

Avaliação “in vitro” da eficácia do extrato hidroalcoólico do cajá (*Spondias mombin* L.) e da graviola (*Annona muricata* L.) sobre microorganismos orais

In vitro evaluation of the efficacy of cajá (*Spondias mombin* L.) and soursop (*Annona muricata* L.) hydroalcoholic extract on oral microorganisms

DOI:10.34117/bjdv6n9-204

Recebimento dos originais: 08/08/2020

Aceitação para publicação: 10/09/2020

Raphael Fernando Dias de Freitas

Graduanda em Ortodontia, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, SP, Brasil

E-mail: raphaelfernando@hotmail.com

Amanda Pissinatti Canelli

Graduanda em Ciências Biomédicas, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, SP, Brasil

E-mail: amanda_canelli@hotmail.com

Andrea Aparecida de Aro

PhD

Professor Associado em Ciências Biomédicas, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, SP, Brasil

E-mail: andreadearo@fho.edu.br

Adilson Sartoratto

PhD

Centro Associado de Pesquisa em Química, Biologia e Agricultura, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

E-mail: adilson@cpqba.unicamp.br

Cristina Maria Franzini

PhD

Professor Associado em Ortodontia, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, SP, Brasil

E-mail: cristinafranzini@yahoo.com

Vivian Fernandes Furletti de Góes

PhD

Professor Associado em Ortodontia, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, SP, Brasil

Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto – FHO

Avenida Dr. Maximiliano Baruto, 500, Araras, SP, Brazil, CEP: 13607-339

E-mail: vivifurletti@hotmail.com

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar in vitro os parâmetros químicos e de citotoxicidade seletiva dos extratos hidroalcoólicos da graviola (*Annona muricata* L.) casca (EGC) e fruto (EGF) e Cajá (*Spondias mombin* L.) casca (ECC) e fruto (ECF), bem como verificar a atividade antimicrobiana dos mesmos sobre *Candida* spp., *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. A análise dos parâmetros químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A citotoxicidade seletiva foi avaliada através do teste MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio) e as análises microbiológicas dos extratos foram determinadas pelos métodos de microdiluição buscando a concentração inibitória mínima (MIC), e a determinação da concentração fungicida e bactericida mínima (MFC / MBC). As análises de rendimento, CG-EM, MIC, MFC e MBC atenderam aos parâmetros de normalidade e foram analisadas por meio de Two-Way Anova e o MTT por meio de Bonferroni com $p < 0,05$. Foram observados os melhores rendimentos para EGC (18,50%) e ECC (14,68%). Os compostos químicos majoritários presentes nos extratos foram do grupamento éster. No ensaio de MTT, no tempo de 24h, o EGF apresentou menor citotoxicidade que a clorexidina ($p < 0,05$), enquanto que em 48h, o ECC apresentou menor citotoxicidade que ECF, nistatina e clorexidina ($p < 0,05$). A MIC para os extratos hidroalcoólicos de casca e fruto de ambas as espécies vegetais frente a *Candida* spp. foi de 8 mg/mL, já para todas as bactérias periodontais apenas o ECC foi efetivo na concentração de 8 mg/mL. Os extratos não demonstraram atividade fungicida e o ECC apresentou ação bactericida na concentração de 8 mg/mL. Pode-se concluir que os extratos da casca e fruto do cajá e da graviola apresentaram baixa atividade antimicrobiana frente aos periodontopatógenos e às células de *Candida* spp. e não demonstraram atividade fungicida nas concentrações avaliadas. Entretanto o ECC apresentou atividade bactericida, podendo ser considerado alternativa viável como antibiótico devido a menor toxicidade comparada aos fármacos disponíveis comercialmente.

Palavras-chave: *Candida* spp., microrganismos periodontais, atividade antimicrobiana, extratos vegetais.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate in vitro selective cytotoxicity and chemical parameters of hydroalcoholic extracts of cajá's (*Spondias mombin* L.) peel (ECC) and fruit (ECF) as well as soursop's (*Annona muricata* L.) peel (EGC) and fruit (EGF), in addition to verifying their antimicrobial activity on *Candida* spp., *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Porphyromonas gingivalis*. The chemical parameters analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The selective cytotoxicity was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and the microbiological analyses of the extracts were determined by microdilution methods seeking minimum inhibitory concentration (MIC) and determination of minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC). Performance analyses, CG-EM, MIC, MFC, and MBC attended the normality parameters and were analyzed by Two-Way ANOVA, with MTT using Bonferroni and $p < 0.05$. The best performances were seen on EGC (18.50%) and ECC (14.68%). The majority of chemical compounds in the extracts were of the ester group. On the MTT assay, in 24 hours, EGF showed less toxicity than chlorhexidine ($p < 0.05$), whereas in 48 hours, ECC showed less cytotoxicity than ECF, nystatin, and chlorhexidine ($p < 0.05$). The MIC for hydroalcoholic extracts of peel and fruit on both vegetal species used in *Candida* spp. was 8mg/mL. However, when it came to all the periodontal bacterias, only ECC was effective using 8mg/mL concentration. The present extracts didn't show fungicidal activity and ECC showed bactericidal activity using 8mg/mL concentration. It can be concluded that the extracts from peel and fruit of both cajá and soursop

showed little antimicrobial activity towards periodontal pathogens and *Candida* spp. cells, and also no fungicidal activity in the evaluated concentrations. Nevertheless, ECC did show bactericidal activity, which can be considered as a viable antibiotic alternative due to less toxicity when compared to commercially available drugs.

Keywords: *Candida* spp., periodontal microorganisms, antimicrobial activity, vegetal extracts.

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são descritas como um conjunto de processos inflamatórios e infecciosos desencadeados e perpetuados por bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* que colonizam o biofilme dental subgingival e estimulam uma resposta imune cuja consequência é a destruição da matriz extracelular (Kouidhi et al., 2015; Casarin et al., 2017) e dos tecidos de suporte (Zandbergen et al., 2013; Hajishengallis, 2014).

