



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAUDINEY FRANKILIN VASCONCELOS MENDES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *XYLOPIA FRUTESCENS* AUBL. (*ANNONACEAE*)**

Recife

2018

RAUDINEY FRANKILIN VASCONCELOS MENDES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *XYLOPIA FRUTESCENS* AUBL. (ANNONACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração:

Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M538c Mendes, Raudiney Franklin Vasconcelos.
Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Xylopi* frutescens AUBL. (Annonaceae) / Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes. – 2018.
84 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Rafael Matos Ximenes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Faringite. 2. Inflamação. 3. Produtos biológicos. I. Ximenes, Rafael Matos (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-029)

RAUDINEY FRANKILIN VASCONCELOS MENDES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *XYLOPIA FRUTESCENS* AUBL. (ANNONACEAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

Aprovada em: 17/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes. Universidade Federal do Pernambuco
(Orientador)

Prof. Dra. Marcia Vanusa da Silva. Universidade Federal do Pernambuco - UFPE
(Avaliador externo)

Profa. Dra. Marcia Silva do Nascimento. Universidade Federal do Pernambuco - UFPE
(Avaliador externo)

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima neto Universidade Federal do Pernambuco – UFPE
(suplente externo)

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley. Universidade Federal do Pernambuco - UFPE
(suplente interno)

Aos meus pais por todo esforço em ajudar-me a alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joselito e Patrícia por todo esforço para me ajudar a alcançar meus objetivos e mesmo sem entender sobre a ciência sempre estiveram dispostos a participar e me incentivar.

Ao meu irmão João Pedro por acreditar em mim e me fazer sempre ser mais inteligente com tudo que me pergunta e pela responsabilidade de ser um bom irmão que tanto me faz crescer.

Ao meu orientador professor Dr Rafael Matos Ximenes que nesses 5 anos desde a oportunidade de minha iniciação científica tem me ensinado tudo sobre ciências e como ser um grande profissional.

Aos meus colegas do laboratório de etnofarmacologia aplicada, Simone, José Welinton, Maria de Fátima, Camila, Caio Cesar, João Alberto e Ester pela ótima convivência, pelo auxílio nos experimentos, pelos bons momentos e apoio nos momentos difíceis .

A professora Kesia Xisto pelo suporte concedido para os testes microbiológicos, por todo apoio, atenção e paciência e por tudo que me ensinou sobre microbiologia.

A professora Dra Juliana Ferreira por todo apoio nos processos de extração, pelas boas tardes de conversa e pelos chocolates.

Ao professor Dr. Reginaldo Gonçalves, Sandra Sá e a todos da micologia médica pela receptividade e o suporte oferecido para os experimentos.

Ao professor Dr. Eduardo Cassel, Ariely e a todos do laboratório de operações unitárias - LOPE da PUCRS pela receptividade e suporte nas análises olfatométricas.

E ao CNPQ pela concessão da bolsa de auxílio a realização deste trabalho.

RESUMO

Xylopia frutescens Aubl conhecida popularmente como “imbira vermelha”, “imbiriba” ou “pau carne” é uma planta aromática conhecida pelos seus diversos tipos de usos tradicionais como anti-inflamatório, tratamento de halitose e antimicrobiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividade biológica e a composição química dos óleos essenciais extraídos das cascas, folhas, flores e frutos maduro, verdes e secos. O estudo da composição dos óleos essenciais foi realizado por meio de análises qualitativa de GC-MS, quantitativa de GC-FID e de perfil olfativo de GC-O. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelos métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo frente leveduras e bactérias Gram positivas isolados cavidade orofaríngea e microrganismos padrão, também foi avaliada a capacidade de inibir a formação de biofilme e capacidade de remoção de biofilme pré-formado e seu efeito sinérgico com fármacos de referência. Foram realizados testes de citotoxicidade e liberação de óxido nítrico utilizando linhagens de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A caracterização dos óleos essenciais apresentou 52 compostos, majoritariamente de monoterpenos, sendo 34 compostos presentes em todos os óleos extraídos, com α -pineno, β -pineno e mirceno presente entre os compostos majoritários de todos os óleos . Na análise olfatométrica, os óleos essenciais apresentaram aromas diversos e distintos entre si com destaque para óleo essencial dos frutos secos que apresentou maior diversidade de aromas. Na avaliação da atividade antimicrobiana. foram o utilizados os óleos extraídos dos frutos verdes, maduros e secos devido ao seu alto rendimento, para os quais foi observado halos de inibição de 10 a 27 mm, com concentrações mínimas inibitórias de 0,14 a 2,2 μ l/ml e inibição e remoção de biofilme de 57% a 46%. Os óleos essências dos frutos secos e verdes apresentaram efeito sinérgico e aditivo enquanto o óleo do fruto maduro apresentou aditivo e indiferente com o fluconazol frente *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* respectivamente. Na avaliação de inibição de produção de oxido nítrico a concentração 6 μ g/ml foi efetiva sem redução significativa de viabilidade celular. Os óleos essenciais testados apresentaram atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana com efeito sinérgico frente leveduras com destaque para óleos dos frutos secos que também apresentou maior diversidade de aromas, oque indica o potencial de uso no tratamento de infecções orofaríngeas.

Palavras-chave: Faringite. Inflamação. Produtos biológicos.

ABSTRACT

Xylopi frutescens the word popularly known as "imbira vermelha", "imbiriba" or "pau carne" is an aromatic plant in several types of classics such as anti-inflammatory, halitosis and antimicrobial treatment. The objective of the exercise was to evaluate the biological activity and chemical composition of the essential oils extracted from the dried, green and dry peels, leaves, flowers and fruits. The analysis of the results was performed through qualitative analyzes of GC-MS, quantitative GC-FID and olfactory profile of GC-O. The evaluation of the antimicrobial activity was performed by the methods of diffusion in micro-availability and broth front yeasts and Gram-bacteria in oropharyngeal cavities and standard microorganisms, the ability to inhibit the formation of biofilm and the ability to remove pre-molded biofilm and its synergistic effect with reference drugs. Nitric oxide cytotoxicity and release tests were performed with the preparation of RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS. The composition of the oils has the 52 compounds, mainly of monoterpenes, being 34 compounds present in all extracted oils, with α -pinene, β -pinene and myrcene present among the major compounds of all the oils. In olfactory analysis, the essential oils are more aromatic and the greater difference of aromas. In the evaluation of antimicrobial activity. Those were extracted from the green fruits, mature and that escaped the high yield, for which inhibition halos of 10 to 27 mm were observed, with inhibitory concentrations of 0.14 to 2.2 μ l / ml and inhibition and removal of biofilm from 57% to 46%. The fruits of the dried and green seeds have opposite effect and the acid while the mature fluoride is additive and indifferent to fluconazole against *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* respectively. In the production of inhibition of nitric oxide production the 6 μ g / ml was successful without significant reduction of cell viability. The oils are tested for anti-bacterial activity and antimicrobial activity with a synergistic effect against yeasts, highlighting the fruit brands that already had a greater diversity of aromas, which indicates the potential of untreated use of oropharyngeal infections.

Key words: Pharyngitis. Inflammation. Biological products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de síntese dos terpenos.....	24
Figura 2 - Terpenos de maior ocorrência em óleos essenciais.	25
Figura 3 - Principais países produtores de óleos essenciais	27
Figura 4 - Fotos do espécime de <i>Xylopi</i> <i>frutescens</i> Aubl.(A) de seus frutos (B) e inflorescência (C).....	37
Figura 5 - Efeito do óleo essencial dos frutos secos de <i>X. frutescens</i> na viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 de linhagem de macrófagos. Os resultados foram expressos em média ± SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Dunnet's com significância de *p<0.01 ****p<0,0001.....	65
Figura 6 - Efeito do óleo essencial dos frutos de secos de <i>X.frutescens</i> sobre a produção óxido nítrico em células macrófagos estimuladas por LPS. Os resultados foram expressos em média ± SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Dunnet's com significância de *p<0.01 ****	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Espécies de <i>xylopi</i> a com ocorrência no Brasil e suas atividades biológicas	30
Tabela 2 - Coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos e da Micoteca URM do centro de biociências (CB) / UFPE utilizadas no estudo	40
Tabela 3 - Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.....	45
Tabela 4 - Rendimento percentual da extração dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>	50
Tabela 5 - Resultados da técnica da cromatografia gasosa associada a um detector de massas para identificação dos constituintes presentes nos óleos essenciais <i>X. frutescens</i>	51
Tabela 6 - Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais das cascas de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	56
Tabela 7 - Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais das flores de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	56
Tabela 8 - Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais das folhas de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	56
Tabela 9 - Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais dos frutos maduros de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	57
Tabela 10 - Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais dos frutos secos de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	57
Tabela 11 - análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatosmetria dos óleos essenciais verdes de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	58
Tabela 12 - Resultados do ensaio de difusão de disco do óleo essencial de frutos de <i>X. frutescens</i>	58
Tabela 13 - Resultados da determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>	60
Tabela 14 - Efeito sinérgico do óleo essencial dos frutos secos de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	61
Tabela 15 - Efeito dos óleos essenciais dos frutos de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i> na formação de biofilmes de isolados da cavidade orofaríngea.....	62
Tabela 16 - Efeito do óleo essencial dos frutos de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i> na remoção de biofilmes produzidos por isolados da cavidade orofaríngea	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
(-)	Menos
(+)	Mais
±	Aproximadamente
µg	Micrograma
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µl/ml	Microlitro por mililitro
ATCC	American type culture collection
CB	Centro de biociências
CDC	American Centers for Disease Control
CG-FID	Cromatografia gasosa determinada por ionização da chama
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical & laboratory standards institute
CO ₂	Gás carbônico
Da	Dalton
DANTI	Departamento de antibióticos
DEX	Dexametasona
DMEM	Meio eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
EPS	Exopolissacarídeos
Ev	Eletrovolt
FBS	Soro fetal bovino
FM	Frequência modificadora
G	Gramas
GAS	Streptococcus grupo A
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa
H	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC	Co-injeção
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IR	Índice de renteção
LPS	Lipopolissacarídeos
m/v	Massa por volume
MHA	Agar mueller hinton
ml	Mililitros
Mm	Milímetro
MS	Espectro de massa
MTT	4.4 Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

°C	Graus célsius
OMS	Organização mundial de saúde
PFAPA	Febres periódicas com estomatite aftosa, faringite e adenite
PBS	Tampão fostato salino
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RPMI	Meio roswell park memorial institute
THB	Todd hewitt broth
UFC	Unidade formadora de colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
US\$	Dollar americano
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Faringite e afecções orofaríngeas	16
2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	18
2.1.3	<i>Candida spp</i>	19
2.2	Biofilmes e faringite	20
2.3	Óleos essenciais	22
2.3.1	Importância econômica dos óleos essenciais.....	25
2.3.2	Propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais	27
3.5	Família Annonaceae	27
3.6.1	Genero <i>Xylopi</i> a	28
3.6.2	<i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	Isolados microbianos	40
4.2	Coleta, extração e caracterização dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>	41
4.2.1	Análise Olfatométrica.....	42
4.3	Avaliação da atividade biológica dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>	43
4.3.1	Ensaio de difusão de disco.....	43
4.3.2	Determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais.....	44
4.3.3	Avaliação da atividade sinérgica em ensaio de checkerboard.....	44
4.4	Determinação da capacidade do óleo essencial de inibir a formação de biofilme e remover o biofilme pré-formado	45
4.4.1	Ensaio de inibição da formação do biofilme	46
4.4.2	Ensaio da avaliação da inibição do biofilme pré-formado	47
4.5	Animais	47
4.6	Cultura de células	47
4.6.1	Macrófagos peritonias	47

4.6.2	Ensaio de MTT para avaliação de citotoxicidade em células RAW 264.7	48
4.6.3	Dosagem de oxido nítrico por estimulação de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS)	48
4.7	Análise estatística	49
5	Resultados da caracterização química.....	50
5.1	Rendimento e caracterização dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>	50
5.2	Análise olfatométrica	56
5.3	Resultados das atividades biológicas dos óleos essenciais de <i>X. frutescens</i>..	58
5.3.1	Atividade do óleo essencial dos frutos secos de <i>X. frutescens</i> frente bactérias gram-positivas e leveduras isoladas da cavidade orofaríngea	58
5.3.2	Determinação da Concentração inibitória mínima do óleo essencial.....	59
5.3.3	Ensaio de Checkerboarder	60
5.4	Inibição da formação de biofilme pelo óleo essencial dos frutos de <i>X. frutescens</i>	61
5.5	Efeito dos óleos essenciais e <i>Xylopiia frutescens</i> sobre o biofilme pré-formado	63
5.6	Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7.....	64
5.7	Dosagem de oxido nítrico em macrófagos estimuladas por LPS	65
6	DISCUSSÃO.....	66
6.1	Caracterização dos óleos essenciais de <i>X.frutescens</i>.....	66
6.2	Análise olfatométrica	67
6.3	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos de <i>X. frutescens</i> .	68
6.4	Efeito dos óleos essenciais de <i>Xylopiia frutescens</i> na inibição da formação de biofilme e remoção do biofilme pré-formado	69
6.5	Avaliação do efeito sinérgico pelo método de checkerboarder	70
6.6	Avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais.....	71
6.7	Efeito do óleo essencial de <i>Xylopiia frutescens</i> na dosagem óxido nítrico em macrófagos peritoniais estimuladas por LPS	72
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais atualmente corresponde a uma parcela importante das práticas terapêuticas no mundo seja por questões culturais de comunidades tradicionais ou fenômenos contemporâneos resultantes da globalização (BALÈE,2005). Estudos apontam que cerca de 60% da população mundial recorra ao uso de plantas medicinais para os tratamentos de diversas doenças devido a dificuldades no acesso ao atendimento de saúde de qualidade e aos elevados custos (MAZZARI e PIETRO, 2014). Diante disto as pesquisas com plantas medicinais têm contribuído com a descoberta de diversos compostos proporcionando a formulação de medicamentos para o tratamento de diversas doenças (ROSSI et al.,2013).

O gênero *Xylopia* é conhecido por plantas aromáticas amplamente utilizadas para fins culinários, cosméticos e farmacêuticos devido a presença de óleos essenciais, flavonoides, alcaloides e acetogeninas. Diferentes espécies pertencentes ao gênero *Xylopia*, como *X. aromatica*, *X. sericea*, e *X. laevigata* são amplamente utilizadas nas práticas tradicionais para cura ou tratamento de doenças como antitumoral, antibacteriano, anti-inflamatório, anti-espasmolítico dentre outros, sendo muitos desses efeitos documentados na literatura científica. (STASHENKO et al. 2004; COLMAN-SAZARBITORIA et al. 1994; MORAES & ROQUE 1988).

Xylopia frutescens Aubl. (Annonaceae) é uma espécie nativa da mata atlântica, que ocorre principalmente na floresta pluvial amazônica de terra firme com relatos de ocorrência em Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Guiana, Suriname na América do Sul e do Panamá ao México na América do Norte. Esta espécie é conhecida popularmente no Brasil por diversos nomes como “imbira vermelha”, “imbiriba” e “pau carne”. Na medicina tradicional *X. frutescens* é utilizado como anti-helmínticos, antipirético, no tratamento do reumatismo faringite e halitose. Estudos reportam atividades biológicas de compostos de diversas partes da planta, como atividade espasmolítica, tripanocida, anti-inflamatória e atividades antimicrobianas (BRAGA et al., 2000; FERRAZ et al.,2013)

Processos infecciosos do trato respiratório superior são uma das principais causas para a procura de centros de atendimentos primários, as infecções microbianas são capazes de desencadear diversas doenças graves e potencialmente fatais. Esse problema vem sendo observado em hospitais e clínicas que recebem cada vez mais pacientes com problemas de saúde em que estão relacionadas a infecções e contaminações em ambientes cirúrgicos bem com surtos associados a microrganismos patogênicos (SIGN,2012).

As pesquisas de novas substâncias antimicrobianas utilizadas na clínica são

amplamente beneficiadas pelos estudos das atividades dos óleos essenciais. Por serem fontes de substâncias bioativas, as plantas medicinais têm despertado o interesse da indústria farmacêutica para produção de novos fitoterápicos onde já foram observadas atividades antimicrobianas de diversos óleos essenciais (WISSA et al., 2016).

Diante disto, as pesquisas sobre óleos essenciais fornecem dados relevantes para a descoberta de substâncias com indicativo terapêutico e que podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos. Embora existam estudos realizados com extratos e óleos essenciais de *Xylopi* *frutescens*, não existem relatos de estudos que avaliem a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *X. frutescens* frente microrganismos causadores de afecções orais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Faringite e afecções orofaríngeas

A faringite é responsável por 1,1% das visitas nos centros de atenção primária e está classificada entre os 20 principais diagnósticos primários. É caracterizada pela inflamação do tecido da faringe relativamente benigna que pode ser uma doença grave potencialmente fatal, que é percebido pelo paciente como desconforto acompanhado de dor e dificuldade de deglutir, que é frequentemente relatada sob o termo “dor de garganta” nos atendimentos hospitalares (SIGN 2011; WALKER et al.,2014).

A faringite pode ter origens distintas que por vezes se confundem dada similaridade de seus sintomas, a faringite pode ser de etiologia infecciosa ou não infecciosa bem como concomitante. A etiologia não infecciosa da faringite é diversa que incluem fatores físico-químicos como tabagismo, drogas e trabalhos insalubres bem como fatores ambientais como poluição, temperatura e umidade (RENNER et al., 2012; SIGN 2011).

A faringite infecciosa é causada por microrganismos e vírus que possuem a capacidade de colonizar o trato respiratório superior principalmente a cavidade orofaríngea que é localizada imediatamente atrás da boca, revestida por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado, esta cavidade além da sua microbiota está constantemente exposta a microrganismos inalados e ingeridos, os quais são depurados por mecanismos mucociliares tanto do trato respiratório superior quanto do trato respiratório inferior e aqueles contidos na saliva (RENNER et al.,2012; LEMON et al., 2010).

Entretanto, algumas espécies sejam por condições do hospedeiro ou do microrganismo, são capazes de induzir quadros infecciosos como: *Streptococcus spp*, *Candida spp*, *Stapylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, dentre os quadros infecciosos a causa bacteriana é relatada em 36% dos casos de faringite aguda infecciosa graves. Além disso estudos recentes observaram a relação entre microrganismos presentes nas tonsilas palatinas com quadros crônicos de faringites como os presentes na síndrome da febre periódica, estomatite aftosa, faringite e adenite – PFAPA (em inglês), uma síndrome febril da infância, onde foi atribuída aos microrganismos a capacidade de atuar como gatilho de ativação de inflamassomas (LANTTO et., al 2015).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram positiva imóvel, de coagulase positiva, anaeróbica facultativa comensal de pele e mucosas. *S. Aureus* é um microrganismo patogênico humano que causa uma ampla de infecções clínicas que possui como os principais sítios de isolamento nariz, faringe, região vaginal e reto (TONG et al., 2015; 2009; MERTZ et al., 2009; VERHOEVEN et al., 2014).

Estimativas apontam que aproximadamente 30% da população mundial são portadores *S. aureus*, embora nem todos os portadores desenvolvem infecções relacionadas a este microrganismo sendo que os portadores assintomáticos apresentam um risco entre 2 a 12 vezes que não-portadores de desenvolver patologias. Sendo observado em pacientes hospitalizados a prevalência de infecções causadas por *S. aureus* dentre os principais quadros infecciosos, tem sido observado a rápida colonização de *S. aureus* na cavidade orofaringe fazendo parte da flora nosocomial, podendo desenvolver infecções do trato respiratório como infecções invasivas, tendo sido observada prevalência de *S. aureus* associação com outros microrganismos em cerca de 40% dos atendimentos nos EUA de pacientes com infecções orofaríngeas, dados epidemiológicos semelhantes forma observados na Asia onde foi observada a relação de *S. aureus* com microrganismos Gram negativos como fator agravante das infecções orofaríngeas, além de já ter sido isolados tanto adultos quanto em infanto-juvenis com histórico de casos recorrentes de faringites e estomatites bem como em quadros recorrentes de tonsilites em pacientes submetidos a procedimentos de tonsilectomia (GOWRISHANKAR et al., 2016; CHEN et al., 2017; TONG et al., 2015).

Infecções causadas por *S. aureus* possuem características que impõem complicações para o tratamento, como a adaptabilidade metabólica que facilita o patógeno a colonizar e persistir em diversas condições ambientais. Além de uma ampla gama de fatores de virulência incluindo toxinas extracelulares e estruturas superficiais, dentre estes componentes da superfície celular como a proteína A e a capsula bacteriana. A produção de toxinas como leucodina, hemolisina e enterotoxinas, e atividade de enzimas como a coagulase livre e a estafilquinolase responsáveis pela destruição leucocitária e intensas manifestações inflamatórias de necrose tecidual acentuada. Além de ter sido observada a que a produção de biofilmes é um importante fator de virulência de *S. aureus* resistentes a meticilina em casos de infecções do trato respiratório superior (TONG et al., 2015; GOWRISHANKAR et al., 2016 ; XU et al., 2012).

