner por todo auxílio, experiências, considerações e por todo apoio durante minha estadia no programa. Ao Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, por toda cooperação e auxílio. Agradeço por todo conhecimento adquirido e aprimoramento na área acadêmica e por terem me proporcionado experiências inovadoras e desafiadoras, mostrando que é possível resolver tudo.

Aos técnicos de laboratório da Faculdade: Valéria Alessandra Defávare Franco, Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral, que sempre me auxiliou em tudo o que precisei dentro do laboratório, agradeço a amizade formada a colaboração e por todo conhecimento compartilhado. Adriano Luis Martins, Microscopia Eletrônica de Varredura, que me ensinou como manipular e registrar boas imagens no MEV e à Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, técnica da Microscopia Eletrônica de Transmissão que me auxiliou nos procedimentos e registrou ótimas imagens dos nossos experimentos. A Paula Cristina Anibal, por todo auxílio, dicas e considerações no projeto e por todo aprendizado, cooperação e colaboração durante esses anos.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica para o Ensino Médio (PIBIC-EM), na pessoa do professor Dr. Miguel Morano Júnior, pela

oportunidade de participar como orientadora dos alunos da área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Aos alunos do PIBIC-EM que me proporcionaram vivenciar a experiência como orientadora, pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram, pelos diversos puxões de orelha que tive que dar, pelo comprometimento e dedicação no desenvolvimento do projeto que se tornou muito melhor do que o esperado, e muito elogiado em suas apresentações.

A empresa Florien Fitoativos LTDA por ter se disponibilizado a fornecer a matéria prima, a rasura da planta *Phyllanthus niruri* em parceria com o nosso projeto.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) através do responsável técnico Dr. Adilson Sartoratto, no Laboratório de Instrumentação (LINST) do CPQBA/UNICAMP pela parceria na análise da Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas acoplada (CG-EMS) do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* do projeto.

Aos examinadores titulares que aceitaram compor a banca de dissertação e aprimorar nossos estudos: Prof. Dr. José Francisco Höfling, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlise Inêz Klein Furlan, Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho; e aos membros suplentes: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Cristina Anibal e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natalia Leal Vizoto.

Agradeço a Nathalia de Oliveira Santos, a minha amiga que sempre me socorreu e me ajudou no que precisei, pelos inúmeros conselhos, convites que atrasados devido a correria na elaboração da dissertação e pelas risadas compartilhadas comigo nesta etapa desafiadora. Aos meus amigos e companheiros estrangeiros Gayan Kanchana Wijesinghe e Hassan Naveed, pela amizade e ensinamentos trocados, pelo apoio, incentivo, encorajamento e aprimoramento do meu inglês, pelo ensino de novas línguas como sinhales, urdu e pashtu. Sou muito grata por sempre me acompanharem em todos os momentos que precisei. Sthuthi Gayan! Shukriya Hassan! Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia: Janaina Priscila Barbosa, Simone Busato, Thais Oliveira, Giovana Boni, Vanessa Cardoso, Felipe Jóia, Livia Alves, Geovanny Salvatierra, Victor Araujo, Eduardo Martinelli e Anderson Teixeira pelo convívio diário, por sempre estarem dispostos a me ajudar e por promover muitos momentos agradáveis, compartilhando as descobertas e crescimento profissional.

Agradeço imensamente a todos que colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho direta ou indiretamente.

## RESUMO

Os microrganismos estão se tornando cada vez mais tolerantes aos tratamentos convencionais, conseqüentemente aumentam-se os relatos de resistência. Inclusive das espécies de *Candida*, que apesar de estarem presentes na flora normal do organismo humano vêm causando diversos casos de infecções, sendo a levedura *C. albicans* uma das espécies de maior virulência. O uso de substâncias alternativas que auxiliem o tratamento contra esses microrganismos vem sendo mais exploradas. Em vista disso, as plantas medicinais que sempre foram utilizadas como forma de tratamento à diversas enfermidades, estão sendo cada vez mais estudadas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antifúngica e o efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn) contra 16 diferentes cepas de *Candida* spp., e o efeito nas etapas de formação do biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA-2876, uma das cepas de maior virulência, também conhecida na literatura como *Candida albicans* SC5314 e a toxicidade do extrato em modelos *in vitro* e *in vivo*. A rasura da planta obtida foi processada até a obtenção do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn) e analisado por Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG-EMS). A atividade microbiana de diferentes cepas de *Candida* foi determinada preliminarmente através do teste de difusão em ágar e posteriormente através da análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os fatores de virulência, como a adesão à superfície, capacidade de formação de tubos germinativos, e de biofilme (2h e 24h) da cepa *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foram avaliados com a presença do EH-Pn. Também foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para verificar a morfologia celular e de biofilme da cepa com a exposição ao EH-Pn. A toxicidade foi determinada através de ensaios com células de queratinócitos normais humanos (*HaCaT*) e com larvas de *Galleria mellonella*. Diversos compostos bioativos, como o éster etílico do ácido linoleico, éster etílico do ácido hexadecanóico, fitol e o beta-sitosterol, foram identificados no EH-Pn. O extrato apresentou atividade antifúngica contra todas as espécies de *Candida* analisadas. A adesão e formação de tubos germinativos de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foram significativamente reduzidas. O EH-Pn foi mais eficaz nos biofilmes em estágios iniciais do que em biofilmes com 24h de formação, observou-se alterações morfológicas externas e internas nas células fúngicas

expostas ao EH-Pn. O tratamento com EH-Pn não demonstrou toxicidade para células *HaCaT* e com *G. mellonella*. O extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* possui potencial como antifúngico.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Biofilmes; Solução hidroalcoólica. *Phyllanthus niruri*. Antifúngicos.

## ABSTRACT

The microorganisms are becoming tolerant to some conventional treatments, consequently reports of resistance are increasing. Including the *Candida* species. Despite being present in the normal flora of the human organism, it has been causing several cases of infections, the yeast *C. albicans* represents one of the most virulent species. The use of alternative substances that help treat microorganisms has been more explored. In view of this, medicinal plants that have always been used as an alternative to treatment for various diseases, are being increasingly studied. Therefore, this study aimed to evaluate the antifungal action of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* (HE-Pn) against 16 different strains of *Candida* spp., and the biofilm of *Candida albicans* ATCC MYA-2876, one of the most virulent strains, also known in literature as *Candida albicans* SC5314. The extract toxicity *in vitro* and *in vivo* models was also measured. The whole dried and crushed plant was boiled until obtaining the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* (HE-Pn) and analyzed by CG-EMS. The microbial activity of different *Candida* strains was determined preliminarily through the Agar diffusion test and later through MIC and MFC analyses. Virulence factors, such as adhesion to the surface, germ-tube formation capacity, and biofilm (2h and 24h) of the strain *C. albicans* (ATCC MYA-2876) were evaluated with the presence of HE-Pn. Also, SEM was performed to evaluate the morphology while TEM was done to assess the strain cells' internal structures and biofilm morphology of the strain with exposure to EH-Pn. Toxicity was determined through assays with normal human keratinocyte cells (*HaCaT*) and with *Galleria mellonella* larvae. Several bioactive compounds, such as ethyl ester of linoleic acid, ethyl ester of hexadecanoic acid, phytol and beta-sitosterol, have been identified in the HE-Pn. The extract showed antifungal activity against all analyzed *Candida* species. The adhesion and formation of *C. albicans* germ tubes (ATCC MYA-2876) were significantly reduced. HE-Pn was more effective in the biofilms in early stages than in biofilms with 24 hours of formation. Morphological changes occurred in the external and internal parts of cells of this strain after exposed to HE-Pn. Treatment with HE-Pn did not demonstrate toxicity for *HaCaT* cells and with *G. mellonella*. Therefore, hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* has potential as an antifungal.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilms, Hydroalcoholic, solution. *Phyllanthus niruri*. Antifungals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia da planta *Phyllanthus niruri*.

Figura 2 - Rasura da planta *Phyllanthus niruri*.

Figura 3 – Processamento do Extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*.

Figura 4 - Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar.

Figura 5 - Zonas de inibição em placa de SDA contendo diferentes concentrações do EH-Pn contra *Candida* spp.

Figura 6 - Porcentagem de células aderidas de *C. albicans* ATCC MYA 2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.

Figura 7 - Imagens de células com tubos germinativos da cepa *C. albicans* ATCC MYA-2876 após o tratamento com diferentes concentrações do EH-Pn.

Figura 8 - Viabilidade celular do biofilme (2 horas de formação) de *C. albicans* ATCC MYA-2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.

Figura 9: Porcentagem da viabilidade celular do biofilme (24 horas de formação) de *C. albicans* ATCC MYA 2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.

Figura 10 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.

Figura 11 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.

Figura 12 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 tratado com 16 mg/mL de EH-Pn.

Figura 13 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.

Figura 14 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.

Figura 15 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com 16 mg/mL de EH-Pn.

Figura 16 - Efeito do EH-Pn na morfologia interna da cepa *C. albicans* (ATCC MYA 2876).

Figura 17 - Viabilidade de *HaCaT* na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.

Figura 18 - Efeito do EH-Pn nas larvas de *Galleria mellonella*.

Figura 19 - Índice de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* após tratamento com diferentes concentrações de EH-Pn.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formação de halos de inibição (mm) exibidos pelas cepas de *Candida* spp. na presença do EH-Pn.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do EH-Pn contra diferentes cepas de *Candida* spp.

Tabela 3 - Porcentagem de células com tubos germinativos após o tratamento com EH-Pn contra *C. albicans* (ATCC MYA-2876).

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - Brain Heart Infusion

B.O.D - Biochemical Oxygen Demand

Ca - *Candida albicans*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CG-EMS - Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DL<sub>50</sub> - Dose Letal 50%

DMSO - Dimetilsulfóxido

EH-Pn - Extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*

*HaCaT* - Linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada

MET - Microscópio Eletrônico de Transmissão

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

RPMI-1640 - Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

SDA - *Sabouraud Dextrose Agar*

SFB - Soro Fetal Bovino

SUS - Sistema Único de Saúde

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

YPD - *Yeast Peptone Dextrose*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	Microbioma .....	21
2.2	<i>Candida</i> spp.....	22
2.2.1	Problemas de saúde relacionados a infecções causadas por <i>Candida</i> spp. ...	24
2.2.2	Fatores de virulência.....	25
2.3	A utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos.....	29
2.3.1	<i>Phyllanthus</i> spp. ....	32
2.3.2	<i>Phyllanthus niruri</i> L.....	34
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	39
3.1	Objetivo geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1	Local de Realização da Pesquisa.....	40
4.2	Cepas de <i>Candida</i> spp. ....	40
4.2.1	Estocagem e ativação dos microrganismos.....	40
4.3	Planta “Quebra-pedra” ( <i>Phyllanthus niruri</i> ) .....	40
4.3.1	Extração hidroalcoólica de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	41
4.3.2	Rendimento do extrato hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	43
4.3.3	Diluição do extrato hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	43
4.3.4	Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EMS).....	43
4.4	Avaliação antifúngica do EH-Pn contra diferentes cepas de <i>Candida</i> spp. através da técnica de difusão em ágar.....	44
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) na presença do extrato hidroalcoólico analisado frente às cepas de <i>Candida</i> spp.....	45
4.6	Efeito do EH-Pn na adesão inicial de <i>Candida albicans</i> (ATCC MYA-2876).....	47
4.7	Efeito do EH-Pn na formação de tubo germinativo de <i>C. albicans</i> (ATCC MYA-2876).....	47
4.8	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>P. niruri</i> no biofilme de <i>C. albicans</i> (ATCC MYA-2876).....	48
4.8.1	Padronização da suspensão celular.....	48

4.8.2	Ensaio de viabilidade celular do biofilme de 2 horas de formação.....	48
4.8.3	Ensaio de viabilidade celular do biofilme de 24 horas de formação.....	49
4.8.4	Análise do ensaio de biofilme.....	49
4.9	Análise da morfologia celular dos biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	49
4.9.1	Ensaio da morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação.....	49
4.9.2	Ensaio da morfologia celular do biofilme de 24 horas de formação.....	50
4.9.3	Fixação do ensaio de biofilme para MEV.....	50
4.10	Efeito do EH-Pn sobre as células de <i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876 através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	51
4.11	Citotoxicidade <i>in vitro</i> do EH-Pn em linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada ( <i>HaCaT</i> ).....	51
4.12	Análise <i>in vivo</i> da toxicidade do extrato hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	53
4.13	Análises estatísticas.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
5.1	Rendimento do Extrato Hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	54
5.2	Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EMS) .....	54
5.3	Avaliação antifúngica do EH-Pn contra diferentes cepas de <i>Candida</i> spp. através da técnica de difusão em ágar.....	54
5.4	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico contra cepas de <i>Candida</i> spp. ....	56
5.5	Análise do efeito do EH-Pn na adesão inicial de <i>Candida albicans</i> (ATCC MYA-2876) .....	57
5.6	Análise do efeito do EH-Pn na formação de tubo germinativo de <i>C. albicans</i> (ATCC MYA-2876) .....	58
5.7	Análise do efeito do extrato hidroalcoólico de <i>P. niruri</i> em biofilmes de <i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876.....	60
5.7.1	Análise do ensaio de viabilidade celular do biofilme de 2 horas de formação.....	60
5.7.2	Análise do ensaio de viabilidade celular do biofilme de 24 horas de formação.....	61

5.8	Análise da morfologia celular dos biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	61
5.8.1	Análise do ensaio da morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação....	61
5.8.2	Análise do ensaio da morfologia celular do biofilme de 24 horas de formação..	64
5.9	Avaliação do efeito do EH-Pn sobre as células de <i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876 através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	66
5.10	Citotoxicidade <i>in vitro</i> do EH-Pn em linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada ( <i>HaCaT</i> ).....	67
5.11	Análise <i>in vivo</i> da toxicidade do extrato hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	68
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	76
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	<b>ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ANÁLISE</b> .....	95
	<b>ANEXO 2 – CROMATOGRAMA</b> .....	97
	<b>ANEXO 3 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO</b> ...	101

## 1 INTRODUÇÃO

O corpo humano apresenta diversas condições que podem promover o estabelecimento de microrganismos e quando em desequilíbrio favorecem o desenvolvimento de microrganismos patógeno-oportunistas (Cardoso, 2015). Fungos do gênero *Candida* são exemplos de microrganismos patógeno-oportunistas, que podem ocasionar infecções superficiais ou sistêmicas, as vezes fatais. A incidência das infecções por estes microrganismos tem causado grandes problemas na saúde pública, aumentando a taxa de mortalidade, principalmente em pacientes hospitalizados (Colombo & Guimarães, 2003). Esses microrganismos vêm se tornando cada vez mais resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais, havendo a necessidade da elaboração de novas estratégias que possam prevenir e tratar a disseminação deles (Vieira & Santos, 2017). Há milênios a humanidade utiliza plantas para tratamento de diversos tipos de doenças, esse conhecimento tradicional facilita a busca de novos alvos de pesquisa de agentes naturais provenientes de plantas, permitindo a comprovação científica desses efeitos terapêuticos. Nas últimas décadas, o uso de plantas com potencial medicinal tem aumentado, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundados de suas propriedades, identificação de seus compostos e mecanismo de ação. Assim, pesquisas nessa área têm sido realizadas e apoiadas pelo Ministério da Saúde com o intuito de comprovar a eficácia das plantas, assegurando seu uso através de estudos toxicológicos, com a finalidade de regulamentar essas pesquisas e seu uso, sem danos ao organismo humano (Martins et al., 2012; Nunes et al., 2016; Escola de Saúde Pública, 2018).

O gênero *Phyllanthus* L. é uma planta que possui muitas espécies com diversas morfologias, pertencente à família Phyllanthaceae, é o maior e mais diverso gênero desta família, com espécies distribuídas em quase todas as regiões do mundo. Na América do Sul, o Brasil é o país que contém a maior quantidade de espécies, onde 40% delas são encontradas nos estados do Sudeste, que concentra o centro de diversidade de *Phyllanthus* do país (Silva & Sales, 2004, Martins et al., 2014).

A espécie *Phyllanthus niruri* é uma planta de baixa estatura comumente encontrada em diversos ambientes, entre eles jardins, plantações e frestas de calçadas. Por ter ampla distribuição, rápida proliferação e adaptabilidade, possibilita sua incidência em diversas regiões do mundo e é muitas vezes considerada uma “erva-daninha” (Silva & Sales, 2004).

A espécie *Phyllanthus niruri*, conhecida como “quebra-pedra”, tem sido muito utilizada na medicina popular brasileira (Cruces et al., 2013; Leão et al., 2017) para aliviar dores e tratar distúrbios do sistema urinário, além de diversas outras doenças. Através do conhecimento popular e pesquisas científicas, tem-se demonstrado que a planta possui efeito anestésico, antioxidante, antiespasmódica, antiviral e antimicrobiano, auxiliando no combate de inflamações e infecções (Nascimento, 2008; Oliveira et al., 2012). Também demonstra atividades contra outras doenças como a gripe, disenteria, vaginite, bem como atividades diuréticas, antiespasmódica, antilitolíticas, antioxidante, antigenotoxicidade, anti-hiperalgésica, hipotensivo e antinociceptivos. Além de apresentar fatores contra afecções do fígado, icterícia, cólicas renais e pedra nos rins, infecções geniturinárias e intestinais, possuir atividade anti-hepatite B, anti-diabetes e também como antiplasmodial, antimicrobiano e antiviral. (Venturi & Randi, 1997; Lorenzi & Matos, 2002; Aita et al., 2009; Marques, 2010; Leão et al., 2017; Escola de Saúde Pública, 2018; Oliveira et al., 2019). Por ter ampla utilização na medicina popular, tem sido estudada cientificamente em diversos países, principalmente na Índia (Salomé, 2007). Atualmente, está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), com alto potencial produtivo para o Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2006a, Escola de Saúde Pública, 2018).

Com o aumento das infecções fúngicas e também dos casos de resistência à medicamentos, esses cenários vem demonstrando a importância de encontrar novos compostos que atuem no tratamento destas infecções e as plantas medicinais se tornaram uma fonte promissora na descoberta de fármacos que auxiliem no tratamento. Portanto, o presente trabalho possui como objetivo analisar a planta *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) submetida à extração hidroalcoólica sobre células planctônicas de diferentes cepas de *Candida* e em biofilme de *Candida albicans* (ATCC MYA-2876) e a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn), afim de contribuir para a expansão dos conhecimentos sobre as atividades biológicas do extrato hidroalcoólico desta espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microbioma

Desde o nascimento o corpo humano fica exposto aos microrganismos, os quais se abrigam em diversos órgãos e tecidos, como pele, sistema genitourinário e gastrointestinal, essa interação denomina-se "microbioma" (Cardoso, 2015; Sender et al., 2016; Germano et al., 2018). O microbioma humano consiste em uma complexa diversidade de microrganismos que colonizam cada indivíduo, podendo ser microrganismos comensais ou patogênicos, estabelecendo uma relação de simbiose entre o organismo humano e microrganismos (Weber & Polanco, 2012; Cardoso, 2015; Wilson, 2018).

O corpo humano saudável apresenta condições favoráveis e desfavoráveis para o estabelecimento de diferentes espécies de microrganismos, podendo ter aproximadamente  $3,8 \times 10^{13}$  de células microbianas (Sender et al., 2016). Grande parte deles são inofensivos ao longo da vida para os hospedeiros saudáveis, permanecendo viável e ativo nos órgãos e podem auxiliar em funções essenciais para o hospedeiro, como digestão, indução de produção de componentes necessários para o metabolismo e defesa do hospedeiro, também podem apresentar atividade contra bactérias patogênicas. Tais características demonstram as importantes interações biológicas com nossa microbiota (Cho & Blaser, 2012; Weber & Polanco, 2012; Cardoso, 2015; Sender et al., 2016; Gajdács et al., 2019).

A microbiota humana está intimamente interligada com os fatores relacionados a saúde e doenças, os microrganismos habitam o hospedeiro sem causar dano ou doença aparente, porém, em situações de desequilíbrio do organismo hospedeiro, os microrganismos patógeno-oportunistas podem se proliferar causando alguns distúrbios. Quando o organismo hospedeiro não consegue eliminá-los, eles podem difundir-se entre os tecidos e causar doenças, que podem ser eventualmente graves (Lamont & Jenkinson, 2010; Cardoso, 2015; Germano et al., 2018).

Logo após o nascimento de um indivíduo, a sua microbiota oral começa a se estabelecer, onde a diversidade microbiana e a quantidade de microrganismos serão modificadas ao longo de sua vida (Santos Júnior & Izabel, 2019). Devido a este local ser o início do sistema digestivo, é considerado a porta de entrada para o organismo humano, onde alguns microrganismos podem adentrar e se estabelecer. Neste ambiente microrganismos se misturam com saliva, proteínas e enzimas no

processo de digestão, o que pode dificultar sua erradicação e seu estudo em ambientes diferenciados devido aos diversos componentes presentes nas condições orais (Silva, 2016; Campo, 2018).

A cavidade oral de um indivíduo é coabitada por diversas espécies de microrganismos que vivem nas várias regiões do interior da boca (língua, dentes e outros) (Cardoso, 2015). Cada indivíduo pode possuir diferentes tipos de microrganismos, os quais em equilíbrio mantêm a saúde oral e geral do organismo hospedeiro. Porém, quando o equilíbrio do organismo do hospedeiro é afetado, a sua saúde é prejudicada e estes microrganismos se aproveitam, vindo a se tornar patogênicos. O desequilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota podem promover infecções e outros tipos de doenças como as pericardites, pneumonias, úlceras gástricas, coronarites, entre outras (Cardoso, 2015; Silva, 2016; Campo, 2018; Wilson, 2018, Gajdács et al., 2019).

A presença de *Candida* spp. em desequilíbrio no hospedeiro pode promover a formação do biofilme, podendo estar agregada a bactérias ou não, o qual colonizará diferentes sítios, como a língua, gengiva, mucosa labial e palato, podendo também se aderir a próteses ou implantes, formando uma camada composta por inúmeros microrganismos (Cardoso, 2015; Peixoto et al., 2010; Campo, 2018). As infecções fúngicas provocadas por espécies de *Candida* podem favorecer ou promover algumas doenças, como as candidíases, e quando associados a outros microrganismos propicia o surgimento de cáries dentárias e doenças periodontais. (Peixoto et al., 2010; Campo, 2018).

## **2.2 *Candida* spp.**

Taxonômicamente, aproximadamente 200 espécies de *Candida* são descritas no Reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, porém algumas espécies se agrupam na subdivisão Ascomycotina, classe Blastomycetes e Família Cryptococcaceae (Santana et al., 2013).

A estrutura celular dos fungos é similar a de outros organismos eucariotos, sendo constituída por parede celular composta principalmente por quitina, sendo uma estrutura relativamente rígida e dinâmica, que proporciona diversos processos essenciais, determinando o formato da célula, sua proteção física, fornecendo o auxílio osmótico, sinalização celular, adesão a superfícies e reprodução. Esta estrutura também é composta por membrana plasmática fosfolipídica, ergosterol,

citoplasma com organelas, vacúolos e o núcleo com material genético armazenado (Fukuda et al., 2009; Santana et al., 2013).

Microrganismos do gênero *Candida* são fungos leveduriformes, unicelulares e eucarióticos, sua morfologia pode ser oval, arredondada ou alongada com reprodução assexuada por brotamento, denominada como blastoconídios (Santana et al., 2013).

As espécies de *Candida* podem ser encontradas na microbiota do ser humano e estão muito adaptadas. São habituais de diversas regiões anatômicas, como em mucosas de indivíduos normais, região gastrointestinal, orofaringe e sistema geniturinário (Colombo & Guimarães, 2003; Nobile & Johnson, 2015). São encontrados no sistema gastrointestinal de 80% da população sadia, e 30% da população feminina apresenta colonização por *Candida* spp. na mucosa vaginal (Colombo & Guimarães, 2003; Álvares et al., 2007). Por esta razão, o gênero *Candida* pode colonizá-lo sem produzir sinais de doença, tendo desenvolvimento e crescimento ótimo em áreas úmidas e quentes (Álvares et al., 2007), e em situações de desequilíbrio desencadeiam as infecções, que são denominadas na literatura como candidíases ou, mais recentemente, candidoses (Simões et al., 2013; Silva, 2017).

Para a maioria das espécies de *Candida*, pode-se considerar duas formas morfológicas distintas, sendo elas blastósporos e hifas, ambas são capazes de provocar infecções (Simões et al., 2013; Silva, 2016), com alto potencial de produzir biofilmes bem estabelecidos e muito resistentes, causadores de graves infecções (Álvares et al., 2007; Purisco, 2010; Ruiz & Pereira, 2016).

Este microrganismo possui a capacidade de se aderir e formar tubos germinativos, podendo causar doença no hospedeiro por invasão tecidual, produção de proteases extracelulares, indução de hipersensibilidade ou produção de toxinas (Simões et al., 2013; Silva, 2016). Seu desenvolvimento é acelerado, capaz de formar extensos biofilmes em diversas superfícies do hospedeiro rapidamente, inclusive na mucosa oral, que em conjunto com a produção salivar e o consumo de alimentos, servem como fatores de crescimento e propicia a formação do biofilme neste local (Lamont & Jenkinson, 2010; Silva, G., 2013; Bath et al., 2014).