A doença evolui continuamente com períodos de exacerbação e de remissão, resultando de uma resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e os seus produtos (Maia et al., 2017). Os antimicrobianos indicados para o tratamento das periodontites pertencem aos seguintes grupos: penicilinas, tetraciclina, macrolídeos, quinolonas e nitroimidazólicos (Keestra et al., 2014; Jepsen & Jepsen, 2016).

Dentre os patógenos orais vulneráveis a alterações da homeostasia do hospedeiro encontra-se as leveduras do gênero *Candida*, presentes na cavidade bucal, principalmente na saliva e no biofilme dental (Kanagalingam et al., 2015). O tratamento convencional das candidíases consta da utilização de antifúngicos azólicos e poliênicos (Perlin et al., 2017; Vipulanandan et al., 2018), porém relatos na literatura demonstram a resistência de algumas leveduras a certos antifúngicos sintéticos utilizados em seu tratamento (Arendrup & Patterson, 2017; Darteville et al., 2018).

O tratamento dessas doenças bucais e a busca por menores efeitos colaterais são fatores que impulsionam a pesquisa de terapias alternativas complementares para o controle de afecções orais. Nesse contexto, cresce o interesse por compostos de origem natural, que apresentem efetividade, eficácia e menor toxicidade seletiva (Furletti et al., 2011).

Os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos podem proporcionar diversos avanços na ciência farmacêutica e no descobrimento de novos princípios ativos (Atanasov et al., 2015), além de promover a preservação da biodiversidade e o uso local das plantas em combinação com os fármacos já conhecidos (Cordeiro & Félix, 2014). Dentre os materiais vegetais com atividade antimicrobiana referenciados pela literatura estão o cajá e a graviola.

A graviola (*Annona muricata* L.) apresenta uma longa e rica história em fitoterapia (Patel & Patel, 2016), possuindo 212 compostos fitoquímicos isolados, que foram descobertos a partir de extratos preparados de diferentes partes da planta (Rady et al., 2018). Estudos ao longo dos anos demonstraram que os extratos de folhas, casca, raiz, caule e sementes de frutas de *Annona muricata* possuem atividade anti-bacteriana (Biba et al., 2014), contra alguns patógenos orais e *Candida albicans* (Pai et al., 2016; Olugbuyiro et al., 2017).

O Cajá (*Spondias mombin* L.) é uma fruta que consta de poucos dados científicos encontrados na literatura, quanto suas propriedades medicinais (Mattietto et al., 2010), no entanto, foram descritos efeitos antibacterianos, sem evidências no potencial contra leveduras e bactérias orais. Ainda apresenta atividades antivirais e antifúngicas (Maduka et al., 2014; Temitope et al., 2017) sendo crescente o estudo da utilização do cajá como antimicrobiano de amplo espectro (Adegoke et al., 2016).

Nesse contexto, é de suma importância o estudo de novos métodos terapêuticos alternativos e compostos naturais que sejam igualmente eficazes, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade (Cruz et al., 2018), para uso na prevenção e tratamento da candidíase e das doenças periodontais. Dessa forma, a hipótese nula do presente trabalho estabelece que os extratos de cajá e graviola são antimicrobianos mais eficazes e menos citotóxicos do que a clorexidina e a nistatina.

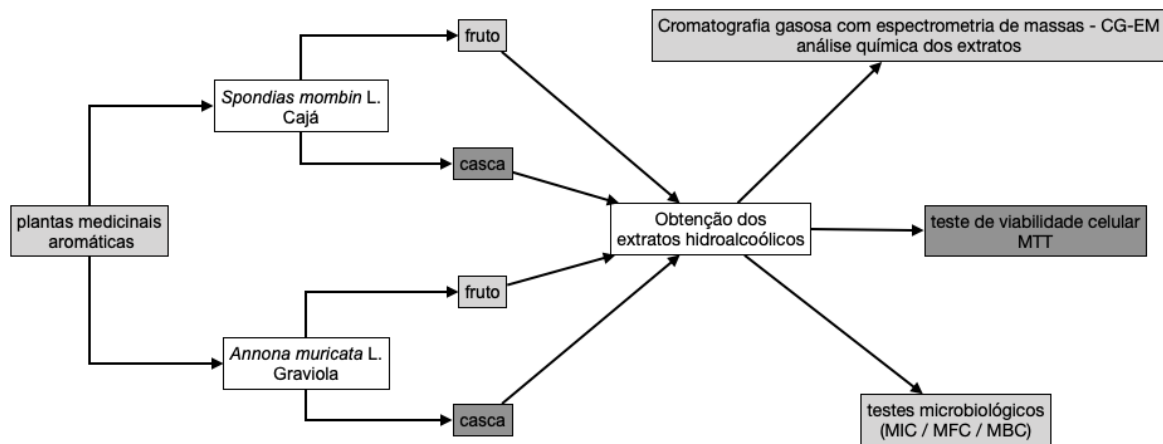
Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* os parâmetros químicos, microbiológicos e de citotoxicidade dos extratos hidroalcoólicos da graviola (*Annona muricata* L.) casca (EGC) e fruto (EGF) e Cajá (*Spondias mombin* L.) casca (ECC) e fruto (ECF), contra patógenos periodontais e *Candida* spp.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização do local do estudo

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FHO|Uniararas (CEUA) sob parecer de número 090/2017. A ordem da execução das metodologias esta descrita no fluxograma representado pela figura 1.

Figura 1. Metodologia das fases experimentais da presente pesquisa.



Material Vegetal

As frutas das quais foram produzidos os extratos de graviola (*Annona muricata* L.) e Cajá (*Spondias mombin* L.), foram adquiridos junto a CEASA-PE, localizada na cidade do Recife-PE.

Metodologia para obtenção dos extratos hidroalcoólicos

Após a identificação e confirmação científica das espécies das frutas, a polpa e a casca das mesmas foram submetidas a maceração e mantidas em solução hidroalcoólica (30:70) por 7 dias para extração por exaustão dos compostos ativos dos respectivos produtos e depois filtradas com papel filtro Whatman 0,5 µm. Após filtração a solução foi destilada com evaporador rotativo (destilação a vácuo) e depois incubada a 37°C para constatação de alguma contaminação (Carrera et al., 2014).