2.1.2 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes são bactérias Gram positivas, beta hemolíticas formadoras de colônia translúcidas. Este microrganismo possui como hábito a colonização de superfícies epiteliais principalmente garganta e pele mas também coloniza outras superfícies, como a vagina e o reto, de onde pode causar uma grande variedade de doenças superficiais, invasivas e imunomediadas como por exemplo a faringite e impetigo de infecções leves, e infecções graves como fascíte necrotizante e síndrome do choque tóxico estreptocócico (WALKER et al., 2014).

S. pyogenes também são conhecidos como GAS - *Streptococcus* do grupo A -segundo uma classificação baseada nos diferentes de carboidratos encontradas na parede celular proposta por Lancefield que pode ser identificado por diversas técnicas imunológicas (GRATZ et al., 2011 ; WALKER et al., 2014). Estudos das últimas duas décadas relatam estimativas globais de 18,1 bilhões de casos de doenças graves relacionadas a infecções causadas por *Streptococcus pyogenes* com 1,78 milhão de novos casos de doenças graves e 517.000 mortes por ano bem como 111 milhões de casos prevalentes de piodermas e 616 milhões casos de faringites por ano (CARAPETIS et al., 2005).

A faringite estreptocócica é a infecção bacteriana de garganta mais comum no centros de atenção primária sendo *S. pyogenes* responsável por 15 a 36% dos casos faringite aguda sendo mais frequente durante a idade escolar, normalmente a infecção é autolimitada com duração de 3 a 5 dias tendo como sintomas principais dor faríngea disfagia e febre, as infecções agudas por *S. pyogenes*, entretanto as infecções persistentes da cavidade orofaríngea são capazes de desencadear complicações supurativas graves como infecções invasivas da faringe, abscesso peritonsilar e adenite cervical com abscesso (MURRAY et al., 2012 ;CARAPETIS et al., 2016)

Atualmente as infecções causadas por *S. pyogenes* são apontados pela OMS como a nona causa de mortalidade no mundo, isto deve-se principalmente ao fato de que as infecções são responsáveis por desencadear graves distúrbios imunomediados pós-infecciosos, como glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, febre reumática aguda e doença cardíaca reumática principalmente em países pouco industrializados. Estudos recentes vem demonstrando que o *Streptococcus pyogenes* possuem um grande repertório de fatores de virulência reguladores que permitem ao *S. pyogenes* colonizar o hospedeiro e lidar com todos os níveis da defesa imunológica do hospedeiro bem como a capacidade formar biofilmes sendo conhecidos mais

de 50 fatores de virulência atribuídos *Streptococcus pyogenes* formadores de biofilmes (FIEDLER et al., 2015; CARAPETIS et al., 2005)

2.1.3 *Candida* spp

Além das espécies bacterianas de importância clínica, os fungos são capazes de infectar seres humanos e causar diversas doenças, acometendo diversos órgãos com diferentes graus de severidade. Dentre estes, pode-se destacar as leveduras do gênero *Candida* que são as causas mais comuns de infecções fúngicas. Cerca de 90% dos casos de infecções por esse gênero são causados por cinco espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, as quais são responsáveis por infecções superficiais de mucosas e cutâneas e também sistêmicas (TURNER et al., 2014)

Na maioria dos casos, as espécies do gênero *Candida* não causam danos ao seu hospedeiro, mas podem apresentar características patogênicas quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão debilitados ou em recém nascidos, que ainda não possuem o sistema imunitário totalmente estabelecido. As doenças causadas por *Candida*, como as candidíases mucocutâneas são geralmente infecções leves ou autolimitadas, como a candidíase oral e vaginal. No entanto, essas infecções superficiais podem ser relacionadas à morbidade significativa, como na candidíase mucocutânea crônica e na candidíase vaginal recorrente. Além disso, espécies de *Candida* causam infecção sistêmica potencialmente fatal, onde as taxas de mortalidade são relatadas em até 80% (SOLL et al., 2016; WHIBLEY et al., 2017).

Leveduras do gênero *Candida* também são capazes de formar biofilme que é um importante fator de virulência, tendo sido observado a formação de biofilme em diversos dispositivos médicos como lentes, cateteres e stents uretais de próteses dentárias bem como no epitélio da orofaringe. No ambiente hospitalar os fungos são a quarta causa mais comum de infecções em que mesmo com a terapia antifúngica atual, sendo observada em cerca de 75% das mulheres ao menos uma vez na vida e ainda com recorrência de 10% dos casos, nas infecções nosocomiais 90% dos pacientes HIV-infectados com AIDS apresentam quadros severos de faringite causados por espécies de *Candida spp* sendo a associação de *Candida albicans* e *Candida glabrata* as espécies mais frequentemente isoladas. Embora tenham sido infecções nosocomiais de importância subestimada, as infecções por *Candida spp* foram relatadas na década de 90 como a quarta agente infeccioso responsável por sepse nosocomial e a primeira em mortalidade a mortalidade associada à candidíase pode chegar a 50% em adultos e até 30% em crianças (SOLL et al., 2016; CHANDRA et al., 2015;

POULAIN, 2015). A candidíase oral é em sua maioria causada por *Candida albicans*, que tem sua virulência atribuída a capacidade de produzir estruturas responsáveis por mecanismos de adesão epitelial e evasão de células fagocitárias (SINGH et al., 2014).

2.2 Biofilmes e faringite

Os microrganismos possuem uma série de adaptações para colonizar o ambiente dentre estas, a capacidade de aderir a substratos formando comunidades sesséis, que são chamadas de biofilmes. A produção de biofilme é parte importante de diversos ecossistemas, entretanto os biofilmes são produzidos por microrganismos são fatores de virulência importante em várias infecções. Isto deve-se a capacidade dos biofilmes formados por microrganismos patogênicos sobreviverem a altas concentrações de agentes antimicrobianos convencionais e a resposta imune do hospedeiro que é dada o nome de recalcitrância que é considerada uma das mais importantes características clínicas dos biofilmes (LEBEAUX et al.,2014)

Os microrganismos formadores de biofilmes possuem diferentes propriedades biológicas quando comparadas ao seus homólogos planctônicos, onde já foi observado a relação de quadro infecciosos persistentes à presença de microrganismos formadores de biofilme. Os biofilmes tem sido relatados em contaminações de dispositivos implantados, como marca-passos, cateteres e lentes de contato, bem como na colonização de tecidos, o que resulta em quadros infecciosos recorrentes potencialmente crônicos como tonsilites, faringite, endocardites, infecções do fígado em fibroses císticas, pedras nos rins, infecções do trato biliar, infecções do trato urogenital, osteomielites e feridas crônicas (BJARNSHOLT,2013).

Os estudos sobre as infecções agudas vêm sido extensamente realizados durante anos principalmente motivadas pelos números relatos de morte a elas atribuídas. Estes estudos proporcionaram diversos avanços terapêuticos para o controle eficaz desse tipo de infecções como o desenvolvimento de vacinas modernas, antibióticos e melhores técnicas de assepsia. Embora as pesquisas voltadas ao tratamento de infecções agudas tenham obtido avanços significativos o tratamento para infecções relacionadas a microrganismos formadores de biofilmes ainda representam um desafio a ser superado. Isto deve-se a aspectos comuns relacionados a complicações de quadros patológicos crônicos, como progressão lenta e sintomas relativamente mais suaves em estágios iniciais, que por vezes tornam a detecção dos agentes responsáveis tardia e por consequência dificulta a definição em tempo hábil de uma terapia mais eficiente. Contudo o maior desafio deve-se principalmente a características fenotípicas destes microrganismos, como resistência aos tratamentos convencionais através

mecanismos como a composição da matriz extracelular, complexidade estrutural do biofilme e alterações nos mecanismos de expressão de genes relacionados a resistência como os de bomba de efluxo e suas adaptações metabólicas (HAUSSLER,2013; COSTERTON,1995). Diante disto o número de estudos relacionados a infecções causadas por microrganismos formadores de biofilmes e suas complicações bem como possíveis novos agentes terapêuticos vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas por meio de estudos *in vivo* e *in vitro* (BJARNSHOLT,2013).

Dentre todas as características dos microrganismos formadores de biofilmes estudadas, a que vem despertado o maior interesse dos pesquisadores tem sido os aspectos relacionados ao a composição e a complexidade estrutural do biofilme em seu diversos substratos bem como as diferenças relacionadas aos diferentes microrganismos produtores de biofilme, e os aspectos que influenciam sobre os quadros clínicos, os tratamentos convencionais e os possíveis novos agentes terapêuticos (XIAO et al., 2012; HAUSSLER,2013). A partir destes estudos foi possível observar que a produção de uma matriz extrapolimérica conferem os microrganismos formadores de biofilme a capacidade de aderir firmemente a diversos substratos tanto biótico como abióticos bem como manter a integridade estrutural do biofilme proporcionando uma conformidade multicelular em que as células adquirem a capacidade comunicar-se mais eficiente (XIAO et al.,2012;BJARNSHOLT.2013). Ainda foi observado que a composição da matriz extrapolíssacarídea é complexa e diversa dependendo do tipo de microrganismo e do local de colonização, já tendo sido observada presença de uma grande variedade de proteínas, lipídios, ácidos nucléicos extracelulares, polissacarídeos e outros biopolímeros de origem microbiana. A presença ou ausência destes compostos oferecem a matriz extracelular diversas características relacionadas a proteção da comunidade formada que pode ser contra dessecação, biocidas oxidantes, antibióticos, cátions metálicos, radiação ultravioleta e protozoários herbívoros bem como maior aporte nutricional para seu metabolismo atuando como um centro de reciclagem, mantendo todos os componentes das células lisadas disponíveis (FLEMING; WINGENDER, 2010).

Em substratos bióticos como a cavidade oral, a formação de biofilmes ainda representam ainda um grande desafio fomentando o interesse sobre as suas características e de como os agentes etiológicos se relacionam com este microambiente, sendo os biofilmes mais bem descritos deste sítio de isolamento os de microrganismos causadores de caries ou doenças periodontais frequentemente estudados pela casuística da clínica odontológica (BJANSHOLT,2013). Entretanto recentemente a influência da formação do biofilme em doenças do trato respiratório superior vem sendo observada em diversas doenças como fibrose

cística, panbronquiolite difusa e bronquiectasia com infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (KOBAYASHI, 2015) e faringite causadas por *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp* (FIEDLER et al., 2015) Os biofilmes presentes nas mucosa do trato respiratório como os de microrganismos causadores de faringite são compostos por microrganismos agregados envolvidas por uma matriz contendo carboidratos ou com o epitélio adenotonsilar formando reservatórios que atuam como fonte de infecções crônicas dos tecidos adjacentes, que apresentam-se clinicamente na forma de hipertrofia faríngea e/ou tuba tonsilar oque pode resultar no bloqueio faríngeo causando a subsequente abertura da tuba de Eustáquio sendo responsável por quadros de otites crônicas pela hipoventilação do ouvido médio. A hipertrofia do tecido tonsilar da faringe é resultado da resposta inflamatória como parte da reação imune causada pela liberação de metabólitos tóxicos como compostos voláteis a base de enxofre produzidos por microrganismos aeróbicos formadores de biofilme presentes nas criptas tonsilares. Em quadros de faringites relacionados aos diversos microrganismos formadores de biofilmes são observadas características singulares no que diz respeito a funções exercidas pela matriz extracelular que assemelham-se a características da matriz de biofilmes dentais no que tange seu arranjo e função sobre a superfície colonizada, de maneira que a disposição com que os biofilmes se estruturam condicionam o ambiente da cavidade orofaríngea de modo que o processo de acidificação inata da formação é mantida pela conformação de zonas de heterogeneidade de Ph, através da formação de micro colônias espacialmente difusa onde a produção de polímeros de glicano conferem proteção contra os mecanismos de neutralização como os da saliva (XIAO et al., 2012; GOWRISHANKAR et al., 2016).

2.3 Óleos essenciais

Materiais provindos de plantas são utilizadas pelo homem desde tempos remotos de maneiras que o uso de plantas para os mais diversos fins desde alimentar, medicinal e ritualístico representam parte importante da cultura de muitos povos, dentre estes materiais podemos destacar os óleos essenciais , termo cunhado por Paracelso no XVI , que acreditava que as plantas possuíam propriedades curativas devido a algo que ele chamou de quintessência e que podem ser extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, principalmente originadas de especiarias e ervas medicinais. Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas

medicinais são creditadas aos óleos essenciais. Fisicamente, os óleos essenciais se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou por enfleuragem. O óleo obtido de uma de planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et. al., 2008 ; BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais são substâncias relativamente complexas com cerca de 20 a 60 componentes bioativos diferentes podem ser observados em muitos desses óleos essenciais. Muitos destes compostos são apreciados farmacologicamente pelas suas numerosas propriedades terapêuticas (SWAMY et al., 2015; BAKKALI et al., 2008). A maioria dos óleos essenciais é composta de terpenos, terpenóides e outros constituintes aromáticos e alifáticos de baixo peso molecular. Os terpenóides constituem uma classe de produtos naturais obtidos de plantas de variedade estrutural e funcional, alguns destes compostos participam de processos como respiração e desenvolvimento celular.

Os terpenos são produzidos no metabolismo secundário através de duas vias **Figura 1** que produtoras dos precursores isopentenil difosfato e seu isômero isômero dimetilalil difosfato sintetizados no citoplasma da célula por meio da via do ácido mevalônico, através da ação da enzima isopentenil difosfato-isomerase, ou pela via plastídica de Rohmer a partir da condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de gliceraldeído 3- fosfato, originando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato 2C- e rearranjado em metil-D-eritritol-4-fosfato pela enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reduto.isomerase e posteriormente produzido isopentenil difosfato e isômero dimetilalil difosfato que serão o substrato para a síntese dos terpenóides pela enzima trans-isoprenil-difosfato sintetase.

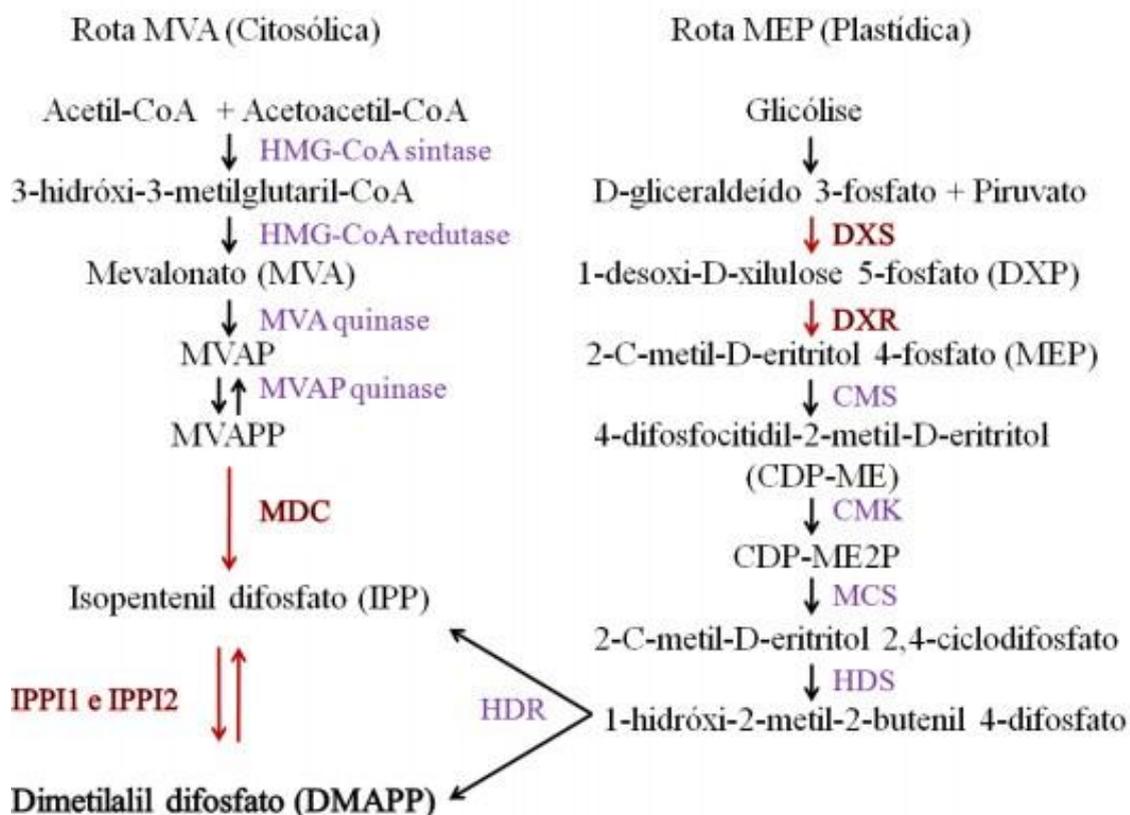


Figura 1. vias de síntese dos terpenos

Sendo os terpenos classificados como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos, bem como em relação a quantidade de unidades de isopreno como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, e triterpenos (BAKKALI et al., 2008). Eles são constituintes principais encontrados em 90% dos óleos essenciais bioativos **Figura 2.** que incluem hidrocarbonetos monoterpênicos (p- cimeno, limoneno, α - pineno e α -terpineno), monoterpenos oxigenados (cânfora, carvacrol, eugenol e timol), diterpenos (cembreno C, caureno e canforeno), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (β - cariofileno, germacreno D e humuleno), sesquiterpenos oxigenados (espatulenol, óxido de cariofileno), álcoois monoterpenos (geraniol, linalol e nerol), álcoois sesquiterpênicos (patchoulol), aldeídos (citral, cuminal), ácidos (ácido gerânico, ácido benzóico), cetonas (acetofenona, benzofenona), lactonas (bergapten), fenóis (eugenol, timol, carvacrol e catecol), ésteres (acetato de bornila, acetato de etila) e cumarinas (fumarina, benzofurano) (BAKKALI et al., 2008; SWAMY et al., 2016).

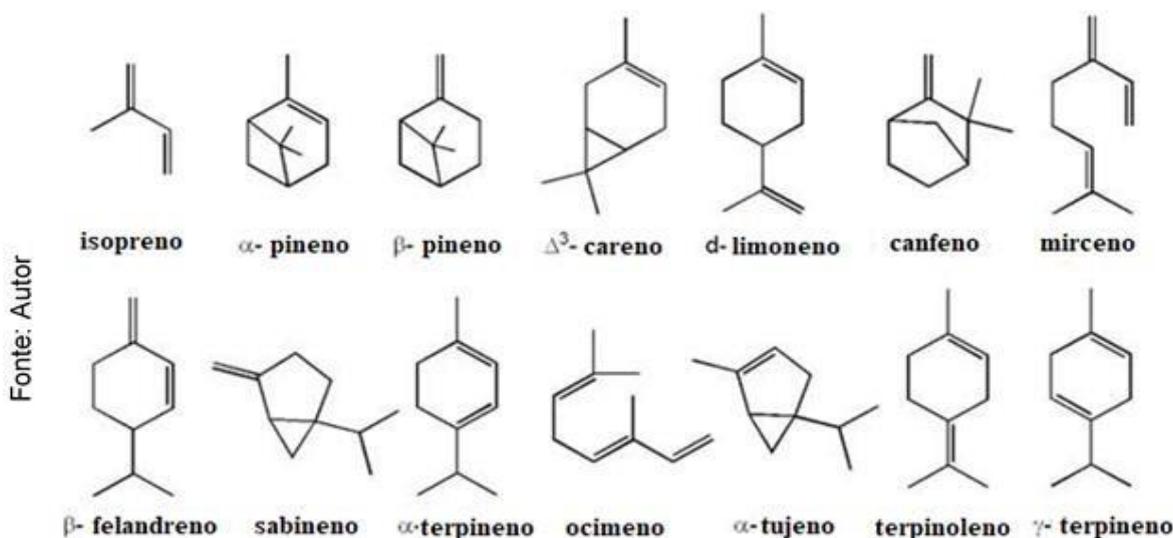


Figura 2. terpenos de maior ocorrência em óleos essenciais.