O poder patogênico de *Candida* spp. está particularmente bem estudado na espécie *Candida albicans* (Cardoso, 2015; Silva, 2014; Ruiz & Pereira, 2016). Está pode ser encontrada na cavidade oral da maioria dos indivíduos adultos, sendo considerada o fungo mais encontrado nas regiões anatômicas humana,

especialmente na cavidade oral, colonizando locais como a língua e a mucosa com potencial patogênico.

O estudo da espécie *Candida albicans* é de extrema relevância devido aos seus fatores de virulência, que são importantes alvos para o desenvolvimento de medicações. Embora existam medicamentos eficazes contra o gênero *Candida*, a utilização inadequada promove processos de seleção, tornando-o menos susceptível a esses fármacos ou ineficazes no tratamento, devido ao desenvolvimento de resistência fúngica (Barbedo & Sgarbi, 2010; Costa & Santiago, 2016; Liu et al., 2016; Silva, 2017). O uso incorreto também pode acarretar toxicidade ao hospedeiro, problemas relacionados ao espectro de ação e efeitos colaterais. A avaliação e o monitoramento da susceptibilidade desses microrganismos são de grande importância, para de diminuir o risco de disseminação e resistência; bem como a importância das pesquisas relacionadas na descoberta de compostos que atuem contra estes fatores de virulência oferecendo tratamentos eficazes e seguros; elaboração de novas estratégias que previnam, diminuam ou auxiliem o tratamento contra as infecções fúngicas (Bergold & Georgiadis, 2004; Costa & Santiago, 2016; Liu et al., 2016; Silva, 2017).

### **2.2.1 Problemas de saúde relacionados a infecções causadas por *Candida* spp.**

Devido a presença de *Candida* spp. em várias regiões anatômicas e a existência de fatores de desequilíbrio da flora do hospedeiro, este microrganismo se prolifera causando alguns danos ao seu hospedeiro. A Candidose ou candidíase é uma das doenças infecciosas fúngicas mais comuns em humanos, podendo ser caracterizada como mucosa, cutaneomucosa, cutânea ou visceral (Giolo & Svidzinski, 2010). O diagnóstico se baseia em sintomas e sinais, pois geralmente são assintomáticos. Porém em infecções orais, o paciente relata dores ou sensação de queimadura quando as lesões se associam a úlceras. Dificuldades ao engolir, alterações no paladar e halitose também são relatados por pacientes acometidos por *Candida* nesta região, técnicas de obtenção e isolamento, bem como exames (biópsias, sementeiras, testes clínicos e outros) são necessários para avaliação e identificação do microrganismo (Menezes et al., 2007; Simões et al., 2013; Silva, 2017).

A candidíase bucal é caracterizada por ser uma infecção oportunista, observada principalmente em indivíduos imunossuprimidos, diabéticos, pessoas com

higiene oral inadequada e indivíduos que apresentam desequilíbrio hormonal, como a hipossalivação. A candidíase crônica está associada à diversos fatores, como *diabetes mellitus*, gestação, antibioticoterapia, entre outras. A candidíase disseminada se associa a baixa concentração de neutrófilos, leucemia, terapia quimioterápica ou imunossupressão em pacientes pós-transplantados. Já a candidíase cutânea e mucosa crônica estão associadas à baixa atividade do sistema imune, indivíduos com defeitos imunológicos hereditários e portadores do vírus da imunodeficiência humana ou iatrogênicos (Álvares et al., 2007; Campo, 2018). Em pacientes idosos e imunossuprimidos a conversão da *Candida* comensal em um patógeno-oportunista pode ser bastante desfavorável, formando biofilmes nas mucosas e em superfícies de próteses, causando estomatite protética, onde na maior parte dos casos associada à candidose eritematosa (Silva, G., 2013, Bath et al., 2014). A relação entre parasita e hospedeiro é dependente dos fatores de virulência da levedura e de fatores do hospedeiro (Simões et al., 2013; Silva, 2016), onde as manifestações da doença em indivíduos saudáveis normalmente não causam ameaça à vida do hospedeiro, mas representam um problema socioeconômico de grande importância, porém em indivíduos debilitados essas manifestações poder ser fatais (Álvares et al., 2007; Campo, 2018).

As infecções causadas por *Candida* spp. variam de lesões superficiais até infecções graves e disseminadas, tendo grande importância pela frequente incidência com que colonizam e infectam o corpo humano, correspondendo a aproximadamente 80% das infecções provocadas por fungos registradas em hospitais, onde metade destas infecções se transformam em candidemia (infecção sanguínea ocasionada pelo fungo *Candida* spp.) representando elevado índice de mortalidade em pacientes debilitados (Colombo & Guimarães, 2003, Álvares et al., 2007; Sá Silva et al., 2009; Ruiz & Pereira, 2016). Sendo que os principais microrganismos responsáveis por estas doenças são: *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*, porém o agente etiológico mais frequente da candidíase oral é a espécie *Candida albicans* (Campo, 2018; Giolo & Svidzinski, 2010).

### **2.2.2 Fatores de virulência**

O gênero *Candida* possui grande patogenicidade e algumas espécies de *Candida* expressam os fatores de virulência, sendo que os mais importantes deles são: a adesão a superfícies bióticas ou abióticas, como células do hospedeiro e

dispositivos médicos, a invasão tecidual através da formação de tubos germinativos e hifas, a formação de biofilmes, a secreção de enzimas hidrolíticas e evasão dos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro. Através desses fatores, o microrganismo é capaz de superar as defesas dos hospedeiros que se encontram mais susceptíveis. (Sardi et al., 2013).

Várias espécies de *Candida* são comumente encontradas nos tecidos e mucosas humanas em forma de biofilme. O seu biofilme também pode se instalar em aparelhos hospitalares e de uso pessoal, como cateteres, implantes e superfícies de próteses ou aparelhos ortodônticos (Lamont & Jenkinson, 2010; Bath et al., 2014; Costa & Santiago, 2016). As infecções causadas pelo gênero *Candida* representam um crescente problema na área de saúde pública, visto que algumas espécies apresentam fatores de virulência que promovem resistência aos antifúngicos convencionais, ocasionando o aumento do tempo de internação de pacientes e elevando o custo hospitalar. Também ocasionando o aumento da taxa de morbidade e mortalidade causadas por *Candida* spp. (Menezes, 2012; Silva, 2014; Cardoso, 2015; Costa & Santiago, 2016; Ruiz & Pereira, 2016).

Algumas espécies de *Candida* expressam estratégias específicas para se fixar, colonizar, invadir e causar doenças e são estes os fatores de virulência, responsáveis por superar as defesas dos hospedeiros que se encontram mais susceptíveis.

Na forma de levedura esta espécie inicia seu estabelecimento, se aderindo as superfícies, processo fundamental para sua colonização e invasão (Cardoso, 2004; Santana et al., 2013; Becker et al., 2016; Barbosa, 2018). A espécie *Candida albicans* mais comumente encontrada quando comparada às outras espécies do mesmo gênero, pode se aderir e induzidas pelas mudanças do meio em que se encontra pode alterar sua morfologia, desencadeando a sua germinação.

A espécie *C. albicans* possui a habilidade conhecida como dimorfismo, que também proporciona sua maior patogenicidade. O microrganismo se multiplica por brotamento, mas pode crescer com alterações fenotípicas da forma leveduriforme para forma filamentosa, denominada como tubos germinativos e hifas, que podem ser favorecidos por alguns ambientes como a bolsa gengival e o fluido crevicular gengival (Järvensivu et al., 2004; Anibal, 2010; Simões et al., 2013). Processo que aumenta a resistência a fatores externos, dificultando a erradicação da infecção e facilitando a

penetração do microrganismo nos tecidos do hospedeiro (Álvares et al., 2007; Santana et al., 2013; Costa & Santiago, 2016; Vieira & Santos, 2017).

Os mecanismos de virulência favorecem a colonização e a infecção no hospedeiro, como a adesão de células em superfícies, que é o processo inicial para a formação de biofilmes, essencial para os microrganismos colonizarem determinado habitat e invadirem o organismo hospedeiro e subsequente causar infecções. A formação dos tubos germinativos proporciona a formação de biofilme, que representa maior resistência e favorece a proliferação. Assim, a adesão e formação de biofilme por essas espécies representa um cenário preocupante tanto pela invasão tecidual como também pela adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas, como cateteres (Hawser & Douglas, 1995; Ghannoum et al., 2015).

A transição morfológica das células leveduriformes e hifas formam o biofilme, que é considerado a característica de virulência mais relevante da espécie *C. albicans*, a qual demonstram a resistência aos antifúngicos. Onde as células se multiplicam, há a agregação de novas células, produção e aumento de hifas e da densidade do biofilme, além da produção de moléculas auto indutoras, indução da transcrição genes específicos reguladores da virulência, motilidade, e da produção da matriz polimérica extracelular (EPS), conferindo maior resistência ao ataque de agentes antimicrobianos e desinfetantes, radiação ultra-violeta e desidratação (Langer et al., 2018).

A formação do biofilme é dividido em etapas importantes, a fase inicial de formação do biofilme de leveduras se dá pela adesão da levedura às células humanas ou superfícies abióticas, como superfícies dentárias ou próteses, processo fundamental para assegurar a sobrevivência das células fúngicas ou internalizado nas células epiteliais do hospedeiro (Ghannoum et al., 2015). O biofilme é composto por células leveduriformes e hifas, onde as leveduras inicialmente formam uma camada que permite a adesão da estrutura do biofilme ao substrato, posteriormente, a matriz extracelular autoproduzida cobre esta estrutura toda, protegendo o biofilme de estresses ambientais. A formação do biofilme de *Candida* progride em diferentes fases diferentes, sendo considerado como biofilme em formação ou biofilme inicial aquele que tem de 0 a 6 horas de formação a partir de sua adesão, biofilme intermediário aquele com 7 a 12 horas, ao atingir 13 horas de formação o biofilme atinge a maturidade, e nesta fase o biofilme libera células fúngicas que irão se dispersar para diferentes locais com a finalidade de estabelecer um novo local de infecção, sendo

considerado como biofilme maduro de 13 a 48 horas de formação (Ghannoum et al., 2015). Porém, diversos autores consideram como biofilme maduro aquele que pode ser visualizado a olho nu em superfícies. Em pesquisas, os biofilmes crescidos de 24 horas a 48 horas são considerados como maduro, sendo mais comumente utilizado o biofilme de 24 horas nos ensaios laboratoriais (Nobile & Johnson, 2015; Gulati & Nobile, 2016; Yan et al., 2019, Pentland et al., 2020). Os biofilmes de *Candida* também apresentam o caráter de se adaptar a diferentes condições de temperatura e pH, além de expressar adesinas, proteases e fosfolipases (Santana et al., 2013).

Diversas técnicas são utilizadas para determinar a ultra-estrutura e as fases de formação dos biofilmes de *Candida* spp., porém a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é importante na observação da biomassa do biofilme e toda sua estrutura, onde qualquer modificação morfológica das células e/ou estrutural do biofilme é considerada como alterações provocadas por fatores de estresse a este biofilme (Ghannoum et al., 2015).

A resistência a agentes antimicrobianos é uma das características mais significativas dos biofilmes, estudos demonstram que os mecanismos de resistência dos microrganismos contribuem no impedimento da penetração dos agentes antifúngicos aos biofilmes, demonstrando que as células de biofilme de *Candida* ficam menos suscetíveis a agentes antifúngicos do que as leveduras planctônicas (Hawser & Douglas, 1995).

A resistência aos antimicrobianos tem sido documentada tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, remetendo a um problema de nível mundial (Duarte, 2006). Atualmente, além da espécie *C. albicans*, espécies de *Candida* não-*albicans*, principalmente as espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*, vem ganhando importância clínica devido ao aumento de casos de infecções causadas por estes microrganismos e resistência aos antimicrobianos (Giolo & Svidzinski, 2010; Silva, G., 2013; Campo, 2018;)

Os antimicrobianos podem possuir diferentes mecanismos de ação contra os microrganismos, os principais são: danos na parede celular e membrana celular; inibição da síntese de proteínas e do ergosterol; danificação da replicação do DNA, sendo que quando há a resistência de um microrganismo ao antimicrobiano, um ou mais destes mecanismos de ação podem ocorrer (Kapoor et al., 2017). Contra as candidoses orais, comumente utiliza-se a clorexidina, em forma de enxaguante bucal; para candidemias são utilizados os antifúngicos poliênicos: anfotericina B, nistatina e

fluconazol, este comumente utilizado em tratamentos sistêmicos. Porém com o aumento de resistência frente aos antifúngicos, estas drogas podem não ter o efeito esperado, como a resistência do biofilme de *Candida* spp. que incapacita a penetração do fluconazol na matriz do biofilme (Bath et al., 2014; Ghannoum et al., 2015).

Antigamente, o consumo de medicamentos era seguido rigorosamente, porém o uso inadequado desses fármacos proporciona a resistência antimicrobiana (Álvares et al., 2007). Atualmente, a dificuldade no tratamento de infecções fúngicas alerta sobre os mecanismos de resistência das leveduras do gênero *Candida* aos agentes antifúngicos, os quais advertem a necessidade de higienização e administração adequada de antibióticos e principalmente de estratégias que impeçam a sua disseminação (Silva G., 2013; Costa & Santiago, 2016).

### **2.3 A utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos.**

As espécies de *Candida*, estão entre são os microrganismos mais comuns diagnosticados no sangue de pacientes hospitalizados, e a série de antifúngicos disponíveis é considerada limitada, pois alguns medicamentos podem ser tóxicos aos pacientes em certas situações. Apesar da classe dos azóis serem considerados eficazes no tratamento de infecções por *Candida*, existem diversos relatos que estes tratamentos podem apresentar falhas. A falta de novas opções terapêuticas, a incidência de infecções por microrganismos se tornando cada vez mais comuns e resistentes aos tratamentos convencionais, estimulou estudos na busca de terapias mais eficazes e novas estratégias que possam prevenir e tratar a disseminação desses microrganismos (Endo et al., 2010; Vieira & Santos, 2017). Assim, utilizam-se dos conhecimentos sobre as plantas para utilização no tratamento de doenças, onde a pesquisa sobre seus compostos permite a comprovação dos efeitos terapêuticos.

O uso de plantas nas diversas regiões do mundo destaca o vasto conteúdo histórico para tratamento de dores e doenças. Novos agentes antifúngicos provenientes das plantas vêm sendo cada vez mais pesquisados, que na maioria das vezes, podem ser considerados menos tóxicos ou atóxicos e efetivos contra diversos tipos de patologias e contra microrganismos, como as espécies de *Candida* potencialmente patogênicas que habitam o organismo humano, inclusive a cavidade oral (Bath et al., 2014).

São consideradas plantas medicinais aquelas que possuem fins terapêuticos, baseados no conhecimento popular ou científico, que são preparados

somente por espécies vegetais, sendo inexistente a mistura com compostos sintéticos (Oliveira, 2016). A utilização de plantas com propósito medicinal foi um dos primeiros recursos de tratamento empregado contra enfermidades pelos povos antigos, as quais vêm sendo aprimoradas cientificamente (Braz et al., 2015). Desde a origem humana, os conhecimentos empíricos sobre o uso de plantas foram observados e passados de geração a geração por diversos grupos étnicos, utilizados para tratamentos e prevenções de doenças (Silva, 2008; Escola de Saúde Pública, 2018).

Em diversos países, principalmente nos quais a população tem pouco ou nenhum acesso a medicamentos convencionais, o tratamento baseado em conhecimentos empíricos foi adotado como forma de prevenção e cura para muitas enfermidades (Leão et al., 2017). No Brasil, os conhecimentos sobre a utilização das plantas medicinais foram adquiridos através de práticas indígenas, assim como vindas de conhecimentos de imigrantes e também por escravos, o que veio a se tornar uma medicina popular tradicional, a qual recentemente foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (Escola de Saúde Pública, 2018). O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas de todo mundo, com mais de 60.000 espécies catalogadas, as quais somente 8% foram pesquisadas sobre os compostos biotivos e medicinais, ao serem associadas aos conhecimentos tradicionais e estudos científicos podem proporcionar ao país um vasto campo econômico (Bergold & Georgiadis, 2004; Brasil, 2006a; Salomé, 2007).

Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou a contribuição necessária da medicina popular tradicional na assistência social, demonstrando que 80% da população faz uso das plantas para amenizar sintomas desagradáveis ou dores, principalmente aos habitantes com pouca acessibilidade aos sistemas de saúde e começou a incentivar a utilização de plantas medicinais comprovadamente estudadas e efetivas (Salomé, 2007). A aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF) permitiu a implementação da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), permitindo que usuários dos serviços de saúde conhecessem e utilizassem as ervas medicinais, garantindo que os valores e tradições repassadas entre as gerações fossem preservadas e que a utilização das plantas ocorra de forma correta e segura, equilibrando as vertentes existentes entre tradições e inovações. Medicamentos derivados de materiais vegetais têm uma grande importância na saúde global que é mantido por gerações devido ao suprimento contínuo e natural de

fitomedicamentos. Assim, a utilização de plantas medicinais são uma importante alternativa contra a resistência antimicrobiana que é atualmente frequente no Brasil, devido ao uso incorreto, indiscriminado e excessivo de antimicrobianos (Brasil, 2006b; Martins et al., 2012; Queiroga, 2015; Brasil, 2016).

As plantas medicinais são, comprovadamente, fonte de vários antioxidantes naturais, extensa variedade de metabólitos secundários (Martins et al., 2012). Seus compostos também apresentam diversos tipos de atividades biológicas, entre elas atividade antifúngica, antimicrobiana, antitumoral, antiparasitária, anti-inflamatória, cicatrizante e muitas outras (Nunes et al., 2016). São consideradas uma das principais fontes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para diversas condições, inclusive para doenças de caráter infeccioso (Silva, 2008).

Recentemente, estudam-se cada vez mais as plantas afim de demonstrar seu potencial terapêutico e encontrar tratamentos menos agressivos e eficientes que auxiliem em conjunto com os medicamentos ou diminuam a resistência adquirida pelos microrganismos aos antimicrobianos já utilizados, assim a pesquisa com plantas vem demonstrando grande importância para o combate de infecções (Martins et al., 2012; Nunes et al., 2016). Sendo que o uso de animais vertebrados em estudos relacionados vem sendo substituídos por outros modelos, como animais invertebrados, especialmente o modelo de insetos, como as larvas de *Galleria mellonella*, que vem se tornando uma alternativa mais aceitável nas pesquisas para o estudo da patogênese fúngica e ensaios para compostos antimicrobianos. Mesmo que os insetos e os mamíferos sejam evolutivamente distantes, as larvas de *G. mellonella* possuem características que sustentam seu uso como modelo *in vivo*, com demonstrativos de que há semelhanças nas estruturas e funções, como o sistema imunológico destes insetos serem semelhantes ao sistema imunológico inato dos mamíferos, permitindo que sejam utilizadas para prever a resposta imunológica no hospedeiro (Scorzoni et al., 2015; Benaducci et al., 2016; Ignasiak & Maxwell, 2017; Oliveira, 2019). Assim, se torna viável a utilização dos ensaios com esses organismos para comprovar a eficiência do tratamento com os compostos bioativos e a eficácia de tratamentos antifúngicos convencionais com o modelo de larvas de *Galleria mellonella*. Além do animal apresentar desenvolvimento rápido, com ciclo de vida de aproximadamente 6 semanas, baixo custo para sua criação, manutenção e reprodução o que são características muito favoráveis para sua utilização em pesquisas (Benaducci et al., 2016; Ignasiak & Maxwell, 2017). Neste contexto,

investiga-se o gênero *Phyllanthus*, o qual tem apresentado ampla atividade biológica e grande potencial terapêutico bem como baixa toxicidade, justificando a exploração dessa planta em pesquisas.

### 2.3.1 *Phyllanthus* spp.

A classificação do gênero consiste em: Reino: Plantae; Divisão: Angiosperma; Classe: Dicotiledônea; Ordem: Tubiflorae; Família: Euphorbiaceae/Phyllanthaceae; Gênero: *Phyllanthus* (Rehder et al., 2003; Silva & Sales, 2004).

O gênero foi referenciado pela primeira vez por Linnaeus, em 1737 no livro “Systema Naturae”, porém só foi estabelecido mais tardiamente pelo mesmo autor no ano de 1753, no livro “Species Plantarum” (Silva & Sales, 2004). O gênero *Phyllanthus* (do grego *phyllon*: folha e *anthos*: flor) é constituído por ervas, arbustos ou árvores monóicas ou dióicas, compreendendo mais de 8.000 espécies espalhadas pela maioria dos continentes (Sarin et al., 2014), sendo considerado o mais diversificado e o maior gênero da família Euphorbiaceae devido a diversidade de características vegetativas e florais (Kassuya et al., 2003; Rehder et al., 2003; Torres et al., 2003, Martins et al., 2014).

O gênero *Phyllanthus* é prevalente em regiões tropicais e subtropicais, nos mais diversos tipos de vegetação (Rehder et al., 2003), podendo ser encontrado no continente americano, africano, asiático e australiano. Na América do Sul, o Brasil é o país que contém a maior quantidade de espécies, aproximadamente 100 espécies, onde 40% delas são encontradas nos estados do Sudeste do Brasil, que congrega o centro de diversidade de *Phyllanthus* do país (Martins, 2013; Martins et al., 2014; Leão et al., 2017).

No Brasil são denominadas como “erva-pombinha” ou mais conhecidas como “quebra-pedra” dentre outras variações de nome popular. São consideradas como ervas daninhas, invasoras em agricultura e áreas rurais. Diversas espécies do mesmo gênero crescem juntas, causando confusão na identificação. Mas, na maioria das vezes, são consideradas como ervas daninhas e também como invasoras em áreas de agricultura (Torres et al., 2003; Silva & Sales, 2004) (Torres et al., 2003; Silva & Sales, 2004; Sarin et al., 2014). As espécies mais comuns são as ervas: *Phyllanthus amarus* Schum. e Thonn, *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. Müll. Arg. Muitas destas espécies são muito parecidas, com pequenas diferenças ou

imperceptíveis a olho nu, muitas vezes sendo necessarias outras análises para identificação. Por esta razão, são denominadas como “complexos de espécies”, onde um grupo de organismos compartilham propriedades fenotípicas e morfológicas muito semelhantes entre si. Sendo assim, a classificação baseada apenas em caracteres morfológicos pode ser errônea. Dentro do gênero *Phyllanthus* tem-se o “complexo *P. niruri*”, que abrange vários táxons com características foliares e florais extremamente similares à espécie *P. niruri* L. (Alonso & Amaral, 2010).

Anteriormente, as espécies *P. amarus*, *P. fraternus* e *P. debilis* foram agrupadas em um único grupo da espécie *P. niruri*, mencionadas como espécies do “complexo *niruri*”. O gênero *Phyllanthus* é parafilético, portanto, existem duas espécies problemáticas e confusas: *P. niruri* e *P. amarus*, que são diversas vezes confundidas, porém são duas espécies individuais (Lee et al., 2006). Atualmente, foi esclarecido que *P. niruri* é uma espécie americana. Assim, a identificação da espécie pode muitas vezes estar equivocada, sendo necessário o uso de marcadores químicos e moleculares para identificação de espécies de *Phyllanthus* (Sarin et al., 2014).

Plantas do gênero *Phyllanthus* são costumeiramente utilizadas em forma de infusão das folhas, caules e raízes para o tratamento de numerosos distúrbios, por apresentar diversas propriedades diuréticas, analgésica, anti-inflamatória, anti-hepatotóxico, antimicrobiana e antitumoral (Torres et al., 2003). Utilizada especialmente para tratar afecções hepáticas, cálculos renais e da bexiga, inflamações e infecções geniturinárias, como herpes e gonorreia. Também usadas no tratamento de gripes, asma, infecções brônquicas, icterícia, disenteria, além de diabetes. Recentemente, foi descoberta a possível aplicação no tratamento contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), hepatite B e câncer (Kassuya et al., 2003; Rehder et al., 2003; Salomé, 2007, Messias et al., 2015). Com isso, nota-se que os produtos feitos com espécies de *Phyllanthus* vêm sendo relatados com satisfatórios efeitos farmacológicos (Salomé, 2007).

A maioria das plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* apresentam várias combinações de metabólitos secundários e mais de 50 compostos que os classificam como plantas medicinais (Sarin et al., 2014; Oliveira, 2016). Assim, os princípios ativos purificados obtidos de diferentes espécies de *Phyllanthus* têm demonstrado atividade antinociceptiva, bem com eficaz contra doenças, inflamações e alergias (Kassuya et al., 2003; Torres et al., 2003; Salomé, 2007). Como o composto beta-sistoterol que atua na prevenção, inibição e eliminação de cálculos, além de

apresentar atividade anti-inflamatória e analgésica (Kassuya et al., 2003; Sarin et al., 2014; Oliveira, 2016). A alta quantidade e eficiência dos componentes presentes na planta a tornam uma planta medicinal que comumente usa-se para tratamentos preventivos e curativos (Braz et al., 2015).

O estudo dos fitoquímicos é de grande importância, visto que reconhecem e identificam os compostos e os metabólitos secundários mais presentes, relevantes e úteis existentes nas plantas de interesse (Bessa et al., 2013). A utilização de informações etnobotânicas e a farmacologia auxiliam na busca por compostos bioativos existente nas plantas medicinais, considerando parâmetros agrotecnológicos, biotecnológicos, farmacológicos e microbiológicos (Bessa et al., 2013). Dentro do gênero *Phyllanthus* observa-se a existência de grande variedade de metabólitos com potencial para tratamento de várias patologias, especialmente na planta *Phyllanthus niruri*, que vem sendo continuamente estudada para comprovar os efeitos benéficos relatados pela medicina popular de diversos países (Braz et al., 2015; Salomé, 2007).