Análises Químicas

Análise dos extratos de graviola (*Annona muricata* L.) e Cajá (*Spondias mombin* L.), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM dos extratos hidroalcoólicos foram feitas de acordo com o método modificado descrito por Markham et al. (1996) e Proestos et al. (2006). Foi necessário realizar a derivatização com o composto N-metil-N-(trimetilsilil) - acetamida trifluor (MSTFA) para que o cromatógrafo conseguisse exibir os compostos químicos presentes nos extratos brutos das plantas medicinais de graviola e cajá. Alíquotas de 400 µL de cada amostra foram colocadas dentro de “vials” de vidro e adicionados 1 mL de uma solução de trimetilsilil para silanização. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás (HP - 6890, Agilent Technologies) acoplado a um

espectrômetro de massas (HP - 5975, Agilent Technologies), equipado com uma coluna capilar DB-5MS (J&W Scientific, Palo Alto, CA; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Detetor operando a 70 eV no modo “scan” (m/z 40 - 400). A programação de temperatura foi de 50° C (0,3 minutos) a 285° C (15 minutos), com um incremento de 6° C/min. As amostras (0,5 µL) foram injetadas por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção “splitless”. A integração foi feita através do software específico do equipamento. Terpenos e sesquiterpenos foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM e de padrões autênticos metilados e eluídos nas mesmas condições. Os outros compostos químicos foram identificados por comparação com os dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento (Nist - 2011).

Análise de Citotoxicidade

Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio]

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio é reduzido por células metabolicamente ativas, em parte pela ação das enzimas desidrogenases mitocondriais para gerar equivalentes redutores tais como NADH e NADPH, levando a formação intracelular do sal de formazan, proporcional ao número de células funcionais (Mosmann, 1983; Tanasiewicz et al., 2017). Fibroblastos NIH/3T3 (29ª passagem) foram plaqueados em triplicata na quantidade de 10×10^3 células por poço, em placas de 96 poços, sendo incubados com meio de cultivo completo (DME+15% de soro fetal bovino), com adição dos extratos de graviola (fruta e casca) ou adição dos extratos de cajá (fruta e casca). As culturas foram mantidas sob atmosfera úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ durante 24h. Como controle positivo, foi utilizado meio de cultivo completo e fibroblastos NIH/3T3 (1×10^3 células por poço); para o controle negativo, foi utilizada adição de DMSO 50% (dimetilsulfóxido) ao meio de cultivo completo. Após 24h e 48h, foi adicionado 180 µL de meio DME sem vermelho de fenol e 20 µL de MTT 0,5% em DMPBS (5 mg/mL), seguindo para incubação por 3h protegido da luz, em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após a retirada do MTT, foram adicionados 200 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância em cada poço foi medida a 540 nm em leitor de microplacas. Para a análise da proliferação celular, os valores de absorbância menores que as do controle positivo indicaram uma redução da taxa de proliferação celular (Krishnan et al., 2014; Mohammadi-Khanaposhtani et al., 2015; Qiao et al., 2014). Para o cálculo da viabilidade celular, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Ansoorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle positivo}} \times 100$$

Análises Microbiológicas

Meios de cultura

O meio utilizado para manutenção das leveduras para as *Candida* spp. foi Ágar Saboraud Dextrose e para os testes de atividade antifúngica, foi utilizado o meio RPMI 1640. Para bactérias foram utilizados para manutenção os seguintes meios de cultura: Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) para a cepa *P. intermedia* e Ágar Sangue para *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. O meio utilizado para os testes microbiológicos foi utilizado caldo BHI

Microrganismos

As leveduras selecionadas considerando-se a composição da microbiota oral e cuja atuação pode ser um patógeno oportunista, foram *Candida albicans* CBS 562, *Candida dubliniensis* CBS 7987, *Candida tropicalis* CBS 94. As bactérias foram selecionadas de acordo com a composição microbiana dos biofilmes orais e dos principais microrganismos relacionados à gengivite, sendo *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Preparo de inóculo de leveduras e bactérias

O preparo dos inóculos para os testes de susceptibilidade foram realizados através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 para fungos (CLSI, 2002) e o protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005). Culturas de leveduras e bactérias de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução salina (0,85%) esterilizada (5 mL), ajustando sua absorbância entre 0,08 à 0,10 a 625 nm, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^6$ céls/mL para leveduras e $1,5 \times 10^8$ céls/mL para bactérias. Foi realizada a diluição seriada obtendo-se ao final da mesma concentração de $1,5 \times 10^3$ céls/mL para leveduras e $1,5 \times 10^6$ céls/mL para bactérias, 1 mL foi adicionado em 500 µL de meio RPMI 1640 cultura (Meck, Alemanha), estabelecendo-se uma concentração de 1×10^3 céls/mL de leveduras e 500 µL de meio caldo BHI 1×10^5 céls/mL de bactérias. Nos poços de placa de Elisa inoculados resultando em uma concentração de 5×10^3 céls/mL de leveduras e 5×10^5 céls/mL de bactérias.

Determinação de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2005). Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100 µL dos meios de cultura citados acima, sendo a coluna de 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - Linha foi acrescentado 50 µL da solução do material a ser testado, de concentração conhecida (uma concentração diferente para cada número de coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100 µL dos mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferido para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida foram adicionados 100 µL do inóculo do microrganismo avaliado, cuja turvação foi comparada à escala MC Farland 0,5, seguido de diluição para concentração final de 10^3 céls/mL de leveduras e 5×10^5 células/mL para as bactérias. As placas foram seladas com Parafilm® e incubadas por 24-48 horas à 37° C em aerobiose para as leveduras e anarobiose para as bactérias. Após este período as placas foram avaliadas e a MIC definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento dos microrganismos. Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos independentes.

Leitura dos Resultados

Após o período de incubação foram adicionados 50µL da solução de CTT (corante) e as placas reincubadas por 3 horas. A MIC foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentarem atividade respiratória. Foram realizadas leituras das placas no início e final de cada ensaio e, leitura de microplacas de Elisa (ASYS) para confirmação da presença ou ausência de crescimento microbiano (CLSI, 2002; CLSI, 2005).