2.3.1 Importância econômica dos óleos essenciais

Os avanços científicos e o conseqüente empenho para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, tem apontado os produtos de origem natural como os das plantas medicinais como uma importante fonte de recursos para vários campos, como as indústrias farmacêutica, de sabor e fragrâncias, perfumaria e cosmética (SWAMY et al.,2016). Diante disto estabeleceu se um novo mercado que de acordo com estimativas recentes, o valor dos produtos de origem vegetal no mercado global é de aproximadamente 62 bilhões de dólares, e prevê-se que cresça até 5 trilhões de dólares até 2050, com as pesquisas para o desenvolvimento deste tipo produtos mais de 9000 plantas nativas foram identificadas e registradas por suas propriedades curativas, e cerca de 1500 espécies são conhecidas por seu aroma e sabor. Dentre estes produtos de maior valor agregado os à base de óleos essenciais ou produtos químicos de aroma naturais têm maior demanda nas indústrias de cosméticos, alimentos, perfumes e farmacêuticos, e mais de 250 tipos de óleos essenciais, no valor de US\$ 1,2 bilhão, são comercializados anualmente no mercado internacional (SWAMY et al.,2016). Segundo estimativas do Dr. Brian Lawrence, editor do Journal of Essential Oil Research, a produção global dos 20 principais óleos essenciais chega a aproximadamente 104.000 toneladas. Este valor aborda não apenas a indústria de cosméticos, mas também outras indústrias, como alimentos, produtos farmacêuticos e domésticos. Além disso, ao lado destes 20, há uma enorme gama de óleos menores, como óleo de cominho, óleo de alcaravia, óleo de valeriana, etc. Em termos de fragrâncias e indústria cosmética, a Europa Ocidental representa uma grande fatia de

mais de 31% do mercado global de cosméticos e produtos de higiene, seguido pela América do Norte e Ásia Pacífico. A indústria farmacêutica de óleos essenciais, também é dominada por grandes empresas multinacionais, e a América do Norte, a UE e o Japão são os três maiores mercados. Os principais produtores de óleos essenciais são os EUA (23%), China (20%), Brasil (8%), México (5%), Marrocos (5%), Indonésia (5%), Índia (4%) e Egito (2%) **Figura 3**. Estima-se que cerca de 65% da produção mundial emana de países em desenvolvimento. Os principais consumidores são os EUA (40%), a Europa Ocidental (30%) e Japão (7%). Em uma escala global, os 18 óleos essenciais mais importantes representam quase 75% do valor total da produção. A concentração em toneladas é ainda maior, pois há um comércio de pequenos volumes de produtos com altos valores unitários. Alguns países (Estados Unidos da América, França, Reino Unido, Japão e Alemanha) dominam o mercado mundial de importação de óleos essenciais. O Estado Unidos da América é o principal importador com 14% de participação ou US\$ 390,9 milhões de importações em 2005. Os Estados Unidos da América, a França, a Índia, o Reino Unido e o Brasil são os cinco principais exportadores de óleos essenciais no mundo. Juntos, eles exportaram US \$ 936,3 milhões em produtos essenciais, representando cerca de 40% das exportações mundiais. Novamente, os EUA são o maior exportador, com US\$ 351,7 milhões em exportações ou 17% das exportações totais mundiais (DEVI et al., 2015). Plantas produtoras de óleos essenciais recebem o nome de plantas aromáticas devido as propriedades organolépticas características dos óleos essenciais extraídos destas plantas, que são uma mistura de substâncias químicas variadas que pertencem a diferentes famílias químicas, incluindo terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres, fenólicos, éteres e cetonas (DEGHENRARDT et al., 2009). Os óleos essenciais dada a sua composição, são produtos versáteis com amplo potencial de mercado devido às suas propriedades únicas de sabor e fragrância e também atividades biológicas, que podem ser empregados na aromaterapia e para o tratamento de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, doença de Alzheimer, câncer bem como suas

propriedades antimicrobianas (DUSCHATZKY et al., 2005).

2.3.2 Propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais

A eficácia dos óleos essenciais difere de um tipo para outro, sendo essas diferenças associadas ao tipo de extração, órgão a ser extraído, estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais as quais a planta está submetida, bem como contra diferentes microrganismo alvo, dependendo da sua estrutura. Um dos mecanismos dos óleos essenciais esta capacidade de desestabilizar principalmente a arquitetura celular, levando à degradação da integridade da membrana e ao aumento da permeabilidade, o que interrompe muitas atividades celulares incluindo a produção de energia, transporte de membrana e outras funções regulatórias metabólicas. O rompimento da membrana celular causada por óleos essenciais pode interferir em vários processos vitais, como processos de conversão de energia, processamento de nutrientes, e a síntese de macromoléculas estruturais bem como na secreção de reguladores de crescimento. Estes mecanismos estão relacionados a características físicas dos óleos essenciais, como a sua natureza lipofílica que é capaz de alterar a permeabilidade da membrana ocasionando a perda de interferindo nos potenciais de membrana causando rompimento de bombas de prótons e por consequência redução da eficiência energética (TURINA et al., 2006).

3.5 Família Annonaceae

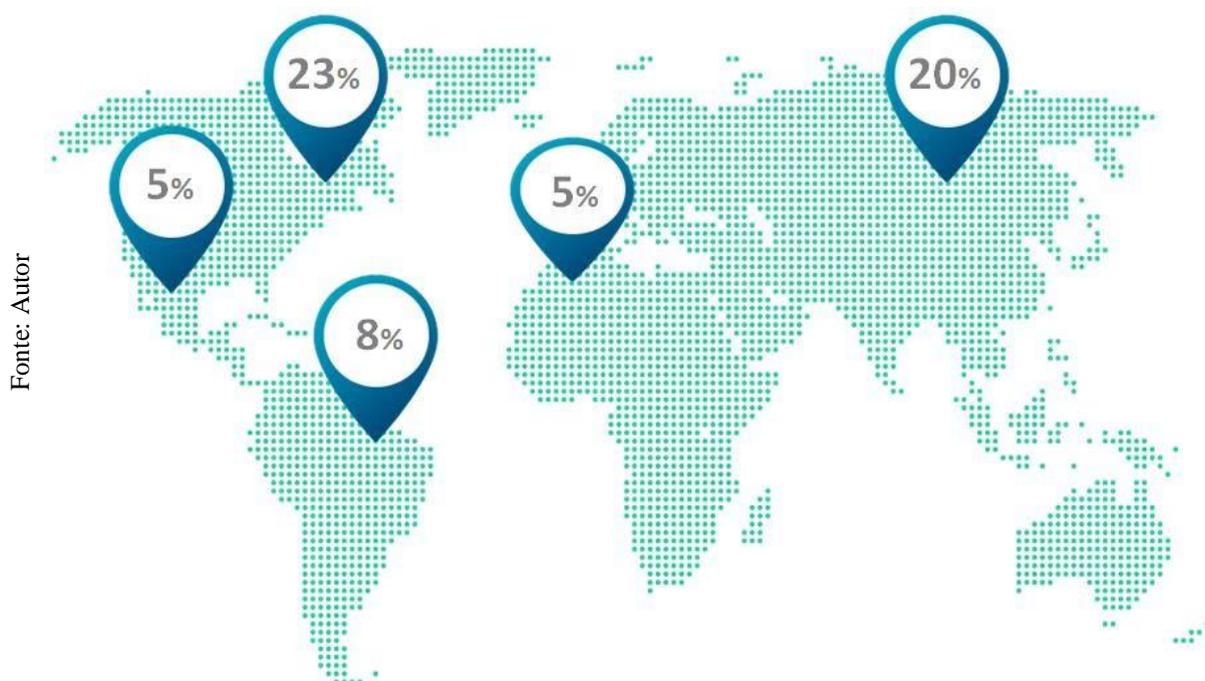


Figura 3 principais países produtores de óleos essenciais

A família *annonaceae* é uma das maiores famílias do reino vegetal, dividida em quatro subfamílias *ambavioideae*, *anaxagoreoideae*, *annonoideae* e *malmeoideae* contendo 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros, dos quais 12 ocorrem no Brasil (HUTCHINSON, 1973) Sua distribuição geográfica é pantropical, ocorrendo quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985), sendo que no neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies.

Em termos taxonômicos, a família *annonaceae* constitui um grupo muito uniforme, seja do ponto de vista anatômico, estrutural, de hábito e habitat, distinguindo-se por apresentarem uma combinação de características bem marcantes. No Brasil, foram registrados 29 gêneros compreendendo cerca de 260 espécies. As plantas dessa família são arbóreas, sendo as trepadeiras também bastante frequentes. Além de seus frutos, na maioria dos casos, serem comestíveis também são muito usados na medicina popular (CHATROU; RAINER e MAAS, 2004).

A família *annonaceae* é fonte de diversos compostos biologicamente ativos, dentre estes terpenoides em sua maioria de diterpenos, alcaloides em sua maioria isoquinolínicos e lignoides, além de óleos essenciais e as acetogeninas. Sendo as acetogeninas uma classe de compostos exclusivos a família *annonaceae* que vem despertando o interesse devido suas propriedades citotóxicas frente diversas linhagens tumorais. Além de serem utilizados para fins cosméticos, culinários e de perfumaria, diferentes grupos de metabólitos obtidos de plantas da família *annonaceae* tem apresentado diversas atividades biológicas como: bactericida em alcaloides; antifúngica de terpenos; citotóxicas de flavanonas; antitumoral de diterpenos e alcaloides (QUÍLEZ et al., 2018; SILVA et al., 2015)

3.6.1 Gênero *Xylopia*

Dentre a família *annonaceae* e pertencente a subfamília *Anaxagoreoideae* o gênero *xylopia* com cerca de 160 espécies, com distribuição pantropical distinguem-se dos demais gêneros pela presença de carpódios livres e frutos deiscentes. As espécies desse gênero são descritas principalmente na forma de arbustos e árvores de até 35m, muitas destas conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividade farmacológica (SILVA et al., 2015)

No Brasil ocorrem 34 espécies do gênero *Xylopia*, muitas possuem relatos na literatura das mais variadas atividades biológicas, como descritos na **Tabela 1**, onde pode-se observar atividades desde extratos vegetais e óleos essenciais a compostos isolados que incluem

acetogeninas, alcaloides isoquilidínicos, flavonóides, sesquiterpenos e diterpenos tipo labdano e caurano. Os terpenoides são substâncias comuns às espécies de *Xylopia*, sendo estes terpenoides, compostos característicos deste gênero, tornando-os importantes como marcadores quimiotaxonômicos (SILVA et al., 2015).

Quadro 1. Espécies de xylopias com ocorrência no Brasil e suas atividades biológicas

Espécies	Sinônimos	Constituintes químicos voláteis	Constituintes Químicas Fixas	Atividades biológicas	Referência
<i>Xylopias amazonica</i> R.E.Fr.	-		Dicentrinona, Liriodenina Aduto Diterpeno (3 e 4)	Antioxidante Antiplasmodial Antidiarreia	Arango et al. (2004) Lima et al. (2015) Vilegas et al. (1991)
<i>Xylopias annoniflora</i> Pombo & C.E.Zartman	-				Pombo (2017)
<i>Xylopias aromatica</i> (Lam.) Mart.	<i>Uvaria aromatica</i> Lam. <i>Xylopias grandiflora</i> A.St.-Hil.	Óleo essencial Óleo essencial da folha e casca Óleo essencial das folhas (biclogermacreno, espatulenol, e limoneno) Óleo essencial folha, flor e fruto	Asimicina, Venezenina, Ácido caurenico, 16- α -ácido-hidroxi-caurenico, Ácido caurenico, Dímero de Guaiano Dímero de Labdano Xilopieno, Xilomatenina, Aromina, Aromicina, Diterpenos Caurenico, 2,4-cis-venezinona, 2,4-trans- venezinona, ácido ent-labda-8 (17), 13 (16), 14-trien-18-oico, sitosterol, estigmasterol, éster metílico do ácido ent-lab-8 (17), 14-dien-13,16-dial-18- oico, ácido ent-labdan-13,16-diol-8 (17), 14-dien-18-oico, ent-traciloban	Antiplasmodial, Citotoxicidade contra linhas celulares de câncer, Antibacteriano Melhorar a resistência à glicose e inflamação do fígado em um modelo de síndrome metabólica de ratos, Antiviral Alelopático, Larvicida (<i>A. aegypti</i>), Inibição de 5-LOX, Anti-inflamatório	Stashenko et al. (2004) Colman-Saizarbitoria et al. (1994, 1995, 1996) Moraes & Roche (1988) Alfonso et al. (1996) Fournier et al. (1994a) Martins et al. (1998, 1999) Melo et al. (2001) Garavito et al. (2006) Maia et al. (2005) Mesquita et al. (2007) Alves et al. (2000) Andrade et al. (2004) Oliveira et al. (2014, 2018) Simoni et al. (2007) Inoue et al. (2009) Rodrigues et al. (2006)

			3 β -ol, ent-atisan-16 α , 18-diol, ácido ent-atisan-16 α -ol-18-oico, ent-traquiloban-3 β -acetoxi, ent-18-nor-atisan-4 β , 16 α -diol, ent-18-nor-atisana-4 β - hidroperóxido-16 α -ol, ent-19-nor-atisan-4 (18) -en- 16 α -ol, N-trans-cafeoilctilamina, canabisina B		Braga et al. (2000) Pino et al. (2000) Estrada et al. (2013) Silva et al. (2010) Suffredini et al. (2007)
<i>Xylopiatlantica</i> Mello-Silva & J.C.Lopes	-				
<i>Xylopiabarбата</i> Hoffmanns. ex Mart.	-				
<i>Xylopiabenthamii</i> R.E.Fr.	<i>Xylopiulei</i> Diels		Nornantenina, Laurotetanina, trans-feruloiltiramina, cis-feruloiltiramina, 2-hidroximanol		Pimenta & Mendonça (2012) Jagessar & Maxwell (2012)
<i>Xylopiabrasiliensis</i> Spreng.	<i>Xylopiabrasiliensis</i> var. <i>gracilis</i> R.E.Fr. <i>Xylopiagracilis</i> (R.E.Fr.) R.E.Fr.	Óleo essencial das folhas (espatulenol, verbenona, e 1,8- cineol)	espatulenol, aromadendrane-4 α , 10 β -diol, aromadendrane-4 α , 10 α -diol, aloaromadendrane-4 β , 10 α -diol, aromadendrane-4 β , 10 α , 15- triol, sitosterol, stigmasterol, sitosterol-3- β -D-galactósido, ácido caurenóico, Ácido 16- α -hidroxi-cauranóico, ácido xilopico,	Antifúngico	Lago et al. (2003) Moreira et al. (2003) Melo et al. (2001)
<i>Xylopiacalophylla</i> R.E.Fr.	-				
<i>Xylopiacayennensis</i> Maas	<i>Xylopialongifolia</i> (Sagot) R.E.Fr.	Oléo essencial das folhas (α - pineno, β -pineno, cariofileno oxide, biciclogermacreno, germacreno D, e 1,8-cineol)	Ácidos graxos (ácidos palmítico e oleico)	Efeitos cardiovasculares	Maia et al. (2005) Fournier et al. (1993a) Nascimento et al.

		Óleo essencial dos frutos e sementes (α -Felandreno, limoneno, e p-cimeno) Óleo essencial das flores (p-cimeno e spatulenol) Óleos essencial das folhas (α -pineno e trans-pinocarveol) Óleo essencial das cascas (bornel acetato, e δ -cadinol) Óleo essencial raiz(trans-pinocarveol)			(2006)
<i>Xylopi</i> <i>crinita</i> R.E.Fr.	-				
<i>Xylopi</i> <i>cuspidata</i> Diels	-				
<i>Xylopi</i> <i>decorticans</i> D.M.Johnson & Lobão	-				
<i>Xylopi</i> <i>discreta</i> (L.f.) Sprague & Hutch.	<i>Unona discreta</i> L.f.		Xylopina	Antileishmanial, Imunomodulador	Lopéz et al. (2009) Sivori and Jatimliansky (1970)
<i>Xylopi</i> <i>egleriana</i> Aristeg. ex Maas	-				
<i>Xylopi</i> <i>emarginata</i> Mart.	-	Óleo essencial das folhas (espatulenol) Óleo essencial das folhas (espatulenol, cariofileno oxide, mirtenol, e trans-pinocarveol)	Aduto de diterpeno (1 e 2), Emarginatina A, Emarginatina B, Ximarginatina, óxido de cariofileno, espatulenol, 1p, 6a-di-hidroxi-4 (15) - eudesmeno, 4-hidroxi-1,15-peroxi- eudesmano, nonadecano, 1 nonadeceno, hentriacontan- 16-um	Antiplasmodial, Inibidor de mitocôndrias cadeia de transporte de elétrons,	Vilegas et al. (1991) Maia et al. (2005) Mesquita et al. (2007) Lago et al. (2005) Moreira et al. (2006, 2007) Fischer et al. (2004) Colman-Saizarbitoria et al. (2009)
<i>Xylopi</i> <i>excellens</i>	-				

R.E.Fr. <i>Xylopi frutescens</i> - Aubl.		Óleo essencial das folhas (E)- cariofileno, biciclogermacreno, germacreD, δ -cadineno, viridifloreno e α -copaeno) Óleo essencial das cascas do caule (δ -cadinol, e α -cubebeno)	Ácido frutóico, Ácido ent-15 α -acetoxi-caur-16- en-19-oico (ácido xilopico), ácido ent-caur-16-en-19-oico (ácido caurenoico), ent-16 β -hidroxi-caurano, ent-caur-16-en-19-ol, Ácido ent-16 β -hidroxi-cauran- 19-oico, ent-16 β , 17-di-hidroxicaurano- Ácido 19-óico, ácido acutiflorico, Ácido 7 β -hidroxi-acutiflorico, Ácido 16- α -hidroxi-Cauranóico, sitosterol,	Inibição de 5-LOX, Citotoxicidade contra linhas celulares de cancro, Antitumoral Antimicrobiano Tripanocida	Braga et al. (2000) Ferraz et al. (2013) Silva et al. (2013) Fournier et al. (1994b) Takahashi et al. (1995) Melo et al. (2001)
<i>Xylopi involucrata</i> M.C.Dias & Kinoshita					
<i>Xylopi laevigata</i> (Mart.) R.E.Fr.	<i>Annona</i> <i>laevigata</i> Mart.	Óleo essencial das folhas (γ - muuroleno, δ -cadineno, germacreno B, α -copaeno, germacreno D, biciclogermacreno, e (E)-cariofileno)	Liriodenina, Lanuginosina, Discretina, norisoboldina ou laureiptina, Lautrotetanina, norboldina ou laurólitsina, Reticulina, Stepharine, Coreximina	Citotoxicidade contra linhas celulares de cancro, Larvicida (<i>A. aegypti</i>), Antimicrobiano, Tripanocida	Quintans et al. (2013) Silva et al. (2013) Costa et al. (2013a, 2013b)
<i>Xylopi langsdorfiana</i> A.St.-Hil. & Tul.	<i>Xylopi lanceolata</i> R.E.Fr.	Óleo essencial das folhas (germacrene D, trans- β -guaieño β - cariofileno, and α -pineno)	Xylodiol, (8) 17,12E, ácido 14- labdatrieno-18-óico, Ácido ent-7 α - acetoxiltraciloban-18-óico, Ácido ent-7 α -hidroxiltraciloban- 18-óico,	Citotoxicidade contra linhas celulares de cancro, Moluscicida, Espasmolítico no músculo traqueal, gastroprotetor, anti-inflamatório antinociceptivo	Castello-Branco et al. (2011) Tavares et al. (2007) Ribeiro et al. (2007) Santos et al. (2012) Martins et al. (2013) Montenegro et al. (2014) Melo (2009)

<i>Xylopi</i> <i>ligustrifolia</i> Humb. & Bonpl. ex Dunal	-			
<i>Xylopi</i> <i>longicuspis</i> R.E.Fr.	-			
<i>Xylopi multiflora</i> R.E.Fr.	-			
<i>Xylopi neglecta</i> (Kuntze) R.E.Fr.	<i>Xylopicrum</i> <i>neglectum</i> Kuntze <i>Xylopi</i> <i>parviflora</i> Spruce		Xylopinidina, Desidrocoreximina, N, N-dimetilanomurina, N-metilpebina, Picnarrina, Lotusina, Sal 6,7-dimetoxi-2-metil- isoquinolio, 1,2-desidroreticulina, (-) - phellodendrine, (+) - tembetarine, (-) - litcubina, (+) - magnoflorina, tetrahidroreticulina, (-) - oblongo, (+) - menisperina, (+) - N-metilcorydina, stefaranina, (+) - xantogoplano, desidrodiscetina, jatrorrizina, palmatina 3,4-di-hidro-6,7-dimetoxi-2- metil-isoquinolio, N-metilpurpuerina	Nishiyama et al. (2004)
<i>Xylopi nervosa</i> (R.E.Fr.) Maas	<i>Oxandra</i> <i>nervosa</i> R.E.Fr.			
<i>Xylopi nitida</i> Dunal	<i>Xylopi nitida</i> var. <i>nervosa</i> R.E.Fr.	Óleo essencial das folhas (γ - terpineno, p-cimeno, α -terpineno, e limoneno)	traquilobano, ácido traquiloban-19-oico, ácido traquiloban-18-oico,	Maia et al. (2005) Fournier et al. (1993b)

		Óleo essencial das folhas (p-cimeno e β -cariofileno)	ácido caurenico, Ácido 16 α , 17-epoxi-19-caurônico		Vieira et al. (2009)
<i>Xylopiya ochrantha</i> Mart.	-	Óleo essencial das folhas (germacreno D, biciclogermacreno, silvestreno, o-cimeno) Óleo essencial dos frutos (α -felandreno, β -felandreno, sabineno, e β -ocimeno)	Campesterol, estigmasterol, γ -sitosterol, quercitrina, luteolina-7-O-rutinosida,		Albuquerque (2013)
<i>Xylopiya polyantha</i> R.E.Fr.	-				
<i>Xylopiya rigidiflora</i> Bagstad & D.M.Johnson	-				
<i>Xylopiya sericea</i> A.St.-Hil.	<i>Xylopiya intermedia</i> R.E.Fr.	Óleo essencial das raízes(p-cimeno, and α -gurjuneno) Óleo essencial das folhas (cubenol and α -epi-muurolol) Óleo essencial dos frutos (β -pineno, e α -pineno) Óleo essencial frutos secos 1,8-cineol e p-cimeno) Óleo essencial dos frutos secos (espatulenol, guaiol,e germacreno D) óleo essencial das folhas (β -ocimeno, γ -elemeno, γ -muuroleno, β -cariofileno, e β -elemeno) Óleo essencial dos frutos(mirceno, β -pineno, e β -elemeno) Óleo essencial das raízes (β -pinene) Óleo essencial do caule (β -pineno e α -gurjuneno)	ácido ent-caur-16-en-19-oico, ácido ent-15a-acetoxicauro-16-en-19-óico, ent-cauran-16b-ol, ácido ent-16b-hidroxiacaurano-19-óico, metil ent-15-atisene-19-oato, metil ent-beier-15-en-19-oato, Ácido ent-15a-hidroxitraquiloban-19-oico, metil ent-15a-acetoxitraxiloban-19-oato, ácido ent-traquiloban-19-oico, metil ent-traquiloban-19-oate, metil ent-traquiloban-18-oate, 3 β , 6 β -di-hidroxi-p-mentol-1-eno	Acaricida Antioxidante Anti-inflamatório	Fournier et al. (1994b) Takahashi et al. (2001) Pontes et al. (2007) Craveiro et al. (1986) Câmara et al. (1996) Mendes et al. (2017a e b)
<i>Xylopiya spruceana</i> Benth. ex Spruce	-				
<i>Xylopiya trichostemon</i>	-				

R.E.Fr.	
<i>Xylopi</i> <i>uniflora</i>	-
R.E.Fr.	
	-
<i>Xylopi</i> <i>xylantha</i>	
R.E.Fr.	