### **2.3.2 *Phyllanthus niruri* L.**

Segundo o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR) a classificação mais recente da planta consiste em: Reino: Plantae; Filo: Tracheophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Malpighiales; Família: Phyllanthaceae; Gênero: *Phyllanthus* L. Espécie: *Phyllanthus niruri* L.

A espécie *Phyllanthus niruri* tem uma variedade de nomes populares, tais como: “Arrebenta-pedras, Erva-pombinha, Fura-parede” entre outros, porém o mais conhecido é “quebra-pedra”. É a espécie do gênero com maior utilização na medicina tradicional, muito utilizada na medicina popular brasileira (Braz et al., 2015). Embora existam outras espécies do gênero, utilizadas e denominadas como “Quebra-pedra”, somente *P. niruri* possui propriedades medicinais oficialmente comprovadas (Farmacopéia Brasileira, 2010; Oliveira, 2016).

A planta é nativa da Amazônia e de outras regiões tropicais do Brasil e do mundo, como Nigéria, Gana, Bahamas, Índia, China, entre outros (Girach et al., 1994; Oliveira, 2016; Leão et al., 2017). Considerada como “erva-daninha”, por sua ampla distribuição e facilidade de adaptação e proliferação, o que possibilita sua incidência em diversas regiões do mundo (Silva & Sales, 2004). A erva possui de 30 a 60 cm de altura e pode crescer em qualquer tipo de solo, bem como se desenvolver entre

pedras, paredes e rachaduras. Pode ser encontrada florida e com frutos durante todo o ano em todos os estados brasileiros (Girach et al., 1994; Oliveira, 2016; Leão et al., 2017).

Segundo a Farmacopéia Brasileira, a espécie se caracteriza como herbácea, glabra, com caules ramificados ou simples, os principais ramos são delgados com ausência foliar, os ramos possuem folhas simples, membranáceas, opostas, com formato oblongo-elíptico com a ponta atenuada, de coloração verde-oliva e face abaxial verde-pálida. As folhas possuem lâminas de 0,6 cm de largura e 0,95 cm de comprimento. Possuem frutos do tipo tricoca, globosos, dispostos na região abaxial dos ramos, pedicelos cilíndricos, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento quando maduros, possui por lóculo duas sementes triangulares. As características macroscópicas de *Phyllanthus niruri* são essenciais para diferenciá-la uma vez que a espécie pode ser muito similar a outras quando observado às características anatômicas (Figura 1) (Farmacopéia Brasileira, 2010, p. 1229; Martins et al., 2014).

Figura 1 – Morfologia da planta *Phyllanthus niruri*



Fonte: o autor (2020)

Atualmente, está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), por possuir alto potencial produtivo para o Ministério da Saúde do Brasil, que sugere estudos para subsidiar a elaboração de produtos fitoterapêuticos e aconselha sobre a utilização das plantas medicinais disponibilizadas para a população (Brasil, 2006a; Queiroga, 2015; Escola de Saúde Pública, 2018).

Os primeiros estudos relacionados a planta *P. niruri* foram realizados por pesquisadores brasileiros, visto que a planta é nativa do país e possui um longo histórico de utilização por seus habitantes contra enfermidades (Kaur et al., 2017), apresentando diversos compostos químicos que possuem atividades biológicas o que faz com que esta planta seja considerada como planta medicinal com alto potencial terapêutico para tratamentos preventivos e curativos (Lorenzi & Matos, 2002; Salomé, 2007; Marques, 2010; Cruces et al., 2013; Escola de Saúde Pública, 2018).

Como esta espécie vem sendo muito utilizada na medicina popular brasileira como tratamento terapêutico contra diversas enfermidades, diversas pesquisas vêm sendo realizadas, inclusive com células e modelos animais, e nos últimos 35 anos proporcionaram o conhecimento de valiosas evidências científicas que demonstram os benefícios de sua utilização (Braz et al., 2015; Messias et al., 2015; Lee et al., 2016).

Foi denominada como “quebra-pedra” pois antigamente acreditava-se que era capaz de quebrar as pedras e elimina-las na urina, porém foi relatado que sua propriedade não é capaz de quebra-las, mas diminui a fixação de oxalato de cálcio nas paredes renais e aumenta a filtração pelos glomérulos, causando o relaxamento do ureter e excreção do ácido úrico, o que facilita a eliminação natural das pedras (Cruces et al., 2013; Braz et al., 2015).

Outros benefícios e propriedades da planta foram demonstrados, tais como atividade contra gripe, disenteria, vaginite, gastrite, além de possuir efeito calmante (Braz et al., 2015; Messias et al., 2015; Lee et al., 2016). Possui propriedades contra infecções geniturinárias e intestinais; afecções renais e hepáticas, especialmente no tratamento de distúrbios do sistema urinário e pedras nos rins, apresentando fatores diuréticos e analgésicos; possui caráter anestésico, antioxidante, antiespasmódico, antilitolítico, anti-inflamatório, anti-hiperalgésico e antinociceptivo (Gorski et al., 1993; Venturi & Randi, 1997; Lorenzi & Matos, 2002; Nascimento, 2008; Aita et al., 2009; Marques, 2010; Oliveira et al., 2012; Escola de Saúde Pública, 2018; Oliveira et al., 2019). Também foi demonstrada como potencial anti-hepatite B, anti-diabetes e também como antiplasmodial, antiviral e antimicrobiano, inclusive possui atividades anticáries, podendo ser utilizada em produtos para uso oral (Venturi & Randi, 1997; Lorenzi & Matos, 2002; Nascimento, 2008; Aita et al., 2009; Marques, 2010; Oliveira et al., 2012; Sunitha et al., 2017; Escola de Saúde Pública, 2018; Oliveira et al., 2019).

Entre essas atividades destacam-se as atividades antimicrobianas, onde autores demonstraram que os compostos ésteres etílicos presentes na planta possuem atividade contra os microrganismos orais, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans* (Huang et al., 2010). O éster etílico do ácido hexadecanóico (ácido palmítico) e do ácido linolênico podem ser encontrados em diversos extratos vegetais da planta e atuar como hemolítico, pesticida, antioxidante, além de ter ação antifúngica e antibacteriana (Tyagi & Agarwal, 2017), especialmente sobre a levedura *C. albicans* (Santos Primo, 2013).

A presença de metabólitos e outros compostos na planta de *P. niruri*, como os ácidos graxos, esteróides, o éster etílico do ácido hexadecanóico, do ácido linolênico e do linoleico auxiliam nas funções antioxidante, anti-inflamatório, anti-acne, anti-histamínico, hemolítico, antiandrogênico, antiparasitário ou nematicida, além de apresentar atividade antimicrobiana (Santos, 2017; Tyagi & Agarwal, 2017). O fitol também presente na planta foi relatado como anti-inflamatório, antinociceptivo e antimicrobiano (Leite, 2010; Ghaneian et al., 2015; Tyagi & Agarwal, 2017). O composto beta-sitosterol presente na planta de *P. niruri* apresentou potencial antinociceptivos, anestésico, e também antimicrobiano, sendo efetivo contra diversas espécies microbianas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Salmonella enterica* (sorotipo typhi) e *Candida albicans*, demonstrado como provável responsável pelas rupturas da membrana dos microrganismos (Acikara et al., 2014; Odiba et al., 2014; Sarin et al., 2014; Yinusa et al., 2016). Sendo que sua utilização não é responsável por modificações psicológicas, físicas ou toxicidade sanguínea, que possam ser relacionadas a efeitos tóxicos do produto (Braz et al., 2015).

Com dados de sensibilidade e atividade contra microrganismos em estado planctônico ou em biofilme através da utilização da planta *Phyllanthus niruri*, se faz necessário ampliar os conhecimentos sobre o uso de seus extratos como agente antimicrobiano no tratamento de infecções e/ou como coadjuvantes e seus possíveis efeitos colaterais, afim de viabilizá-la como um agente farmacológico.

Com base na revisão de literatura, a espécie *P. niruri* é comumente utilizada e apresenta inúmeras atividades biológicas. Porém, a planta submetida à extração hidroalcoólica havia sido pouco reportada até o momento, propôs-se avaliar o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn) sobre células planctônicas de diferentes

cepas de *Candida* e em biofilme de *C. albicans* ATCC MYA 2876, conhecida em literatura como *C. albicans* SC5314, e a toxicidade das diferentes concentrações do EH-Pn, afim de contribuir para a expansão dos conhecimentos sobre as atividades biológicas antifúngicas do extrato hidroalcoólico desta espécie.

### 3. PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn) sobre diferentes cepas de *Candida* spp., e o efeito do EH-Pn nas etapas de formação do biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e a toxicidade de EH-Pn em modelos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (EH-Pn) através da maceração, avaliar o rendimento total e a composição do EH-Pn através de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas acoplada (CG-EMS);
- Avaliar a ação antifúngica do EH-Pn, através das técnicas: difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra diferentes cepas de *Candida* spp;
- Avaliar a adesão e produção de tubos germinativos de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após exposição ao EH-Pn;
- Analisar a viabilidade celular dos biofilmes de 2 horas e 24 horas de formação por *C. albicans* ATCC MYA-2876 após exposição ao EH-Pn;
- Avaliar o efeito do EH-Pn na morfologia celular dos biofilmes de *C. albicans* ATCC MYA-2876 através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Analisar as células leveduriformes de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 após exposição ao EH-Pn através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Avaliar a toxicidade do EH-Pn *in vitro* em linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada (*HaCaT*) e o efeito *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da Realização da Pesquisa

O estudo foi realizado nos laboratórios da Área de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), Brasil.

### 4.2 Cepas de *Candida* spp.

Foram utilizadas cepas de *Candida* spp. de interesse médico e acadêmico, com nomenclatura oficial definida pela *American Type Culture Collection* (ATCC) recomendadas para testes pelo *Clinical and Laboratory Standards Institutes* - CLSI (2008), sendo elas: *Candida albicans* (ATCC MYA-2876), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA-646), *Candida glabrata* (ATCC 5207), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida krusei* (ATCC 749), *Candida lusitaniae* (ATCC 4031), *Candida lusitaniae* (ATCC 42720), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida parapsilosis* (ATCC 10232), *Candida rugosa* (ATCC 10571), *Candida tropicalis* (ATCC 40281), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida utilis* (ATCC 9950).

#### 4.2.1 Estocagem e ativação dos microrganismos

Todas as 16 cepas padrão de *Candida* spp. utilizadas neste estudo foram obtidas no laboratório da área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP, Brasil. Os microrganismos foram acondicionados em microtubos contendo glicerol 80% em ultrafreezer a -80°C. Para reativação dos microrganismos utilizou-se meio de *Saboraud Dextrose Agar* (SDA, Kasvi) e *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD, Oxoid).

### 4.3 Planta “Quebra-pedra” (*Phyllanthus niruri*)

A rasura da planta (planta triturada - Figura 2) foi obtida em parceria com a empresa Florien Fitoativos LTDA. Forn/Proc.: Flora do Sul Produtos Naturais LTDA (Estrada Vicente Bellini, 175. CEP: 13427-225. Piracicaba/SP, Brasil).

➤ *Phyllanthus niruri*

(Certificado de análise: Lote: 18K26-FL37-004769. Lote fabricante: 30. Data de fabricação: 05/2018. Data de validade: 05/2020. Origem e procedência: Brasil. Data fracionamento e análise: 03/2019. N° Ordem Frac.: 004769). (Anexo 1 –

Certificado de análise). Registro de acesso à biodiversidade no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGen), com cadastro nº: AA98D53.

Figura 2 - Rasura da planta *Phyllanthus niruri*.



Fonte: o autor (2020)

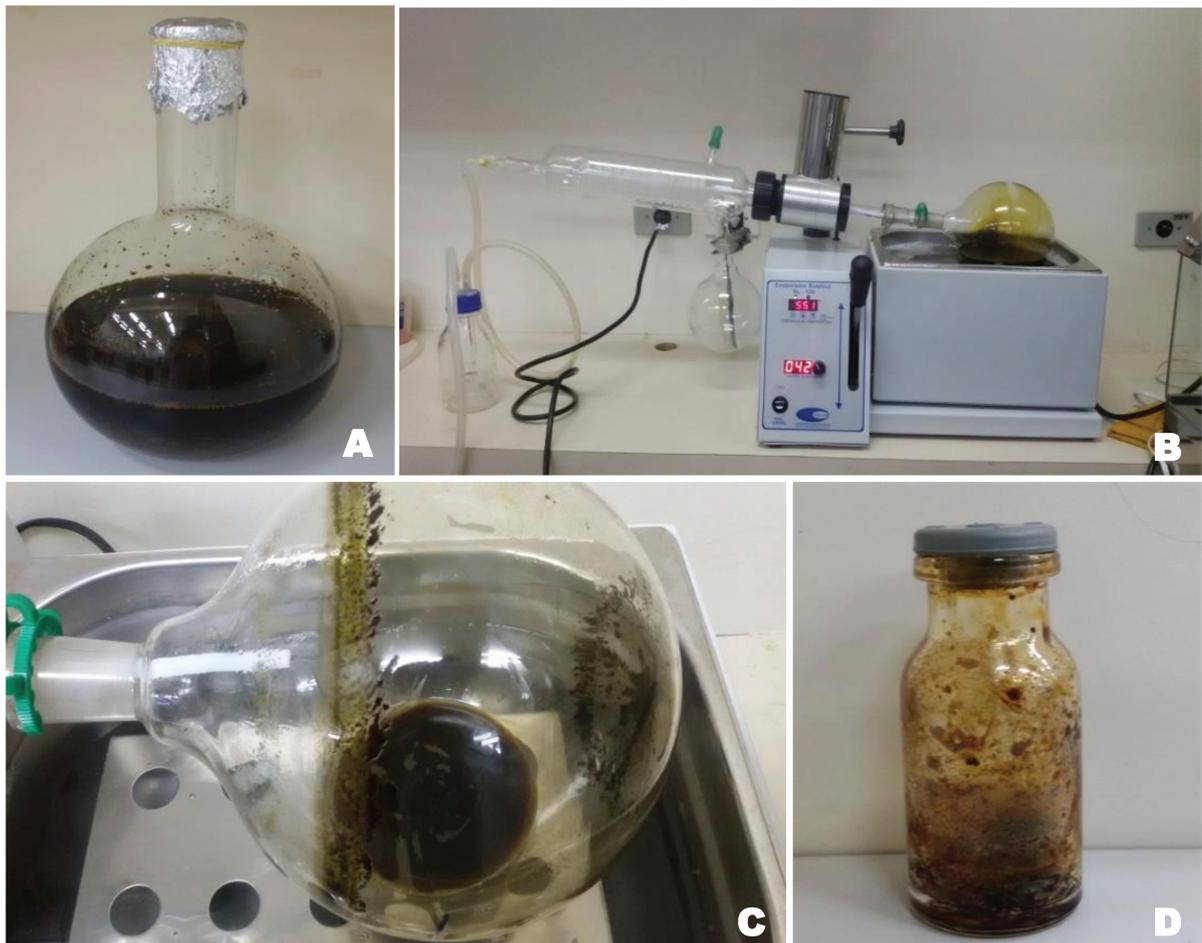
#### 4.3.1 Extração hidroalcoólica de *Phyllanthus niruri*

O processo de extração hidroalcoólica foi baseado nos procedimentos realizados por Silva et al. (2014) e Leão et al. (2017) com adaptações. Preparou-se o extrato hidroalcoólico com 300 g da rasura de *Phyllanthus niruri* (constituído de caule, folha e semente da planta) macerada em 3 litros de solução hidroalcoólica 70% (v/v), onde a planta rasurada (triturada) ficou submersa em temperatura ambiente por um período de 10 dias consecutivos ao abrigo da luz (Figura 3-A), sendo diariamente revolvida, afim de promover o esgotamento dos princípios ativos da rasura vegetal. O resultante da maceração foi filtrado em papel qualitativo para separação de partículas pouco solúveis ou insolúveis (Nakamura et al., 2006; Silva, J., 2013; Silva et al., 2014; Leão et al., 2017).

Para a evaporação do solvente presente no extrato, 500 mL do conteúdo foi submetido a rotoevaporação em 40 rpm acoplado em sistema de banho de aquecimento a 40 °C (Evaporador rotativo a vácuo, modelo: SL-126, Solab, Brasil), recirculador de água destilada a temperatura de 7°C (Banho ultratermostático, modelo: SL-152, Solab, Brasil), e bomba a vácuo com pressão negativa de 500 mmHg (Millipore, modelo: wp6111560, US) (Figura 3-B). Após a evaporação total do solvente, o produto final (Figura 3-C) foi transferido para um frasco de 500 mL (Schott Duran®)

e mantido por 24 horas em  $-20^{\circ}\text{C}$  para averiguação do congelamento do produto e a eficácia da evaporação do solvente. Em seguida, alíquotas de 5 mL dos extratos foram transferidas em frascos de vidro (15 mL), novamente congeladas e submetidas ao processo de liofilização a  $-46^{\circ}\text{C}$  a 0,07mBar (Liofilizador Jouan LP3, modelo 60, Jouan inc., Winchester, VA) (Figura 3-D). Assim, foram obtidos os frascos com o extrato seco e determinou-se a massa seca do EH-Pn, estes foram armazenados em refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização nos ensaios (Nakamura et al., 2006; Silva, J., 2013; Silva et al., 2014).

Figura 3 – Processamento do Extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*



Fonte: o autor (2020). Imagem A: refere-se à maceração da planta; B: rotoevaporação do solvente do extrato hidroalcoólico de *P. niruri*; C: Produto restante após a rotoevaporação; D: Extrato hidroalcoólico de *P. niruri* liofilizado.

#### 4.3.2 Rendimento do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*

Após a maceração, foi feita a filtragem, rotoevaporação e liofilização do extrato. O rendimento total do extrato foi calculado de acordo com a metodologia de Rodrigues et al. (2011). Utilizando a fórmula:

$$\text{Re} = (\text{Pext} / \text{Pfolhas}) \times 100$$

Sendo:

**Re** = Rendimento total do extrato (%)

**Pext** = Peso do extrato seco / liofilizado (g)

**Pfolhas** = Peso da rasura (g)

#### 4.3.3 Diluição do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*

Em todos os ensaios, os extratos hidroalcoólicos de *Phyllanthus niruri* liofilizados foram solubilizados em solvente DMSO 1% (v/v) (Dimetilsulfóxido) e meio de cultura ideal e homogeneizados em agitador de soluções (modelo: AP56, Phoenix, Brasil) (Fernandes, 2013). Após, a dissolução completa do extrato, a solução foi centrifugada e filtrada (Jet Biofil Syringe Filter, PVDF Membrane, pore size 0,22 µm, Ø 47 mm). O antifúngico fluconazol foi diluído de acordo com as recomendações do fabricante nos respectivos meios de cultura ideais para realização do ensaio, obtendo-se as concentrações iniciais de 64 µg/ml.

#### 4.3.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EMS)

As análises cromatográficas foram feitas em parceria com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), no Laboratório de Instrumentação (LINST) do CPQBA/UNICAMP localizado na cidade de Paulínia no Cromatógrafo a gás (Agilent, modelo HP-6890) acoplado a detector seletivo de massas quadruplo (Agilent, modelo HP-5975), operando na faixa de 10 a 1100 u.m.a., fonte de ionização de 70 eV, conforme as condições abaixo descritas.

Coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Temperaturas: Injetor: 280°C

Coluna: 150°C (2 min), 5°C/min, 240°C, 10°C/min, 300°C (34 min)

Detector: 300°C

Volume injetado: 1,0 µL

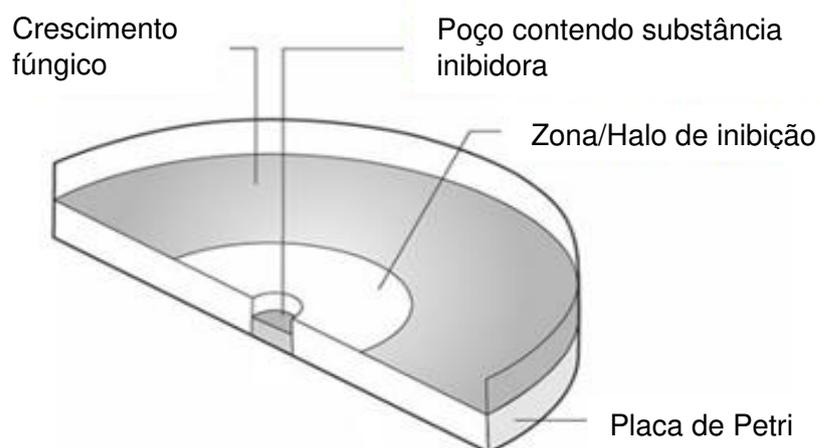
Vazão do gás de arraste (He): 1,0 ml/min

Os componentes químicos encontrados no extrato hidroalcoólico de *P. niruri* através de CG-EMS foram analisados pelo software MSD ChemStation (G1701DA, D.02.00.275, Agilent Technologies), comparando-se os picos cromatográficos e índices de retenção.

#### 4.4 Avaliação antifúngica do EH-Pn contra diferentes cepas de *Candida* spp. através da técnica de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar através da técnica de poço-difusão é comumente utilizado para testar extratos vegetais. Neste ensaio o microrganismo foi inoculado na superfície do ágar e foi removida partes circulares de ágar desta placa que foram os poços, os quais posteriormente foram preenchidos pela substância a ser testada. Ao fim do ensaio obteve-se as placas com crescimento microbiano, e os poços em que a substância se difundiu e teve caráter antimicrobiano inibitório, foi observada uma zona sem crescimento bem aparente, que é denominada como zona ou halo de inibição (Figura 4). Assim, foi possível relacionar o tamanho do halo de inibição (não crescimento) com a substância inibidora (Aulton, 2005; Silva, 2011).

Figura 4 - Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar



Fonte: Adaptação de Aulton, 2005.

Este teste foi utilizado para identificar se o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* possui ação antimicrobiana, através do protocolo M2-A8 (CLSI,

2003), com pequenas modificações, utilizando-se a técnica em *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA) em camada dupla (Groove & Randall, 1955).

Para o teste, os inóculos das cepas de *Candida* foram padronizados conforme CLSI (2003), em solução salina 0,9% estéril, de acordo com a escala McFarland de 0.5 nm de turbidez (aproximadamente  $10^8$  cél/mL). Inoculou-se as cepas na superfície da primeira camada de SDA nas placas com o auxílio de swab. O procedimento foi repetido duas vezes, girando  $60^\circ$  em sua margem, a fim de distribuir uniformemente o inóculo. Posteriormente, foram feitos orifícios (poços) somente na primeira camada de ágar, com auxílio de ponteiras de 10  $\mu$ L estéreis (6 mm), subsequentemente os poços foram preenchidos com 20  $\mu$ L da diluição em série (64 mg/mL a 0,5 mg/mL) do EH-Pn e os controles: fluconazol (64  $\mu$ g/mL) e DMSO 1% com o objetivo de testar a atividade antimicrobiana. As placas foram colocadas em estufa por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  (Martins et al., 2012; Balouiri et al., 2016; Queiroga, 2015; Silva et al., 2017). Após a incubação, os diâmetros das zonas de inibição do crescimento (visível a olho nu) das leveduras foram observados e mensurados utilizando escala milimétrica com auxílio de uma régua (CLSI, 2003; Silva et al., 2017). Para o teste de poço-difusão em ágar foram considerados com atividade inibitória os halos com diâmetro  $\geq 6$  mm, onde qualquer crescimento perceptível dentro dos halos de inibição foi considerado como resistência do microrganismo ao extrato (CLSI, 2003; Bona et al., 2014).

#### **4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) na presença do extrato hidroalcoólico analisado frente às cepas de *Candida* spp.**

Os testes foram feitos segundo as recomendações do protocolo M27-A3 metodologia estabelecida pelo *Clinical e Laboratory Standarts Institute* - CLSI (2008) que determina a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição em caldo. Na primeira coluna de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 200  $\mu$ l do extrato hidroalcoólico de *P. niruri* preparado com meio de cultivo RPMI 1640 (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*, Sigma Aldrich, EUA), na concentração inicial de 64 mg/mL. E em todos os outros compartimentos da microplaca de 96 poços esterelizada foi distribuído 100  $\mu$ l do meio de cultivo RPMI e em seguida foi adicionado na segunda coluna da placa 100  $\mu$ l do extrato na concentração de 64 mg/mL juntamente com o 100  $\mu$ l do meio de cultura já

presente e feita a microdiluição seriada do EH-Pn até a concentração final de 0,031 mg/mL. Utilizou-se o DMSO 1% com objetivo de saber se o efeito antimicrobiano nas células de *Candida* spp. seria devido a sua presença. O antifúngico fluconazol também foi incluído, com concentração inicial de 64 µg/mL, seguindo o mesmo procedimento de microdiluição seriada, com objetivo de validação e controle da viabilidade das cepas e do ensaio, visto que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para estes microrganismos já é previamente conhecida conforme o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008; Barbosa, 2018). O inóculo de cada uma das 16 cepas foi ajustado em espectrofotômetro de 0,08 a 0,1 abs a 530 nm, equivalente a  $5,0 \times 10^6$  céls/mL, foram diluídas 1:10 em salina e 1:20 em RPMI, e 100 µl deste inóculo foi adicionado aos orifícios da placa, resultando em uma concentração final de  $2,5 \times 10^3$  céls/mL. Posteriormente, incubou-se a microplaca à 37 °C por 24 horas, em aerobiose, após esse período foram analisadas visualmente quanto à turbidez dos poços. A CIM foi considerada a mais baixa concentração do extrato hidroalcoólico de *P. niruri* capaz de inibir o crescimento visível da levedura (CLSI, 2008; Feiria, 2019). Para confirmação do resultado de CIM, foram adicionados 30 µl do corante Resazurina 0,01% (Alamar Blue®) nos poços da placa de microtitulação de 96 poços e novamente incubadas por 2 horas. Após o tempo de incubação os poços que continham leveduras viáveis mudaram a coloração de azul para cor rosa, por causa da atividade de redução da resazurina para resofurina que ocorre nas mitocôndrias, evidenciando a atividade metabólica desses microrganismos, enquanto que os poços que não continham leveduras viáveis continuavam apresentando a coloração azul, confirmando a morte do microrganismo (Moreira, 2013).

Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi feita uma análise quantitativa da viabilidade celular das leveduras. Anteriormente a coloração com a Resazurina, os compartimentos da microplaca do teste de CIM foram homogeneizados e coletou-se alíquotas de 5 µL de cada compartimento, transferindo-as para placa de SDA. As placas foram incubadas em estufa de aerobiose por 24 horas a 37°C, com propósito de analisar o crescimento dos microrganismos, considerando como CFM a menor concentração de extrato hidroalcoólico de *P. niruri* capaz de impedir o crescimento do subcultivo em meio sólido por leitura visual após o período de incubação (Gullo et al., 2012; Barbosa, 2018).

#### 4.6 Efeito do EH-Pn na adesão inicial de *Candida albicans* (ATCC MYA-2876)

A cepa *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foi escolhida para este e para os ensaios seguintes por ser uma das cepas de maior virulência. A adesão desta cepa em superfície sólida de poliestireno esterilizada na presença do EH-Pn foi analisada seguindo a metodologia descrita por Raut et al. (2013). *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foi inoculada em caldo YPD e incubada por 24 horas a 37 °C sob agitação a 30 rpm (Nova Instruments, Brasil). Após, o inóculo foi lavado 2x em solução PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline* - solução salina tamponada com fosfato) e ajustado utilizando a câmara de contagem aprimorada de *Neubauer* em  $1 \times 10^7$  cél/mL em meio de cultivo RPMI (Pierce et al., 2008) e adicionou-se 100 µL de *C. albicans* ajustada nos poços da microplaca, sucessivamente foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações do EH-Pn, sendo a concentração inicial de 32 mg/mL e final de 0,031 mg/mL, incubando-se a placa sob agitação a 100 rpm (Nova Instruments, Brasil) por 90 minutos à 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados cuidadosamente com 200 µL de solução PBS para remoção de células não aderidas. Em cada poço da microplaca foram adicionados 80 µL de XTT e a densidade da aderência das células metabolicamente viáveis foi quantificada utilizando o leitor de microplacas em 490 nm (Versa MAX, molecular Devices, EUA), e a redução de células aderidas foi calculada equiparando-se com o controle sem tratamento.

#### 4.7 Efeito do EH-Pn na formação de tubo germinativo de *C. albicans* (ATCC MYA-2876)

A formação de tubos germinativos foi testada para avaliar o efeito do EH-Pn na transição morfológica de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), onde a cepa de *C. albicans* foi padronizada em salina estéril em  $5 \times 10^7$  cél/mL e adicionada aos tubos com os tratamentos na proporção 1:2, utilizando os tratamentos de EH-Pn nas concentrações de 2,1, 0,5 e 0,25 mg/mL preparados com SFB (Soro Fetal Bovino - CultiLab) em tubos de ensaio e incubada em estufa de aerobiose à 37 °C. Posteriormente, 10 µL das amostras foram coletadas nos períodos de 0h, 2h, 4h e 6h de incubação e contadas em câmara de contagem aprimorada de *Neubauer*, onde os tubos germinativos foram analisados e definidos de acordo com a descrição de Hammer e Carson (2000). A cada período foram coletadas alíquotas de cada tratamento e foram preparadas lâminas de microscopia coradas com coloração de Gram para visualização dos tubos germinativos das leveduras, comprovação e

obtenção de imagens através de microscopia óptica trinocular (Nova 800T, Nova Instruments) com câmera de vídeo USB 5.1, full HD de 12 MP acoplada (Nova DCM 510, Nova Instruments).

#### **4.8 Efeito do extrato hidroalcoólico de *P. niruri* em biofilmes de *Candida albicans* ATCC MYA-2876**

Os ensaios de biofilme *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foram testadas com a presença do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* diluído em série, obtendo-se as concentrações, sendo a inicial de 64 mg/mL e final de 0,031 mg/mL e o DMSO 1% também foi analisado, afim de saber se sua presença causava algum tipo de alteração na formação de 2 horas ou 24 horas do biofilme.

##### **4.8.1 Padronização da suspensão celular**

A cepa *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foi incubada em caldo de cultivo YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) com agitação orbital (Nova Instruments, Brasil) à 30 rpm sob temperatura de 30 °C. Após a incubação foram transferidos 7 mL deste inóculo para um tubo de fundo cônico (tubo Falcon), onde foi centrifugado (Eppendorf, modelo: 5810R, United States) por 5 minutos a 3.000 rpm à 4 °C, o inóculo sedimentado foi lavado com a Solução PBS, repetido em duas vezes, para retirada do meio de cultivo. Subsequentemente a última lavagem e nova centrifugação o sobrenadante foi descartado, conservando o conteúdo sedimentado (*pellet*), que foi ressuspenso em 7 mL de meio de cultivo YNB (*Yeast Nitrogen Base*). Para o ajuste do inóculo preparou-se a diluição de 1:100 para observação em Câmara de contagem aprimorada de *Neubauer* através de microscopia óptica, utilizando o aumento de 400x, ajustando o inóculo na proporção de  $1 \times 10^6$  cél/mL (Pierce et al., 2008; Oliveira, 2018).

##### **4.8.2 Ensaio de viabilidade celular do biofilme de 2 horas de formação**

Após a padronização celular, inoculou-se 100 µL nos poços da microplaca estéril de fundo côncavo contendo 96 poços, esta placa foi incubada sob agitação a 75 rpm (Nova Instruments, Brasil) por 120 minutos à 37 °C. Após incubação, a placa foi lavada cuidadosamente com auxílio de pipeta duas vezes com solução PBS e foram adicionados 100 µl das concentrações do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* diluído em série, sendo a concentração inicial de 64 mg/mL a 0,031 mg/mL.

Incubou-se a microplaca com o EH-Pn e controles em estufa de aerobiose por 24h à 37°C (Silva et al., 2010).

#### **4.8.3 Ensaio de viabilidade celular do biofilme de 24 horas de formação**

Subsequentemente a padronização celular, 100 µL do inóculo foi adicionado nos poços da microplaca estéril de fundo côncavo de 96 poços, a qual foi incubada por 24 horas à 37 °C em estufa de aerobiose. A placa foi cuidadosamente lavada com solução PBS por duas vezes e adicionou-se 100 µl dos tratamentos na placa, e incubou-a novamente por 24h em estufa de aerobiose a 37°C.

#### **4.8.4 Análise do ensaio de biofilme**

Após o período da segunda incubação de ambos experimentos, as placas foram submetidas a duas lavagens cuidadosas com PBS 1%. Acrescentou-se em cada poço da placa 80 µL do corante metabólico XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) incubando-a novamente por 2 horas em estufa de aerobiose à 37°C protegida da luz. Posteriormente, a viabilidade celular do biofilme foi mensurada ( $A_{490nm}$ ) em Espectrofotômetro Leitor de Microplacas (Versa MAX, molecular Devices, EUA) (Pierce et al., 2008; Barbosa, 2018).

### **4.9 Análise da morfologia celular dos biofilmes de *C. albicans* ATCC MYA-2876 em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)**

Os biofilmes *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foram analisados com o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* diluído em série, incluiu-se nos testes em compartimentos separados os controles, do microrganismo somente com o meio de cultura e com a presença do DMSO 1%, afim de analisar alterações na formação de 2 horas ou 24 horas do biofilme, e também em um dos reservatórios da lâmina adicionou-se o RPMI, que foi mantido como controle de crescimento do biofilme. Utilizou-se a cepa de *C. albicans* na concentração de  $1 \times 10^6$  céls/mL em meio de cultura RPMI 1640, como previamente incluído no tópico 4.8.1.

#### **4.9.1 Ensaio da morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação**

A morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foi avaliada sobre o efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus*

*niruri* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A suspensão celular padronizada foi inoculada em lâminas de cultura (BD Falcon) e incubadas em agitador de microplacas a 75 rpm (Nova Instruments, Brasil) por 2 horas. Após a incubação, os reservatórios da lâmina foram cuidadosamente lavados com PBS, adicionando-se em cada compartimento as concentrações de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL do EH-Pn. Posteriormente, as amostras foram novamente incubadas por 24 horas em estufa de aerobiose à 37 °C.

#### **4.9.2 Ensaio da morfologia celular do biofilme de 24 horas de formação**

A cepa padronizada foi inoculada nos reservatórios das lâminas de cultura (BD Falcon) e incubadas em aerobiose à 37 °C por 24 horas. Os reservatórios foram lavados duas vezes com PBS, adicionando as concentrações de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL do EH-Pn. Incubou as lâminas novamente por 24 horas em estufa de aerobiose à 37°C por 24 horas.

#### **4.9.3 Fixação do ensaio de biofilme para MEV**

Ao término da incubação, procedeu-se a fixação do biofilme na lâmina, com intuito de paralisar o metabolismo e resguardar as estruturas do biofilme para análise. Assim, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o biofilme foi lavado por três vezes com PBS e banhado com glutaraldeído (2,5%) à 4 °C por 30 minutos para fixação, posteriormente as amostras foram lavadas com PBS e passaram pelo processo de desidratação em álcool com concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e 100% por 10 minutos cada concentração. As lâminas foram secas naturalmente e após completa secagem, as lâminas foram metalizadas com ouro e armazenadas ao abrigo da umidade, para posterior observação em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, JSM 5600LV, Japão) no modo de alto vácuo a 10kV e as imagens processadas (Barbosa, 2018; Oliveira, 2018) para observar o efeito e as modificações estruturais causadas pela presença do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*. As imagens de MEV foram obtidas com auxílio do técnico de laboratório Adriano Luis Martins, no Centro de Microscopia e Imagem (CMI), Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

#### **4.10 Efeito do EH-Pn sobre as células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A técnica para visualização de *C. albicans* ATCC MYA-2876 em Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada seguindo a metodologia de Spinola et al. (2019) com modificações e Feiria (2019), com o auxílio da técnica de laboratório de microscopia Flávia Sammartino Mariano Rodrigues. A cepa foi cultivada em placa de SDA e ajustada em meio de cultura RPMI 1640 na concentração  $1 \times 10^6$  cél/mL. As amostras foram tratadas com as concentrações de 0,25 mg/mL e 2 mg/mL do EH-Pn e incubadas em estufa de aerobiose por 24 horas à 37°C, posteriormente foram centrifugadas e o sedimento celular foi ressuspensão com o fixador de *Karnovsky* e deixado agir por 48h. Após a fixação, as amostras foram lavadas com NaCl 0,9% e centrifugadas para remoção do fixador. As amostras foram tratadas com 1% de tetróxido de ósmio por 4 horas, e lavadas com solução Sorensen por 5 minutos em três lavagens consecutivas e desidratadas com concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% de acetona por 5 minutos cada concentração e infiltradas gradativamente em concentrações crescentes de 25%, 50%, 70% e 100% de resina Dr. Spurr por 5 minutos cada concentração, procedendo-se a secagem e a polimerização em estufa (Fanem) à 60-70 °C. As amostras de resina com os *pellets* foram cortadas com 50-70 nm de espessura com lâmina de diamante (Diatome, Suíça) utilizando ultra-micrótomo (EM UC6; Leica Microsystems, Viena, Áustria). As amostras cortadas foram coletadas e revestida por grades de cobre (EMS, EUA) contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As grades com as amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM 1400, JEOL, Akishima, Tóquio, Japão), sobre tensão de aceleração de 80 kV, e as imagens foram obtidas pelo sistema de câmera digital (Gatan, Pleasanton, CA, EUA) no Centro de Microscopia e Imagem (CMI), Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

#### **4.11 Citotoxicidade *in vitro* do EH-Pn em linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada (*HaCaT*)**

Foi utilizada a linhagem *HaCaT* (*Ha* = adulto humano, *Ca* = cálcio, *T* = temperatura) que é uma linhagem celular de queratinócitos normais da pele humana adulta espontaneamente imortalizada, não transformada (Rekus, 2000). As células *HaCaT* mantidas em ultrafreezer -80 °C foram reativadas em garrafas para cultivo celular (Gibco) com meio de cultura RPMI completo suplementado com

antimicrobianos (penicilina e estreptomicina, Sigma Aldrich, EUA), aminoácidos não essenciais (Gibco), estabilizante para meio de cultura 2-β-mercaptoetanol e 10% de SFB (Cultilab). As células foram incubadas em estufa de cultivo celular (Thermo Forma - Eletron Corporation) com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C. As células foram supervisionadas e cultivadas até 80% de confluência da monocamada celular, sendo adicionado tripsina 0,25% à garrafa por 10 minutos, com a finalidade de desprender as células das garrafas de cultivo celular. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 3.500 rpm, a tripsina foi removida e as células ressuspensas com RPMI completo. As células de *HaCaT* foram ajustadas à 5 x 10<sup>4</sup> cél/mL e 100 µL dessa suspensão celular foram semeadas em cada compartimento da microplaca para cultura de células (Kasvi) e incubadas em estufa de cultura celular (Thermo Forma - Eletron Corporation) à 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas (Oliveira, 2018; Busato, 2019).

O EH-Pn foi diluído em série com RPMI suplementado em compartimentos separados, ambos iniciados pela concentração de 64 mg/mL e finalizados com a concentração de 0,031 mg/mL. Posteriormente a incubação, o sobrenadante foi retirado da placa com as células de *HaCaT*, acrescentando nos poços 100 µL das concentrações diluídas dos tratamentos. Incubou-se a placa tratada por 24 horas à 37° C em estufa de cultura celular (Thermo Forma - Eletron Corporation) e após a incubação, cada compartimento da microplaca foi aspirado cuidadosamente e preenchido com 100 µL de solução MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) (5 mg/mL, Sigma). Em seguida a placa foi novamente incubada por 4 horas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) depois da incubação, a solução foi cuidadosamente aspirada e acrescentada aos compartimentos 100 µL de DMSO 1%, sendo os resultados mensurados em leitor de microplacas (432nm) (Versa MAX, molecular Devices, EUA) (Monks et al., 1991; Van de Loosdrecht et al., 1994). A toxicidade foi expressa como porcentagem, onde a concentração média de absorbância representa o percentual de viabilidade celular das concentrações testadas em relação ao controle de células sem tratamento (Monks et al., 1991; Van de Loosdrecht et al., 1994; Oliveira, 2018).

#### **4.12 Análise *in vivo* da toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* em larvas de *Galleria mellonella*.**

O ensaio *in vivo* de toxicidade foi realizado com larvas de *Galleria mellonella* (R.J. Mous Livebait, The Netherlands), criadas em estufa incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio), as larvas foram doadas pelo departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica (FOP/UNICAMP).

Foram selecionadas as larvas com peso entre 0,2-0,3g, sem nenhuma anomalia ou melanização. As larvas foram colocadas em placas de Petri em grupos (n=10), identificadas conforme a concentração do EH-Pn diluídos em PBS nas concentrações 0,12, 0,5, 4, 16 e 64 mg/mL, testando-se também o DMSO 1% e mantendo-se um grupo sem tratamento. As pró-patas das larvas foram desinfetadas com álcool 70% e 10 µL da concentração do EH-Pn foram injetados na hemocele da última pró-pata esquerda utilizando seringa hipodérmica de 1 mL (BD Ultrafine) em cada grupo, incubando-as em estufa de aerobiose à 37°C. O índice de sobrevivência foi mensurado pelo monitoramento das larvas durante 96 horas, através de inspeção visual, considerando o aspecto, coloração e inspeção após estímulo (toque dorsal com pinça) considerando a movimentação das larvas de *G. mellonella* (Scorzoni et al., 2013; Megaw et al., 2015; Silva, 2017; Oliveira, 2018).

#### **4.13 Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram feitos em três ensaios independentes, e os resultados expressos como a média dos valores obtidos e  $\pm$  desvio-padrão (exceto nos ensaios de poço-difusão e no ensaio de determinação CIM e CFM, onde os resultados são expressos através da moda dos valores). Usou-se a análise de variância (ANOVA: um critério) e aplicou-se o teste de *Tukey*, sendo considerados como resultados significantes os valores de  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Rendimento do Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*

Para o cálculo do rendimento do extrato (Re), utilizou-se o material liofilizado pesado, equivalente a 61,98 g, sendo o peso total da massa seca do EH-Pn (Pext) e o peso de 300 g da rasura de *P. niruri* (Pfolhas). O rendimento total do extrato foi obtido pela fórmula utilizada por Rodrigues et al. (2011), onde:

$$\text{Re} = (\text{Pext} / \text{Pfolhas}) \times 100$$

$$\text{Re} = (61,98 / 300) \times 100$$

$$\text{Re} = 20,66$$

O cálculo do rendimento total mostra que o rendimento total do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* foi de 20,66%.

### 5.2 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EMS)

A qualificação e quantificação dos compostos presentes no EH-Pn foi obtida por cromatografia gasosa (CG-EMS) pelo software MSD ChemStation (G1701DA, D.02.00.275, Agilent Technologies). Nesta análise foi observada a composição do extrato hidroalcoólico de *P. niruri*, identificando a presença dos componentes: Éster etílico do ácido hexadecanóico (18,23%), Fitol (10,22%), Éster etílico do ácido linoleico (6,27%), Éster etílico do ácido linolênico (23,38%), Éster etílico do ácido octadecanóico (3,03%), Dihidrocrisina (4,30%), Alfa-tocoferol (M = 430) (6,42%), Estigmasterol (M = 412) (7,41%), Beta-Sitosterol (M=414) (16,90%) que foram identificados por massa e tempo de retenção com similaridade acima de 90% pelo programa (Anexo 2 – Cromatograma).

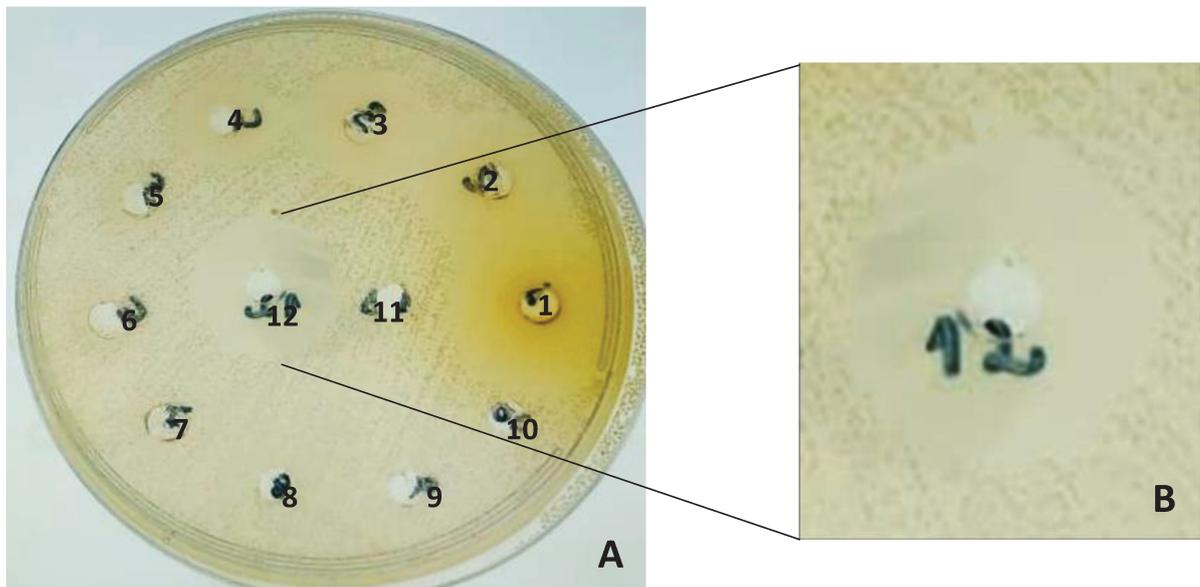
### 5.3 Avaliação antifúngica do EH-Pn em cepas de *Candida* spp. através da técnica de difusão em ágar

A ação antifúngica do EH-Pn através da técnica de difusão em ágar por poço-difusão demonstrou que o extrato possui atividade antifúngica de nenhuma cepa até 16 mg/mL, indicados pela ausência de crescimento microbiano, denominados halos de inibição, o qual indica a sensibilidade do microrganismo a este tratamento, sendo que a ausência dos halos de inibição demonstra a tolerância do microrganismo

(Figura 2). Para este ensaio se considera como atividade inibitória a presença de halos de inibição com diâmetro  $\geq 6$  mm.

A concentração de 64 mg/mL do extrato de *P. niruri* demonstrou a formação de halos de inibição em todas as cepas de *Candida* spp., apresentando sensibilidade das espécies ao EH-Pn (Figura 5). Na concentração de 8 mg/mL os halos estão presentes em 81% das cepas, sendo que as espécies *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 5207) e *C. tropicalis* (ATCC 40281) apresentaram tolerância ao EH-Pn em diluições a partir desta concentração. Com a concentração de 4 mg/mL foram inibidas 50% das cepas e com a concentração de 1 mg/mL do EH-Pn somente as cepas de *C. dubliniensis* (ATCC MYA-646) e *C. krusei* (ATCC 749) que demonstraram sensibilidade ao tratamento. Não houve a presença de zonas de inibição nas concentrações abaixo de 0,5 mg/mL para todas as cepas testadas.

Figura 5 - Zonas de inibição em placa de SDA contendo diferentes concentrações do EH-Pn contra *Candida* spp.



Fonte: o autor (2020). Imagem A: Refere-se a placa de SDA inoculada com cepa de *Candida* spp. na presença diferentes concentrações do EH-Pn (1 ao 9), sendo: 1 = 64 mg/mL, 2 = 32 mg/mL; 3 = 16 mg/mL; 4 = 8 mg/mL; 5 = 4 mg/mL; 6 = 2 mg/mL; 7 = 1 mg/mL; 8 = 0,5 mg/mL; 9 = 0,25 mg/mL; 10 = DMSO 1%; 11 = PBS; 12 = Fluconazol (64  $\mu$ g/mL). Imagem B: aproximação da imagem para visualização do halo de inibição.

A tabela 1 expressa as dimensões dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento fúngico (mm) obtidos pela metodologia de poço-difusão em ágar, utilizando diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* frente a cepas padrão de *Candida* spp.

Tabela 1 - Formação de halos de inibição (mm) exibidos pelas cepas de *Candida* spp. na presença do EH-Pn.

Cepas	Concentração do extrato hidroalcoólico de <i>Phyllanthus niruri</i>								Controles	
	64 mg/mL	32 mg/mL	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	DMSO 1%	Fluconazol 64 µg/mL
<i>C. albicans</i> (ATCC MYA-2876)	28 mm	26 mm	16 mm	10 mm	-	-	-	-	-	32 mm
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	28 mm	28 mm	20 mm	14 mm	8 mm	-	-	-	-	28 mm
<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	14 mm	14 mm	8 mm	-	-	-	-	-	-	22 mm
<i>C. dubliniensis</i> (ATCC MYA-646)	24 mm	24 mm	22 mm	20 mm	16 mm	14 mm	8 mm	-	-	20 mm
<i>C. glabrata</i> (ATCC 5207)	10 mm	10 mm	8 mm	-	-	-	-	-	-	22 mm
<i>C. guilliermondii</i> (ATCC 6260)	18 mm	18 mm	10 mm	8 mm	-	-	-	-	-	24 mm
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	22 mm	22 mm	19 mm	18 mm	14 mm	12 mm	-	-	-	28 mm
<i>C. krusei</i> (ATCC 749)	26 mm	26 mm	25 mm	22 mm	16 mm	14 mm	8 mm	-	-	30 mm
<i>C. lusitanae</i> (ATCC 4031)	18 mm	14 mm	12 mm	10 mm	-	-	-	-	-	26 mm
<i>C. lusitanae</i> (ATCC 42720)	14 mm	14 mm	10 mm	8 mm	-	-	-	-	-	20 mm
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	28 mm	28 mm	24 mm	18 mm	14 mm	12 mm	-	-	-	22 mm
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 10232)	10 mm	10 mm	9 mm	8 mm	-	-	-	-	-	22 mm
<i>C. rugosa</i> (ATCC 10571)	28 mm	28 mm	24 mm	18 mm	14 mm	12 mm	-	-	-	30 mm
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 40281)	14 mm	14 mm	10 mm	-	-	-	-	-	-	20 mm
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	12 mm	12 mm	10 mm	10 mm	8 mm	-	-	-	-	20 mm
<i>C. utilis</i> (ATCC 9950)	18 mm	18 mm	14 mm	12 mm	10 mm	-	-	-	-	18 mm

mm: milímetros; -: sem halo de inibição.