Determinação de Concentração Fungicida (MFC) e Concentração Bactericida (MBC)

As determinações da Concentração Fungicida (MFC) e da Concentração bactericida (MBC) foram realizadas após a seleção da concentração dos extratos de Cajá (*Spondias mombin* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) com potencial para uso fungicida e bactericida, conforme descrito no item anterior. A atividade foi confirmada através do plaqueamento do material do poço correspondente à MIC e os demais acima deste, em meio de cultura específico. Após 24h de incubação em estufa a 37°C os resultados foram obtidos. A MFC e a MBC foram definidas como

as concentrações capazes de não promover nenhum crescimento microbiano em meio de cultura sólido específico (CLSI, 2002; CLSI, 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos independentes.

Análise estatística

Para estatística descritiva, e após a análise de teste de normalidade foi determinado se os testes são paramétricos e não paramétricos, elaboração de tabelas, gráficos e regressões, foram utilizados os programas estatísticos Biostat 5.3 e Statistica 10.0. Para as análises de MTT foram realizados o teste de Two-Way Anova seguido pelo teste Bonferroni.

3 RESULTADOS

Rendimentos dos Extratos Hidroalcoólicos

Os dados, massa do fruto utilizado, rendimento em extrato hidroalcoólico e estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Rendimento em extrato hidroalcoólico (EH) dos frutos estudados.

Planta medicinal	Família	nome popular	parte do fruto	siglas dos extratos	rendimento EH
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Graviola	casca	EGC	18,50%
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Graviola	fruto	EGF	7,33%
<i>Spondias mombin</i> L.	Anacardiaceae	Cajá	casca	ECC	14,68%
<i>Spondias mombin</i> L.	Anacardiaceae	Cajá	fruto	ECF	10,14%

Análise Química dos extratos hidroalcoólicos vegetais

A identificação da composição química dos extratos hidroalcoólicos das cascas e frutos da graviola (*Annona muricata* L.) e Cajá (*Spondias mombin* L.) foi realizada através da CG-EM, onde estão representados seus cromatogramas na figura 2 e os compostos que foram possíveis de serem identificados estão descritos na tabela 2. A maioria dos compostos identificados estão dentro do Grupamento químico dos ésteres que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, revelada na literatura (Wemmenhove et al., 2016; Díaz De Rienzo et al., 2016).

FIGURA 2. A - Comatograma ECC; B - Comatograma ECF; C - Comatograma EGC; D - Comatograma EGF; E – Comatograma expandido (7 – 27 min) EGC.

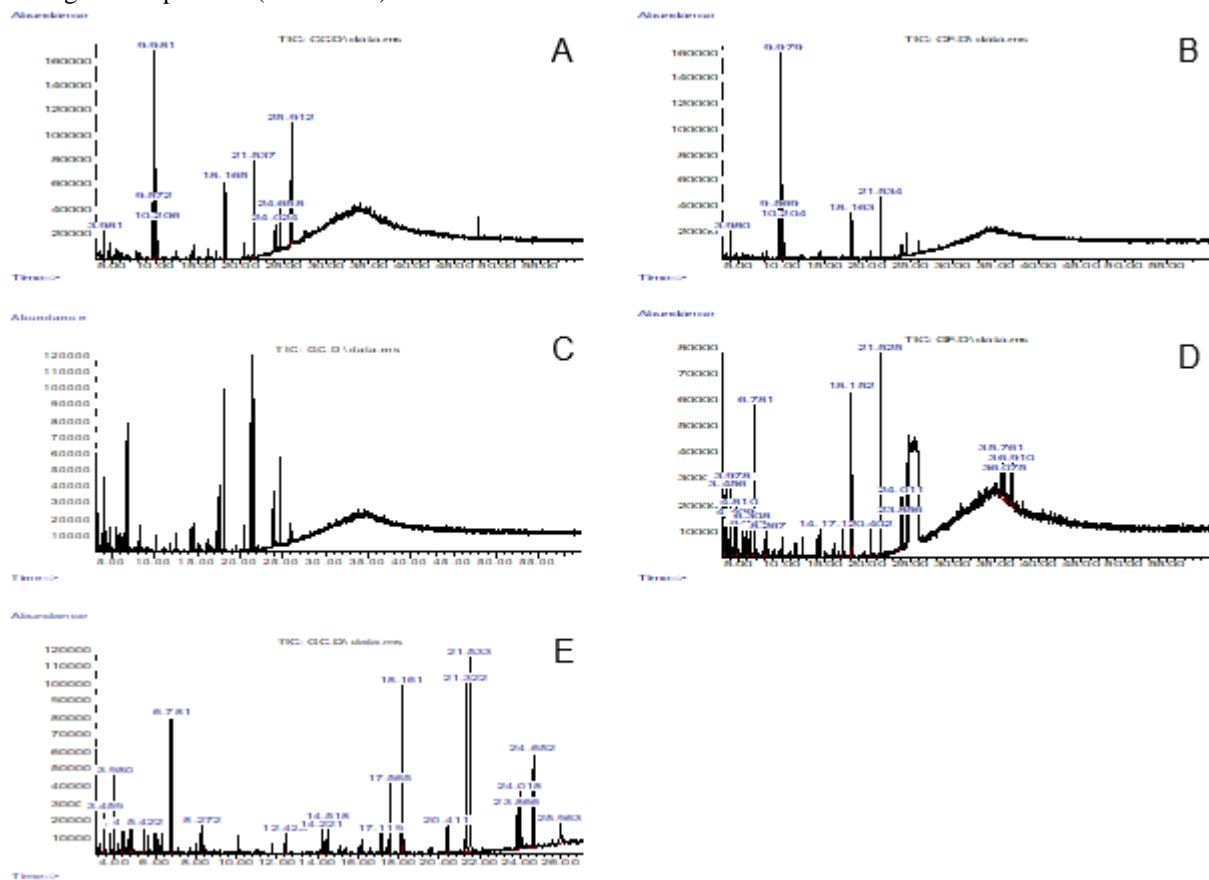


TABELA 2: Identificação dos compostos majoritários presentes nos extratos hidroalcoólicos estudados.