3.6.2 *Xylopia frutescens*

X. frutescens é uma árvore perene com uma coroa alongada e espalhada e ramos horizontais muito característicos tem um caule cilíndrico reto que pode ter de 20 a 30 cm de diâmetro. A árvore cresce de 4 a 8 metros de altura é perenifólia, heliófita, seletiva xerófita, pioneira, característica e exclusiva da floresta pluvial amazônica de terra firme com relatos de ocorrência em Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Guiana, Suriname na América do Sul e do Panamá ao México na América do Norte **Figura 4**. Apresenta elevada frequência, com dispersão contínua variável, mas irregular ao longo de sua região de distribuição. Ocorre preferencialmente em formações secundárias de terrenos arenosos e de baixa fertilidade, produzindo por ano abundante quantidade de sementes viáveis, largamente disseminadas em síndromes de ornitofilia. Possui diversos usos de cordoaria, medicinais, ornamentais, além do seu emprego como condimento e na indústria de perfumaria (DI STASI HIRUMA-LIMA, 2002), entretanto, ainda é considerada pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como farmacológicos.



Figura 4. Fotos do espécime de *Xylopia frutescens* Aubl.(A) de seus frutos (B) e inflorescência (C).

Suas sementes são usadas na medicina popular em comunidades tradicionais como agente antimicrobiano e contra reumatismo, entre outros usos. Na região amazônica, a decocção da casca, é utilizada na forma de inalação, servindo para combater resfriados e dores de cabeça (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). As folhas são usadas pelos índios Guaymi uma tribo tradicional do norte do Panamá como anti-helmíntico e antipirético (FOURNIER et al., 1994),

cuja infusão serve como um potente analgésico e anti-inflamatório. Na parte colombiana da Amazônia, os índios utilizam o chá das folhas como diurético e antiedematogênico, entretanto com cautela o que pode ser um possível indicio de toxicidade (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Os frutos são conhecidos pelo sabor aromático e usados como carminativos. Os frutos moídos, são utilizados para o tratamento e assepsia de ferimentos causados por mordidas de serpentes e consumidos em natura para tratamento de afecções do trato respiratório superior como dor de garganta ou inalados para desobstrução das via áreas (BRAGA et al., 2000) . As sementes possuem propriedades organolépticas utilizadas como sucedâneos da pimenta do reino e são tidas como estimulantes da bexiga, digestivo e úteis contra catarro, leucorreia, cólicas estomacais (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), reumatismo, halitose e cáries (FOURNIER, 1994). Há relatos que essas sementes, que são conhecidas por conter óleo volátil e aromático, possuem uma destinação mais nobre sendo processadas por maceração de onde é obtida bebida alcoólica que são tomadas como afrodisíaco por comunidades tradicionais (VAN ANDEL et al., 2012).

Além disso já foram isolados diversos compostos, principalmente terpenoides , que apresentaram atividade biológica, como ácido caurenóico, obtido abundantemente das sementes, que apresentou atividade tripanossomicida e contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina; além dos compostos como caurool e os ácidos xilópico e acutiflórico, que também apresentaram atividade tripanossomicida (DI STASI e HIRUMA-LIMA et al., 2002).

Além de ter tido sua atividade antimicrobiana demonstrada (MACÊDO e FERREIRA, 2004), anti-inflamatória; inibitória da 5-lipoxigenase (BRAGA et al., 2000), que corroboram com os usos na medicina tradicional (MELO et al., 2001). Adicionalmente, o óleo essencial das folhas de *X. frutescens* apresentou atividade antifúngica em espécies de dermatófitos (LIMA et al., 2009) e atividade antitumoral em células de câncer de próstata PC-3M e pulmão NCI-H358M (FERRAZ et al.,2013) e atividade tripanocida (MENEZES et al.,2013), além de ter demonstrado potencial efeito espasmolítico no íleo de cobaia por meio da redução dos níveis de cálcio citosólico (SOUZA et al., 2015) e o extrato etanólico seco da casca do caule apresentou boa atividade moluscida contra o caramujo *B. glabrata* (SANTOS et al., 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais de diferentes órgãos de *Xylopiia frutescens*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição química e perfil olfatométrico dos óleos essenciais de diferentes órgãos de *X. frutescens*;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *X. frutescens* frente bactérias Gram positivas e leveduras isoladas da cavidade orofaríngea;
- Avaliar a capacidade dos óleos essenciais de *X. frutescens* de inibir a formação de biofilmes e erradicar biofilmes pré-formados por microrganismos causadores de afecções orais;
- Avaliar o efeito sinérgico dos óleos essenciais de *X. frutescens* e fármacos de referência frente bactérias Gram positivas e leveduras isoladas da cavidade orofaríngea;
- Investigar a citotoxicidade dos óleos essenciais de *X. frutescens* frente à macrófagos;
- Avaliar a liberação de óxido nítrico em macrófagos estimulados e não estimulados com LPS tratados com os óleos essenciais de *X. frutescens*;

4 METODOLOGIA

4.1 Isolados microbianos

As cepas bacterianas e as leveduras utilizadas no presente estudo estão apresentadas na tabela 2 e foram provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos e da Micoteca URM do Centro de Biociências (CB) da UFPE e incluíam isolados clínicos da cavidade orofaríngea humana e ATCC.

Tabela 1. Coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos e da Micoteca URM do centro de biociências (CB) / UFPE utilizadas no estudo.

Isolado	Origem
<i>S. pyogenes</i> U480	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U720	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H620	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U 670	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U650	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U630	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H640	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H510	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U680	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H494	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H610	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> H420	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U635	Clínica/DANTI
<i>S. pyogenes</i> U560	Padrão/DANTI
<i>S. aureus</i> 25923	Clínica/DANTI
<i>S. aureus</i> 2213	Clínica/DANTI
<i>C. albicans</i> 6392	Padrão/DANTI
<i>C. albicans</i> 6401	Padrão/DANTI
<i>C. albicans</i> 6395	Padrão/DANTI
<i>C. albicans</i> ATCC 22019	Padrão/URM
<i>C. albicans</i> 4388	Clínica/URM
<i>C. albicans</i> 4278	Clínica/URM
<i>C. albicans</i> 90028	Padrão/URM

Isolado	Origem
<i>C. kruzei</i> 6258	Clínica/URM
<i>C. parapsilosis</i> 4261	Clínica/URM
<i>C. glabrata</i> 9415	Clínica/URM
<i>C. tropicalis</i> 5034	Clínica/URM

As bactérias Gram-positivas foram cultivadas utilizando como meio para o crescimento das estirpes na fase Ágar Mueller-Hinton (HiMedia®) suplementado com 5% de sangue de carneiro com crescimento à 37°C durante 14-16 h. As leveduras foram mantidas em meio sólido Ágar Sabouraud (Kasvi®) e incubadas à temperatura de 37 °C durante pelo menos dois dias.

4.2 Coleta, extração e caracterização dos óleos essenciais de *X. frutescens*

Foram coletados casca, folha, flor e frutos de três indivíduos localizados no bairro de Aldeia em Camaragibe PE na coordenadas 7°57'21.6"S 35°00'56.1"W, 7°55'59.4"S 35°00'22.6"W em agosto de 2016 e a partir destes espécimes foram confeccionadas exsiccatas e depositadas no Herbário IPA - Dárdano de Andrade-Lima sob o número de registro: IPA 98.179 ao IPA 98.182. Imediatamente após a coleta os frutos foram agrupados de acordo com seu grau de maturação e 100g das amostras foram trituradas e submetidas à extração pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger utilizando um litro de água destilada em balão de vidro (capacidade 2,0 L), aquecida em manta aquecedora, mantendo-se temperatura de ebulição por 2 horas. O material resultante foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar, e mantido em temperatura inferior a 4,0 °C.

As análises quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa utilizando um aparelho PerkinElmer Clarus® 580 equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna não polar Rxi®-5ms (Crossbond® 5% difenil / 95% dimetilpolisiloxano) (10m x 0,10 mm ID x 10µm df). A temperatura do forno foi programada de 40 a 250 ° C a uma taxa de 25 ° C / min para fins de integração. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 ° C. O hidrogénio foi utilizado como gás de transporte a um caudal de 1 L / min e 30 p.s.i. pressão de entrada no modo de divisão (1:30). O volume de injeção foi de 0,5 µl de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir de áreas de pico GC na ordem de eluição da coluna DB-5 e expressa como uma percentagem relativa da área total dos cromatogramas.

As análises qualitativas de GC-MS foram realizadas utilizando-se utilizando um aparelho PerkinElmer Clarus® SQ8S com detector seletivo de massa, espectrômetro de massas em EI 70 eV com intervalo de varredura de 0,5 se fragmentos de 40 a 550 Da. equipado com a mesma coluna e programa de temperatura que para os experimentos de CG-FID, com os seguintes parâmetros: gás de arraste = hélio; taxa de fluxo = 1 mL / min; modo de divisão (1:30); volume injetado = 1 µl de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano.

A identificação dos componentes foi baseada nos índices de retenção de GC com referência a uma série homóloga de n-alcenos C8-C40 calculados usando a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz 1963) e por computador comparando com a biblioteca espectral de massa de o sistema de dados GC / MS (NIST 98 e WILEY) e co-injeção com padrões autênticos, bem como outros espectros de massa publicados (Adams 2007). Os percentuais de área foram obtidos eletronicamente da resposta GC-FID sem o uso de um padrão interno ou fatores de correção.

4.2.1 Análise Olfatométrica

A análise do perfil olfatométrico das amostras de óleos essenciais foi realizada utilizando-se o cromatógrafo a gás equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) da Perkin Elmer Auto System e um olfatômetro adaptado.

A injeção das amostras de óleos essenciais no GC/FID foi realizada diretamente no injetor. Para cada análise foram injetados 2 µL de óleo essencial diluído em ciclohexano (2:1) no modo splitless, sendo que o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma vazão de 1 mL/min. O injetor e o FID foram ajustados a 250°C e o programa de temperatura utilizado foi: 60°C durante 8 minutos, aumentando para 180°C a 3°C/min, 180-250°C a 20°C/min, então 250°C por 10 minutos, e o detector olfatométrico foi mantido constante à 250°C durante toda a análise.

Um painel de quatro avaliadores sensoriais composto por quatro mulheres e dois homens (idade de 24 a 35 anos, pertencentes ao laboratório de operações unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS) ficaram responsáveis pela olfação dos óleos essenciais. Cada um dos avaliadores relatou as seguintes informações sobre os aromas durante a análise:

- a) tempo, em relação ao início da análise, em que sentiu um determinado aroma;
- b) descrição do aroma;
- c) intensidade do aroma, em uma escala de números inteiros, de 1 a 5, sendo 1 a menor

intensidade e 5 a maior intensidade.

A partir dos dados fornecidos pelos avaliadores foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos individualmente e gerar uma nova grandeza, que relaciona intensidade e frequência de detecção, denominada Frequência Modificada (FM), que é calculada pela Equação:

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%) \cdot I(\%)}$$

Onde F(%) é a frequência, em termos percentuais, de detecção de um aroma entre o universo de avaliadores e I(%) é a intensidade média de um atributo de aroma em relação à escala, sendo 100% correspondendo a média 5. Se um aroma possui 100% de FM quer dizer que o mesmo foi detectado por todos os avaliadores e com a máxima intensidade. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O tempo de olfação foi aproximadamente 60 minutos e cada avaliador realizou uma sessão por dia. Os aromas tomados como significativas foram aquelas em que pelo menos três avaliadores detectaram. Nenhum dos avaliadores era anósmico e todos tinham experiência em olfatometria.

4.3 Avaliação da atividade biológica dos óleos essenciais de *X. frutescens*

4.3.1 Ensaio de difusão de disco

O método de disco difusão foi realizado de acordo com CLSI (2015). Somente as cepas padrões listadas na tabela 1 foram utilizadas primeiramente para verificar se os óleos possuíam atividade antimicrobiana frente a espécies sensíveis. Um inóculo foi preparado a partir das colônias até atingir a escala padrão de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Este inóculo foi semeado na superfície do meio Ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado para as bactérias Gram positivas e saboraud para as leveduras com auxílio de um swabe e em seguida discos de papéis filtros estéreis impregnados com 10 µl dos óleos essenciais puros de *X. frutescens* foram colocados na superfície do meio e as placas incubadas por 24 horas a 37° C. A leitura foi realizada a partir da medição dos halos de inibição formados ao redor do disco empregando os padrões descritos por Ponce et al., (2003) onde os critérios de sensibilidade foram: não sensível para halos menores que 8 mm (-), sensível para halos entre 9-14 mm (*), muito sensível para diâmetros entre 15-19 mm (***) e extremamente sensível para halos de inibição superior a 20 mm (***). Como controles foram empregados discos de antimicrobianos

específicos para cada uma das cepas avaliadas. Cada teste realizou-se em triplicata.

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais

Os testes foram realizados com base no protocolo CLSI (2015) com algumas modificações. Inóculos das bactérias e das leveduras que apresentaram sensibilidade ao óleo foram preparados a partir de uma cultura de 24 horas do micro-organismo até atingir a escala 0,5 de McFarland. Em uma placa de 96 poços, 100 μL do meio caldo Todd Hewitt para as bactérias e RPMI para leveduras foi adicionado em cada poço da placa. A seguir, uma solução de 100 μL dos óleos essenciais de *X. frutescens* a 4,4 $\mu\text{l/ml}$ diluídos em água e 5% de Tween® 80 foi inoculado no primeiro poço e logo realizadas diluições seriadas de 4,4 $\mu\text{l/ml}$ até a concentração de 0,06 $\mu\text{l/ml}$. Logo, 10 μL do inóculo padronizado foi inserido nos poços. As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C para as bactérias e 48 horas a 30 °C para as leveduras e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento microbiano e a leitura com o revelador resazurina (100 $\mu\text{g/ml}$) para as bactérias e por densidade ótica para as leveduras foram utilizados como indicadores de crescimento microbiano. A menor concentração do óleo capaz de inibir 50% o crescimento microbiano foi considerado a concentração inibitória mínima. Controles de esterilidade do meio e de viabilidade do microrganismo foram utilizados no experimento. Os experimentos foram realizados em triplicata

4.3.3 Avaliação da atividade sinérgica em ensaio de checkerboard

Para avaliar o efeito sinérgico dos óleos essenciais de *X. frutescens* com fármacos antimicrobianos de referência frente aos microrganismos resistentes, foi realizada a técnica de microdiluição modificado para o ensaio checkerboard de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI 2009/2012.

A suspensão dos microrganismos foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas, em THB para bactérias Gram-positivas ou RPMI para as leveduras, adicionando-se PBS pH 7,2 estéreis até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,0 x10⁷ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração deste micro-organismo.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80µL de caldo RPMI ou THB. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100µL de fármacos de referência para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100µL do poço anterior para o próximo até a coluna 3. Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100µL da solução de óleos essenciais de *X. frutescens* a 4,4µL/mL diluídos em água e 5% de tween® para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 contém apenas o óleo essencial e a linha A apenas o fármaco de referência. No poço H6 à H12 foi feito o controle de crescimento bacteriano. Adicionalmente, foram distribuídos 20µL da suspensão microbiana em cada poço.

As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C e após esse período a mensuração do crescimento microbiano foi realizada a por meio da leitura da densidade ótica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula:

$$ICIF = \frac{CIM \text{ do Óleo combinado}}{CIM \text{ do Óleo}} + \frac{CIM \text{ do fármaco combinado}}{CIM \text{ do Óleo}}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar et al. (2012), na Tabela 3.

Tabela 2. Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.

Interação	ICIF
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF > 2$

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada.

4.4 Determinação da capacidade do óleo essencial de inibir a formação de biofilme e remover o biofilme pré-formado

Para avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme e de remoção do biofilme pré-formado pelo óleo essencial, foi realizado o protocolo descrito por Jadhav et al., (2013).

4.4.1 Ensaio de inibição da formação do biofilme

Em uma microplaca de poliestireno de fundo chato (TPP; Trasadingen, Suíça), contendo 96 poços (12x8), foi adicionado em cada poço 180 µl de caldo Todd Hewitt (THB) para as bactérias gram positivas e caldo YNB para as leveduras, 20 µL da suspensão microbiana de turbidez de 0,5 de McFarland ou $1,5 \times 10^8$ UFC / mL e as concentrações dos óleos essenciais utilizadas no experimento foram a concentração mínima inibitória, e o dobro da concentração mínima inibitória. A placa foi incubada em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37 °C. Passado o período de incubação, o conteúdo líquido da placa foi descartado e três lavagens com 200 µL solução salina estéril foram realizadas de modo a remover as células microbianas não aderidas à superfície polimérica (células planctônicas). As células bacterianas aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol, durante 20 minutos. Então, o metanol foi removido por pipetagem e a microplaca foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos, para corar as células microbianas aderidas à microplaca. Após isso, removeu-se o cristal violeta e procedeu-se à lavagem das microplacas em água corrente e, depois de secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com 200 µL de etanol 95%, durante 30 minutos. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 590 nm, em aparelho leitor de microplaca (Behring EL 311- HOECHST, Akasaka, Japan). Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura realizado com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 e como controle de esterilidade somente o meio de cultura (branco), sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata. O valor da densidade óptica (DO) utilizado foi o valor médio obtido nas três leituras para cada isolado, subtraído do valor medido para o controle branco (controle de esterilidade); desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura da DO para cada isolado, foi maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula: $[B + 3(s)]$, onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das leituras do branco.

Os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme quando $4DOc \leq DO$ moderado quando $2DOc \leq DO \leq 4DOc$, fraco quando $DOc \leq DO \leq 2DOc$ e não produtor de biofilme quando o valor obtido foi igual ou menor ao valor de DOc.

A porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração seguiu a seguinte fórmula, de acordo com Jadhav et al. (2013) onde seguiu-se:

$$\% \text{ de inibição do biofilme} = \frac{(\text{DO da amostra tratada})}{(\text{DO do controle positivo não tratado}) \times 100}$$

4.4.2 Ensaio da avaliação da inibição do biofilme pré-formado

Em uma placa de 96 poços 180 µl de caldo THB ou YNB, 20µl do inóculo microbiano foram misturados e incubados por 6 horas a 37 °C. Após esse período as concentrações dos óleos essenciais de *X. frutescens* foram adicionadas ao biofilme pré-formado e a placa incubada novamente por 18 horas a 37 °C. As etapas de lavagem, leitura do biofilme e classificação foram as mesmas descritas no item 4.4.1.

Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura, um controle para validar o teste realizado com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 e como controle de esterilidade somente o meio de cultura, sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo de submissão nº).

4.6 Cultura de células

4.6.1 Macrófagos peritoniais

Os camundongos receberam injeção peritoneas de 10ml de tioglicolato 3,8% p/v e após 3 dias os animais foram eutanasiados câmara de CO₂ e os macrófagos foram obtidos por lavado peritoneal com solução de PBS (10ml/animal), a suspensão celular obtida foi centrifugada a 500G por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em solução de PBS, semeados em placas de 24 poços 150µl por poço, incubadas em estufa de atmosfera de CO₂ a 5% e a 37 °C por 1 hora para adesão a placa. Após a adesão as células foram lavadas duas vezes e cultivadas em

meio de cultura *Dulbecco Medium Eagle Modified* (DMEM) (Sigma), com 10 mM de tampão Hepes DMEM, na presença de Soro Fetal Bovino a 10% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) (Sigma) trocado a cada três dias. A concentração de células é ajustada para 10^5 células/mL de meio, plaqueadas em garrafa de cultura e mantidas para condução de procedimentos experimentais.