#### 5.4 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico contra cepas de *Candida* spp.

A técnica de microdiluição em caldo para encontrar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada com a finalidade de determinar e validar a concentração de EH-Pn que é capaz de inibir as cepas de *Candida* spp., segundo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Para a classificação da atividade fungistática ou fungicida do extrato hidroalcoólico de *P. niruri* foram utilizados os seguintes critérios: foram consideradas fungistáticas as concentrações que após a inibição de crescimento no ensaio de CIM, quando em meio sólido na ausência do extrato apresentaram crescimento fúngico; e fungicidas as concentrações que após inibição de crescimento fúngico no ensaio de CIM, inibiram o crescimento fúngico em meio sólido na ausência do EH-Pn. O extrato hidroalcoólico de *P. niruri* apresentou os valores de CIM inferiores ou igual a 1 mg/mL, nas cepas testadas, exceto na *Candida glabrata* (ATCC 5207) que teve seu crescimento inibido com a concentração de 8 mg/mL. O extrato hidroalcoólico de *P. niruri* demonstrou valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 64 mg/mL do EH-Pn apenas para a cepa de *Candida albicans* (ATCC MYA-2876), e a mais baixa concentração fungicida foi de 0,5 mg/mL

observada na cepa de *Candida tropicalis* (ATCC 750), para as outras cepas, os valores de CFM foram entre 2 mg/mL a 32 mg/mL (Tabela 2). O EH-Pn demonstrou atividade fungistática para todas as cepas testadas em suas respectivas concentrações inibitória mínima, apresentou atividade fungicida apenas em concentrações bem superior ao CIM, entre 0,5 mg/mL a 64 mg/mL.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do EH-Pn contra diferentes cepas de *Candida* spp.

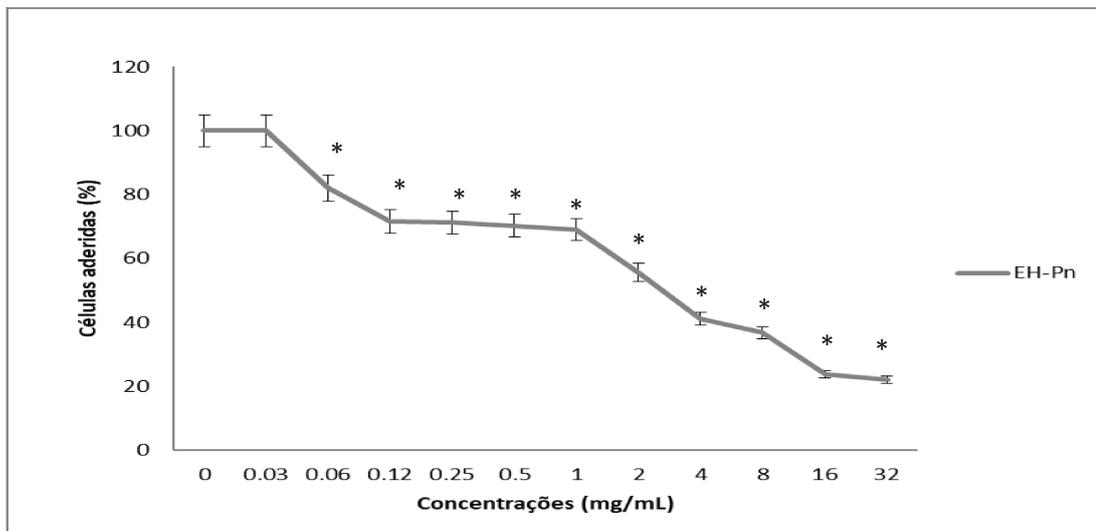
Cepas	EH-Pn (mg/mL)		Fluconazol* (µg/mL)
	CIM	CFM	CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC MYA 2876)	0.5	64	0.12
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	0.25	32	1
<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	0.25	32	1
<i>C. dubliniensis</i> (ATCC MYA 646)	1	32	0.25
<i>C. glabrata</i> (ATCC 5207)	8	16	8
<i>C. guilliermondii</i> (ATCC 6260)	0.12	32	0.12
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	0.06	8	32
<i>C. krusei</i> (ATCC 749)	0.03	16	8
<i>C. lusitaniae</i> (ATCC 4031)	0.12	2	1
<i>C. lusitaniae</i> (ATCC 42720)	0.12	8	1
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	0.12	32	2
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 10264)	0.12	32	2
<i>C. rugosa</i> (ATCC 10571)	0.12	16	1
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 40281)	0.25	0.5	0.5
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	1	16	2
<i>C. utilis</i> (ATCC 9950)	0.25	32	4

EH-Pn= Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CFM = Concentração Fungicida Mínima; \* = Validação dos microrganismos conforme o protocolo M27-A3 do CLSI (2008).

### 5.5 Análise do efeito do EH-Pn na adesão inicial de *Candida albicans* (ATCC MYA-2876)

De acordo com os resultados obtidos no teste de adesão inicial das células de *C. albicans* ATCC MYA-2876 o tratamento o EH-Pn foi capaz de reduzir em 41% a adesão da cepa na concentração de 2 mg/mL, já a concentração de 32 mg/mL foi capaz de inibir 78% da adesão deste microrganismo (Figura 6).

Figura 6 - Porcentagem de células aderidas de *C. albicans* ATCC MYA 2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.



EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*; \* = diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,01$ ). Análise de variância (ANOVA: um critério) seguida de teste Tukey.

### 5.6 Análise do efeito do EH-Pn na formação de tubo germinativo de *C. albicans* (ATCC MYA-2876)

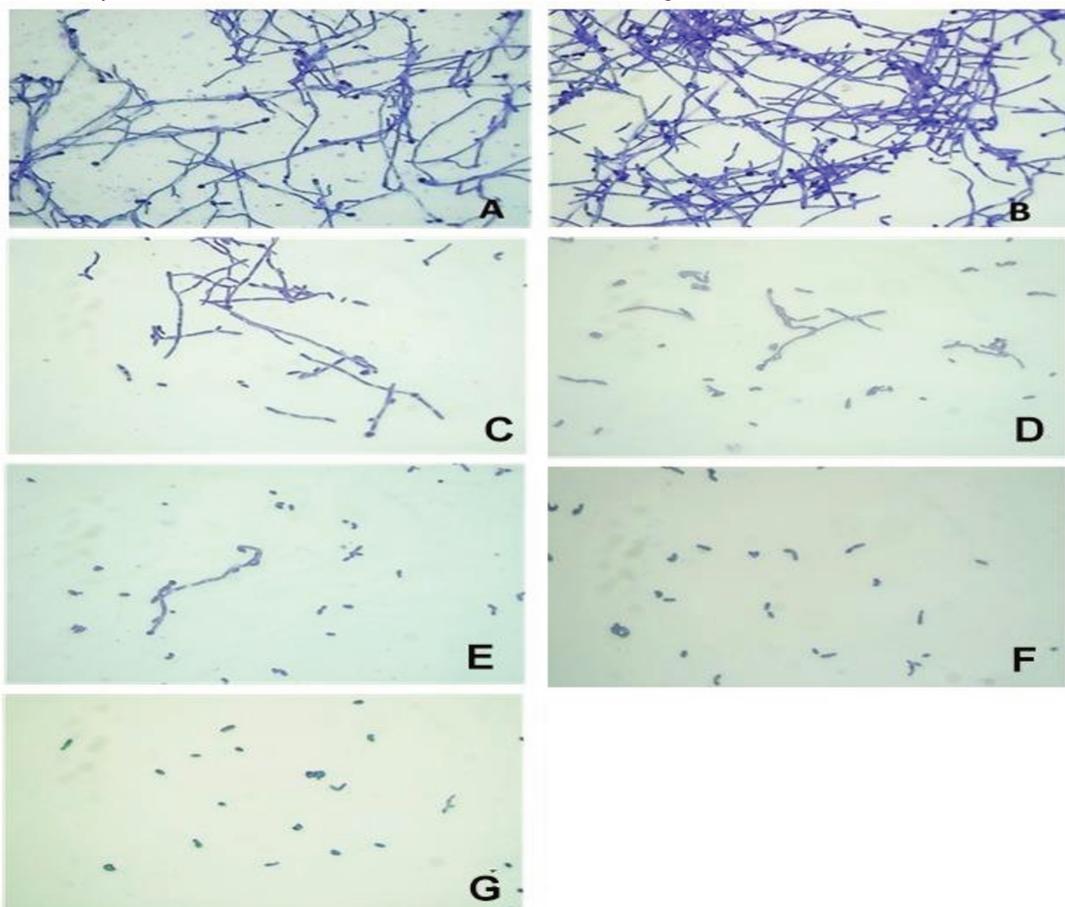
A cepa *C. albicans* ATCC MYA-2876 somente com meio de cultura teve um bom crescimento (Figura 7-A). Quando exposta ao SFB apresentou um desenvolvimento muito melhor, com presença de tubos germinativos e hifas em alta quantidade (Figura 7-B), sendo que a partir de 4h de ensaio esta cepa teve 100% de formação de tubo germinativo. A mesma cepa na presença da concentração de 0,25 mg/mL do EH-Pn (Figura 7-C) apresentou diminuição da formação de tubos germinativos, e ao submetê-la na concentração de 0,5 mg/mL do EH-Pn (Figura 7-D) a redução dos tubos se torna ainda mais evidente. Com 1 mg/mL do EH-Pn (Figura 7-E) percebe-se uma grande redução da formação de tubos germinativos, sendo que nesta concentração, na última análise de tempo (6h), o EH-Pn foi capaz de inibir 95% da formação do tubo germinativo da cepa de *C. albicans* ATCC MYA-2876. *C. albicans* submetida a 2 mg/mL do EH-Pn apresentou uma grande redução, onde os tubos germinativos reduziram em 67% na primeira amostragem (0h), após 2h pode-se notar a redução de 91% dos tubos germinativos da amostra, sendo que ao observá-la 4h após a administração do EH-Pn nenhum tubo germinativo foi visualizado (Figura 7-F), permanecendo sem nenhum tubo germinativo até a conclusão do ensaio (6h) (Figura 7-G), sendo que na última amostragem o EH-Pn demonstrou inibição total (100%) da formação dos tubos germinativos da cepa de *C. albicans* ATCC MYA-2876 (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de células com tubos germinativos após o tratamento com EH-Pn contra *C. albicans* (ATCC MYA-2876).

Tratamento/ Tempo	0h	2h	4h	6h
Ca	2%	8%	56%	58%
Ca + SFB	15%	79%	100%	100%
Ca + SFB + EH-Pn (0.25 mg/mL)	63%	40%	26%	22%
Ca + SFB + EH-Pn (0.5 mg/mL)	57%	27%	18%	11%
Ca + SFB + EH-Pn (1 mg/mL)	50%	29%	13%	5%
Ca + SFB + EH-Pn (2 mg/mL)	33%	9%	0%	0%

Ca: *Candida albicans* (ATCC MYA-2876); SFB: Soro Fetal Bovino; EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *P. niruri*.

Figura 7 - Imagens de células com tubos germinativos da cepa *C. albicans* ATCC MYA-2876 após o tratamento com diferentes concentrações do EH-Pn.



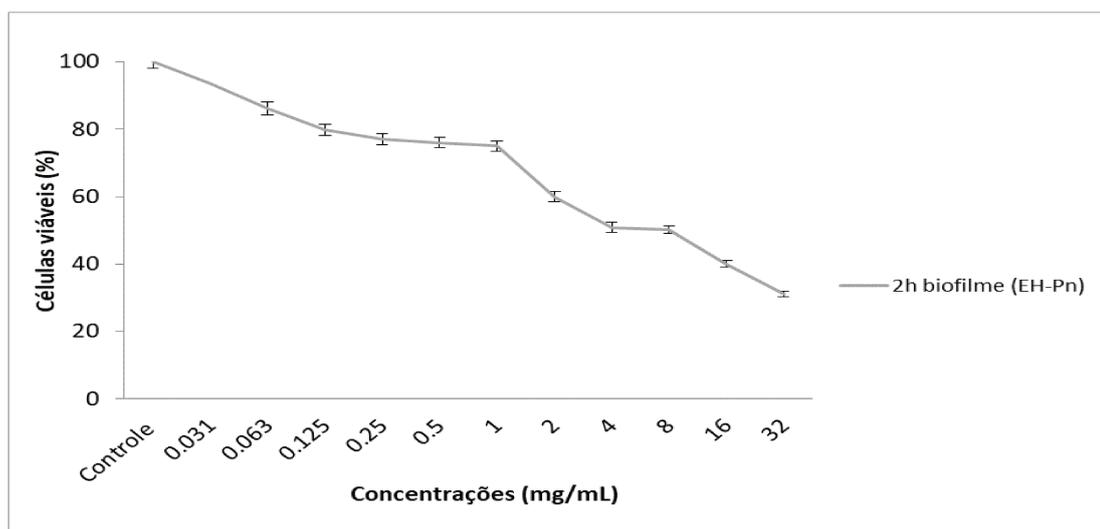
Fonte: o autor (2020). Imagens obtidas através de microscopia óptica (40x) das amostras de *C. albicans* coradas em diferentes concentrações do EH-Pn na última amostragem (6h). Imagem A: Ca (controle); B: Ca + SFB (controle); C: Ca + SFB + EH-Pn (0,25 mg/mL); D: Ca + SFB + EH-Pn (0,5 mg/mL); E: Ca + SFB + EH-Pn (1 mg/mL); F: Ca + SFB + EH-Pn (2 mg/mL) (4h); G: Ca + SFB + EH-Pn (2 mg/mL) (6h); Ca: *Candida albicans* (ATCC MYA-2876); SFB: Soro Fetal Bovino; EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*.

## 5.7 Análise do efeito do extrato hidroalcoólico de *P. niruri* em biofilmes de *Candida albicans* ATCC MYA-2876

### 5.7.1 Análise do ensaio de viabilidade celular do biofilme de 2 horas de formação

A viabilidade celular da cepa de *Candida albicans* (ATCC MYA-2876) em biofilme com 2 horas de formação com a presença do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* demonstrou redução da atividade metabólica do biofilme cepa *Candida albicans* (ATCC MYA-2876) em 50% na presença da concentração de 4 mg/mL, e ao expor a cepa em uma maior concentração (32 mg/mL) do EH-Pn houve redução de 69% da viabilidade celular (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem da viabilidade celular do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.

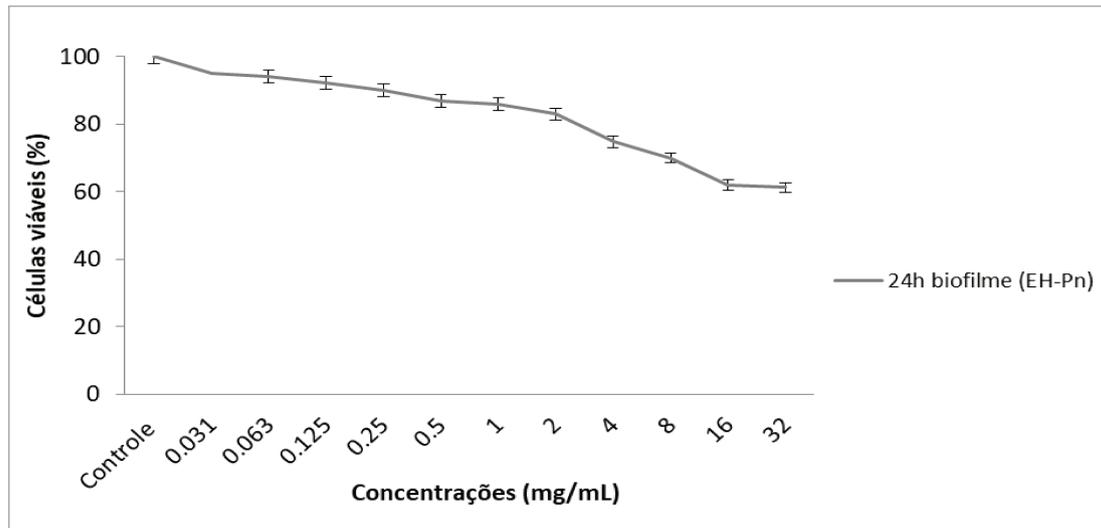


EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*. \* = diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,01$ ). Análise de variância (ANOVA: um critério) seguida de teste Tukey.

### 5.7.2 Análise do ensaio de viabilidade celular do biofilme de 24 horas de formação

O biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) exposto ao tratamento com o EH-Pn foi capaz de reduzir em 39% a viabilidade celular do biofilme de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) quando exposto à concentração de 32 mg/mL (Figura 9).

Figura 9 - Porcentagem da viabilidade celular do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA 2876 na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.



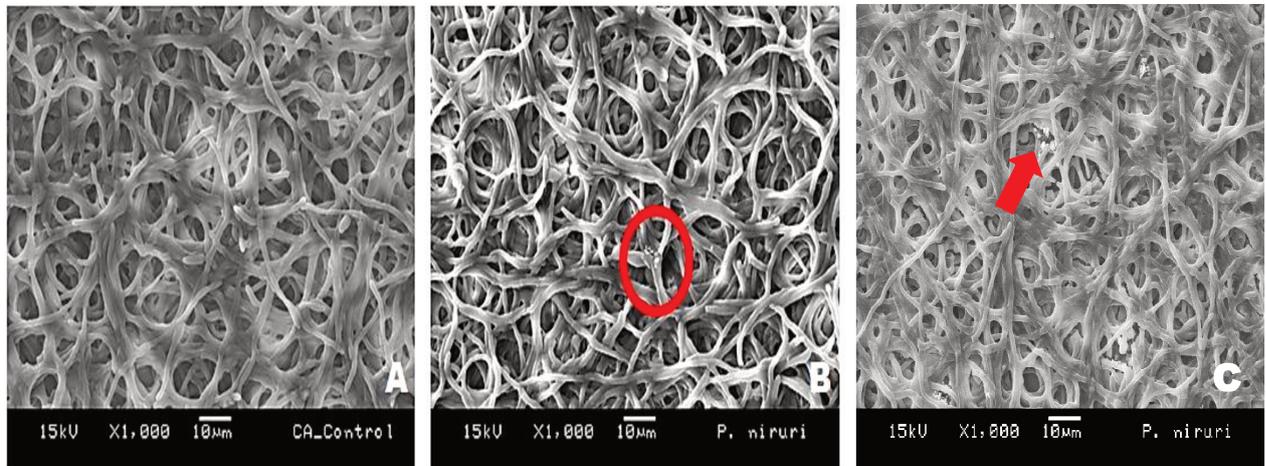
EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*. \*\* = diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); \* = diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,01$ ). Análise de variância (ANOVA: um critério) seguida de teste Tukey.

## 5.8 Análise da morfologia celular dos biofilmes de *C. albicans* ATCC MYA-2876 em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

### 5.8.1 Análise do ensaio da morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação

A morfologia celular do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 foi avaliada inicialmente sem nenhum tratamento, tendo como base a morfologia celular do biofilme sem alterações (controle), sem tratamento. Este controle de crescimento do biofilme de *C. albicans* demonstrou muitas camadas de hifas, não sendo visualizada presença de células leveduriformes, toda estrutura do biofilme se encontrava intacta, com superfície lisa e espessura regular (Figura 10-A). Com o tratamento de 0,25 mg/mL (Figura 10-B) e 0,5 mg/mL (Figura 10-C) do EH-Pn foi possível observar que houve pouca diminuição na proporção de hifas, apesar de ainda se apresentarem em quantidade elevada, há a presença de algumas células leveduriformes, porém algumas apresentam rugosidade e alguns focos de estresse.

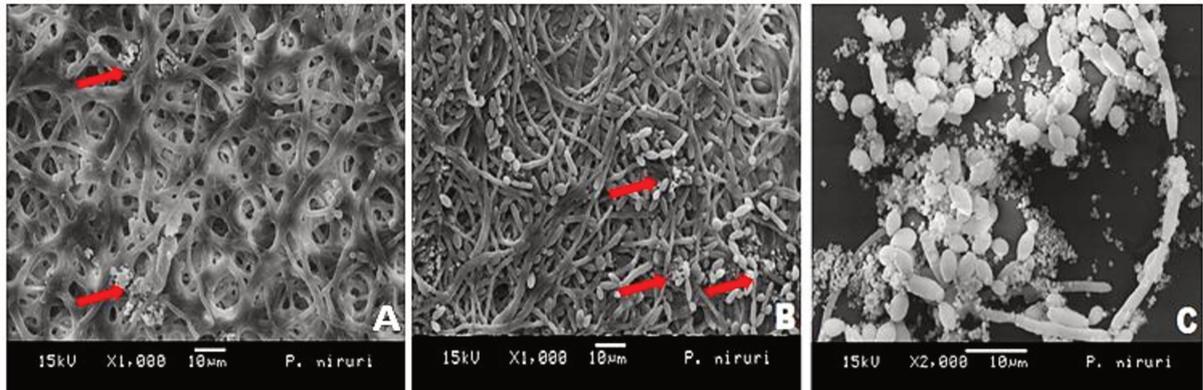
Figura 10 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.



Fotografia de MEV: Imagem A: Controle *C. albicans*; B: *C. albicans* + EH-Pn (0,25 mg/mL); C: *C. albicans* + EH-Pn (0,5 mg/mL); círculo vermelho: extravasamento intracelular; seta vermelha: presença de células leveduriformes e extravasamento intracelular.

O biofilme de *C. albicans* ATCC MYA-2876 com a presença de 1 mg/mL não apresentou redução de hifas, mas foram observados focos de rompimento de parede celular e extravasamento do conteúdo intracelular, semelhantes ao observado nas imagens da concentração de 0,5 mg/mL; com 2 mg/mL (Figura 11-A) houve uma leve diminuição na proporção de hifas, também foi possível observar a presença de algumas células leveduriformes e focos de conteúdo intracelular por toda lâmina. Na concentração de 4mg/mL do EH-Pn (Figura 11-B), a amostra apresentou diminuição significativa na quantidade de hifas e presença elevada de leveduras, diversas destas apresentando alterações morfológicas, como rompimentos de parede celular e extravasamentos presentes na maioria das células. Notou-se que com 8 mg/mL do tratamento com EH-Pn (Figura 11-C), o biofilme teve dificuldade de desenvolvimento e formação de hifas, nesta amostra as mesmas são escassas, também apresentam leveduras de *C. albicans* bastante danificadas, com ruptura e grande quantidade de extravasamento celular.

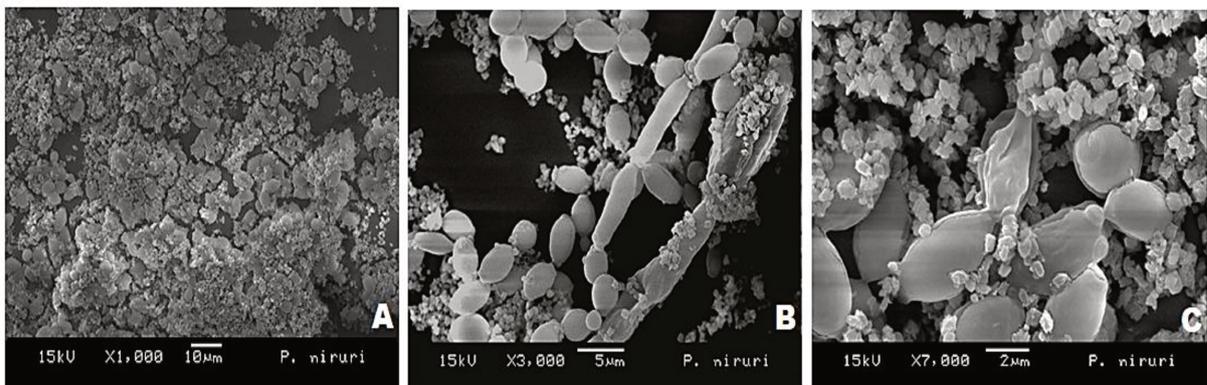
Figura 11 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.



Fotografias de MEV: Imagem A: *C. albicans* + EH-Pn (2 mg/mL); B: *C. albicans* + EH-Pn (4 mg/mL); C: *C. albicans* + EH-Pn (8 mg/mL) evidenciando a elevada quantidade de extravasamento celular no aumento de 2000x; seta vermelha: extravasamento intracelular.

O biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* submetido ao extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* na concentração de 16 mg/mL, apresenta poucas hifas, quase que inexistentes, nota-se que as células leveduriformes estão em baixa quantidade, demonstrando alterações morfológicas bem visíveis, com o aspecto rugoso, fissuras e murchamento. Próximo as leveduras foi possível visualizar, em abundância, o conteúdo intracelular ao redor das células e também saindo do seu interior (Figura 12) demonstrando que o tratamento com 16 mg/mL de EH-Pn causou diminuição significativa na formação de hifas deste microrganismo e danos na estrutura morfológica das leveduras, ocasionando a morte celular.

Figura 12 - Morfologia do biofilme de 2 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 tratado com 16 mg/mL de EH-Pn.