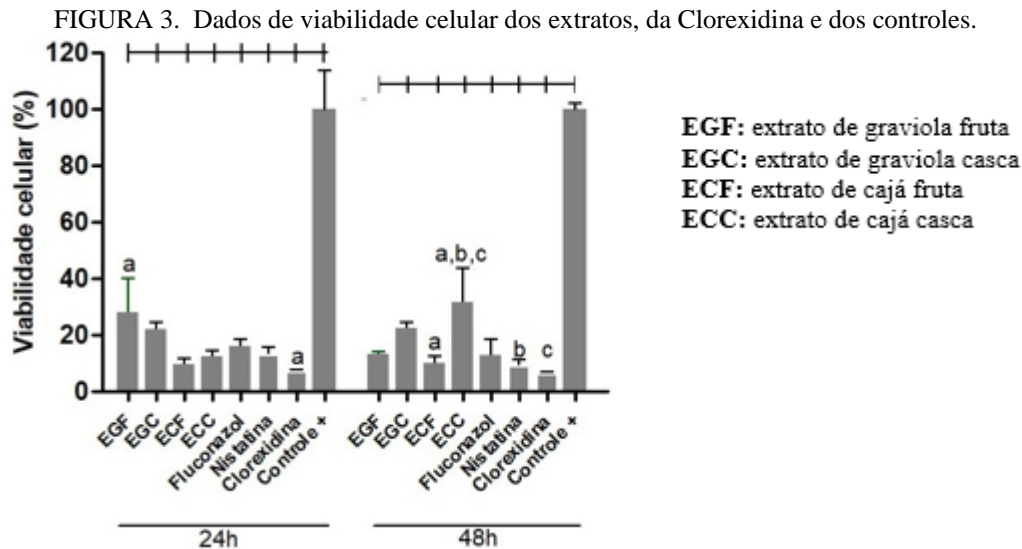
Extrato	tr (min)	identificação	% rel.
Cajá casca	25,91	éster bis(2-etilhexil) do ácido hexanodióico	24,21
	8,27	éster trimetílico do ácido cítrico	1,84
Graviola casca	17,57	éster metílico do ácido hexadecanóico	5,41
	21,32	metil estearato	13,81
Graviola fruto	8,27	éster trimetílico do ácido cítrico	1,65

tr = tempo de retenção em minutos. % rel.= percentual relativo.

Avaliação de Citotoxicidade

Através da análise (figura 3) foi possível observar que houve redução da viabilidade celular com a utilização dos extratos vegetais. O EGF no tempo de 24h apresentou 30% de viabilidade celular, sendo a maior observada nesse período, enquanto a clorexidina foi a substância que apresentou a menor viabilidade celular para o mesmo intervalo de tempo ($p < 0,05$). No intervalo de 48h, o ECC apresentou 35% de viabilidade celular, sendo a maior observada neste período

apresentando diferença estatística significativa quando comparado ao ECF, nistatina e clorexidina ($p < 0,05$). Os demais compostos apresentaram citotoxicidade semelhante à da nistatina, fluconazol e clorexidina ($p < 0,05$), em ambos os intervalos de tempo avaliados, porém a clorexidina apresentou menor viabilidade celular em relação à todas as substâncias avaliadas ($p < 0,05$).



Letras iguais representam diferenças significativas entre os extratos (em ambos os tempos experimentais); Todos os extratos e os fármacos diferem do controle positivo (DMEM) em ambos os tempos experimentais – representados pela barra.

Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente as leveduras e periodontopatógenos

Para estudo da atividade antimicrobiana dos extratos da casca e fruto da graviola (*Annona muricata* L.) e do cajá (*Spondias mombin* L.), os mesmos foram diluídos em água na concentração inicial de 8 mg/mL e final 0,0039 mg/mL. Em seguida os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com os extratos brutos vegetais sobre as células de *Candida* spp. e sobre os periodontopatógenos e os resultados estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3: Atividade antimicrobiana (MIC/MBC/MFC – mg/mL) dos extratos vegetais, do fluconazol, da Nistatina e da Clorexidina contra os periodontopatógenos e as *Candida* spp.

Microrganismos	<i>Annona muricata</i> L.				<i>Spondias mombin</i> L.				Fluconazol		Nistatina		Clorexidina		Desvio Padrão
	Casca		Fruto		casca		Fruto								
	MI C	MFC MBC	MI C	MFC MBC	MIC	MFC MBC	MIC	MFC MBC	MIC	MFC MBC	MIC	MFC MBC	MIC	MBC MBC	MIC /MBC/ MFC
<i>Candida albicans</i> CBS 562	8,0	*	8,0	*	8,0	*	8,0	*	0,002	*	0,044	0,044	#	#	< 0,05
<i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987	8,0	*	8,0	*	8,0	*	8,0	*	0,001	*	5,675	5,675	#	#	< 0,05
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	8,0	*	8,0	*	8,0	*	8,0	*	0,016	*	0,044	0,044	#	#	< 0,05
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	*	*	*	*	8,0	8,0	*	*	#	#	#	#	0,031	*	< 0,05
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	*	*	*	*	8,0	8,0	*	*	#	#	#	#	2,000	4,000	< 0,05
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	*	*	*	*	8,0	8,0	*	*	#	#	#	#	0,500	0,001	< 0,05

Valores de MIC, MBC e MFC em mg/mL * Não houve inibição nas concentrações testadas # Não se aplica esta substância a esse microrganismo

4 DISCUSSÃO

Pesquisas a base de extratos de plantas ganham destaque (Newman & Cragg, 2012), especialmente, no que se refere à prevenção e tratamento de doenças orais (Cruz et al., 2018) e por serem constituídos de grupamentos químicos que possuem atividade biológica (Smanski et al., 2016). Isto aumenta o interesse por pesquisas no intuito de identificar a atividade antimicrobiana de produtos naturais e, futuramente, descobrir quais os princípios ativos responsáveis por esse efeito.

Ambas as espécies avaliadas no presente estudo, o cajá (*Spondias mombin* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) são frutíferas tropicais cujas produções estão centralizadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Alencar et al., 2015; Brito et al., 2018) e por apresentarem sabor adstringente buscava-se no presente trabalho avaliar a possibilidade do uso terapêutico contra *Candida* spp. e periodontopatógenos orais.