4.6.2 Ensaio de MTT para avaliação de citotoxicidade em células RAW 264.7

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado formazan. As células de RAW 264.7 foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 células / poço em uma placa de 96 poços em meio de cultura de DMEM suplementado com 10% de FBS e incubadas a 37°C , numa atmosfera de CO_2 a 5% umidificada. Após a incubação, de 24h para aderência das células, o DMEM foi substituído por DMEM 10% de FBS 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/ml}$ do óleo essencial diluído em DMSO exceto no controle, onde o meio de cultura foi substituído por fresco DMEM. As células foram incubadas durante 24 h e 48 h e 72h a 37°C , numa atmosfera umidificada a 5% de CO_2 . Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de DMEM fresco juntamente com 10 μL de solução de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltétrazólio (MTT) (5 mg / mL em PBS) e incubado no escuro, durante 3 h, a 37°C , numa atmosfera de CO_2 a 5% umidificada. Foi necessário um controle negativo sem células com 100 μL de DMEM e 10 μL de solução MTT. Posteriormente, removeu-se 85 μL de meio de cultura e adicionou-se 50 μL de DMSO a cada poço e incubou-se durante mais 10 min, a 37°C , numa atmosfera umidificada a 5% de CO_2 . Após a homogeneização dos cristais de formazan, a absorvância a 540 nm foi determinada por um leitor de placas ELISA. A porcentagem de proliferação / viabilidade celular foi calculada e comparada ao controle (100% da viabilidade).

4.6.3 Dosagem de oxido nítrico por estimulação de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS)

As células da cavidade peritoneal de camundongos ($10^5/\text{poço}$) em placas de 24 poços serão estimuladas com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) por um período de 1 h de exposição. Posteriormente, serão incubados com os óleos essenciais (nas concentrações viáveis a partir do ensaio de citotoxicidade) durante 24 h. Dexametasona (DEX, 10^{-4} mol/L), L-NAME (25 μM) e LPS (5

$\mu\text{g/mL}$) que após o período de incubação as placas receberão o reagente de griess e após 10 minutos submetidas a leitura de absorbância por um leitor de placas ELISA a 540 nm sendo os dados obtidos comparados com a curva padrão do reagente de griees com nitrato.

4.7 Análise estatística

Para as análises dos resultados do efeito citotóxico sobre células RAW 267.4 e dos resultados da influência dos óleos essenciais de *X. frutescens* na produção de células peritoneais de camundongos celular foi utilizado o programa GraphPad Prism7 sendo os resultados expressos em média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Dunnet's com significância de $p < 0.01$.

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento e caracterização dos óleos essenciais de *X. frutescens*

Na extração dos óleos essenciais dos diferentes órgãos por hidrodestilação, os maiores rendimentos obtidos foram para os frutos verdes, maduros e secos como demonstrado na tabela 4 em que entre os óleos obtidos dos frutos não obtiveram diferenças de rendimento significantes entre os estados de maturação.

Tabela 3. Rendimento percentual da extração dos óleos essenciais de *X. frutescens*

Indivíduos	Casca	Folha	Flor	fruto maduro	fruto verde	fruto seco
1	0,69%	0,68%	0,25%	2,04%	1,82%	1,58%
2	1,28%	0,83%	0,20%	2,14%	2,17%	2%
3	0,55%	0,44%	0,21%	1,63%	2,93%	2,35%
Média	0,84%	0,65%	0,22%	1,937%	2,307%	1,977%
DP	±0,3874	±0,1967	±0,02646	±0,2702	±0,5675	±0,3855

Os rendimentos foram calculados levando em consideração massa seca das amostras.

Os resultados da caracterização dos óleos essenciais de *X. frutescens* estão representados na Tabela 5. As análises dos óleos essenciais de *X. frutescens* identificaram 52 compostos, onde os óleos obtidos das cascas apresentaram principalmente monoterpenos ($83.46 \pm 0.90\%$) compostos majoritariamente por β -pineno ($46.96 \pm 1.01\%$), α -pineno ($23.19 \pm 1.1\%$) e β -longifoleno ($6.44 \pm 0.13\%$). As flores apresentaram principalmente monoterpenos ($61.74 \pm 0.34\%$) compostas majoritariamente por β -pineno ($26.58 \pm 1.09\%$), β -cariofileno ($16.74 \pm 1.43\%$) e α -pineno ($12.88 \pm 0.67\%$). Os óleos das folhas apresentaram em sua composição maior proporção de sesquiterpenos ($72.38 \pm 0.66\%$) onde foram identificados β -cariofileno ($19.28 \pm 0.82\%$), aromadendreno ($17.30 \pm 0.58\%$) e p-cimeno ($17.96 \pm 0.71\%$) como compostos majoritários. Os óleos essenciais dos frutos maduros, secos e verdes de *X. frutescens* apresentaram principalmente monoterpenos ($85.59 \pm 0.72\%$, $84.45 \pm 0.54\%$ e $79.76 \pm 1.02\%$) sendo identificados como compostos majoritários: mirceno ($29.17 \pm 0.99\%$, $30.09 \pm 0.78\%$ e $27.20 \pm 1.22\%$), β -pineno ($14.95 \pm 0.78\%$, $13.29 \pm 0.48\%$ e $13.63 \pm 0.79\%$), e β -cariofileno ($8.75 \pm 0.23\%$, $9.13 \pm 0.53\%$ e $10.01 \pm 0.37\%$) respectivamente.

Tabela 4. Resultados da técnica da cromatografia gasosa associada a um detector de massas para identificação dos constituintes presentes nos óleos essenciais *X. frutescens*

Compostos	^a IR	^b IR	Cascas	Flores	Folhas	Frutos Maduros	Frutos Secos	Frutos verdes	Métodos de identificação
α -thujeno	920	924	0,48	0,27	-	2,37	2,07	1,92	RI, MS
			±	±	-	±	±	±	
			0,05	0,01	-	0,12	0,03	0,20	
α -pineno	928	932	23,19	12,88	0,87	7,79	7,64	6,91	RI, MS, CI
			±	±	±	±	±	±	
			1,10	0,67	0,07	0,08	0,04	0,36	
α -fencheno	944	945	1,00	0,35	0,32	0,14	0,19	0,19	RI, MS
			±	±	±	±	±	±	
			0,08	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	
Sabineno	969	969	-	±	±	±	±	±	RI, MS
			0,04	0,00	0,00	0,27	0,19	0,35	
			46,96	26,58	0,19	14,95	13,29	13,63	
β -pineno	970	974	±	±	±	±	±	±	RI, MS, CI
			1,01	1,09	0,00	0,78	0,48	0,79	
			4,16	4,72	0,30	29,17	30,09	27,20	
Mirceno	981	988	±	±	±	±	±	±	RI, MS, CI
			0,17	0,10	0,00	0,99	0,78	1,22	
			3,12	2,49	2,34	0,08	0,09	0,19	
Óxido de linalol	985	991	-	-	-	±	±	±	RI, MS
			0,64	0,14	0,12	0,24	0,21	0,19	
			±	±	±	±	±	±	
δ -2-careno	1000	1001	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	RI, MS
			2,14	1,42	0,10	1,23	1,97	2,02	
			±	±	±	±	±	±	
α -felandreno	1001	1002	0,14	0,11	0,00	0,09	0,03	0,14	RI, MS
			2,03	3,21	-	-	-	-	
			±	±	-	-	-	-	
iso-silvestreno	1003	1007	0,08	0,06	-	-	-	-	RI, MS
			0,12	2,92	0,30	8,59	11,61	7,96	
			±	±	±	±	±	±	
δ -3-careno	1006	1008	0,00	0,08	0,00	0,39	0,45	0,47	RI, MS
			±	±	±	±	±	±	
			0,00	0,08	0,00	0,39	0,45	0,47	
α -terpineno	1014	1014	-	-	-	3,29	2,37	2,88	RI, MS, CI
			±	±	±	±	±	±	
			±	±	±	±	±	±	

Compostos	^a IR	^b IR	Cascas	Flores	Folhas	Frutos Maduros	Frutos Secos	Frutos verdes	Métodos de identificação
						0,17	0,01	0,08	
<i>p</i>-cimeno	1017	1020	0,81 ± 0,07	4,53 ± 0,16	17,96 ± 0,71	3,33 ± 0,21	3,44 ± 0,11	3,14 ± 0,48	RI, MS
<i>o</i> -cimeno	1019	1022	0,38 ± 0,03	0,38 ± 0,04 0,20	0,06 ± 0,05	0,76 ± 0,16	0,47 ± 0,17	0,44 ± 0,18	RI, MS
Limoneno	1020	1024	- 0,19	± 0,03 0,54	± 0,00 0,12	± 0,00 1,65	± 0,00 1,30	± 0,00 1,36	RI, MS, CI
<i>β</i> -felandreno	1023	1025	± 0,02 0,39	± 0,02 0,12	± 0,01 0,07	± 0,11 0,16	± 0,01 0,30	± 0,05 0,34	RI, MS
Silvestreno	1024	1025	± 0,02 0,46	±0,00 0,36	± 0,00 0,10	± 0,00 0,93	± 0,02 1,29	± 0,03 1,46	RI, MS
1,8-cineol	1026	1026	± 0,04	± 0,00	± 0,01 0,35	± 0,04	± 0,05	± 0,16	RI, MS, CI
<i>Z</i> - <i>β</i> -ocimeno	1018	1032	-	-	± 0,00 2,76	-	-	-	RI, MS
<i>E</i> - <i>β</i> -ocimeno	1040	1044	-	-	± 0,11	-	-	-	RI, MS
<i>γ</i> -terpineno	1049	1054	0,62 ± 0,04	0,84 ± 0,00		0,54 ± 0,00	0,76 ± 0,01	0,89 ± 0,04	RI, MS
<i>m</i> -cimeneno	1082	1082	0,22 ± 0,00	0,67 ± 0,07	0,07 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,39 ± 0,01 0,18	0,45 ± 0,02 0,28	RI, MS
Terpinoleno	1085	1086	-	-	-	-	± 0,00	± 0,04	RI, MS, CI
<i>α</i> -ilangeno	1368	1373	0,50 ±	0,51 ±	0,51 ±	0,31 ±	0,43 ±	0,56 ±	RI, MS

Compostos	^a IR	^b IR	Cascas	Flores	Folhas	Frutos Maduros	Frutos Secos	Frutos verdes	Métodos de identificação
			0,02	0,02	0,00	0,00	0,03	0,02	
<i>α</i> -copaeno	1371	1374	2,10 ± 0,06	1,84 ± 0,16 2,20	2,60 ± 0,01 1,33	1,21 ± 0,09 0,31	1,70 ± 0,12 0,53	2,08 ± 0,11 0,70	MS, CI
<i>β</i> -cubebeno	1385	1387	-	± 0,05	± 0,08 0,68	± 0,00	± 0,03	± 0,00	RI, MS
iso-longifoleno	1387	1389	-	-	± 0,02 0,47	-	-	-	RI, MS
<i>β</i> -elemeno	1389	1389	-	-	± 0,01 0,52	-	-	-	RI, MS
Sibereno	1395	1400	-	-	± 0,07	-	-	-	RI, MS
<i>β</i>-longifoleno	1401	1407	6,44 ± 0,13 0,30	1,97 ± 0,04 0,29	14,23 ± 1,03 0,21	0,50 ± 0,02 0,10	0,70 ± 0,00	0,93 ± 0,00 0,17	RI, MS
<i>α</i> -gurjuneno	1405	1409	± 0,03 0,68	± 0,00 0,51	± 0,02 1,82	± 0,00 0,11	± 0,13	± 0,00 0,18	RI, MS
<i>β</i> -ionol	1411	1412	± 0,06 1,84	± 0,00 0,19	± 0,09	± 0,00	± 0,01	± 0,00	RI, MS
<i>β</i> -funebreno	1413	1413	± 0,14 2,39	± 0,00 16,74	- 19,28	- 8,75	- 9,13	- 10,01	RI, MS
<i>β</i>-cariofileno	1415	1417	± 0,11	± 1,43	± 0,82	± 0,23	± 0,53 0,61	± 0,37	RI, MS, CI
<i>β</i> -cedreno	1418	1419	-	-	-	-	± 0,02	-	RI, MS
<i>γ</i> -elemeno	1430	1434		0,36 ±	-	0,49 ±	-	0,81 ±	RI, MS

Compostos	^a IR	^b IR	Cascas	Flores	Folhas	Frutos Maduros	Frutos Secos	Frutos verdes	Métodos de identificação
				0,04		0,03		0,03	
Aromadendreno	1435	1439	0,20 ± 0,01	1,96 ± 0,09	17,30 ± 0,58 0,53	0,23 ± 0,02	-	0,28 ± 0,00	RI, MS, CI
6,9- guaiadieno	1440	1442	-	-	± 0,03	-	-	-	RI, MS
Cis-Muurolo-3,5- dieno	1446	1448	-	1,74 ± 0,08 0,67	0,21 ± 0,00 1,13	-	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,00	RI, MS
α-humuleno	1448	1452	-	± 0,06 1,05	± 0,03 0,44	-	-	-	RI, MS, CI
alo aromadendreno	1451	1458	-	± 0,03	± 0,04	0,48 0,03	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,01	RI, MS
Dehidro- aromadendreno	1456	1460	0,34 ± 0,00	0,97 ± 0,45	0,49 ± 0,00 0,32	-	-	-	RI, MS
α-acoradieno	1462	1466	-	-	± 0,01	-	-	-	RI, MS
9-epi-(E)- cariofileno	1465	1466	-	0,69 ± 0,11	5,31 ± 0,18 1,02	-	0,12 ± 0,00	0,20 ± 0,00	RI, MS
β-acoradieno	1466	1469	-	-	± 0,03 0,39	-	-	-	RI, MS
Cumacreno	1468	1470	-	-	± 0,01	-	-	-	RI, MS
10-epi-β- acoradieno	1472	1474	-	0,77 ± 0,11	0,20 ± 0,01	-	-	-	RI, MS
γ-Gurjuneno	1475	1475	-	0,28 ±	0,11 ±	-	-	-	RI, MS

Compostos	^a IR	^b IR	Cascas	Flores	Folhas	Frutos Maduros	Frutos Secos	Frutos verdes	Métodos de identificação
				0,04	0,00				
D-Germacreno	1483	1484	-	0,99 ± 0,04 0,26	0,66 ± 0,11 1,30	-	-	0,28 ± 0,00	RI, MS
Viridifloreno	1491	1496	-	± 0,02 1,29	± 0,10 0,16	-	-	-	RI, MS
Biciclogermacreno	1496	1500	-	± 0,14 0,37	± 0,00 0,71	0,35 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,27 ± 0,10 0,00	RI, MS, CI
Germacrene A	1502	1508	-	± 0,01	± 0,01 0,09	-	± 0,00	-	RI, MS
α -cadinol	1647	1652	-	-	± 0,00	-	-	-	RI, MS
Total	98,39 ± 0,97 83,46	97,02 ± 0,59 61,74		96,16 ± 0,98 23,78	98,43 ± 0,97 85,59	98,40 ± 0,72 84,45		97,55 ± 1,06 79,76	
Monoterpenos	± 0,90 14,93	±. 0,34 35,28		± 0,57 72,38	± 0,72 12,84	± 0,54 13,95		± 1,02 17,76	
Sesquiterpenes	± 0,12	± 1,11		± 0,66	± 0,23	± 0,43		± 0,30	

a: Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos em uma coluna capilar DB-5 de 30m. *b*: Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção, DP = desvio padrão, MS = espectro de massa, IC = co-injeção com padrões autênticos.

5.2 Análise olfatométrica

A análise descritiva dos compostos aromáticos dos óleos essenciais de *X. frutescens* foi baseada na detecção e descrição dos aspectos sensoriais da análise qualitativa e semi-quantitativa pelo painel previamente definido.

Tabela 5. Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatometria dos óleos essenciais das cascas de *Xylopi*
frutescens

Compostos	IR	Aroma	FM%
-	918	Planta/cítrica/limpeza	60
-	1147	Pão/camomila	42

Foram encontrados 2 aromas significativos no óleo essencial das cascas de *Xylopi*
frutescens, destacando-se o aroma de planta/cítrico/limpeza com FM de 60% como apresentado na tabela 6

Tabela 6. Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatometria dos óleos essenciais das flores de *Xylopi*
frutescens

Compostos	IR	Aroma	FM%
-	920	Gramado verde/floral	63
-	988	Folhagem/queimado	56
-	1021	Naftalina/menta/cítrico	77

Foram detectados 3 aromas significativos no óleo essencial das flores de *Xylopi*
frutescens. Apresentação como principal aroma de naftalina/menta/cítrico com FM de 77% como apresentado na tabela 7

Tabela 7. Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatometria dos óleos essenciais das folhas de *Xylopi*
frutescens

Compostos	IR	Aroma	FM%
-	924	Folhas verdes/doce	82
-	1013	Mato/queimado	52
-	1392	Margarida/talco de bebê	63

Foram detectados 3 aromas significativos no óleo essencial das folhas de *Xylopi*
frutescens, apresentado como principal aroma o de folhas verdes/doce com FM de 82% como apresentado na tabela 8

Tabela 8. Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatométrica dos óleos essenciais dos frutos maduros de *Xylopia frutescens*

Compostos	IR	Aroma	FM%
-	808	Planta/mato	86
-	813	Quinina/erva/refrescante	63
-	982	Planta seca/eucalipto	56
-	990	Barata/gás	42
-	1063	Ração pra cão/ferrugem	52
-	1125	Chá de camomila/refrescante	56
-	1161	Rosa vermelha/flor/perfume	60
-	1488	Doce/essência fresca	42

Foram detectados 8 aromas significativos no óleo essencial dos frutos maduros de *Xylopia frutescens*. Podem-se destacar os aromas Planta/Mato com FM de 86% e Quinina/Erva/refrescante com FM de 63% como apresentado na tabela 9

Tabela 9. Análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatométrica dos óleos essenciais dos frutos secos de *Xylopia frutescens*

Compostos	IR	Aroma	FM%
-	816	Mato/cítrico	82
-	919	planta/folha/cítrico	56
-	921	Ruim/capim	89
-	966	Gramma/menta/mato	86
-	983	Cogumelo/tinta	60
-	1025	Planta	63
-	1142	Doce/borracha de mamadeira	52
-	1086	Flor molhada/sabonete	56
-	1122	Suave/refrescante/essência	82
-	1250	Cítrico/amendoim	42

Foram detectados 9 aromas significativos no óleo essencial dos frutos secos de *Xylopia frutescens*. Podem-se destacar os aromas mato/cítrico e Suave/refrescante/essência ambos com FM de 85%, Ruim/capim com FM de 89% e Suave/refrescante/essência com FM de 82% como apresentado na tabela 10

Tabela 10. análise de cromatografia gasosa acoplada a olfatométrica dos óleos essenciais verdes de *Xylopi frutescens*

compostos	IR	Aroma	FM%
-	808	Cidreiro/eucalipto	82
-	980	Óleo de pétalas/cítrico	56
-	918	Folhas verdes/queimado	67
-	1182	Menta/Doce/cheiro de limpeza	56
-	816	Medicamento/mato	56
-	1492	Samambaia/essência frutada	56
-	1122	Doce/Agradável	60

Foram detectados 7 compostos voláteis com aromas significativos no óleo essencial dos frutos verdes de *xylopi frutescens*. Podem-se destacar os aromas cidreiro/eucalipto com FM de 82% e folhas verdes/queimado de limpeza com FM de 67%.

5.3 Resultados das atividades biológicas dos óleos essenciais de *X. frutescens*

5.3.1 Atividade do óleo essencial dos frutos secos de *X. frutescens* frente bactérias gram-positivas e leveduras isoladas da cavidade orofaríngea

Os resultados do ensaio de disco difusão do óleo essencial dos frutos de *X. frutescens* estão listados na Tabela 12 onde foram observados halos de inibição que variaram de 10 a >27 mm, sendo o maior detectado na cepa de *C. albicans 6401* e o menor para *S. pyogenes U720* e maiores halos de inibição do óleo essencial dos frutos secos.

Tabela 11. Resultados do ensaio de difusão de disco do óleo essencial de frutos de *X. frutescens*.