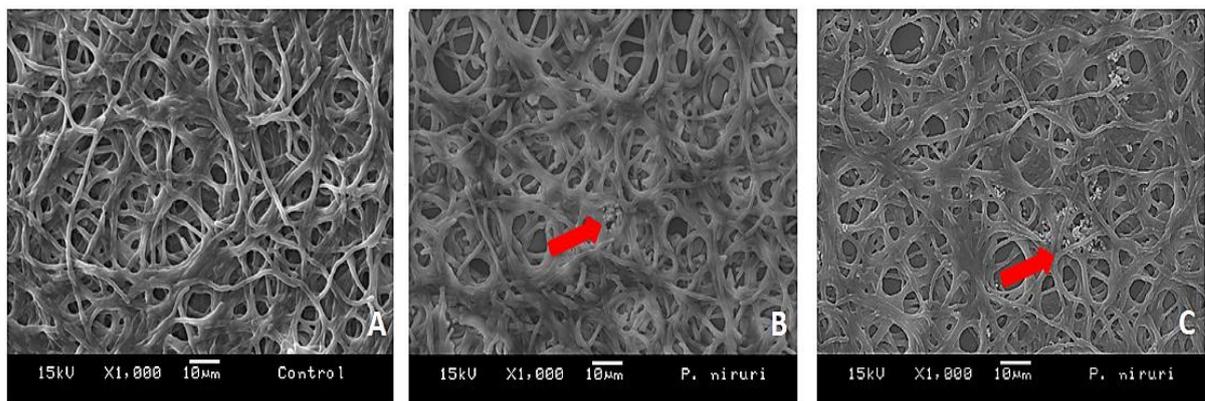


Fotografia de MEV: Imagens de *C. albicans* + EH-Pn (16 mg/mL). Imagem A: Cepa exposta ao tratamento no aumento de 1000x. Imagem B e C evidenciam a ruptura, murchamento e o extravasamento celular nos aumentos de 3000x e 7000x, respectivamente.

### 5.8.2 Análise do ensaio da morfologia celular do biofilme de 24 horas de formação

O biofilme de 24 horas de formação da *C. albicans* ATCC MYA-2876 sem qualquer tratamento foi testado para obter imagens controle, com o biofilme sem alterações morfológicas. O controle analisado apresentou crescimento intenso, formado por extensas camadas de hifas e ausência total de células leveduriformes, toda estrutura se mostrou íntegra, com espessura e superfície normais, sem qualquer anomalia (Figura 13-A). O tratamento com 0,25 mg/mL (Figura 13-B) e 0,5 mg/mL (Figura 13-C) de EH-Pn não apresentou diferença na quantidade de hifas, porém notou-se a presença de algumas hifas com alterações morfológicas, como leve murchamento, algumas fissuras e focos de extravasamento intracelular.

Figura 13 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.

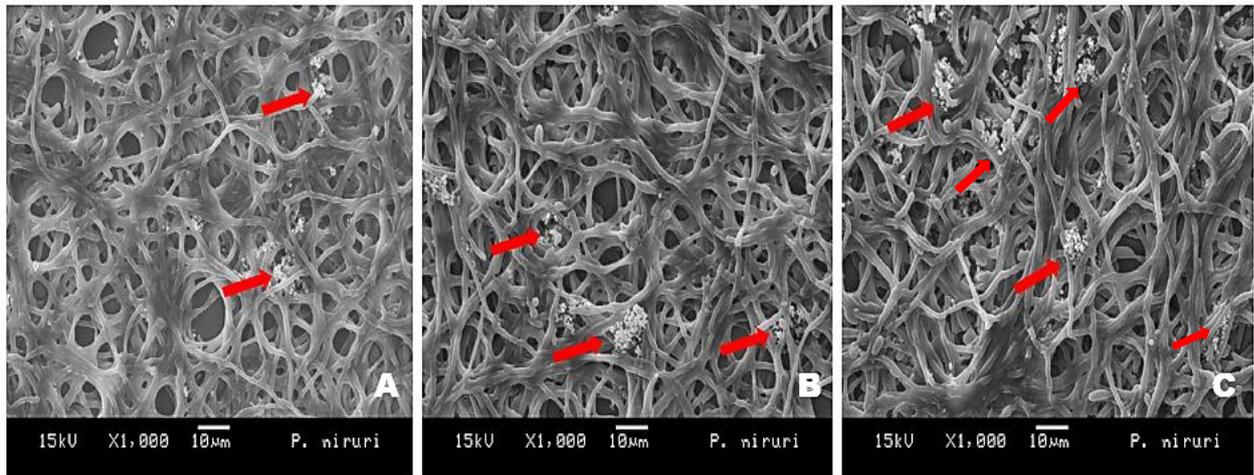


Fotografia de MEV: Imagem A: Controle *C. albicans*; B: *Candida albicans* + EH-Pn (0,25 mg/mL); C: *Candida albicans* + EH-Pn (0,5 mg/mL); seta vermelha: extravasamento intracelular.

Com a presença da concentração de 1 mg/mL do EH-Pn foi possível observar elevada quantidade de hifas e raros focos de alteração celular, semelhantes ao tratamento com 0,5 mg/mL do EH-Pn. Com o tratamento de 2 mg/mL do EH-Pn (Figura 14-A) foi observada a modificação na morfologia das hifas, que se apresentavam levemente murchas com diversas rachaduras, algumas com focos de rompimento e extravasamento extracelular. Observou-se que na concentração de 4 mg/mL do EH-Pn (Figura 14-B) a amostra demonstra abundância de hifas, porém as alterações morfológicas foram mais frequentes quando comparado com as demais concentrações, as hifas apresentaram-se rugosas, com rupturas e extravasamento do conteúdo intracelular. Foi observado que com o tratamento na concentração de 8

mg/mL do EH-Pn (Figura 14-C) o biofilme de *C. albicans* ainda apresentou elevada quantidade de hifas, porém os danos celulares eram bem visíveis, como hifas mais finas, rachaduras e murchamento das hifas, apresentando maior quantidade de focos de extravasamento de componentes intracelulares.

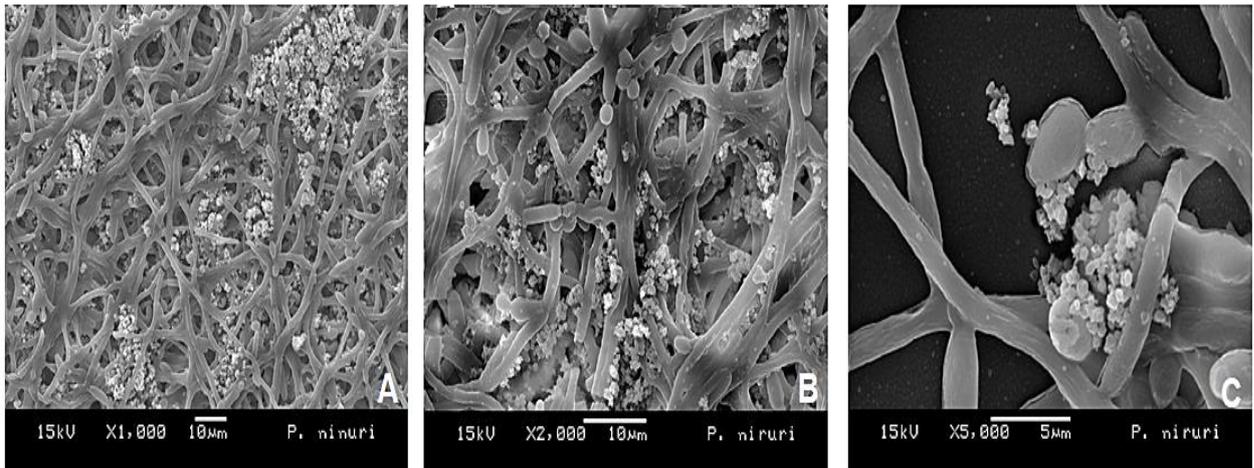
Figura 14 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com EH-Pn.



Fotografia de MEV: Imagem A: *Candida albicans* + EH-Pn (2 mg/mL); B: *Candida albicans* + EH-Pn (4 mg/mL); C: *Candida albicans* + EH-Pn (8mg/mL); seta vermelha: extravasamento intracelular.

Ao ser tratado com o extrato hidroalcoólico de *P. niruri* na concentração de 16 mg/mL, o biofilme apresentou diferença na camada das hifas, apesar de demonstrar uma alta quantidade de hifas; seguida da presença de várias células leveduriformes, ambas estruturas apresentaram-se diferentes de sua morfologia original, revelando alterações morfológicas, como rugosidade e abaulamentos, murchamento, afinamento das hifas, rompimentos de parede celular e abundância de grânulos do conteúdo intracelular extravasado (Figura 15).

Figura 15 - Morfologia do biofilme de 24 horas de formação de *C. albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com 16 mg/mL de EH-Pn.

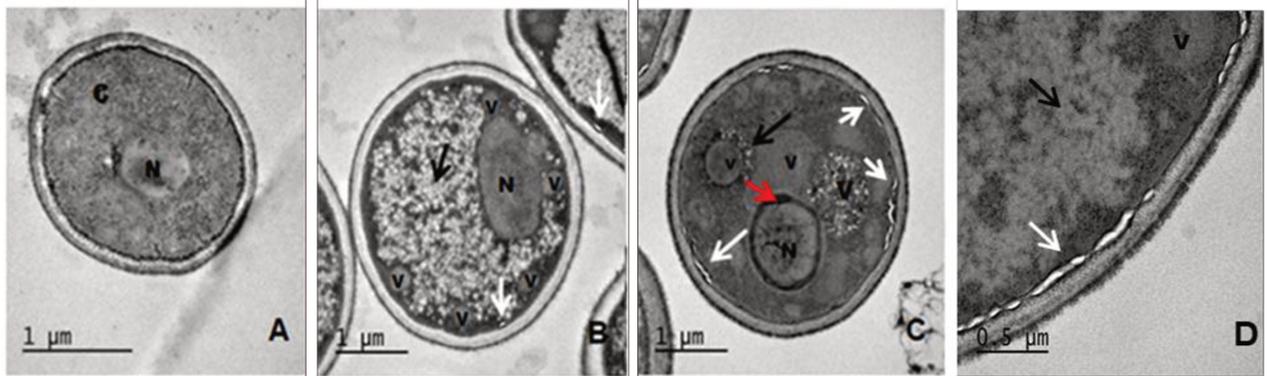


Fotografia de MEV: Imagem A e B: Ca + EH-Pn (16 mg/mL) visualizado no aumento de 1000x e 2000x, respectivamente; Imagem C: evidencia a ruptura e extravasamento do conteúdo intracelular no aumento de 5000x.

### 5.9 Avaliação do efeito do EH-Pn sobre as células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células planctônicas de *C. albicans* (ATCC MYA-2874) não tratadas com EH-Pn se encontraram preservadas, com parede celular e membrana plasmática íntegra e citoplasma homogêneo, como pode ser observado na Figura 16-A. As cepas pós-exposição a 0,25 mg/mL do EH-Pn revelaram alterações importantes no citoplasma, podendo ser observado a presença de grânulos e acúmulo de diversos vacúolos, além de pequenos descolamentos da membrana plasmática, características indicativas de estresse celular (Figura 16-B). Na presença de 2 mg/mL do extrato as células de *C. albicans* apresentaram as características acima citadas e também outras associadas a estresse e morte celular, como a condensação da cromatina na periferia nuclear, grânulos no citoplasma, alterações nucleares e perinucleares granulares, como descrito por Yang et al. (2006), Hao et al. (2012), Polonelli et al. (2016) e Khan et al. (2017). Neste tratamento também foi possível visualizar diversas áreas de descolamento da membrana citoplasmática por toda célula (Figura 16-C). A Figura 18-D demonstra a célula de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) com o tratamento de 2 mg/mL do EH-Pn em aproximação (0.5 µm) para a melhor visualização do descolamento da membrana citoplasmática, também foi possível observar a presenças dos grânulos e vacúolos.

Figura 16 - Efeito do EH-Pn na morfologia interna da cepa *C. albicans* (ATCC MYA 2876).

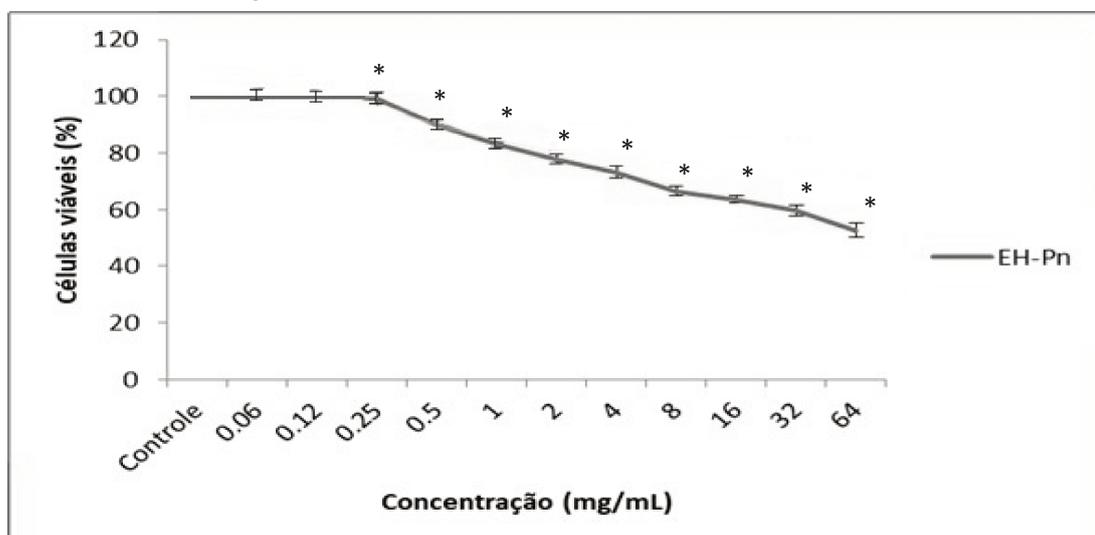


Fotografia de MET: Imagem A: *C. albicans* (controle); B: *C. albicans* + EH-Pn (0,25 mg/mL); C: *C. albicans* + EH-Pn (2 mg/mL); D: *C. albicans* + EH-Pn (2 mg/mL) em aproximação para visualização do descolamento da membrana citoplasmática. C: citoplasma; N: núcleo; V: vacúolo; Seta preta: grânulos; Seta branca: descolamento da membrana plasmática; Seta vermelha: condensação da cromatina.

### 5.10 Citotoxicidade *in vitro* do EH-Pn em linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformada (*HaCaT*)

A redução do MTT ocorre em células metabolicamente ativas, que são mensuradas em leitor de microplacas para obter o percentual de viabilidade celular. Os tratamentos com a concentração de 64 mg/mL de EH-Pn demonstraram viabilidade celular de 53%, respectivamente. Os resultados demonstraram baixa citotoxicidade, onde a viabilidade celular após o tratamento com EH-Pn expressou resultado acima de 50% em todas as concentrações avaliadas (Figura 19).

Figura 17 - Viabilidade celular das células de *HaCaT* na presença de diferentes concentrações de EH-Pn.



Análise de variância (ANOVA: um critério) seguida de teste Tukey. \* = diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,01$ ). EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*.

### 5.11 Análise *in vivo* da toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* em larvas de *Galleria mellonella*

A sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* foi testada após o tratamento com diferentes concentrações de EH-Pn e os controles: PBS 1x e DMSO 1%. O índice de sobrevivência das larvas não foi alterado durante todo período avaliado, obtendo-se 100% de larvas de *Galleria mellonella* vivas após o tratamento com todas as concentrações do extrato avaliadas, bem como os controles. No tratamento, logo após a injeção da concentração de 64 mg/mL do EH-Pn, as larvas apresentaram comportamento letárgico. Todas as amostras foram igualmente incubadas e após 15 minutos de incubação as larvas pertencentes ao tratamento de 64 mg/mL de EH-Pn permaneceram imóveis na placa, mesmo após estímulo dorsal. Algumas das larvas apresentaram-se um pouco mais escuras, porém a maioria mantinha a mesma coloração (Figura 18). Por não apresentar alteração significativa na coloração, foram mantidas em incubação até as próximas observações. Constatou-se que após 1 hora essas larvas apresentaram comportamento letárgico semelhante ao comportamento posterior à administração do EH-Pn (64 mg/mL); após 2 horas de incubação pôde-se perceber que todas as larvas responderam normalmente aos estímulos dorsais, permanecendo com comportamentos normais até a conclusão do ensaio, não havendo nenhuma morte.

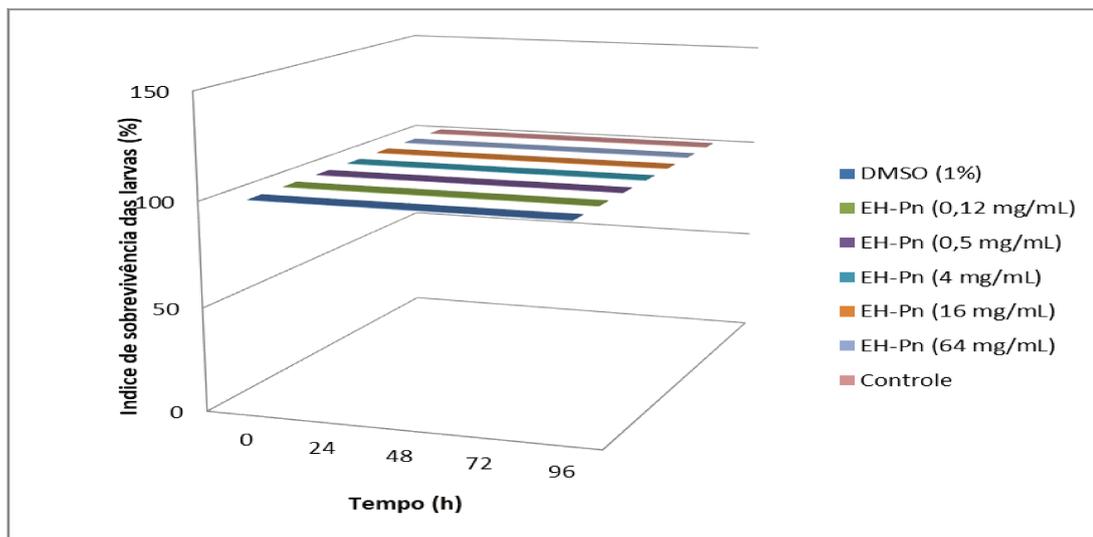
Figura 18 - Efeito do EH-Pn nas larvas de *Galleria mellonella*.



Imagem A: Larvas antes da administração do tratamento; B: Larvas submetidas a administração de 64 mg/mL do EH-Pn após 96 horas de tratamento.

Sugere-se que o EH-Pn contenha fatores antinociceptivos (Gorski et al. 1993), anestésicos e/ou de disrupção de reflexo, inibindo o reflexo das larvas. Porém, devido à falta de informações referentes a esta condição com este animal, este fato deve ser analisado posteriormente em futuros trabalhos, juntamente com a morfologia e estruturas das larvas, com a administração de anestésicos e antinociceptivos previamente conhecidos (Figura 21).

Figura 19 - Gráfico referente ao índice de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* após tratamento com diferentes concentrações de EH-Pn.



DMSO: Dimetilsulfóxido; EH-Pn: Extrato Hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificados os compostos presentes no extrato hidroalcoólico de *P. niruri* através de análise cromatográfica do extrato que demonstrou os compostos detectados, sendo os mais abundantes o éster etílico do ácido linolênico (23,38%), o éster etílico do ácido hexadecanóico (18,23%), o beta-sitosterol (16,90%) e o fitol (10,22%). Os dados obtidos neste estudo corroboram com a literatura, onde os estudos realizados por Ahmad (1981), Marques (2010), Santos (2013), Kuttan e Harikumar (2017) e Garlet (2019) demonstram a presença destes compostos presentes na planta de *P. niruri*.

Nos ensaios de difusão em ágar e microdiluição em caldo, demonstraram atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* contra as cepas de *Candida* testadas, com a formação de halo de inibição em todas as placas no ensaio de poço-difusão em concentrações entre 64 mg/mL a 16 mg/mL (Tabela 1) e

no ensaio de microdiluição em caldo houve inibição do crescimento das cepas em concentração entre 0,03 mg/mL a 8 mg/mL (Tabela 2).

Esses dados demonstram a ação antimicrobiana desse extrato corroborando com a literatura, onde a presença de ésteres etílicos possuem potencial antimicrobiano, como demonstrado no estudo de Huang et al. (2010), que destaca a atividade antimicrobiana contra os microrganismos orais *S. mutans*, *S. gordonii*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e também contra a levedura *C. albicans*. A presença do éster etílico do ácido hexadecanóico, do éster etílico do ácido hexadecanóico, do éster etílico do ácido linolênico e do fitol demonstraram ação antifúngica (Tyagi e Agarwal, 2017; Santos Primo, 2013), também demonstrados que o éster etílico dos ácidos linoleico e linolênico como antimicrobiano nos estudos de Ahmad e colaboradores (1981) e Ferreira e colaboradores (2012). O composto fitol e estigmasterol também demonstraram potencial antimicrobiano segundo os autores Leite (2010), Ghaneian e colaboradores (2015) e Tyagi e Agarwal (2017) da mesma forma o composto estigmasterol inibiu espécies de bactérias e fungos, inclusive *C. albicans* segundo dois estudos realizados por Yinusa e colaboradores (2014 e 2016). O composto beta-sitosterol de acordo com Odiba e colaboradores (2014) apresentou-se com potencial antimicrobiano, contra diversas espécies, como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *P. aureginosa*, *S. typhi* e *C. albicans*, podendo ser o responsável pelas rupturas da membrana dos microrganismos (Acikara et al., 2014; Sarin et al., 2014; Yinusa et al., 2016). Relacionando estes dados ao nosso estudo, nota-se a existência destes compostos agindo como antimicrobianos, inclusive contra as diversas cepas de *Candida*.

Os dados quando analisados em conjunto com a literatura, demonstram que o extrato hidroalcoólico de *P. niruri* é potencialmente antibacteriano e antifúngico, exibindo ação contra esses microrganismos de maneira diversa, podendo ser utilizado como uma alternativa no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos, embora outros dados deverão ser obtidos em relação a outros fatores como estudos com outras partes das plantas, óleos essenciais e extratos, a fim de se ampliar o conhecimento em relação as possibilidades desta planta como uma alternativa viável.

A adesão inicial de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), em superfície sólida, foi significativamente reduzida na presença do EH-Pn em concentrações decrescentes, a partir de 32 mg/mL até 0,031 mg/mL, demonstrando já na concentração de 2 mg/mL

uma redução da adesão da cepa à superfície sólida de 41%, sendo que com 32 mg/mL a redução foi de 78%. Segundo Raut et al. (2013) a adesão de cepas de *C. albicans* não foi influenciada pela presença do antifúngico fluconazol, onde a quantia de 64 µg/mL do antifúngico não reduziu significativamente a adesão das cepas à superfície sólida. O EH-Pn reduziu significativamente a adesão das células desta cepa em superfície abiótica, podendo ser estrategicamente utilizada como fator preventivo da colonização e também de infecções bucais causadas por *C. albicans*. Inibindo esta etapa, haverá interação desfavorável à deposição celular, impedindo a cepa de se aderir nas superfícies, dificultando as fases seguintes de desenvolvimento do biofilme.

A transição morfológica da cepa *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foi avaliada com a presença do EH-Pn, observando a diminuição na quantidade de leveduras e da formação de tubos germinativos. Quando testados com fatores de indução de desenvolvimento de hifas, como o SFB, houve o aumento da quantidade de levedura e desenvolvimento de hifas. O tratamento com 1 mg/mL de EH-Pn foi capaz de diminuir grande parte dos blastoconídios da amostra e reduzir 95% da formação dos tubos germinativos da cepa durante o período do experimento (6h), e com 2 mg/mL, o EH-Pn foi capaz de inibir totalmente a formação dos tubos germinativos durante os períodos (4h e 6h). Esta característica de transição demonstra a alta virulência do microrganismo, sendo de extrema importância encontrar componentes que possam evitar a adesão e penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro (Consolaro et al., 2005, Busato, 2015), assim foi demonstrado que o EH-Pn tem um efeito positivo na diminuição da transição morfológica desta cepa, diminuindo 100% dos tubos germinativos com 2 mg/mL.

O antifúngico fluconazol não apresentou efeito significativo no biofilme em formação (90 min) e biofilmes maduros (24 h) de *C. albicans*, como demonstrado por Raut et al., (2013). Enquanto que, o extrato hidroalcoólico de *P. niruri* demonstrou resultados positivos contra *C. albicans* (ATCC MYA-2876), onde na concentração de 4 mg/mL do EH-Pn, detectou-se 50% de inibição do desenvolvimento do biofilme em formação (120 min), sendo que com a concentração de 32 mg/mL do EH-Pn o biofilme apresentou redução de 69% da atividade metabólica da cepa de *C. albicans*. Os biofilmes de 24 horas de formação de *C. albicans* foram menos sensíveis à atividade inibidora do EH-Pn, apresentando 39% de redução da viabilidade da cepa na maior concentração de 32 mg/mL do EH-Pn. Com isso, o EH-Pn apresenta redução do biofilme, principalmente no biofilme em formação, indicando resultados significativos,

quando comparado com o resultado demonstrado por Raut et al., (2013) sobre o Fluconazol em biofilmes de *Candida*.