O trabalho evidenciou que os melhores rendimentos em extratos hidroalcoólicos foram para a EGC, seguido pelo ECC, posteriormente ECF e EGF. O zoneamento agro-climático pode maximizar o rendimento dos extratos e os princípios ativos a partir da seleção adequada do local de cultivo e da época de plantio (Bochner et al., 2012). No presente estudo os frutos foram coletados no verão, e propiciou um rendimento em extrato considerado baixo (Rodrigues et al., 2011). Os estágios de desenvolvimento, as épocas do ano e os horários de coleta da planta também irão refletir nas propriedades medicinais e toxicidade (Bochner et al., 2012).

Outro fato a salientar é o motivo pelo qual várias partes da mesma fruta são avaliadas. A literatura apresenta as diferentes partes de produtos naturais sendo investigadas com intuito de se compreender em qual delas se encontra o maior rendimento e a atividade biológica. O estudo de Gondim (2005) aponta que as cascas das frutas apresentam teores de nutrientes maiores que do fruto em si, legitimando o resultado da mesma possuir propriedades biológicas superiores em relação ao fruto, o que vem de encontro aos resultados apresentados no presente trabalho que ratifica o potencial antimicrobiano da casca do cajá superior ao fruto.

Em relação à atividade antimicrobiana dos extratos, a concentração mínima de inibição (MIC) para todos os extratos de casca e fruto de ambas as espécies frutíferas avaliadas de graviola e cajá frente às espécies de *Candida* e periodontopatógenos foi considerada baixa, sendo a MIC de 8 mg/mL, sendo que apenas o ECC apresentou potencial antimicrobiano de amplo espectro de ação bacteriostática nos periodontopatógenos testados. Isso pode ser constatado baseando-se na literatura que define com base em Aligiannis (2001) que para produtos de origem natural, concentrações mínimas inibitórias (MIC) de até 0,5%, de 0,55% a 1,5% e acima de 1,5% representam, respectivamente, forte, moderada e fraca atividade antimicrobiana (Duarte et al., 2005).

Tal resultado contrasta com o trabalho de Pai et al. (2016), que evidenciou que a graviola apresenta atividade fungicida frente às cepas da *Candida* e antimicrobiana frente a *P. gingivalis*, porém, em consonância com o mesmo estudo, mostrou ineficácia frente a *P. intermedia*. Estes resultados podem ter relação com a presença do ácido hexadecanóico identificado na casca da graviola, também encontrado em diversos extratos vegetais como a *Elsholtzia ciliata* (Ma et al., 2018) e *Allium* spp. (Kim et al., 2016; Adesanwo et al., 2017), tendo comprovada ação antibacteriana quando testado contra bactérias gram-negativas como *Shigella* sp. (Adesanwo et al., 2017) e *Porphyromonas gingivalis* (Lim et al., 2018).

Já os ésteres de ácido cítrico, encontrados no fruto e casca de graviola, possuem características antimicrobianas testadas contra diversas espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas (Wemmenhove et al., 2016; Díaz De Rienzo et al., 2016), além de apresentar efeitos antifúngicos (Hassan et al., 2015).

Um fator relevante é que na análise química dos extratos houve uma predominância do grupamento éster, e estes se apresentaram como substâncias altamente lipofílicas, atravessando facilmente as membranas celulares, e por isto são muito utilizados no desenvolvimento de fármacos, visto que esta característica permite mascarar certos grupos funcionais com propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, possibilitando a estes compostos uma maior permeabilidade das substâncias pela membrana celular (Parise Filho et al., 2010). Porém, o fraco desempenho frente aos microrganismos testados pode ser relacionado a uma adversidade associada ao grupo éster, uma vez que os ésteres sofrem clivagem intramolecular. No entanto, este mecanismo pode ser de grande valia quando os ésteres são usados como pró-fármacos, realizando o transporte e liberação controlada do princípio ativo (Santos, 2008).

Com referência ao cajá, os ésteres de ácido hexanodióico, identificados na sua casca, são encontrados em diversos extratos vegetais como *Allium* spp. e *Strobilanthes crispus* (Kim et al., 2016; Jalalvand et al., 2019; Peng et al., 2017; Lim et al., 2015). Esse mesmo ácido também pode ser identificado em fungos *Penicillium* sp., servindo como substância inibidora para o crescimento de outras espécies de fungos competidores (Luo et al., 2017; Gnavi et al., 2016). Suas propriedades antibacterianas e até mesmo antifúngicas foram demonstradas em estudos *in vitro* por Luo et al. (2017) e Gnavi et al. (2016).

No trabalho de Silva et al. (2012) o extrato metanólico de folhas de cajá apresentou inibição no crescimento dos microrganismos *Candida albicans*, entretanto, uma menor atividade do extrato hidroalcolólico de cajá casca foi verificada no presente estudo em relação a mesma espécie de levedura. O que pode estar relacionado a essas diferenças de atividade antimicrobiana é o fato de

que os extratos do presente trabalho são hidroalcoólicos e os apresentados na literatura são metanólicos. O diluente extrator nesses casos pode ter conseguido reter substâncias químicas com propriedades antimicrobianas contra *Candida* o que não foi possível no extrato hidoroalcoólico do presente estudo. Vale salientar ainda que o metanol desempenha atividade antimicrobiana que pode mascarar a real capacidade microbiológica do extrato da planta e ainda apresentar toxicidade ao organismo em que for administrado. Quanto ao fluconazol, os estudos de Crocco et al. (2004) evidenciaram que a espécie *Candida albicans*, é susceptível ao antifúngico pelo padrão geral de susceptibilidade. No presente estudo para o fluconazol a inibição verificada foi fungistática em baixa dosagem do fármaco e não apresentou potencial fungicida *Candida* spp. Já a Nistatina, apresentou potencial de inibição de crescimento e evidenciou-se também sua capacidade fungicida para todas as espécies de levedura avaliadas.

Foram encontrados na literatura atividade antimicrobiana da clorexidina 0,12% contra *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e embora as *Candida* spp. não sejam bactérias houve ação do referido antibiótico contra essas leveduras (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2015). No presente trabalho a clorexidina apresentou potencial bacteriostático para *Fusobacterium nucleatum* e bactericida para *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* e não foi testada contra as leveduras.