Micro-organismos	Diâmetro do halo em mm (critério de sensibilidade)		
	Óleos testados		
	Frutos secos	Frutos Maduros	Frutos Verdes
<i>S. pyogenes U480</i>	20±1**	12±1*	16±1**
<i>S. pyogenes U720</i>	20±1***	14±1*	19±1**
<i>S. pyogenes H620</i>	20±1***	14±1*	19±1**
<i>S. pyogenes U 670</i>	18±1**	12±1*	16±1**
<i>S. pyogenes U650</i>	20±1***	12±1*	14±1**
<i>S. pyogenes U630</i>	20±1***	14±0,57*	19±1,52**

Micro-organismos	Diâmetro do halo em mm (critério de sensibilidade)		
	Óleos testados		
	Frutos secos	Frutos Maduros	Frutos Verdes
<i>S. pyogenes H640</i>	20±1***	14±1*	19±1**
<i>S. pyogenes H510</i>	18±1**	12±1*	14±1**
<i>S. pyogenes U680</i>	19±1**	12±1*	17±1**
<i>S. pyogenes H494</i>	18±0,57**	12±1*	16±1**
<i>S. pyogenes H610</i>	20±1,52***	14±1*	16±1,5**
<i>S. pyogenes H420</i>	27±1***	15±1**	15±1**
<i>S. pyogenes U635</i>	25±1***	10±1*	19±1**
<i>S. pyogenes U560</i>	23±1***	14±1*	17±1**
<i>S. aureus 25923</i>	23±1***	15±1**	17±1**
<i>S. aureus 2213</i>	20±1***	13±1*	16±1**
<i>C. albicans 6392</i>	18±1**	15±1**	18±1**
<i>C. albicans 6401</i>	17±1**	15±1**	17±1**
<i>C. albicans 6395</i>	14±1*	12±1**	12±1**
<i>C. albicans ATCC 22019</i>	16±1**	14±1*	15±1**
<i>C. albicans 4388</i>	18±1**	14±1*	17±1**
<i>C. albicans 4278</i>	20±1**	12±1*	16±1**
<i>C. albicans 90028</i>	20±1***	14±1*	19±1**
<i>C. cruzei 6258</i>	20±1***	14±1*	19±1**
<i>C. parapsilosis 4261</i>	18±1**	12±1*	16±1**
<i>C. glabrata 9415</i>	20±1***	12±1*	14±1**
<i>C. tropicalis 5034</i>	20±1***	14±0,57*	19±1,2**

(-): não sensível, (*): sensível. (**): muito sensível e (***) : extremamente sensível. CLSI (2015)

5.3.2 Determinação da Concentração inibitória mínima do óleo essencial

O resultado do ensaio para determinação da concentração inibitória do óleo essencial frente aos microrganismos listado na Tabela 13. As concentrações variaram de 0,13 µl/ml a 2,2 µl/ml onde a menor concentração necessária para inibir o crescimento microbiano foi para *S. pyogenes U560* e a maior concentração *C. parapsilosis 4261*.

Tabela 12. Resultados da determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *X. frutescens*

Micro-organismos	Concentração mínima inibitória (µl/ml)		
	Óleos testados		
	Frutos secos	Frutos Maduros	Frutos Verdes
<i>S. pyogenes</i> U480	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> U720	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> H620	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> U 670	0,275	0,55	0,275
<i>S. pyogenes</i> U650	0,275	0,55	0,275
<i>S. pyogenes</i> U630	0,275	0,55	0,275
<i>S. pyogenes</i> H640	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> H510	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> U680	0,275	0,55	0,55
<i>S. pyogenes</i> H494	0,275	0,55	0,275
<i>S. pyogenes</i> H610	0,275	0,55	0,275
<i>S. pyogenes</i> H420	0,13	0,275	0,275
<i>S. pyogenes</i> U635	0,13	0,275	0,13
<i>S. pyogenes</i> U560	0,13	0,275	0,13
<i>S. aureus</i> 25923	0,55	1,1	0,55
<i>S. aureus</i> 2213	0,55	1,1	0,55
<i>C. albicans</i> 6392	0,55	1,1	0,55
<i>C. albicans</i> 6401	2,2	2,2	2,2
<i>C. albicans</i> 6395	0,275	0,55	0,275
<i>C. albicans</i> ATCC 22019	0,13	0,275	0,275
<i>C. albicans</i> 4388	0,13	0,275	0,275
<i>C. albicans</i> 4278	2,2	2,2	2,2
<i>C. albicans</i> 90028	0,55	0,55	0,55
<i>C. cruzei</i> 6258	0,55	0,55	0,55
<i>C. parapsilosis</i> 4261	0,275	1,1	1,1
<i>C. glabrata</i> 9415	0,275	0,55	0,55
<i>C. tropicalis</i> 5034	0,275	0,55	0,55

5.3.3 Ensaio de Checkerboarder

Para o teste de sinergismo pelo modelo de checkerboard foram selecionados microrganismos resistentes a agente antimicrobianos de referência onde duas leveduras apresentaram resistência ao fluconazol: *C. albicans* 4388 e *C parapsilosis* 4261 e não foram observadas bactérias resistentes.

Tabela 13. Efeito sinérgico do óleo essencial dos frutos secos de *Xylopiá futescens*.

Substâncias Teste	Microrganismo	CIM (µg/mL)		CIF	ICIF	Resultado
		Sozinho	Combinado			
Óleo essencial dos frutos secos de <i>X. frutescens</i> + FLUCONAZOL	<i>C. albicans</i> 4388	78,57	39,285	0,5	0,507	Aditivo
		64	0,5	0,007		
	<i>C. parapsilosis</i> 4261	78,571	4,910	0,062	0,187	Sinérgico
		64	8	0,125		
Óleo essencial dos frutos maduros de <i>X. frutescens</i> + FLUCONAZOL	<i>C. albicans</i> 4388	314,28	314,28	1,0	1,5	Indiferente
		64	32	0,5		
	<i>C. parapsilosis</i> 4261	157,142	39,28	0,249	0,749	Aditivo
		64	32	0,5		
Óleo essencial dos frutos verdes de <i>X. frutescens</i> + FLUCONAZOL	<i>C. albicans</i> 4388	157,14	78,57	0,5	0,725	Aditivo
		64	16	0,25		
	<i>C. parapsilosis</i> 4261	78,571	9,82	0,124	0,37	Sinérgico
		64	16	0,25		

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada;

5.4 Inibição da formação de biofilme pelo óleo essencial dos frutos de *X. frutescens*

Para avaliação do efeito dos óleos essenciais de *X. frutescens* sob o biofilme foram inicialmente selecionados os microrganismos com maior capacidade produzir biofilme. A partir destes resultados, foram realizados os ensaios de inibição da formação do biofilme pelo óleos essenciais com o resultados expressos na forma de percentual de crescimento residual de biofilme na Tabela 15. Todos os microrganismos selecionados para o ensaio apresentaram uma redução significativa da formação do biofilme em relação ao controle não tratado para todas as concentrações testadas dos óleos essenciais.

Tabela 14. Efeito dos óleos essenciais dos frutos de *Xylopia frutescens* na formação de biofilmes de isolados da cavidade orofaríngea.

Micro-organismos	CMI Frutos Maduros	CMI Frutos Verdes	CMI Frutos Secos	CMI Fármaco padrão	2CMI Frutos Maduros	2CMI Frutos Verdes	2CMI Frutos Secos
<i>S. pyogenes</i> U480	28,13% ±0,51	21,20% ±1,56	12,00% ±0,93	14,01% ±0,24	16,72% ±0,69	12,06% ±0,64	12,06% ±0,64
<i>S. pyogenes</i> U720	27,58% ±0,51	26,53% ±0,75	11,18% ±1,09	12,94% ±0,54	17,51% ±0,95	17,54% ±0,40	18,34% ±0,40
<i>S. pyogenes</i> H620	26,90% ±0,55	28,01% ±0,72	12,09% ±1,14	13,40% ±0,66	18,19% ±0,61	13,48% ±0,78	10,48% ±0,78
<i>S. pyogenes</i> U670	20,14% ±1,10	21,45% ±0,29	11,86% ±1,95	15,47% ±0,27	19,05% ±1,01	13,14% ±0,20	13,14% ±0,20
<i>S. aureus</i> 25923	37,43% ±0,45	37,11% ±4,86	12,41% ±3,16	18,22% ±0,76	20,25% ±0,58	20,09% ±0,05	20,19% ±0,14
<i>S. aureus</i> 2213	35,00% ±1,00	32,90% ±0,04	14,03% ±3,73	20,09% ±0,61	21,79% ±0,51	24,11% ±0,52	24,11% ±0,52
<i>C. Krusei</i> 6258	28,1% ±0,51	31,20% ±1,56	24,12% ±0,52	25,00% ±5,62	14,01% ±0,24	14,01% ±0,24	12,06% ±0,64
<i>C. Parapsilosis</i> 4261	47,6% ±0,51	46,53% ±0,75	44,07% ±0,97	44,42% ±10,73	22,94% ±0,54	22,94% ±0,54	17,54% ±0,40
<i>C. albicans</i> 4388	26,9% ±0,55	38,01% ±0,72	29,87% ±0,28	35,07% ±10,32	13,40% ±0,66	13,40% ±0,66	13,48% ±0,78
<i>C. albicans</i> 90028	10,1% ±1,10	41,45% ±0,29	27,94% ±0,70	21,85% ±8,11	5,47% ±0,27	5,77% ±0,27	5,14% ±0,20
<i>C. glabrata</i> 9415	17,45% ±0,45	37,88% ±1,01	20,16% ±1,00	6,91% ±1,13	8,22% ±0,76	8,22% ±0,76	20,09% ±0,05

Micro-organismos	CMI	CMI	CMI	CMI	2CMI	2CMI	2CMI
	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos	Fármaco padrão	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos
<i>C. albicans</i>	35,0%	42,90%	42,00%	24,03%	20,09%	20,17%	21,11%
ATCC 22019	±1,00	±0,04	±1,01	±1,91	±0,61	±0,61	±0,52

%Crescimento residual de biofilme.

5.5 Efeito dos óleos essenciais e *Xylopiá frutescens* sobre o biofilme pré-formado

Os resultados do ensaio de remoção do biofilme pré-formado estão apresentados na Tabela 16. Neste experimento, os óleos essenciais dos frutos demonstraram pouca atividade de remoção do biofilme pré-formado para as bactérias Gram-positivas, para as quais as concentrações dos óleos de *X. frutescens* apresentaram um percentual residual de biofilme entre 57% a 42% quando comparados com o controle. Contudo, os óleos essenciais testados frente as leveduras apresentaram percentuais residuais abaixo de 50% onde o óleo dos frutos secos apresentaram maior capacidade de remoção em ambas as concentrações testadas .

Tabela 15. Efeito do óleo essencial dos frutos de *Xylopiá frutescens* na remoção de biofilmes produzidos por isolados da cavidade orofaríngea.

Micro-organismos	CMI	CMI	CMI	CMI	2CMI	2CMI	2CMI
	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos	Fármaco Padrão	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos
<i>S. pyogenes</i>	52,43%	53,24%	54,12%	32,00%	55,32%	52,16%	44,01%
U480	±0,64	±0,69	±0,24	±5,62	±1,56	±0,51	±0,52
<i>S. pyogenes</i>	57,88%	56,53%	54,07%	30,42%	52,00%	57,54%	42,04%
U720	±0,40	±0,95	±0,54	±1,73	±0,75	±0,51	±0,97
<i>S. pyogenes</i>	56,90%	58,01%	58,01%	30,07%	57,51%	53,08%	43,40%
H620	±0,78	±0,61	±0,66	±1,32	±0,72	±0,55	±0,28
<i>S. pyogenes</i>	51,94%	51,95%	57,94%	31,86%	50,23%	52,92%	45,68%
U670	±0,20	±1,01	±0,27	±0,81	±0,29	±1,10	±0,70

Micro-organismos	CMI	CMI	CMI	CMI	2CMI	2CMI	2CMI
	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos	Fármaco Padrão	Frutos Maduros	Frutos Verdes	Frutos Secos
<i>S. aureus</i> 25923	57,83% ±0,14	69,10% ±0,58	60,16% ±0,76	32,91% ±1,13	58,05% ±1,01	50,00% ±0,45	47,22% ±1,00
<i>S. aureus</i> 2213	56,17% ±0,52	62,97% ±0,51	62,88% ±0,61	35,53% ±1,91	51,42% ±0,04	54,91% ±1,00	39,99% ±1,01
<i>C. krusei</i> 6258	28,43% ±0,64	33,10% ±0,69	24,12% ±0,24	25,25% ±0,93	16,55% ±1,56	12,06% ±0,51	14,22% ±0,52
<i>C. parapsilosis</i> 4261	37,88% ±0,40	42,53% ±0,95	39,07% ±0,54	54,18% ±1,09	33,88% ±0,75	27,54% ±0,51	23,94% ±0,97
<i>C. albicans</i> 4388	26,80% ±0,78	37,01% ±0,61	29,17% ±0,66	65,07% ±1,14	18,51% ±0,72	14,58% ±0,55	13,40% ±0,98
<i>C. albicans</i> 90028	23,94% ±0,20	30,45% ±1,01	27,84% ±0,27	21,06% ±1,95	19,23% ±0,29	13,92% ±1,10	10,47% ±0,70
<i>C. glabrata</i> 9415	17,43% ±0,05	25,10% ±0,58	20,18% ±0,76	6,91% ±3,16	19,05% ±4,86	10,09% ±0,45	8,72% ±1,00
<i>C. albicans</i> ATCC 22019	32,18% ±0,52	36,87% ±0,51	34,88% ±0,61	25,53% ±3,73	28,43% ±0,04	24,94% ±1,00	21,09% ±1,01

% residual de biofilme

5.6 Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7

Na avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais em células RAW 264.7 foi observado que a concentração acima de 6µg/ml do óleo essencial dos frutos secos de *X. frutscens* apresentaram percentuais significantes de redução da viabilidade celular.

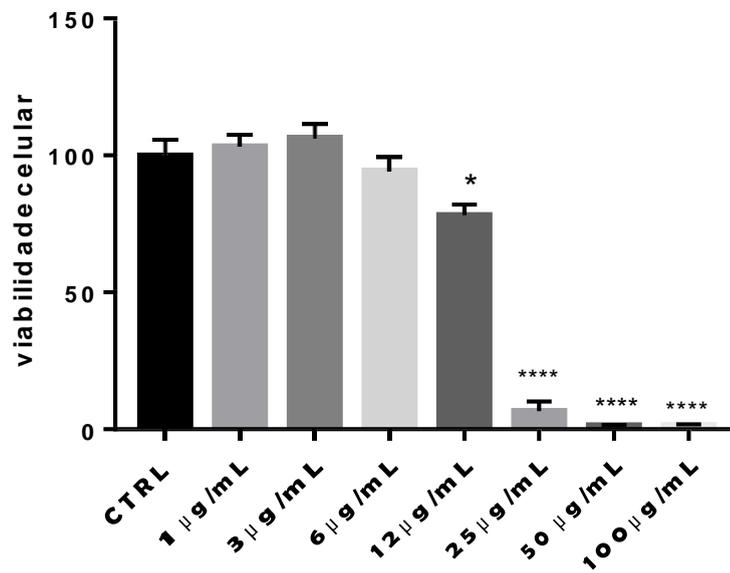


Figura 5. Efeito do óleo essencial dos frutos secos de *X. frutescens* na viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 de linhagem de macrófagos. Os resultados foram expressos em média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Dunnet's com significância de * $p < 0.01$ **** $p < 0,0001$

5.7 Dosagem de óxido nítrico em macrófagos estimuladas por LPS

Na avaliação de produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS foi observado que a concentração de 6µg/ml do óleo essencial dos frutos secos de *X. frutescens* foi capaz de reduzir significativamente a produção de óxido nítrico quando comparado ao controle negativo.

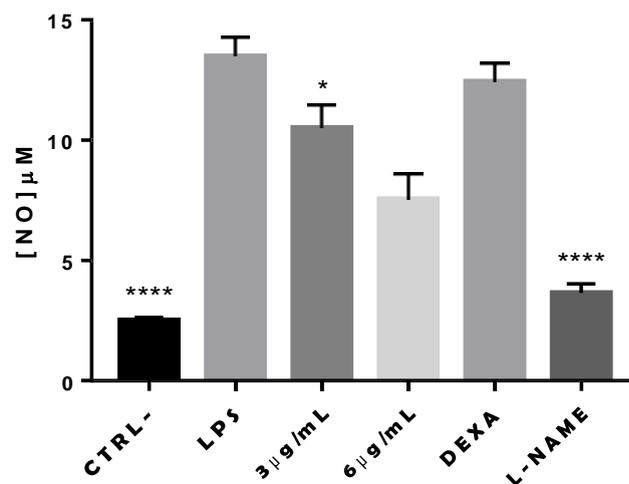


Figura 6. Efeito do óleo essencial dos frutos de secos de *X. frutescens* sobre a produção óxido nítrico em células macrófagos estimuladas por LPS. Os resultados foram expressos em média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Dunnet's com significância de * $p < 0.01$ ****

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos óleos essenciais de *X.frutescens*

Na análise de cromatografia gasosa foram identificados um total de 34 compostos comuns aos óleos extraídos das cascas, folhas, flores e frutos verdes, maduros e secos.

Nos óleos das cascas foram identificados 43 componentes sendo os principais componentes α -pineno (23.19%), β -pineno (46.96%) e β -longifoleno (6.44%) estes resultados diferem dos resultados obtidos por Fouriner et al., (1994) em que foram identificados α -cubebeno (25,2%) e δ -cadinol (27,4%) como compostos majoritários de óleos extraídos por hidrodestilação por 3 horas.

Dos óleos das folhas foram identificados 54 componentes sendo os principais componentes p-cymeno (17.96%), β -longifoleno (14.23%) e β -caryophylleno (19.28%) estes resultados diferem dos resultados obtidos por Ferraz et al., (2013) em que foram identificados (E) - cariofileno (31,48%), biciclogermacreno (15,13%), germacreno D (9,66%) como compostos majoritários sob o processo de hidrodestilação por período de 4 horas. Entretanto os resultados são semelhantes aos obtidos por análises de óleos extraídos de outras espécies do genero *Xylopi*a como os estudos de Kariot et al.,(2004) que identificaram α -pineno (7.3%) e β -pineno (5.8.%) como parte dos compostos majoritários.

Para os óleos das flores foram identificados 53 componentes sendo os principais componentes β -pineno (17.96%), α -pineno (14.23%) e β -cariofileno (19.28%).

Na análise da composição dos óleos essenciais dos frutos de *X.frutescens* no estágios de maturação seco, maduro e verde foram identificados 52 compostos comuns sendo o mirceno (30.09%), β -pineno (14.95%), α -pineno (7,79%) com variações menores de 1% na concentração destes compostos, a respeito da constituição química dos óleos essenciais de *Xylopi*a *frutescens* na literatura não foram encontrados relatos da composição química dos frutos de *X. frutescens* , contudo óleos essenciais extraídos dos frutos de outras espécies do gênero *Xylopi*a apresentam composição semelhante, apresentando o β -pineno como um dos compostos majoritários como os resultados obtidos por Kariot et al.,(2004) que analisando a composição dos frutos frescos e seco de *Xylopi*a *aethiopica* identificou β -pineno em (25.1%) e (21.1%) de suas composições respectivamente, bem como Andrade et al., (2004) que ao analisar os frutos de *Xylopi*a *aromática* identificou como compostos majoritários β -pineno

(14,95%), α -pineno (7,79%).

A composição e a produção dos óleos essenciais está sujeita a interferência de diversas variáveis como o tempo de colheita, sazonalidade e o estágio de desenvolvimento sendo estes fatores responsáveis por dificultarem a criação de modelos de produção de compostos sob a variabilidade de condições ambientais. Bem como, já foi observada que fatores no processo de extração como: temperatura de extração, tempo, agitação e propriedades físico-químicas do solvente de extração exercem influência na composição dos óleos essenciais (PAOLINI et al., 2010; WANG et al., 2012).

6.2 Análise olfatométrica

Com o uso da técnica de cromatografia gasosa acoplada olfatométrie foi possível identificar uma variedade de aromas em todas as amostras exceto para o óleo das cascas que apresentou uma menor gama de aromas significativos com apenas dois aromas. As tabelas 6 á 11 apresentam os aromas identificados que obtiveram FM maior ou igual a 40. Os resultados mostram que os compostos majoritários em composição química não necessariamente apresentam as maiores FM. Os resultados das análises cromatográficas nos óleos essenciais estudados apresentaram compostos com aromas distintos, e diversos entre si. Embora quando comparada os aromas dos óleos essenciais dos diversos órgãos estudados seja possível traçar um paralelo entre a diferença de composição bem como os componentes majoritários dos órgãos distintos podendo atribuir a isso a diferença nos aromas obtidos tendo sido observado a prevalência de notas aromáticas nas regiões do cromatograma correspondente a monoterpenos, no entanto nos óleos essenciais dos frutos extraídos quando maduro, verde seco a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massa não apresentou diferenças acentuadas em sua composição principalmente entre os compostos majoritários o que pode indicar que a grande maioria dos aromas encontrados são oriundos de constituintes minoritários, com alterações de suas concentrações ao longo do processo de amadurecimento como apresentados nos óleos essenciais dos frutos secos que apresentaram maior variedade de notas aromáticas nas áreas correspondentes a monoterpenos oxigenados bem como observado a ausência de aromas desagradáveis, os resultados obtidos indicam similaridade com o uso tradicional que prioriza o uso dos frutos secos em detrimento dos demais (BRAGA 2000). as como observado por Lihua (2004) ao avaliar a composição e os perfis aromáticos de frutos verdes , maduros e secos de *Xanthoxylum piperitum* DC, onde foi possível observar que alterações nas proporções de terpenoides oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenicos

minoritários ao longo do processo de amadurecimento correspondem ao surgimento de novas notas olfativas de teor mais suaves nos frutos secos, logo os aromas mais perceptíveis não correspondem necessariamente aos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais analisados (XAVIER et al., 2013; ASIKIN et al., 2015; BAIETTO; BEM BRAHIM et al., 2018).