Os antifúngicos que apresentaram melhor atividade inibitória contra células planctônicas de *Candida albicans* foram itraconazol, voriconazol e fluconazol, apresentando certa ineficiência em reduzir o crescimento dos blastósporos em superfícies de dispositivos médicos, o que pode dificultar os tratamentos de infecções relacionadas a formação de biofilme de *Candida* spp., porém em forma de biofilme apresentou resistência a estes antifúngicos. Já a anfotericina B demonstrou-se com melhor atividade contra os biofilmes de *C. albicans*, sendo a melhor opção para tratamentos de candidiases sistêmicas (Pereira, 2011). O EH-Pn neste trabalho apresentou melhor atividade nas fases de formação do biofilme de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), o que pode ser associado ao fato de ele inibir os estágios iniciais, como as fases de adesão e transição morfológica da cepa *C. albicans* (ATCC MYA-2876), sendo essencial a inibição destas etapas, as quais são primordiais para o desenvolvimento do biofilme e invasão do hospedeiro.

A redução nos biofilmes e a visualização através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), permite avaliar melhor quais mudanças ocorrem nessa estrutura. Através de MEV foi possível visualizar alterações morfológicas tanto do biofilme quanto do microrganismo, devido ao estresse ocasionado pela exposição ao EH-Pn. Embora o biofilme ainda apresente quantidade elevada de hifas nas concentrações mais baixas do extrato, é notável a presença de diversos focos de extravasamento intracelular. O tratamento com EH-Pn provocou alterações nas células de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) semelhantes à relatos anteriores que descrevem a ruptura e o extravasamento de conteúdo intracelular. Conforme aumentou-se a concentração de EH-Pn a quantidade de hifas do biofilme em formação (2h) de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) diminuíram, já as células com morfologia alteradas (murchas) e os focos de ruptura e extravasamento de conteúdo intracelular aumentaram. Com 16 mg/mL observou-se baixa quantidade de leveduras apresentando murchamento, rupturas e abundância de conteúdo intracelular por toda a lâmina. Para o biofilme de 24h, mesmo com o aumento da concentração do EH-Pn a abundância de hifas foi pouco alterada, porém as células apresentaram-se com rugosidade, focos de ruptura e extravasamento. Apesar da presença abundante de hifas na concentração de 16 mg/mL, as alterações morfológicas das células leveduriformes e os focos de extravasamento de componentes intracelulares são encontrados em grande

quantidade em toda lâmina. A presença destes grânulos nas rupturas e ao redor das células são evidências de morte celular (Khan e et al., 2017). O extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* demonstrou possuir atividade antifúngica com evidência de estresse e morte celular no biofilme de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), corroborando com o ensaio anterior que o EH-Pn foi mais eficiente no biofilme em formação (2h). Esses dados indicam que o EH-Pn foi mais efetivo na prevenção do biofilme de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), inibindo a adesão das células da levedura e a construção do biofilme.

As células de *C. albicans* (ATCC MYA-2876) avaliadas através do MET, apresentaram alterações visíveis após a exposição da concentração de 0,25 mg/mL do EH-Pn, como a presença de grânulos e acúmulo de vacúolos, indicativos de estresse celular, como também observados anteriormente em pesquisas feitas com *Candida* spp. tratadas com extratos vegetais, compostos derivados e fluconazol (Ishida et al., 2011; Dornelas-Ribeiro et al., 2012; Madhavan et al., 2018). Com a concentração de 2 mg/mL foi possível observar estas alterações e outras características relacionadas a estresse celular e apoptose, como a condensação de cromatina na periferia nuclear, grânulos no citoplasma, alterações nucleares e perinucleares granulares, características já relatadas na observação de leveduras expostas a fatores de estresse (Yang et al., 2006; Hao et al., 2012; Polonelli et al., 2016; Khan et al., 2017).

Os resultados obtidos nos ensaios antibiofilme corroboram com a literatura, demonstrando que o extrato hidroalcoólico de *P. niruri* além de possuir efeito inibitório nas células planctônicas também tem efeito no biofilme de *C. albicans*, afetando seu metabolismo, causando alterações morfológicas e na estrutura do biofilme, demonstrando que o EH-Pn pode ser uma alternativa nos tratamentos contra o infecções do gênero *Candida*.

Ensaio de citotoxicidade também foram realizados, afim de avaliar possíveis efeitos citotóxicos do EH-Pn. Nos ensaios *in vitro* com células *HaCaT*, o EH-Pn apresentou levemente citotóxico, visto que a viabilidade celular destas células foi de 53% na concentração do extrato (64 mg/mL). Assim, o EH-Pn não é caracterizado como citotóxico, pois o percentual de células viáveis de *HaCaT* não apresentou resultado inferior a 50% de viabilidade das células com as concentrações avaliadas. Esses dados sugerem que a utilização do EH-Pn possa ser segura, uma vez que o EH-Pn apresentou baixa toxicidade para as células humanas utilizadas neste ensaio.

Foram utilizadas diversas concentrações do EH-Pn diluídos em PBS para os estudos *in vivo* com larvas de *G. mellonella*. Embora a maior concentração utilizada neste ensaio ser considerada relativamente alta (64 mg/mL), não demonstrou ser tóxica, já que todos os animais permaneceram vivos durante todo experimento. Devido ao ocorrido nos ensaios, onde as larvas ficaram sem mobilidade e reação, sugere-se que o EH-Pn contenha fatores de interrupção de reflexo, inibindo o reflexo das larvas, ou anestésicos e/ou antinociceptivos, causando o efeito letárgico e inerte para as mesmas. Os extratos hidroalcoólicos de *Phyllanthus* spp. possuem atividade antinociceptivas (Venturi & Randi, 1997). Esta reação pode ocorrer devido à presença dos compostos beta-sitosterol e fitol (Villasenor et al., 2002; Leite, 2010; Acikara et al., 2014; Dighe et al., 2016). Diversas espécies de *Phyllanthus* no Brasil podem causar o bloqueio da resposta da dor (Calixto et al., 1998; Kassuya et al., 2003). As informações referentes a estas condições de dor são insuficientes com este tipo de animal, sendo que deve ser criteriosamente analisada em futuros trabalhos, com estudos dos órgãos e estruturas das larvas, juntamente aos disruptores de reflexo, anestésicos e antinociceptivos previamente conhecidos.

A utilização da planta *P. niruri* em doses contínuas por três meses não apresentou efeito tóxico, alterações urinárias ou outras intercorrências nos pacientes (Gilbert et al., 2005), bem como não provocou alterações sanguíneas, eletrocardiográficas, físicas ou psicológicas em pacientes avaliados em estudos clínicos, demonstrando que o uso contínuo da planta não apresenta toxicidade (Santos, 1990). Afirma-se em literatura que durante o período de gravidez seja evitado, pois há indícios de que possa ser abortivo se administrado em exagero (Santos, 1990; Braz et al., 2015). O EH-Pn não apresentou indicativos significativos de toxicidade *in vivo* com modelos de *G. mellonella*, corroborando com diversos autores, como Santos (1990), Gilbert et al. (2005), Barros et al. (2006), Boim et al. (2010), Marques (2010), Cruces et al. (2013) e Braz et al. (2015).

Uma grande parte dos agentes antifúngicos podem produzir efeitos tóxicos, já que os fungos tem similaridades fisiológicas e bioquímicas com as células do hospedeiro, por serem eucariota. Consequentemente o uso do arsenal terapêutico é bem limitado, onde muitas vezes a administração de antifúngicos, como a anfotericina B e o fluconazol, em altas doses ou por um período prolongado pode apresentar toxicidade celular e tecidual ao hospedeiro, embora o fluconazol apresente efeitos tóxicos colaterais bastante reduzidos (Nobre et al., 2002; Santos Júnior et al., 2005;

Meinerz et al., 2007). É importante ressaltar que o EH-Pn exibiu baixa toxicidade, sugerindo ter uma eficiente capacidade de ação, não causando nenhum tipo de dano aos organismos expostos ao EH-Pn.

Nossos experimentos de controle demonstraram que a utilização do DMSO 1% não provocou nenhuma alteração na morfologia ou crescimento dos microrganismos, assim como relatados por Nenaah (2013). Estes dados em conjunto com a literatura indicam que as propriedades medicinais e antimicrobianas existentes na planta *Phyllanthus niruri* não são apenas advindas da crença popular. As pesquisas com esta espécie apresentam resultados positivos e devem ser incentivadas, afim da indicação da efetividade desses extratos, da baixa toxicidade nos ensaios realizados, e da redução de gastos do sistema de saúde, aproveitando-se dos recursos naturais do nosso país (Lorenzi & Matos, 2002; Pucci, 2017). Os estudos com o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* abrem futuras perspectivas de pesquisas dando continuidade à esta linha de investigação, para obtenção de mais informações como sítio de ação dos compostos e quais são responsáveis pela atividade antifúngica (Anibal, 2010), assim como o uso de outras partes, extratos ou óleos essenciais dessa planta, ampliando o conhecimento dos benefícios que podem contribuir na terapia alternativa contra *Candida* spp. e outros tipos de microrganismos, podendo ser estrategicamente utilizada como fator preventivo da colonização e também de infecções bucais causadas por *Candida albicans*.

## 7 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* possui bom rendimento obtido através da técnica de maceração, apresentando diversos compostos bioativos;

Apresenta ação antifúngica contra diferentes cepas de *Candida* spp., com perfil fungistático para as espécies de *Candida* na Concentração Inibitória Mínima (CIM), precisando de doses superiores ao CIM para ter ação fungicida;

O EH-Pn possui ação antiaderente em superfícies abióticas, bem como redução total da formação de tubos germinativos de *C. albicans* (ATCC MYA-2876);

A viabilidade celular dos biofilmes da cepa *C. albicans* (ATCC MYA-2876) foram reduzidos com a presença do EH-Pn, com melhor atividade no biofilme de 2h de formação, associado a inibição da adesão e transição morfológica da levedura.

O EH-Pn mostra-se efetivo na prevenção do biofilme inicial de *C. albicans* (ATCC MYA-2876), sendo mais eficiente em biofilmes iniciais com mais focos de células leveduriformes fissuradas, murchamento e extravasamento intracelular.

As leveduras expostas ao EH-Pn demonstraram alterações internas, seguido de sinais de estresse e morte celular.

O tratamento com EH-Pn não é tóxico *in vitro* para células de *HaCaT* e *in vivo* para larvas de *G. mellonella*.

O extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* possui ação antifúngica sobre diferentes cepas de *Candida*, especialmente contra *Candida albicans* ATCC MYA-2876, com baixa toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Acikara OB, Citoğlu GS, Dall'Acqua S, Ozbek H, Cvacka J, Zemlicka M, Smejkal K. Bioassay-guided isolation of the antinociceptive compounds motiol and  $\beta$ -sitosterol from *Scorzonera latifolia* root extract. *Pharmazie* 2014; 69: 711-714.

Adolpho LO, Reis RCN, Wyrepkowski CC, Turra C, Avila GI, Lanz CLN. Screening da Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais da Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. In: Anais do Simpósio de plantas medicinais do Brasil 25 [internet]. Eventus; 2018. p. 190 [acesso em 2019 dez 13]. Disponível em: <[http://www.eventus.com.br/plantasmedicinais2018/anais\\_xxv\\_simposio\\_plantas\\_medicinais\\_2018.pdf](http://www.eventus.com.br/plantasmedicinais2018/anais_xxv_simposio_plantas_medicinais_2018.pdf)>.

Ahmad MU, Husain S, Osman SM. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 1981: 58(6): 673–674.

Aita AM, Matsuura HN, Machado CA, Ritter MR. Espécies medicinais comercializadas como “quebra-pedras” em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19(2): 471-477.

Alonso MA, Amaral MCE. Estudos taxonômicos e biosistemáticos no complexo *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae). UNICAMP, 2010. Disponível em: <<https://www.prp.unicamp.br/pibic/congresso/xviiicongresso/paineis/082090.pdf>>.

Álvares CA, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Candidiase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43(5): 319-327.

Anibal PC. Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de *Punica granatum* L. (romã) sobre *Candida* spp. [tese]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2010.

Aulton ME. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6(2):71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidiase. DST - J bras Doenças Sex Transm 2010; 22(1): 22-38.

Barbosa GM. Atividade antifúngica de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade em leveduras de *Candida albicans* [dissertação]. Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011.

Barbosa JP. Atividade anti-*Candida* de óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* [dissertação]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2018.

Barros ME, Lima R, Mercuri LP, Matos JR, Schor N, Boim MA. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. *Urological Research* 2006; 34(6): 351-357.

Bath V, Sharma SM, Shetty V, Shastry CS, Rao V, Shenoy MS, Saha S, Balaji S. Screening of selected plant essential oils for their antifungal activity against *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *Nitte University Journal of Health Science* 2014; 4(1): 46-51.

Becker DL, Bulle DJ, Rodrigues PL, Santos O, Dalla Lana DF, Fuentefria AM. Biofilm antifungal susceptibility of *Candida* urine isolated from ambulatory patients. *R. Epidemiol. Control. Infec.* 2016; 6(3): 107-113.

Benaducci T, Sardi JCO, Lourencetti NMS, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front Microbiol.* 2016; 7: 290.

Bergold AM, Georgiadis S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica* 2004; 5(2): 159-172.

Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes S, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela

comunidade rural do assentamento vale verde-Tocantins. Rev. Bras. Pl. Med, 2013; 15(4): 692-707.

Boim MA, Heilberg IP, Schor N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. International Brazilian Journal of Urology 2010; 36(6): 657-664.

Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arq. Inst. Biol. 2014; 81(3): 218-225.

Boni GC. Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados isolados de diferentes espécies de *Mentha* [dissertação]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2016.

Brasil. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Ministério da Saúde, Brasília, 2006a; 148p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

Brasil. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

Braz AG, Silva AS, Costa VAM, Nabas JMABB. Quebra-Pedra (*Phyllanthus niruri* L): Considerações no Tratamento da Litíase Renal. Rev. Conexão Eletrônica 2015; 12(1): 1-8.

Calixto JB, Santos ARS, Cechinel Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev.* 18: 225-258.

Campo MJA. Características do microbioma bucal humano. *J Dent Pub H.* 2018; 9(2): 145-155.

Cardoso VM. *O Microbioma Humano [dissertação]*. Portugal: Universidade Fernando Pessoa; 2015.

CLSI (2003). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 8. ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI/NCCLS document M2-A8: 2003: 23(1): 58.

CLSI (2008). *Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica*. 2. ed. Clinical and Laboratorial Standards Institute. CLSI Norma M27-A3: 2008; 28(14).

Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(4): 260-270.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 2003; 36(5): 599-607.

Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM, Svidzinski TIE. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 2005; 159(4): 501–7.

Costa KRA, Santiago SB. *Mecanismos de resistência da Candida albicans*. Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser; 2016.

Cruces IL, Patelli THC, Tashima CM, Mello-Peixoto ECT. Plantas medicinais no controle de urolitíase. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013; 15(4): 780-788.

Dighe SB, Kuchekar BS, Wankhede SB. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *International Journal of Pharmacological Research.* 2016; 6(3): 109-113.

Domingues K, Gonçalves A, Oliveira CP, Perim CM, Gonçalves FB. Avaliação de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas 2015; 17(3): 427-435.

Dornelas-Ribeiro M, Pinheiro EM, Guerra C, Braga-Silva LA, Carvalho SMF de, Santos ALS dos, et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2012; 107(1): 31-38.

Duarte MCT. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Rev. Multiciência 2006; 7(10): 1-17.

Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Research in Microbiology 2010; 161: 534-540.

Escola de Saúde Pública. Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Porto Alegre [internet]. Porto Alegre: 2018 [acesso 2019 jul 23]. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20190154/17115411-e-book-plantas-medicinais.pdf>

Feiria SNB. Avaliação do efeito antifúngico e inibição de fatores morfológicos em *Candida spp.* por espécies de *Mentha* [dissertação]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2015.

Feiria SNB. Bioatividade de óleos essenciais de *Mentha spp.* sobre microrganismos orais [tese]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2019.

Fernandes MRV. Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por spray drying [tese]. Brasil: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

Ferreira AM, Souza BMV, Rigotti MA, Loureiro MRD. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. Rev. esc. enferm. USP 2012; 46(3): 752-760.

Ferreira JK de F. Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos contra bactérias patogênicas de importância alimentar [dissertação]. Brasil: Universidade de São Paulo; 2017.

Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa AM, Dekker RFH, Silva MLC. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina: Ciências Agrárias* 2009; 30(1): 117-134.

Gajdács M, Dóczy I, Ábrók M, Lázár A, Burián K. Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: Results from a 10-year retrospective survey. *Central European Journal of Urology* 2019; 72(2): 209-214.

Ganan M, Lorentzen SB, Agger JW, Heyward CA, Bakke O, Knutsen SH, et al. Antifungal activity of well-defined chito-oligosaccharide preparations against medically relevant yeasts. *PLoS One* 2019; 8: 1-14.

Garlet TMB. Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul [recurso eletrônico]. Santa Maria: 2019 [acesso 2019 ago 20]. Disponível em: <https://www.ufsm.br/pro-reitorias/pre/wp-content/uploads/sites/346/2019/12/Cartilha-Plantas-Medicinais.pdf>

Germano VE, Xavier CMR, Jales MMS, Albuquerque TVG, Lima ELF, Ribeiro LH. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: Revisão de literatura. *Rev. Nova Esperança* 2018; 16(2): 91-99.

Ghaneian MT, Ehrampoush MH, Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Mahmoudi M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal* 2015; 2(1): 13–16.

Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petraitis V, Walsh TJ. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm–Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems, *Clinical Infectious Diseases* 2015; 1(61): 618-621.

Gilbert B, Ferreira JLP, Alves LF. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. Fiocruz. Curitiba, Brasil: Abifito, 2005.

Giordani C, Santin R, Cleff MB. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2015; 17(1), 175-185.

Girach RD, Siddioui PA, Khan SA. Traditional plant remedies among the kondh (Orissa). *Int. J. Pharmacol*, 1994; 32: 274–283.

Gorski F, Corrêa CR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Potent antinociceptive activity of a hydroalcoholic extract of *Phyllanthus corcovadensis*. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993; 45: 1046-1049.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310-321.

Grove DC, Randall WA. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs). New York. Medical Encyclopedia Inc.:1955: 2: 408.

Gullo FP, Sardi JCO, Santos VAFFM, Sangalli-Leite F, Pitanguí NS, Rossi SA, de Paula e Silva ACA, et al. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. Hindawi Publishing Corporation, 2012.

Hammer KA, Carson CF. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Medical Mycology* 2000; 38: 355–362

Hao B, Cheng S, Clancy CJ, Nguyen MH. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012; 57(1): 326-332.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2128-2131.

Hoffman BR, DelasAlas H, Blanco K, Wiederhold N, Lewis RE, Williams L. Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Ten Medicinal Plants from Ghana. *Pharmaceutical Biology* 2004; 42(1): 13-17.

Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of oral biology.* 2010; 55: 555-560.

Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. BMC Res Notes. 2017; 10: 428.

Ishida K, Rodrigues JCF, Carmmerer S, Urbiba J, Gilbert I, de Souza W, Rozental S. Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2011; 10(3): 2-10.

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 2017; 33(3): 300–305.

Kuttan R, Harikumar KB, editores. *Phyllanthus* species: Scientific evaluation and medicinal applications. Tradicional herbal medicines for modern times, v: 10. 2011

Kassuya CAL, Silvestre AA, Rehder VLG, Calixto JB. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. European Journal of Pharmacology 2003; 478: 145–153.

Kaur N, Kaur B, Sirhindi G. Phytochemistry and Pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: A Review. Phytother Res. 2017; 31(7): 980-1004.

Khan SN, Khan S, Iqbal J, Khan R, Khan AU. Enhanced killing and antibiofilm activity of encapsulated Cinnamaldehyde against *Candida albicans*. Frontiers in Microbiology. 2017; 8: 1-15.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Oral microbiology at a glance. Inglaterra (Oxford): John Wiley e Sons: 2010; 85p.

Langer LTA, Staudt KJ, Carmo RL, Alves IA. Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura. Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas 2018; 2(2):1-15.

Leão AFM, Gúez CM, Duarte JA, Schmitt EG, Quintana LD, Zambrano, et al. Avaliação dos efeitos anti-genotóxicos *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) em leucócitos humanos expostos a agente agressor. Revista Saúde 2017; 43(1): 133-139.

Lee SK, Li PT, Lau DT, Yung PP, Kong RY, Fong W F. Phylogeny of medicinal *Phyllanthus* species in China based on nuclear ITS and chloroplast atpB-rbcL sequences and multiplex PCR detection assay analysis. *Planta Med.* 2006; 72: 721–726.

Leite ACRM. Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais [tese]. Brasil: Universidade Federal do Ceará; 2010.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 428.

Madhavan P, Jamal F, Pei Pei C, Othman F, Karunanidhi A, Peng Ng K. Comparative Study of the Effects of Fluconazole and Voriconazole on *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida rugosa* Biofilms. *Mycopathologia.* 2018; 183: 499–511.

Marques LC. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no Tratamento de urolitíase: Proposta de documentação para registro simplificado como fitoterápico. *Revista Fitos* 2010; 5(3): 20-33.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(5): 449-60.

Martins ER, Lima LR, Cordeiro I. *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) no estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia*, 2014; 65(2): 405-424.

Martins ER. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) na região sudeste do Brasil [dissertação]. Brasil: Universidade Federal de São Carlos, 2013.

Martins TVF, Almeida PSVB, Oliveira LL, Amaro MOF, Dal Prá V, Mazutti M, et al. Atividade antibacteriana de *Brassica oleracea* var. *capitata* em modelos experimentais in vitro. *Rev. Monografias ambientais (REMOA-UFSM)* 2012; 9(9): 2088-2100.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Landes Bioscience*, 2013; 4(2): 119-128.

Megaw J, Thompson TP, Lafferty RA, Gilmore BF. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere*. 2015; 139: 197–201.

Meinerz ARM, Cleff MB, Nascente PS, Nobre MO, Schuch LFD, Antunes TA, et al. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2007; 43 (1): 105-109.

Menezes EA, Lustosa AK, Freire CCF, Cunha FA, Montenegro RM, Montenegro Júnior RM. Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2007; 43: 241-244.

Messias MCTB, Menegatto MF, Prado ACC, Santos BR, Guimarães MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2015; 17(1): 76-104.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991; 757-766.

Moreira CA. Estudo de sensibilidade do biofilme de *Burkholderia pseudomallei* à antibióticos de uso clínico e farnesol [tese]. Brasil: Universidade Federal do Ceará; 2013.

Nakamura CV, Santos AO, Vendrametto MC, Luize PS, Dias Filho BP, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16 (1): 61-66.

Nascimento JE. Estudo comparativo de três espécies de *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) conhecidas por quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. e *Phyllanthus tenellus* Roxb.) [tese]. Brasil: Universidade Federal de Pernambuco; 2008.

Nenaah G. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. World Journal Microbiology Biotechnology 2013; 29 (1): 1255- 1262.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol. 2015; 69:71-92.

Nobre MO, Nascente PS, Meireles MC, Ferreiro L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. Ciência Rural 2002; 32(1): 175-184.

Nunes FRS, Dias HMC, Cavalcante GM. Investigação das atividades antioxidante e antimicrobiana de duas espécies arbóreas ocorrentes no bioma caatinga. Rev. Estação Científica (UNIFAP) 2016; 6 (1): 81-90.

Odiba JO, Musa AM, Hassan HS, Yahaya SM, Okolob EI. Antimicrobial activity of isolated Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -Sitosterol) from Honeybee Propolis from North-Western, Nigeria. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR). 2014; 5(12): 908-918.

Oliveira BED, Sousa GSS, Melo HD, Pereira JF, Alves LA, Lorenzo VP. Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Phyllanthus Niruri* (Quebra - Pedra) em *Escherichia coli*. In: Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação 7; 2012 out 19-21; Palmas, Tocantins.

Oliveira FF. Efeito dos extratos aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri* Linn. (quebra-pedra) sobre o testículo, próstata, fígado e rins de ratos wistar adultos: avaliação histopatológica, histomorfométrica e hormonal [tese]. Brasil: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2016.

Oliveira TR. Avaliação da toxicidade “*in vivo*”, atividade antifúngica e efeito anti-proliferativo do óleo essencial de *Melaleuca* spp. (Tea tree, Cajuput e Naiuli) sobre espécies do gênero *Candida* [tese]. Brasil: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2018.

Oliveira VA, Oliveira VMA, Oliveira TWN, Damasceno ANC, Sousa CB, Nogueira TR, et al. Aspectos atuais sobre a utilização da *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) no tratamento da litíase renal. Revista Eletrônica Acervo Saúde 2019; 11(15): 1-10.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais, *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18 (2): 301-307.

Peixoto ITA, Sardi JCO, Aníbal PC, Gonçalves RB, Höfling JF. Evidências científicas da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais. *RFO UPF* [online] 2010; 15(2): 177-182.

Pentland DR, Mühlischlegel FA, Gourlay CW. CO<sub>2</sub> enhances the ability of *Candida albicans* to form biofilms, overcome nutritional immunity and resist antifungal treatment. *BioRxiv* 2020; 1-58.

Pereira NP. Atividade *in vitro* de antifúngicos em biofilmes de *Candida* [dissertação]. Brasil: Universidade Federal de Goiás; 2011.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 2008; 3 (9): 1494-500.

Polonelli L, Ciociola T, Elviri L, Zanello PP, Giovati L, Arruda DC, et al. A Naturally Occurring Antibody Fragment Neutralizes Infectivity of Diverse Infectious Agents. *Scientific Reports* 2016; 6: 1-12.