A literatura atesta a eficácia de extratos da graviola como agente microbianos frente a *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans* (Pai et al., 2016), e o cajá, embora reportado como bactericida e fungicida em alguns estudos realizados (Luo et al., 2017; Gnavi et al., 2016; Ayoka et al., 2008), a sua atividade antifúngica não é unanimidade (Abo et al., 1999; Ajao & Shonikan, 1981), necessitando mais pesquisas quanto a eficácia dos extratos frente aos periodontopatógenos e *Candida* spp.

Através da avaliação da viabilidade celular *in vitro* (MTT), foi observado que houve diferença estatística na citotoxicidade dos compostos testados comparados à clorexidina, fluconazol e a nistatina. O ECF apresentou citotoxicidade bastante semelhante à da clorexidina nos tempos de 24h e 48h. Em contrapartida, no tempo de 24h, o EGF apresentou menor percentual de citotoxicidade, seguido do EGC. Considerando que a clorexidina, nistatina e fluconazol apresentam inúmeros efeitos colaterais indesejáveis (Saffari et al., 2015), os extratos de cajá e de graviola podem ser alternativas eficazes e viáveis no tratamento de afecções fúngicas e bacteriana.

Contrapondo os achados dessa pesquisa, estudos na literatura evidenciaram alta toxicidade para os extratos de graviola, justificada pela presença de acetogeninas, e com ação indutora para inibição do metabolismo celular (Freitas et al., 2017), porém o Cajá apresentou baixa citotoxicidade

em modelos experimentais *in vivo* (Asuquo et al., 2013; Silva et al., 2014). Essas controvérsias em relação aos achados do presente estudo, se deve ao fato de que as partes das plantas e os tipos de extratos avaliados pelos trabalhos da literatura e da presente pesquisa são diferentes, além da presença de compostos como os ésteres serem majoritários nos extratos do presente estudo.

Alinhados os resultados do presente trabalho, apesar da menor atividade antimicrobiana apresentada pelo ECC e evidenciando sua toxicidade seletiva inferior a Nistatina, Fluconazol e Clorexidina, estudos mais aprimorados do mesmo podem indicá-lo como alternativa viável para o tratamento das doenças periodontais e candidíases orais.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o ECC apresenta fraca atividade fungistática e atividade antimicrobiana inferior em relação aos compostos testados. No entanto, demonstra amplo espectro de ação com respectiva atividade bacteriostática e fungistática frente às células de *Candida* spp. e periodontopatógenos, podendo ser considerado alternativa viável como antimicrobiano, apresentando toxicidade seletiva inferior aos fármacos disponíveis comercialmente, usados no tratamento dessas afecções orais.

REFERÊNCIAS

- KOUIDHI, Bochra; AL QURASHI, Yasir Mohammed A.; CHAIEB, Kamel. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbial pathogenesis*, v. 80, p. 39-49, 2015.
- CASARIN, M. et al. RT-PCR quantification of periodontal pathogens in crack users and non-users. *Oral diseases*, v. 23, n. 3, p. 324-330, 2017.
- ZANDBERGEN, Dina et al. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *Journal of periodontology*, v. 84, n. 3, p. 332-351, 2013.
- HAI SHENGALLIS, George. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*, v. 35, n. 1, p. 3-11, 2014.
- MAIA, Melissa Barral; COSTA, Gustavo Silva; DA SILVA, Kelly Cristine Fernandes. Associação entre diabetes mellitus e doença periodontal. *Revista Intercâmbio*, v. 10, p. 181-197, 2017.
- KEESTRA, J. A. J. et al. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontal research*, v. 50, n. 3, p. 294-314, 2015.
- JEPSEN, Karin; JEPSEN, Søren. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology 2000*, v. 71, n. 1, p. 82-112, 2016.
- KANAGALINGAM, J. et al. Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections. *International journal of clinical practice*, v. 69, n. 11, p. 1247-1256, 2015.
- PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases*, v. 17, n. 12, p. 383-392, 2017.
- VIPULANANDAN, G. et al. Dynamics of mixed-Candida species biofilms in response to antifungals. *Journal of dental research*, v. 97, n. 1, p. 91-98, 2018.
- ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-resistant Candida: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of infectious diseases*, v. 216, n. suppl_3, p. S445-S451, 2017.
- DARTEVELLE, Pauline et al. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral Candida albicans associated infections. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- FURLETTI, V. F. et al. Action of Coriandrum sativum L. essential oil upon oral Candida albicans biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1-9, 2011.

ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

PATEL, Ms Sejal; PATEL, Jayvadan K. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 5, n. 1, p. 137-148, 2016.

RADY, Islam et al. Anticancer properties of Graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, p. 1-39, 2018.

BIBA, V. S. et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 3, p. 1595-1604, 2014.

PAI, BH Mithun et al. Anti-microbial efficacy of soursop leaf extract (*Annona muricata*) on oral pathogens: An in-vitro study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v. 10, n. 11, p. 1-4, 2016.

OLUGBUYIRO, J. A. O. Antioxidant activity, DNA damaged protection and apoptosis induction potential of *Vernonia amygdalina* leaf extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 8, n. 7, p. 3122-3127, 2017.

MATTIETTO, R. de A.; LOPES, A. S.; DE MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 13, n. 3, p. 156-164, 2010.

MADUKA, H. C. C. et al. Phytochemical, antioxidant and microbial inhibitory effects of *Spondias mombin* leaf and stem bark extracts. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 9, n. 2, p. 14-17, 2014.

TEMITOPE, Osuntokun Oludare et al. Synergistic Antibacterial and Antifungal Activities of *Spondias mombin* Extracts and Conventional Antibiotic and Antifungal Agents on Selected Clinical Microorganisms. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, v. 5, n. 2A, p. 307-318, 2017.

ADEGOKE, Anthony A.; AIYEGORO, Olayinka A.; STENSTROM, Thor A. Effect of interaction of methanol leaf extract of *Spondias mombin* (Linn) and amoxicillin on some diarrheagenic *Escherichia coli*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 3, p. 475-480, 2016.