6.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos de *X. frutescens*

Para os testes foram selecionados os óleos das partes que obtiveram maior rendimento, os resultados observados pela técnica de difusão de disco do óleo essencial dos frutos maduros, secos e verdes de *X. frutescens* de todos microrganismos testados mostraram-se sensíveis, com destaque para o óleo dos frutos secos com halos superiores a 14 mm, resultados semelhantes foram observados em outras espécies do gênero *Xylopi*a, como *X. aethiopica* que segundo Fleischer et., (2008) os óleos essenciais dos frutos apresentaram halos de inibição de 17 a 18 mm. Na determinação da concentração inibitória mínima, para as bactérias gram positivas, as concentrações foram 0,13 e para as leveduras 0,13 apresentando uma menor concentração para as cepas Gram positivas de *S. pyogenes* U560 para a leveduras a menor concentração foi observada frente *Candida albicans* ATCC 90028. Observando-se concentrações significativamente menores para os óleos essenciais dos frutos secos. Não foram encontrados relatos na literatura de ensaios de determinação da concentração inibitória mínima envolvendo o óleo essencial dos frutos de *Xylopi*a *frutescens*. Entretanto, pesquisas com óleos essenciais frente microrganismos com a capacidade de causar patologias orais vem sendo relatadas na literatura como a de Costa et al., (2013) ao investigar atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *Xylopi*a *laevigata* frente cepas de bactérias Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC(14458), *Staphylococcus epidermidis* ATCC (1228) e leveduras *Candida tropicalis* ATCC(157) observou atividades antimicrobiana com concentrações mínimas inibitórias de $\pm 0,14$ μ l/ml para todas os microorganismos. Sfeir et al., (2013) ao avaliar a atividade de 18 óleos essenciais de diferentes espécies de frente cepas de *S. pyogenes* observou que 14 dos óleos essenciais apresentaram concentrações mínimas inibitórias entre 1,9 e 9,9 (v/v) valores superiores aos obtidos neste estudo onde a concentração máxima avaliada foi de 0,44%(v/v).

A composição dos óleos essenciais testados assemelha-se com o de outros óleos com atividades antimicrobianas como os óleos essenciais de Rosemary que apresenta β -pineno em sua composição que demonstrou se eficaz frente *S.aureus* e *Candida* (JIANG et al ., 2011),

bem como os óleos essenciais de *Hypericum rumeliacum* que assim como os óleos extraídos dos frutos de *X. frutescens* apresentam como seus compostos majoritários os β -pineno e α -pineno, que no estudo demonstrou atividades antimicrobianas frente a bactérias Gram positivas e leveduras do gênero *Candida*, tendo ainda observado que as concentrações mínimas inibitórias dos óleos de *H. rumeliacum* essenciais são menores que a dos compostos majoritários isolados, indicando que os compostos majoritários em associação são responsáveis pela atividade antimicrobiana (COULADIS et al., 2013)

Contudo os mecanismos antimicrobianos e seus componentes dos óleos essenciais são diversos dada a variedade de compostos presentes em sua composição, sendo que no geral os óleos essenciais exercem seu efeito antimicrobiano alterando a composição da parede celular desnaturando proteínas ou alterando a permeabilidade da membrana interrompendo processos metabólicos, como alterações no transporte de elétrons, translocações de proteínas, fosforilação e outras reações que interferem no equilíbrio quimiosmótico (SWAMY et al., 2016).

6.4 Efeito dos óleos essenciais de *Xylopiya frutescens* na inibição da formação de biofilme e remoção do biofilme pré-formado

A prevenção da formação de biofilmes obtido de compostos de plantas tem sido relatada por diversos autores contra *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Candida albicans*, entre outros patógenos (FARISSA et al., 2018; VAILLANCOURT et al., 2018; SHIRDEL et al., 2017; c et al., 2018). Os óleos essenciais são compostos majoritariamente por monoterpenos, estes compostos já tiveram demonstrada a capacidade de inibir a formação e remover o biofilme pré-formado por microrganismos resistentes agentes antimicrobianos (KIFER et al., 2016). Na avaliação do efeito dos óleos essenciais dos frutos maduros, secos e verdes foi observado que as concentrações mínimas inibitórias foram capazes de inibir a formação de bactérias Gram positivas testadas com variação de formação residual entre 14% a 37%, e para as leveduras testadas foi observada que as concentrações mínimas inibitórias foram capazes de reduzir a formação de biofilme com variação de percentual de formação residual de 10% a 47%.

Bem como foi observado que os óleos essenciais extraídos dos frutos maduros, secos e verdes de *X. frutescens* apresentaram a capacidade de remoção de biofilme com percentuais residuais de biofilmes abaixo dos 50% frente a bactérias Gram positivas apenas com duas vezes a concentração inibitória mínima, entretanto quando frente as leveduras do gênero *Candida*

foi observado que as concentrações mínimas inibitórias apresentaram capacidade de remoção com percentual residual que variaram entre 23% e 42%. Semelhante aos óleos essenciais extraídos dos frutos maduros, secos e verdes de *X. frutescens*. Óleos essenciais que apresentam β -pineno, α -Pineno e mirceno como componentes majoritários são relatados como capazes atuar inibindo formação de biofilme e remover biofilmes já formados com maior destaque para os biofilmes formados, como óleos essenciais extraídos *Mutellina purpurea* (SIENIWASKA et al., 2013). Ainda tendo sido observado que β -pineno α -Pineno exercem seu efeito antimicrobiana por meio da inibição da fosfolipase e esterases microbianas de espécies de leveduras do gênero *Candida* (SILVA et al., 2012).

6.5 Avaliação do efeito sinérgico pelo método de checkerboarder

A associação dos óleos essenciais dos frutos de *Xylopi frutescens* e o fluconazol foi avaliada no ensaio de checkerboarder para verificação de possível sinergismo entre estes compostos. Para o teste foram selecionas cepas tomando como parâmetro a resistência frente e antimicrobianos de referência através do teste de difusão em disco utilizando discos de antibióticos onde não foram observados halos que indicassem resistência para as bactérias apenas paras as leveduras testadas onde foi observada resistência ao fluconazol em duas leveduras a *Candida parapsilosis* 4261 e a *Candida albicans*. Os índices de inibição fracionada combinada observadas nos testes de checkerboarder para os óleos essenciais dos frutos secos associados ao fluconazol demonstraram efeito sinérgico para *C. parapsilosis* 4261 e aditivo para *C. albicans* 4388 bem como os óleos essenciais dos frutos verdes, contudo os óleos essenciais dos frutos maduros mostraram se indiferente frente a *C. albicans* e aditivo frente *C. parapsilosis*. O fluconazol quando combinado aos óleos essenciais dos frutos verdes e secos frente as leveduras testadas apresentou redução significativa na concentração mínima inibitória frente as leveduras testadas tendo sido reduzida em sete vezes para *C. albicans* e três vezes para *C. parapsilosis* esses dados sugerem que os óleos essenciais testados exerçam mecanismo que sejam capazes de atenuar caracteres de resistência fluconazol (KHAN et al., 2011). Os óleos quando combinados ao fármaco apresentaram alterações significativas de suas CMI o que pode significar que os mecanismos da ação antimicrobiana dos óleos essenciais ou de seus constituintes diferem do fluconazol que atua inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase fúngica dependente do citocromo P450. Bloqueando a biossíntese do ergosterol, bem como

inibindo as enzimas dependentes do P450 envolvidas na respiração fúngica (ONYEWU et al., 2007). Podendo promover os efeitos de drogas antifúngicas, principalmente sob a parede celular, membrana plasmática e outras estruturas da membrana da células de leveduras podendo ser capazes de danificá-las facilitando a entrada na célula promovendo maior inibição da síntese de ergosterol, O que pode tornar a atividade fungistática do fluconazol em atividade fungicida (ISHIDA et al., 2006). Diante do surgimento crescente de fungo resistentes, o uso de compostos antifúngicos em combinação como óleos essenciais podem apresentar eficácia melhorada diminuindo as concentrações necessárias para efeitos fungicidas, o que pode conferir um espectro mais amplo de ação frente múltiplas infecções por diferentes patógenos e uma duração reduzida da terapia, resultando na diminuição da probabilidade de desenvolver resistência (VASQUEZ et al., 2013)

6.6 Avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais

Para a avaliação da citotoxicidade do óleo essencial dos foram selecionados os frutos secos de *Xylopiya frutescens*, que obteve os resultados mais significativos nos testes antimicrobianos, frente a linhagem celular de macrófagos macrofagos peritonias com o objetivo de identificar concentrações bioativas seguras de *X.frutescens*, que obteve os melhores resultados na análise olfatométrica bem como nos testes de sinergismo, com isto foi observado que nas concentrações acima de 6µg/ml semelhante acausou redução significativa das viabilidade celular das linhagens testadas isso deve-se aos óleos essenciais serem constituído por várias moléculas ativas, portanto, afetam múltiplos alvos em uma célula (CARSON E HAMMER, 2011). Geralmente o principal alvo é membrana citoplasmática geralmente por meio da ruptura e permeabilização membrana celular levando à perda de importantes funções celulares, tais como homeostase de íons e cadeia de transporte de elétrons (BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais podem exercer efeitos citotóxicos nas células eucarióticas. Através da permeabilização de membranas mitocondriais externas e internas causa a morte celular por necrose e apoptose (ARMSTRONG, 2006). Geralmente álcool, aldeídos e constituintes fenólicos são responsáveis para a citotoxicidade dos óleos essenciais (BRUNI et al., 2004). Este efeito citotóxico é importante para as aplicações quimioterapêuticas dos óleos essenciais contra uma variedade de vírus, bactérias e fungos (RAUT et., 2014). No entanto, a toxicidade para células eucarióticas também é responsável pelos efeitos colaterais indesejáveis hospedeiro. O

risco de vários efeitos tóxicos, como irritação e corrosão, sensibilização das células, absorção percutânea, toxicidade aguda ao sistema orgânico, fototoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade tendem limitar o uso medicinal de óleos essenciais. Contudo não há muitos relatórios disponíveis para resolver esta questão complexa, para isso faz necessário analisar o perfil de toxicidade para cada óleo essencial, entretanto torna-se difícil, uma vez que a toxicidade de um óleo essencial em particular pode variar de acordo com a composição, que é influenciado por muitos fatores interdependentes (VIGAN, 2010).

6.7 Efeito do óleo essencial de *Xylopia frutescens* na dosagem óxido nítrico em macrófagos peritoniais estimuladas por LPS

A infecção por microrganismos é responsável por uma série de fenômenos relacionados aos mecanismos de defesa do organismo hospedeiro, que ao identificar um agente patogênico inicia fenômenos fisiológicos para remoção deste agente, principalmente por meio da resposta inflamatória que é um processo imunológico complexo mediado pela ativação das células da imunidade inata, como os macrófagos. Os resultados obtidos nos testes deste estudo efetuados na linha celular de macrófagos com o óleo essencial dos frutos de secos *X. frutescens* evidenciaram a diminuição de nitritos induzida por LPS na concentração de 6µg/ml esta concentração não apresentou citotoxicidade, o que demonstra uma boa atividade anti-inflamatória. Óleos essenciais são compostos que são capazes de interferir nas vias de transdução de sinal e que interrompem a cascata de produção de mediadores inflamatórios, dentre eles o óxido nítrico, e possuem um elevado potencial anti-inflamatório (VERGIS et al., 2015; SILVEIRA E SÁ et al., 2014) como no estudo de Ko et al. (2017) onde foi observado que o óleo essencial de *Lindera erythrocarpa* assim como *X. frutescens* possui como compostos majoritários α -pineno e β -pineno, inibiu significativamente a expressão de óxido nítrico sintetase (NO) indutível e ciclooxigenase-2, e subsequente produção de NO e prostaglandina E 2. Além disso, reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células macrófagos peritoneais de camundongos ativadas por LPS. O mecanismo molecular subjacente ao efeito do óleo foi associado à inibição da fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, o óleo inibiu a fosforilação e a degradação induzidas por LPS do inibidor de kappa B- α , o que é necessário para a ativação das subunidades do fator nuclear p50 e p65 (NF) - κ B em macrófagos (MIGUEL, 2010; BAKKALI et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais extraídos das cascas, folhas, flores, e frutos verdes, maduros e secos de *X. frutescens* apresentaram composição com significativa similaridade, entretanto com proporção e propriedades olfativas diferentes com destaque para os frutos secos com maior complexidade. Os óleos essenciais dos frutos maduros, secos e verdes frente cepas padrão gram-positiva e isolados clínicos de leveduras obtidos da cavidade orofaríngea apresentaram resultados que demonstraram que concentrações muito baixas dos óleos foram capazes de inibir o crescimento microbiano. A análise dos resultados de inibição da formação do biofilme pelos óleos essenciais dos frutos maduro, verdes e secos, demonstrou que em todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir significativamente a formação do biofilme e remover o biofilme já formado entretanto com maior eficiência frente as leveduras, o efeito sinérgico dos óleos essenciais dos frutos secos e verdes associados a fluconazol apresentaram efeito sinérgico para *Candida parapsilosis* e aditivo para *Candida albicans* sendo o óleo dos frutos secos a apresentar menores índices enquanto os frutos maduros apresentaram efeito aditivo e indiferente respectivamente. O óleo dos frutos secos foi capaz reduzir a produção de oxido nítrico em células RAW 264.7 na concentração 6µg/ml onde não foi observada citotoxicidade no ensaio de MTT. Diante disto foi observado que o óleo essencial extraído dos frutos secos de *X. frutescens* possui atividades anti-inflamatória, antimicrobiana frente microrganismos isoladas da orofaringe, mesmo em microrganismos resistentes. Apresentando a maior complexidade de aromas ,sendo ainda necessários estudo para elucidar os mecanismo de ação responsáveis por suas atividades biológicas, oque pode possibilitar o emprego em formulações orais para o tratamento de afecções orofaríngeas.

REFERÊNCIAS

- Alfonso, Dorothée et al. “Aromin and Aromicin, Two New Bioactive Annonaceous Acetogenins, Possessing an Unusual Bis-THF Ring Structure, from *Xylopia Aromatica* (Annonaceae).” *Tetrahedron* 52.12 (1996): 4215–4224. Web.
- Alves, Tânia Maria de Almeida et al. “Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants.” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95.3 (2000): 367–373. Web. 1 July 2018.
- Andrade, Eloisa Helena A. et al. “Essential Oil Composition from Leaf, Fruit and Flower of *Xylopia Aromatica* (Lam.) Mart.” *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 7.2 (2004): 151–154. Web. 1 July 2018.
- Arango, Orlando et al. “Inhibición De La Peroxidación Lipídica Y Capacidad Atrapadora De Radicales Libres De Alcaloides Aislados De Dos Annonaceae .,” *Actual Biol* 26.81 (2004): 105–110. Web. 1 July 2018.
- Asikin, Yonathan et al. “Cultivation Line and Fruit Ripening Discriminations of Shiikuwasha (*Citrus Depressa* Hayata) Peel Oils Using Aroma Compositional, Electronic Nose, and Antioxidant Analyses.” *Food Research International* 67 (2015): 102–110. Web. 12 July 2018.
- Bakkali, F. et al. “Biological Effects of Essential Oils – A Review.” *Food and Chemical Toxicology* 46.2 (2008): 446–475. Web. 1 July 2018.
- Barbieri Xavier, Vanessa et al. “Evaluation of the Key Odorants of *Baccharis Anomala* DC Essential Oil: New Applications for Known Products.” *Industrial Crops and Products* 49 (2013): 492–496. Web. 1 July 2018.
- Ben Brahim, Samia et al. “Gas Chromatography–Mass Spectrometry–Olfactometry To Control the Aroma Fingerprint of Extra Virgin Olive Oil from Three Tunisian Cultivars at Three Harvest Times.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66.11 (2018): 2851–2861. Web. 12 July 2018.
- Bisno, Alan L. et al. “Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis.” *Clinical Infectious Diseases* : 113–125. Web. 1 July 2018.
- Bjarnsholt, Thomas. “The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections.” *APMIS* 121.136 (2013): 1–58. Web. 10 July 2018.
- Braga, Fernão Castro et al. “Screening Brazilian Plant Species for in Vitro Inhibition of 5-Lipoxygenase.” *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 6.6 (2000): 447–452. Web. 1 July 2018.
- Bruni, Renato et al. “Chemical Composition and Biological Activities of Ishpingo Essential Oil, a Traditional Ecuadorian Spice from *Ocotea Quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) Flower Calices.” *Food Chemistry* 85.3 (2004): 415–421. Web. 4 July 2018.

Carapetis, Jonathan R et al. “The Global Burden of Group A Streptococcal Diseases.” *The Lancet Infectious Diseases* 5.11 (2005): 685–694. Web. 10 July 2018.

Castello-branco, Marianna Vieira S et al. “Apoptosis in HL60 Cells.” (2011): 1035–1042. Print.

Chen, Yinshuang et al. “Inverse Relationship between Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Antibodies and Interferon- γ and Interleukin-6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Pediatric Tonsillitis Caused by Staphylococcus Aureus.” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 97 (2017): 211–217. Web. 19 July 2018.

Colman-Saizarbitoria, T. et al. “Venezenin: A New Bioactive Annonaceous Acetogenin from the Bark of *Xylopia Aromatica*.” *Journal of Natural Products* 58.4 (1995): 532–539. Web.

Colman-Saizarbitoria, T., Z.-M. M. Gu, and J. L. McLaughlin. “Two New Bioactive Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Bark of *Xylopia Aromatica*.” *Journal of Natural Products* 57.12 (1994): 1661–1669. Web. 1 July 2018.

Colman-Saizarbitoria, T., Z.-M. Gu, and J. L. McLaughlin. “Two New Bioactive Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Bark of *Xylopia Aromatica*.” *Journal of Natural Products* 57.12 (1994): 1661–1669. Web. 1 July 2018.

Colman-Saizarbitoria, Trina, Dorothée Alfonso, and J.L. (Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apartado-40109, Caracas (Venezuela)) Jerry L. McLaughlin. “2,4-Cis- and Trans-Venezinones: New Bioactive Ketolactone Annonaceous Acetogenins, Lacking Tetrahydrofuran Rings, from *Xylopia Aromatica*.” *Phytochemical Analysis* 7.6 (1996): 313–317. Web. 1 July 2018.

Colman-Saizarbitoria, Trina, Dorothée Alfonso, and Jerry L. McLaughlin. “2,4-Cis- and Trans-Venezinones: New Bioactive Ketolactone Annonaceous Acetogenins, Lacking Tetrahydrofuran Rings, from *Xylopia Aromatica*.” *Phytochemical Analysis* 7.6 (1996): 313–317. Web.

Colman-Saizarbitoria, Trina et al. “Xymarginatin: A New Acetogenin Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport from *Xylopia Emarginata* Mart., Annonaceae.” *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19.4 (2009): 871–875. Web. 1 July 2018.

Colman-Saizarbitoria, Trina et al. “Xymarginatin: A New Acetogenin Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport from *Xylopia Emarginata* Mart., Annonaceae.” *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19.4 (2009): 871–875. Web.

Costa, Emmanoel Vilaça et al. “Isoquinoline Alkaloids from the Leaves of *Xylopia Laevigata* (Annonaceae).” *Biochemical Systematics and Ecology* 51.15440 (2013): 331–334. Web.

Costa, Emmanoel Vilaça et al. “Biological Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Xylopia Laevigata* (Annonaceae).” *Journal of Essential Oil Research* 25.3 (2013): 179–185. Web. 1 July 2018.

Couladis, M. et al. “Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil Of *Hypericum Rumeliacum* Subsp. *Apollinis* (Boiss. & Heldr.).” *Phytotherapy Research* 17.2 (2003): 152–154. Web. 15 Aug. 2018.

Craveiro, A. A., J. W. Alencar, and Otto Vostrowsky. "Essential Oil of *Xylopia Sericea*. A Comparative Analysis." *Journal of Natural Products* 49.6 (1986): 1146–1148. Web.

Da Câmara, Cláudio Augusto Gomes, José Wilson De Alencar, and Edilberto Rocha Silveira. "Volatile Constituents of *Xylopia Sericea* St. Hill." *Journal of Essential Oil Research* 8.1 (1996): 75–78. Web.

Da Silva, Karina Luize, and Valdir Cechinel Filho. "Plantas Do Gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico." *Química Nova* 25.3 (2002): 449–454. Web.

De Almeida Alves, Tânia Maria et al. "Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95.3 (2000): 367–373. Web. 1 July 2018.

de Cássia da Silveira e Sá, Rita et al. "A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils." *Molecules* 19.2 (2014): 1459–1480. Web. 4 July 2018.

De Melo, Angelita Cristine et al. "HPLC Quantitation of Kaurane Diterpenes in *Xylopia* Species." *Fitoterapia* 72.1 (2001): 40–45. Web.

de Mesquita, M. L. et al. "In Vitro Antiplasmodial Activity of Brazilian Cerrado Plants Used as Traditional Remedies." *Journal of Ethnopharmacology* 110.1 (2007): 165–170. Web.