Pucci ND. Efeitos do *Phyllanthus niruri* em parâmetros metabólicos de portadores de litíase urinária [tese]. Brasil: Universidade de São Paulo, 2017.

Purisco SU. Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco frequentes como agentes de candidemia [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças; 2010.

Queiroga GMT. Plantas medicinais e fitoterápicas como alternativa terapêutica às infecções urinárias: um diagnóstico dessa realidade na saúde pública de Mossoró [dissertação]. Brasil: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2015.

Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. Biofouling. 2013; 29:87-96.

Rehder VLG, Melo LV, Kohn LK, Carvalho JE, Antonio MA, Silvestre A, Santos AS. Atividade antiproliferativa de lignanas isoladas de *Phyllanthus amarus* Schum. e Thonn. Poços de Caldas: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2003.

Revie Nm, Iyer Kr, Robbins N, Cowen Le. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Current Opinion in Microbiology 2018; 45: 70-76.

Rekus MT. Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system [tese]. Alemanha: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2000.

Ribeiro LHF. Potencial biotecnológico do óleo essencial de *Vitex gardneriana* na prevenção e controle de biofilmes de espécies de *Candida* de importância clínica [dissertação]. Brasil: Universidade Federal do Ceará; 2016.

Rodrigues TS, Guimarães SF, Rodrigues RG, Gabriel JV. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). Rev. Bras. de Plantas Mediciniais 2011; 13 (1): 587-590.

Ruiz LS, Pereira VBR. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. Bol. Inst. Adolfo Lutz 2016; 26 (2): 1-3.

Sá Silva FS, Ferreira TM, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Junior M, et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais. Rev. Inst. Adolfo Lutz 2009; 68(3): 434-441.

Salomé JR. Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico [dissertação]. Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; 2007.

Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Naves PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Rev. Ciênc. Méd. Biol. 2013; 12(2): 229-233.

Santos AE. Extração de compostos bioativos do jambolão (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels) a baixas pressões e livre de solvente orgânico [dissertação]. Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina; 2017.

Santos DR. Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e em ratos [tese]. Brasil: Escola Paulista de Medicina; 1990.

Santos JR ID, Souza IAM, Borges RG, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HDM. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. Scientia Medica 2005; 15(3): 189-197.

Santos PER. Estudo da composição química e avaliação da atividade esquistossomicida do extrato etanólico e frações das folhas de *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn (Euphorbiaceae) [mestrado]. Brasil: Universidade Estadual de Campinas, 2013.

Santos Primo RG. Caracterização do potencial biotecnológico do *Crambe abyssinica* na alimentação de ruminante [dissertação]. Brasil: Universidade Federal da Grande Dourados; 2013.

Saraiva RMC. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas [dissertação]. Brasil: Universidade Federal do Pará; 2012.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes MJSG. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology 2013; 62(1): 10–24.

Sarin B, Verma N, Martín JP, Mohanty A. An overview of important ethnomedicinal herbs of *Phyllanthus* species: Present status and future prospects. The Scientific World Journal 2014; 2014 (1): 1-12.

Scorzoni L, Lucas MP de, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano, Cuenca-Estrella M, Mendes-Giannini MJ, Zaragoza O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. PLoS One 2013; 8(3): 1-13.

Scorzoni L, Silva ACAP, Singulani JL, Leite FS, Oliveira HC, Silva RAM, et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. Virulence 2015; 6(8): 766-776

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biol 2016; 14(8): 1-14.

Shilpa VP, Muddukrishnaiah K, Thavamani BS, Dhanapal V, Arathi KN, Vinod KR, et al. In vitro immunomodulatory, antifungal, and antibacterial screening of *Phyllanthus niruri* against to human pathogenic microorganisms. Environmental Disease 2018; 3(3): 63-68.

Silva AKF, Lisboa JES, Barbosa MPS, Lima AF. Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *Candida*: uma revisão. Ciências Biológicas e da Saúde 2014; 2 (1): 45-57.

Silva ASM. Microbioma Oral O seu papel na saúde e na doença [dissertação]. Brasil: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; 2016.

Silva DR. Potencial antifúngico e antibiofilme contra espécies de *Candida* e toxicidade da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan [dissertação]. Brasil: Universidade Estadual da Paraíba; 2017.

Silva FM. Potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro [dissertação]. Brasil: Universidade de Brasília; 2008.

Silva GM. Candidíase oral: sintomas, diagnósticos e tratamentos [trabalho de conclusão de curso]. Brasil: Faculdade de Educação e Meio Ambiente; 2013.

Silva JJ. Triagem antimicrobiana de extratos vegetais contra isolados ambientais de *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistentes (ORSA) [dissertação]. Brasil: Universidade Federal de Alfenas, 2013.

Silva JJ, Cerdeira CD, Chavasco JM, Cintra ABP, Silva CBP, Mendonça NA, et al. *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2014; 56(4): 333-340.

Silva MJ, Sales MF. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco-Brasil. *Rodriguésia*, 2004; 55(84): 101-126.

Silva RS, Oliveira KMS, Cavalcante GM. Atividade antifúngica de *Sideroxylon obtusifolium* frente a diferentes espécies de *Candida* sp. *Estação Científica (UNIFAP)* 2017; 7(1): 95-102.

Silva WJ, Seneviratne J, Samaranyake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *Journal of Biomedical Material Research* 2010; 94: 149-156.

Silva, KCFD. Avaliação do uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana como conservantes em formulações farmacêuticas [trabalho de conclusão de curso]. Brasil: Instituto de Tecnologia de Fármacos - Farmanguinhos/ Fiocruz; 2011.

Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). *Phyllanthus niruri*: Quebra Pedra [internet]. Brasília: 2020. [acesso 2020 out 01]. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/304977#classification>.

Spinola MS, Nóbrega DF, Del Bel Cury AA, Ricomini Filho AP, Cury JA, Tenuta LMA. Fluoride penetration and clearance are higher in exopolysaccharide-containing bacterial pellets. *Caries Res.* 2019; 53: 16-23.

Sunitha J, Krishna S, Ananthalakshmi R, Jeeva JS, Smiline Girija AS, Jeddy N. Antimicrobial effect of leaves of *Phyllanthus niruri* and *Solanum nigrum* on caries causing bacteria: An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2017; 11(6): KC01-KC04.

Torres DSC, Cordeiro I, Giuliatti AM. O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 2003; 17 (2): 265- 278.

Tyagi T, Agarwal M. Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(1): 195-206.

Van de Loosdrecht AA, Beelen RHJ, Ossenkuppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MMAC. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Immunological Methods* 1994; 174: 311-320.

Venturi S, Randi AM. Influência da coloração das sementes na germinação de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Acta Bot. Bras.* 1997; 11(1): 87-94.

Vieira AJH, Santos JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*: 2017; 49 (3): 235-9.

Villasenor IM, Angelada J, Canlas AP, Echegoyen D. Bioactivity Studies on  $\beta$ -Sitosterol and its Glucoside. *Phytotherapy Research* 2002; 16: 417–442.

Weber TK, Polanco I. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review. *Gastroenterol Res Pract.* 2012; 2012: 1-12.

Wilson D. *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 188-189, 2018.

Yan Y, Tan F, Miao H, Wang, Cao Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1-11.

Yang H, Ren Q, Zhang Z. Chromosome or chromatin condensation leads to meiosis or apoptosis in stationary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *FEMS Yeast Research* 2006; 6(8) 1254–1263.

Yinusa I, George NI, Ayo RG Rufai Y. Evaluation of the pharmacological activities of Betasitosterol isolated from the bark of *Sarcocephalus latifolius* (Smith Bruce). *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research* 2016; 4(4): 8-15.

Yinusa I, George NI, Shuaibu OA, Ayo RG. Bioactivity of stigmasterol isolated from the aerial part of *Spilanthes acmella* (Murr) on selected microorganism. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2014; 3(2): 475–479.

Yusuf AJ, Abdullahi MI, Aleku GA, Ibrahim IAA, Alebiosu CO, Yahaya M et al. Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*. Journal of Medicinal Plants for Economic Development 2018; 2(1): 1-5.

## ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ANÁLISE



1

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

<b>Insumo:</b>	Quebra Pedra (Rasura)	<b>Data de Análise:</b>	18-03-2019
<b>Lote Interno:</b>	18K26-FL37-004769	<b>Lote Fabricante:</b>	30
<b>Data de Fabricação:</b>	30-05-2018	<b>Data de Validade:</b>	30-05-2020
<b>Origem:</b>	Brasil	<b>Procedência:</b>	Brasil
<b>Condições de Armazenamento:</b>	Temperatura Ambiente	<b>Ordem de Fracionamento:</b>	004769

<b>DCB:</b>	10880	<b>DCI:</b>	
<b>CAS:</b>		<b>Peso Molecular:</b>	
<b>Fórmula Molecular:</b>			
<b>Observações:</b>	<b>Esterelização</b>	Houve	
	<b>Nome científico</b>	Phyllanthus Niruri	
	<b>Parte Utilizada</b>	Planta Inteira	

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Aspecto *	Rasura	Conforme		FB5
Aspecto macroscópico *	Aspecto macroscópico	Conforme		FB5
Epiderme de ambas as faces da folha são constituídas por células de paredes anticlinais onduladas, os estômatos são do tipo paracíticos e, menos frequentemente, anomocíticos ocorrendo principalmente na epiderme inferior. Em secção transversal o caule apresenta uma camada de fibras muito espessas circundando o floema.				
Aspecto microscópico *	Aspecto microscópico	Conforme		FB5
As folhas são alternas dísticas, simples, membranáceas, glabras, oblongo-elípticas, de ápice atenuado, às vezes mucronado e base assimétrica, margem lisa, cor verde-oliva na face adaxial e verde-pálida a cinza na abaxial, caules simples ou ramificados, os principais delgados e sem folhas, Raízes marrons enrugadas e ramificadas, frutos esquizocárpico.				
Bactéria gram negativa *	< 10000	Conforme	ufc/g	FB5
Contagem de bactérias *	< 10000000	Conforme	ufc/g	FB5
Bolores e leveduras *	< 10000	Conforme	ufc/g	FB5
Cinzas insolúveis *	< 4	2,69	%	FB5
Cinzas totais *	< 8	4,69	%	FB5
Cor *	Verde a Castanho esverdeado	Castanho esverdeado		FB5
Elementos estranhos *	< 2,0	Conforme	%	FB5
Escherischia *	< 100	Conforme	ufc/g	FB5
Odor *	Inodora	Conforme		FB5
Sabor *	Amargo	Conforme		FB5
Salmonella *	Ausente	Conforme		FB5
Teste de identificação *	Taninos	Conforme		FB5
Umidade *	< 14,0	11,9	%	FB5



2

### CERTIFICADO DE ANÁLISE

<b>Insumo:</b>	Quebra Pedra (Rasura)	<b>Data de Análise:</b>	18-03-2019
<b>Lote Interno:</b>	18K26-FL37-004769	<b>Lote Fabricante:</b>	30
<b>Data de Fabricação:</b>	30-05-2018	<b>Data de Validade:</b>	30-05-2020
<b>Origem:</b>	Brasil	<b>Procedência:</b>	Brasil
<b>Condições de Armazenamento:</b>	Temperatura Ambiente	<b>Ordem de Fracionamento:</b>	004769
<b>DCB:</b>	10880	<b>DCI:</b>	
<b>CAS:</b>		<b>Peso Molecular:</b>	
<b>Fórmula Molecular:</b>			
<b>Observações:</b>	<b>Esterelização</b>	Houve	
	<b>Nome científico</b>	Phyllanthus Niruri	
	<b>Parte Utilizada</b>	Planta Inteira	

\* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade FLORIEN FITOATIVOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

**Conclusão:**

Aprovado  (X)  
 Reprovado  ( )

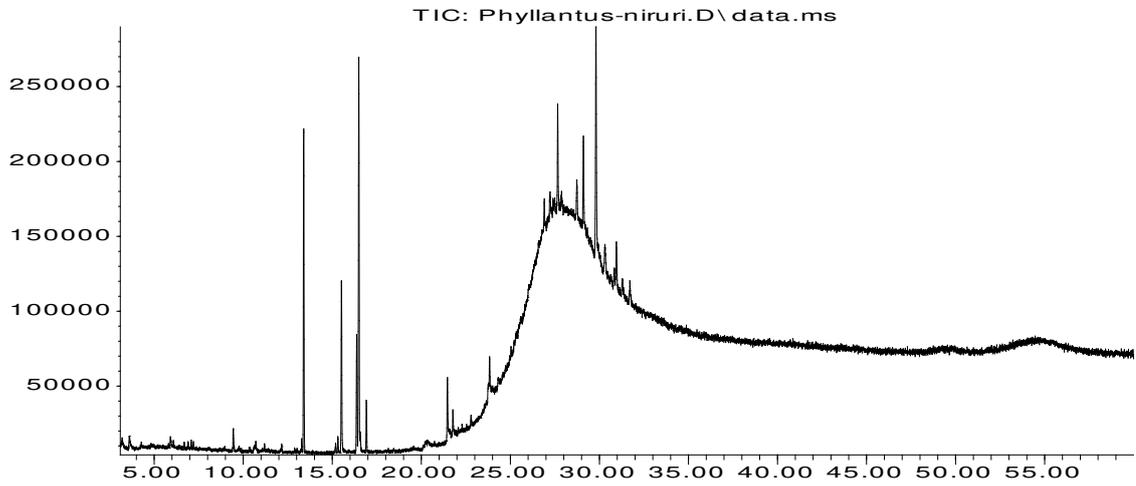
*Karina Maria da Silva*  
 Responsável Técnico  
 Karina Maria da Silva  
 CRF-SP Nº 66.627

*Lilian Cristina Faganello*  
 Responsável Técnico Substituto  
 Lilian Cristina Faganello  
 CRF-SP Nº 75.642

Fim do Documento

### ANEXO 2 – CROMATOGRAMA

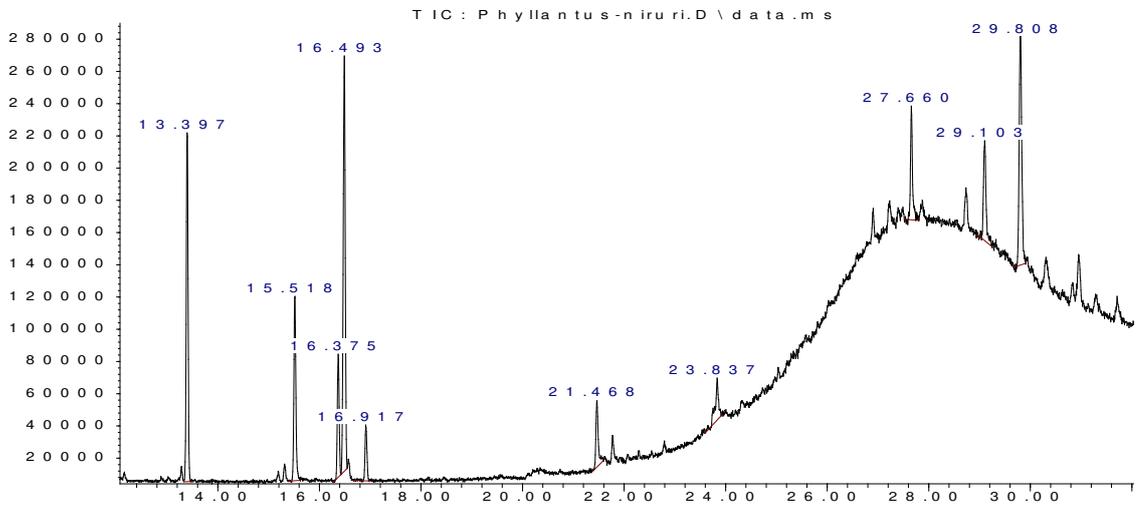
Abundance



Time-->

Cromatograma do extrato de *Phyllanthus niruri*

Abundance



Time-->

Cromatograma expandido (12-32 min) do extrato de *Phyllanthus niruri*

Analitos identificados no extrato de *Phyllanthus niruri*

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Identificação</b>	<b>% rel.</b>
13,40	Éster etílico do ácido hexadecanóico	18,23
15,52	Fitol	10,22
16,38	Éster etílico do ácido linoleico (éster etílico do ácido 9,12-octadecadienóico)	6,27
16,49	Éster etílico do ácido linolênico (éster etílico do ácido 9,12,15-octadecatrienóico)	23,38
16,92	Éster etílico do ácido octadecanóico	3,03
21,47	Dihidrocrisina	4,30
23,84	n.i.	3,84
27,66	M = 430 Alfa-tocoferol	6,42
29,10	M = 412 Estigmasterol	7,41
29,81	M = 414 Beta-sitosterol	16,90

### Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas HP-5975, conforme as condições abaixo:

Coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

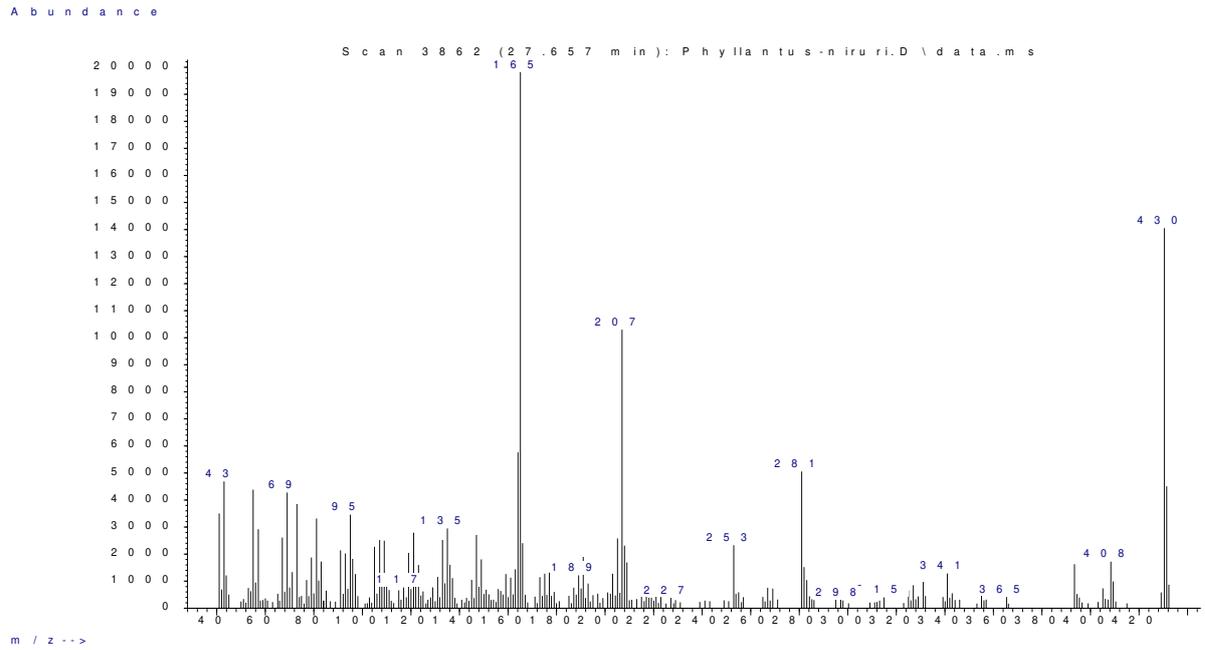
Temperaturas: Injetor: 280°C

Coluna: 150°C (2 min), 5°C/min, 240°C, 10°C/min, 300°C (34 min)

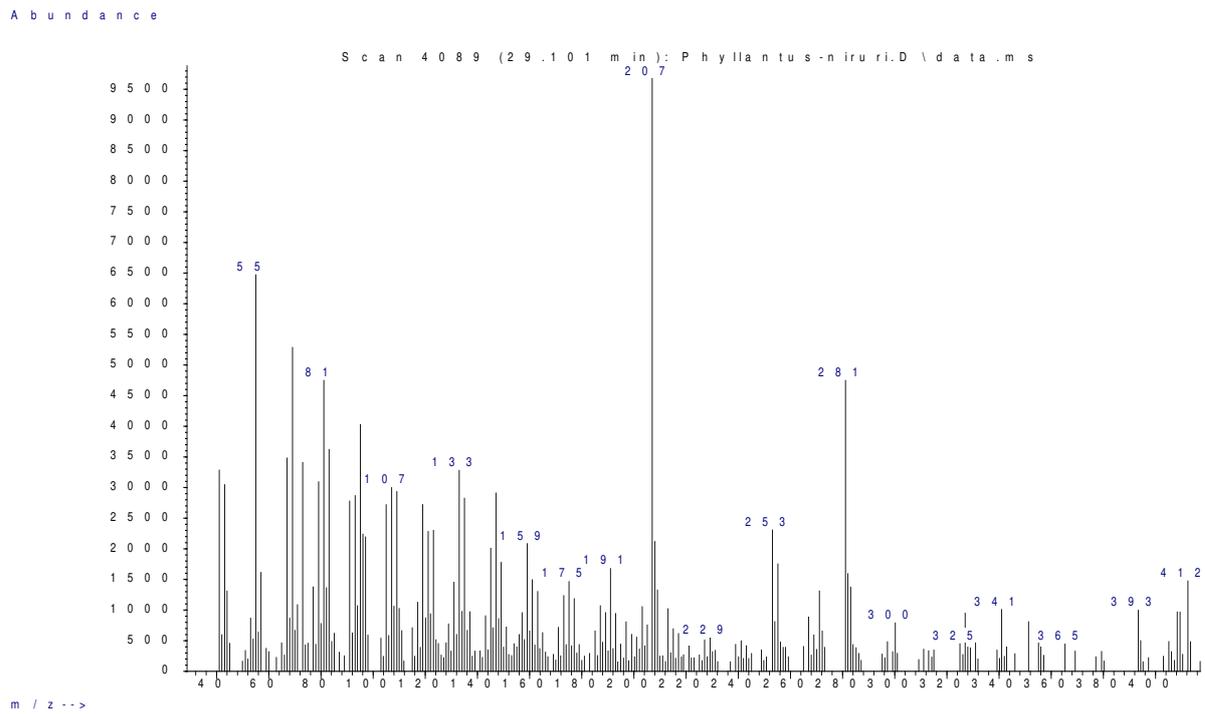
Detector: 300°C

Volume injetado: 1,0 µL

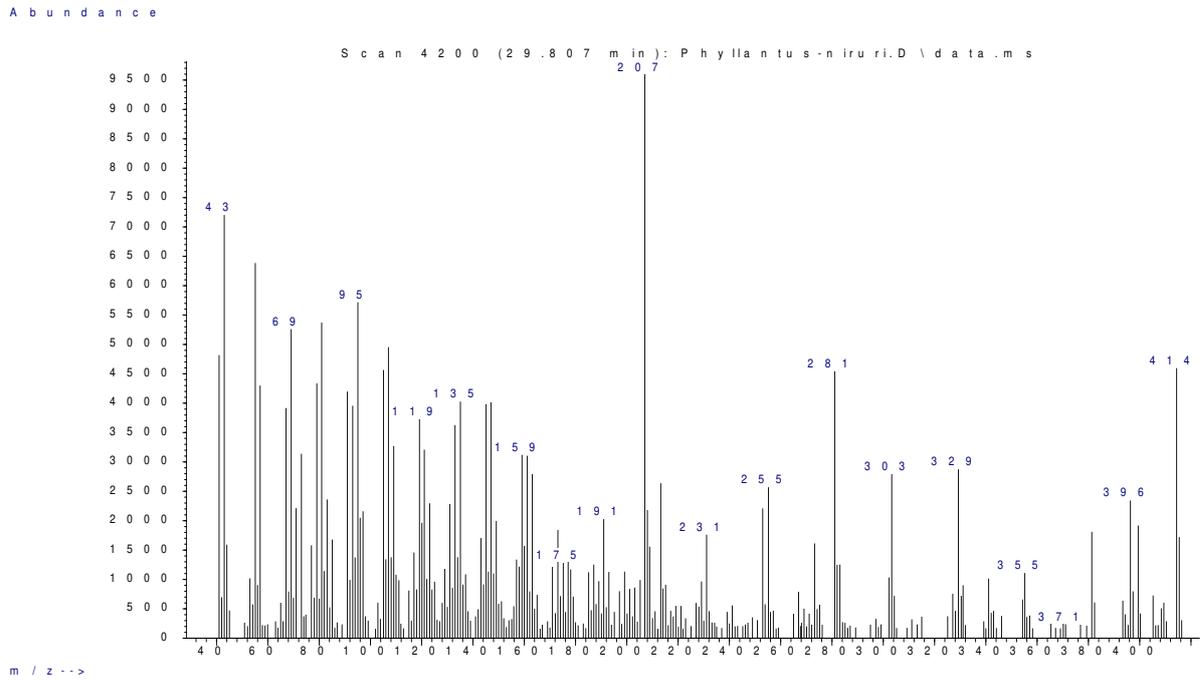
Vazão do gás de arraste (He): 1,0 ml/min



Espectro de massas do analito com  $t_R = 27,66$  min



Espectro de massas do analito com  $t_R = 29,10$  min



Espectro de massas do analito com  $t_R = 29,81$  min

**ANEXO 3 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO**

Efeito do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* L. (Quebra-pedra) sobre células planctônicas e em biofilme de *Candida albicans*

---

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

---

<b>3%</b> ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>3%</b> FONTES DA INTERNET	<b>1%</b> PUBLICAÇÕES	<b>%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
-----------------------------------	---------------------------------	--------------------------	-----------------------------------

---

FONTES PRIMÁRIAS

---

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>sbpgo.org.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>

---