CRUZ, José Henrique Araújo et al. *Malva Sylvestris*, *Vitis Vinífera* e *Punica Granatum*: uma revisão sobre a contribuição para o tratamento de periodontite. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*, v. 7, n. 11, p. 486-491, 2019.

CARRERA, G. C. et al. Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl.(Orchidaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 4, p. 938-944, 2014.

MARKHAM, Kenneth R. et al. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry*, v. 42, p. 205-211, 1996.

PROESTOS, Charalampos et al. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food chemistry*, v. 95, n. 1, p. 44-52, 2006.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

TANASIEWICZ, Marta et al. The analysis of cytotoxicity of an experimental preparation used for the reduction of dentin hypersensitivity. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2017.

KRISHNAN, Kannabiran; MANI, Abirami; JASMINE, Subashini. Cytotoxic activity of bioactive compound 1, 2-benzene dicarboxylic acid, mono 2-ethylhexyl ester extracted from a marine derived *Streptomyces* sp. VITSJK8. *International journal of molecular and cellular medicine*, v. 3, n. 4, p. 246-254, 2014.

MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, Maryam et al. Design, synthesis, in vitro cytotoxic activity evaluation, and apoptosis-induction study of new 9 (10H)-acridinone-1, 2, 3-triazoles. *Molecular diversity*, v. 19, n. 4, p. 787-795, 2015.

QIAO, Xin et al. Biological evaluation of a cytotoxic 2-substituted benzimidazole copper (II) complex: DNA damage, antiproliferation and apoptotic induction activity in human cervical cancer cells. *Biometals*, v. 27, n. 1, p. 155-172, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratorial Standards Institute, Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2º ed, 2002.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6º ed, 2005.

WEMMENHOVE, Ellen et al. Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese. *Food microbiology*, v. 58, p. 63-67, 2016.

DÍAZ DE RIENZO, Mayri A. et al. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 2, p. 1-11, 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

CRUZ, José Henrique Araújo et al. *Malva Sylvestris*, *Vitis Vinífera* e *Punica Granatum*: uma revisão sobre a contribuição para o tratamento de periodontite. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*, v. 7, n. 11, p. 486-491, 2019.

SMANSKI, Michael J. et al. Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 135-149, 2016.

ALENCAR, Lianne Carla Batista et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 1, p. 111-116, 2015.

BRITO, Samara Alves et al. Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2018, p. 1-20, 2018.

BOCHNER, Rosany et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 3, p. 537-547, 2012.

RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. SPE, p. 587-590, 2011.

GONDIM, Jussara A. Melo et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Food Science and Technology*, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

ALIGIANNIS, Nektarios et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

MA, Jun et al. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of supercritical fluid extract of *Elsholtzia ciliata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 21, n. 2, p. 556-562, 2018.

KIM, Jung-Eun et al. Antimicrobial constituents from *Allium hookeri* root. *Natural product communications*, v. 11, n. 2, p. 237-238, 2016.

ADESANWO, Julius K. et al. Chemical analyses, antimicrobial and antioxidant activities of extracts from *Cola nitida* seed. *Journal of exploratory research in pharmacology*, v. 2, n. 3, p. 67-77, 2017.

LIM, Hae-Soon et al. Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules*, v. 23, n. 8, p. 1-13, 2018.

HASSAN, Ramadan; EL-KADI, Sherif; SAND, Mostafa. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advances in Biology*, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2015.

PARISE FILHO, Roberto et al. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 3, p. 393-420, 2010.

SANTOS, Cledir. Ciclização intramolecular: uma estratégia promissora no desenvolvimento de pró-fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 3, p. 349-360, 2008.

JALALVAND, Ali R. et al. Chemical characterization and antioxidant, cytotoxic, antibacterial, and antifungal properties of ethanolic extract of *Allium Saralicum* RM Fritsch leaves rich in linolenic

acid, methyl ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 192, p. 103-112, 2019.

PENG, Wanxi et al. Characteristics of antibacterial molecular activities in poplar wood extractives. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 24, n. 2, p. 399-404, 2017.

LIM, Vuanghao et al. Antimicrobial evaluation and GC-MS analysis of *Strobilanthes crispus* ethanolic leaf extract. *European Journal of Medicinal Plants*, v.10, n. 4, p. 1-8, 2015.

LUO, Yu et al. A New hexanedioic acid analogue from the endophytic fungus *Penicillium* sp. OC-4 of *Orchidantha chinensis*. *Chemistry of natural compounds*, v. 53, n. 5, p. 834-838, 2017.

GNAVI, Giorgio et al. The antimicrobial potential of algicolous marine fungi for counteracting multidrug-resistant bacteria: phylogenetic diversity and chemical profiling. *Research in microbiology*, v. 167, n. 6, p. 492-500, 2016.

DA SILVA, GABRIEL ARAÚJO et al. Avaliação da letalidade e atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Spondias mombin* aff. *tuberosa*. *FACIDER - Revista Científica*, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2012.

CROCCO, Elisete I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Chlorhexidine–pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 19, n. 7, p. 1321-1326, 2015.

AYOKA, A. O. et al. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. *African Journal of Biomedical Research*, v. 11, n. 2, p. 129-136, 2008.

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 13, n. 6, p. 494-497, 1999.

AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial effect of aqueous and alcohol extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia*-two local antimicrobial remedies. *International Journal of crude drug Research*, v. 23, n. 2, p. 67-72, 1985.

SAFFARI, Fereshteh et al. The effects of chlorhexidine and persica mouthwashes on colonization of *Streptococcus mutans* on fixed orthodontics O-rings. *Journal of Dentistry*, v. 16, n. 1, p. 54-57, 2015.

FREITAS, Erlania Carmo; DE MORAES, Maria Olímpia Batista; SILVA, Ana Carolina Morais. Metabólitos secundários presentes na *Annona muricata* L e suas propriedades nutricionais e funcionais em oncologia. *RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 11, n. 61, p. 19-22, 2017.

ASUQUO, O. R. et al. Comparative study of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Spondias mombin* on neurobehaviour in male rats. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 5, n. 2, p. 29-35, 2013.

DA SILVA, Gabriel Araujo et al. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 10, n. 1, p. 27-41, 2014.