Degenhardt, Jörg, Tobias G. Köllner, and Jonathan Gershenzon. "Monoterpene and Sesquiterpene Synthases and the Origin of Terpene Skeletal Diversity in Plants." *Phytochemistry* 70.15–16 (2009): 1621–1637. Web. 12 July 2018.

Devi, M. Preema et al. "Essential Oil: Its Economic Aspect, Extraction, Importance, Uses, Hazards and Quality." *Value Addition of Horticultural Crops: Recent Trends and Future Directions*. New Delhi: Springer India, 2015. 269–278. Web. 3 July 2018.

Dhifi, Wissal et al. "Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review." *Medicines* 3.4 (2016): 25. Web. 2 July 2018.

di Stasi, Luiz Claudio, and Clélia Akiko Hiruma-Lima. "Plantas Mediciniais Na Amazônia e Na Mata Atlântica." São Paulo: Editora UNESP. 323–330. Print.

E. Zautner, Andreas. "Adenotonsillar Disease." *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 6.2 (2012): 121–129. Web. 14 Aug. 2018.

Estrada, O et al. "Cytotoxic Activity against Tumour Cell Lines and Anti-Inflammatory Effects of Compounds Isolated from *Xylopia Aromatica*." *Planta Medica* 79.13 (2013): PF10. Web. 2 July 2018.

Farisa Banu, S. et al. "Effects of Patchouli and Cinnamon Essential Oils on Biofilm and Hyphae Formation by *Candida* Species." *Journal de Mycologie Médicale* 28.2 (2018): 332–339. Web. 24 July 2018.

Ferraz, Rosana P.C. et al. "Antitumour Properties of the Leaf Essential Oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae)." *Food chemistry* 141.1 (2013): 196–200. Web. 1 July 2018.

- Fiedler, Tomas, Thomas Köller, and Bernd Kreikemeyer. "Streptococcus Pyogenes Biofilm-Formation, Biology, and Clinical Relevance." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5 (2015): 15. Web. 11 July 2018.
- Figueiredo, A. Cristina et al. "Factors Affecting Secondary Metabolite Production in Plants: Volatile Components and Essential Oils." *Flavour and Fragrance Journal* 23.4 (2008): 213–226. Web. 1 July 2018.
- Firmino, Diego F. et al. "Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities." *The Scientific World Journal* 2018 (2018): 1–9. Web. 24 July 2018.
- Fischer, Dominique Corinne Hermine et al. "In Vitro Screening for Antiplasmodial Activity of Isoquinoline Alkaloids from Brazilian Plant Species." *Acta Tropica* 92.3 (2004): 261–266. Web.
- Flemming, Hans-Curt, and Jost Wingender. "The Biofilm Matrix." *Nature Reviews Microbiology* 8.9 (2010): 623–633. Web. 1 July 2018.
- Fournier, G. et al. "Chemical and Biological Studies of *Xylopia Aromatica* Stem Bark and Leaf Oils." *Planta Medica* 60.3 (1994): 283–284. Web.
- Fournier, G. et al. "Volatile Constituents of *Xylopia Frutescens*, *X. Pynaertii* and *X. Sericea*: Chemical and Biological Study." *Phytotherapy Research* 8.3 (1994): 166–169. Web.
- Fournier, G et al. "Volatile Constituents of *Xylopia Nitida* Leaf Oil." *Planta medica* 59.2 (1993): 185–186. Web.
- Fournier, Gilbert et al. "Chemical and Biological Studies of *Xylopia Longifolia* A. DC. Essential Oils." *Journal of Essential Oil Research* 5.4 (1993): 403–410. Web.
- Frausin, Gina et al. "Plants of the Annonaceae Traditionally Used as Antimalarials: A Review." *Revista Brasileira de Fruticultura* 36.spe1 (2014): 315–337. Web.
- Garavito, G. et al. "Antimalarial Activity of Some Colombian Medicinal Plants." *Journal of Ethnopharmacology* 107.3 (2006): 460–462. Web. 1 July 2018.
- Gowrishankar, Shanmugaraj et al. "In Vitro and In Vivo Biofilm Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* from Patients Associated with Pharyngitis Infection." *BioMed research international* 2016 (2016): 1289157. Web. 10 July 2018.
- Gratz, Nina et al. "Type I Interferon Production Induced by *Streptococcus Pyogenes*-Derived Nucleic Acids Is Required for Host Protection." *PLoS pathogens* 7.5 (2011): e1001345. Web. 10 July 2018.
- Hammer, K.A. et al. "A Review of the Toxicity of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil." *Food and Chemical Toxicology* 44.5 (2006): 616–625. Web. 4 July 2018.

Haussler, Susanne. "Biofilm Formation by the Small Colony Variant Phenotype of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Environmental Microbiology* 6.6 (2004): 546–551. Web. 13 Aug. 2018.

Hutchinson, John. "The Families of Flowering Plants; Arranged According to a New System Based Ontheir Probable Phylogeny/." 1973. Web. 1 July 2018.

INOUE, Miriam Hiroko et al. "EXTRATOS AQUOSOS DE *Xylopi*a Aromatica E *Annona Crassiflora* SOBRE CAPIM-MARANDU (*Brachiaria Brizantha*) E SOJA." *Scientia Agraria* 10.3 (2009): 245. Web. 1 July 2018.

Ishida, K. et al. "Influence of Tannins from *Stryphnodendron Adstringens* on Growth and Virulence Factors of *Candida Albicans*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58.5 (2006): 942–949. Web. 1 July 2018.

Jagessar, R C, and A R Maxwell. "The First Hydroxymanool, a Diterpene and Its Corresponding Monoacetate from *Xylopi*a Benthamii." *Journal of Natural Products* 5 (2012): 45–53. Web. 1 July 2018.

Jiang, Yang et al. "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Rosemary." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32.1 (2011): 63–68. Web. 15 Aug. 2018.

Kalia, Manmohit et al. "Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa*." Ed. Livia Leoni. *PLOS ONE* 10.8 (2015): e0135495. Web. 1 July 2018.

Karioti, Anastasia et al. "Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Xylopi*a *Aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) Leaves, Stem Bark, Root Bark, and Fresh and Dried Fruits, Growing in Ghana." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.26 (2004): 8094–8098. Web. 1 July 2018.

Khan, Mohd Sajjad Ahmad, and Iqbal Ahmad. "Antifungal Activity of Essential Oils and Their Synergy with Fluconazole against Drug-Resistant Strains of *Aspergillus Fumigatus* and *Trichophyton Rubrum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 90.3 (2011): 1083–1094. Web. 1 July 2018.

Kifer, Domagoj, Vedran Mužinić, and Maja Šegvić Klarić. "Antimicrobial Potency of Single and Combined Mupirocin and Monoterpenes, Thymol, Menthol and 1,8-Cineole against *Staphylococcus Aureus* Planktonic and Biofilm Growth." *The Journal of Antibiotics* 69.9 (2016): 689–696. Web. 1 July 2018.

Ko, Yeong-Jong et al. "Anti-Inflammatory Effect and Mechanism of Action of *Lindera Erythrocarpa* Essential Oil in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells." *EXCLI journal* 16 (2017): 1103–1113. Web. 4 July 2018.

Kobayashi, Hiroyuki. "Airway Biofilms: Implications for Pathogenesis and Therapy of Respiratory Tract Infections." *Treatments in respiratory medicine* 4.4 (2005): 241–53. Web. 10 July 2018.

Kumar, S. Nishanth et al. "Activity and Synergistic Interactions of Stilbenes and Antibiotic Combinations against Bacteria in Vitro." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28.11 (2012): 3143–3150. Web. 1 July 2018.

Lago, João Henrique G. et al. "Mono and Sesquiterpenes from the Leaf Essential Oil of *Xylopia Brasiliensis* Spreng. Annonaceae." *Journal of Essential Oil Research* 15.6 (2003): 406–407. Web.

Lago, João Henrique G. et al. "Composition of the Leaf Oil of *Xylopia Emarginata* Mart. (Annonaceae)." *Journal of Essential Oil Research* 17.6 (2005): 622–623. Web.

Lantto, Ulla et al. "Microbes of the Tonsils in PFAPA (Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis) Syndrome - a Possible Trigger of Febrile Episodes." *APMIS* 123.6 (2015): 523–529. Web. 19 July 2018.

Lebeaux, David, Jean-Marc Ghigo, and Christophe Beloin. "Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 78.3 (2014): 510–43. Web. 9 July 2018.

Lemon, Katherine P et al. "Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx." *mBio* 1.3 (2010): n. pag. Web. 19 July 2018.

Lihua Jiang, and Kikue Kubota*. "Differences in the Volatile Components and Their Odor Characteristics of Green and Ripe Fruits and Dried Pericarp of Japanese Pepper (*Xanthoxylum Piperitum* DC.)." (2004): n. pag. Web. 24 July 2018.

Lima, E. O. et al. "In Vitro Antifungal Activity of Essential Oils Obtained from Medicinal Plants against Dermatophytes." *Mycoses* 36.9–10 (2009): 333–336. Web. 1 July 2018.

Lima, Renata B. S. et al. "In Vitro and in Vivo Anti-Malarial Activity of Plants from the Brazilian Amazon." *Malaria Journal* 14.1 (2015): 508. Web.

Lin, Li Gen et al. "Naturally Occurring Diterpenoid Dimers: Source, Biosynthesis, Chemistry and Bioactivities." *Planta Medica* 82.15 (2016): 1309–1328. Web.

LÓPEZ, R., L. E. CUCA, and G. DELGADO. "Antileishmanial and Immunomodulatory Activity of *Xylopia Discreta*." *Parasite Immunology* 31.10 (2009): 623–630. Web. 1 July 2018.

Macedo, M., and A. R. Ferreira. "Plantas Hipoglicemiantes Utilizadas Por Comunidades Tradicionais Na Bacia Do Alto Paraguai e Vale Do Guaporé, Mato Grosso - Brasil." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14 (2004): 45–47. Web. 1 July 2018.

Maia, José Guilherme S. et al. "Leaf Volatile Oils from Four Brazilian *Xylopia* Species." *Flavour and Fragrance Journal* 20.5 (2005): 474–477. Web. 1 July 2018.

Maia, José Guilherme S et al. "Leaf Volatile Oils from Four Brazilian *Xylopia* Species." *Flavour and Fragrance Journal* 20.5 (2005): 474–477. Web.

Martins, Dirceu et al. "Labdane Dimers from *Xylopia Atomica*." *Phytochemistry* 51.6 (1999): 813–817. Web.

Martins, Dirceu et al. "A Sesquiterpene Dimer from *Xylopia Aromatica*." *Phytochemistry* 48.4 (1998): 677–680. Web.

Martins, Italo R. R. et al. "Relaxant Effect of Ent-7^α-Hydroxytrachyloban-18-Oic Acid, a Trachylobane Diterpene from *Xylopia Langsdorffiana* A. St-Hil. & Tul., on Tracheal Smooth Muscle." *Journal of Smooth Muscle Research* 49.0 (2013): 15–25. Web.

Mazzari, Andre L D A, and Jose M Prieto. "Herbal Medicines in Brazil: Pharmacokinetic Profile and Potential Herb-Drug Interactions." *Frontiers in pharmacology* 5 (2014): 162. Web. 1 July 2018.

Mello-Silva, Renato, and Jenifer De Carvalho Lopes. "Xylopia Atlantica (Annonaceae), New Species from the Coastal Forest of Bahia, Brazil." *Phytotaxa* 188.1 (2014): 038–042. Web.

Mendes, R et al. "The Potential of the Essential Oil from the Brazilian Spice *Xylopia Sericea* A. St.-Hil. (Annonaceae) in the Treatment of Skin Inflammation." 4.S 01 (2017): 1608172. Web.

Mendes, Renata de F. et al. "The Essential Oil from the Fruits of the Brazilian Spice *Xylopia Sericea* A. St.-Hil. Presents Expressive in-Vitro Antibacterial and Antioxidant Activity." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69.3 (2017): 341–348. Web.

Mertz, Dominik et al. "Exclusive Staphylococcus Aureus Throat Carriage." *Archives of Internal Medicine* 169.2 (2009): 172. Web. 1 July 2018.

Miguel, Maria Graça. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review." *Molecules* 15.12 (2010): 9252–9287. Web. 4 July 2018.

Montenegro, Camila de Albuquerque et al. "Gastroprotective Effect of *Xylopia Langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae): Involvement of Endogenous Sulfhydryls Compounds and Nitric Oxide." *Records of Natural Products* 8.2 (2014): 165–183. Print.

Moraes, Miguel P.L., and Nidia F. Roque. "Diterpenes from the Fruits of *Xylopia Aromatica*." *Phytochemistry* 27.10 (1988): 3205–3208. Web.

Moreira, Isabel C. et al. "Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopia Brasiliensis*." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14.5 (2003): 828–831. Web. 1 July 2018.

Moreira, Isabel C. et al. "Sesquiterpenos e Hidrocarbonetos Dos Frutos de *Xylopia Emarginata* (Annonaceae)." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17.1 (2007): 55–58. Web. 1 July 2018.

Moreira, Isabel C., Nidia F. Roque, and João Henrique G. Lago. "Diterpene Adducts from Branches of *Xylopia Emarginata*." *Biochemical Systematics and Ecology* 34.11 (2006): 833–837. Web.

Mukherjee, Pranab K., and Jyotsna Chandra. "Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance." *Microbiology Spectrum* 3.4 (2015): n. pag. Web. 13 Aug. 2018.

Nascimento, Alessandra A. et al. "Cardiovascular Effects Induced by the Hydroalcoholic Extract of the Stem of *Xylopia Cayennensis* in Rats." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16.1 (2006): 17–21. Web. 1 July 2018.

Nishiyama, Yumi et al. "Quaternary Isoquinoline Alkaloids from *Xylopia Parviflora*." *Phytochemistry* 65.7 (2004): 939–944. Web.

Oliveira, Verena B. et al. "Chemical Composition and Inhibitory Activities on Dipeptidyl Peptidase IV and Pancreatic Lipase of Two Underutilized Species from the Brazilian Savannah: *Oxalis Cordata* A.St.-Hil. and *Xylopia Aromatica* (Lam.) Mart." *Food Research International* 105.November 2017 (2018): 989–995. Web.

Oliveira, Verena B. et al. "Effects of *Xylopia Aromatica* (Lam.) Mart. Fruit on Metabolic and Inflammatory Dysfunction Induced by High Refined Carbohydrate-Containing-Diet in Mice." *Food Research International* 62 (2014): 541–550. Web.

Oral, Pilosa, E M Pacientes, and Portadores Do. "Universidade Federal Fluminense." (2006): n. pag. Print.

Ortiz-Gomez, Francisco. "Botanica Medica Guahibo . Plantas Medicinales, Magicas y Psicotropicas Utilizadas Por Los Sikuaní y Cuiba (Llanos Orientales De Colombia)." *Caldasia* 16.76 (1989): 14–22. Print.

Pino, Jorge A. et al. "Leaf Oil of *Xylopia Aromatica* (Lam.) Mart, from Cuba." *Journal of Essential Oil Research* 12.6 (2000): 751–752. Web.

Pombo, M M et al. "*Xylopia Annoniflora* (Annonaceae)—A New Species from Central Amazonia." *Phytotaxa* 317ID–3.2 (2017): 130–136. Web.

Ponce, A.G. et al. "Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Microflora of Organic Swiss Chard." *LWT - Food Science and Technology* 36.7 (2003): 679–684. Web. 1 July 2018.

Pontes, Aline Fernandes, Maria Regina de V. Barbosa, and Paul J.M. Maas. "Flora Paraibana: Annonaceae Juss." *Acta Botanica Brasilica* 18.2 (2004): 281–293. Web. 1 July 2018.

Pontes, Wendel José Teles et al. "Atividade Acaricida Dos Óleos Essencias de Folhas e Frutos de *Xylopia Sericea* Sobre o Ácaro Rajado (*Tetranychus Urticae* Koch)." *Química Nova* 30.4 (2007): 838–841. Web. 1 July 2018.

Poulain, Daniel. "Candida Albicans, Plasticity and Pathogenesis." *Critical Reviews in Microbiology* 41.2 (2015): 208–217. Web. 15 Aug. 2018.

Quílez, A.M. et al. "Potential Therapeutic Applications of the Genus *Annona* Local and Traditional Uses and Pharmacology." *Journal of Ethnopharmacology* (2018): n. pag. Web. 20 July 2018.

Quintans, Jullyanade S S et al. “Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia Laevigata*.” *Planta Medica* 79.2 (2013): 123–130. Web.

Renner, Bertold, Christian A Mueller, and Adrian Shephard. “Environmental and Non-Infectious Factors in the Aetiology of Pharyngitis (Sore Throat).” *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 61.10 (2012): 1041–52. Web. 13 Aug. 2018.

Ribeiro, Luciano A.A. et al. “O Ácido (8)17,12E,14-Labdatrieno-18-Óico (Labdano302), Diterpeno Tipo Labdano Isolado de *Xylopia Langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) Relaxa a Traquéia Isolada de Cobaia.” *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17.2 (2007): 197–203. Web.

Rodrigues, A. M. S. et al. “Larvicidal Activity of Some Cerrado Plants Extracts Againsts *Aedes Aegypti*.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 22.2 (2006): 314–317. Web.

Santos, D. Y.A.C., and M. L.F. Salatino. “Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: Taxonomic Significance.” *Phytochemistry* 55.6 (2000): 567–573. Web.

Santos, Rosimeire F. et al. “Ent-7 α -Acetoxytrachyloban-18-Oic Acid and Ent-7 α -Hydroxytrachyloban-18-Oic Acid from *Xylopia Langsdorffiana* A. St-Hil. & Tul. Modulate K⁺ and Ca²⁺ channels to Reduce Cytosolic Calcium Concentration on Guinea Pig Ileum.” *European Journal of Pharmacology* 678.1–3 (2012): 39–47. Web.

Sfeir, Julien et al. “In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus Pyogenes*.” *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2013 (2013): 269161. Web. 16 Aug. 2018.

Shirdel, Maryam, Hossein Tajik, and Mehran Moradi. “Combined Activity of Colloid Nanosilver and *Zataria Multiflora* Boiss Essential Oil-Mechanism of Action and Biofilm Removal Activity.” *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 7.4 (2017): 621–628. Web. 24 July 2018.

Sieniawska, Elwira et al. “Antimicrobial Efficacy of *Mutellina Purpurea* Essential Oil and α -Pinene against *Staphylococcus Epidermidis* Grown in Planktonic and Biofilm Cultures.” *Industrial Crops and Products* 51 (2013): 152–157. Web. 15 Aug. 2018.

SIGN-Intercollegiate Guidelines Network, Scottish. *Management of Sore Throat and Indications for Tonsillectomy*. N.p., 2010. Web. 13 Aug. 2018.

Silva, L E et al. “Plantas Do Gênero *Xylopia*: Composição Química e Potencial Farmacológico.” *Rev. Bras. Pl. Med* (2015): 814–826. Web. 20 July 2018.

Silva, L E et al. “Plantas Do Gênero *Xylopia*: Composição Química e Potencial Farmacológico.” *Rev. Bras. Pl. Med., Campinas* 17.4 (2015): 814–826. Web. 12 July 2018.

Silva, Thanany Brasil da et al. “Chemical Composition and Anti-Trypanossoma *Cruzi* Activity of Essential Oils Obtained from Leaves of *Xylopia Frutescens* and *X. Laevigata* (Annonaceae).” *Natural Product Communications* 8.3 (2013): 403–406. Web.

Simoni, Ic. "Evaluation of the Antiviral Activity of Brazilian Cerrado Plants against Animal Viruses." *Virus Reviews & Research* 12.1–2 (2007): 25–31. Print.

Sivori, Enrique M., and Jaime R. Jatimlansky. "Effects of Xylopine on Physiological Activities of *Scenedesmus Obliquus*." *Plant and Cell Physiology* 11.6 (1970): 921–926. Web.

Soll, David R, and Karla J Daniels. "Plasticity of *Candida Albicans* Biofilms." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 80.3 (2016): 565–95. Web. 13 Aug. 2018.

Souza, Iara Leão Luna de et al. "Essential Oil from *Xylopia Frutescens* Aubl. Reduces Cytosolic Calcium Levels on Guinea Pig Ileum: Mechanism Underlying Its Spasmolytic Potential." *BMC complementary and alternative medicine* 15 (2015): 327. Web. 16 Aug. 2018.

Stashenko, Elena E., Beatriz E. Jaramillo, and Jairo René Martínez. "Analysis of Volatile Secondary Metabolites from Colombian *Xylopia Aromatica* (Lamarck) by Different Extraction and Headspace Methods and Gas Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1025.1 (2004): 105–113. Web.

Suffredini, Ivana B. et al. "In Vitro Cytotoxic Activity of Brazilian Plant Extracts against Human Lung, Colon and CNS Solid Cancers and Leukemia." *Fitoterapia* 78.3 (2007): 223–226. Web. 1 July 2018.

Swamy, Mallappa Kumara, Mohd Sayeed Akhtar, and Uma Rani Sinniah. "Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review." *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2016 (2016): 3012462. Web. 12 July 2018.

Takahashi, Jacqueline A. et al. "Frutoic Acid, a Dimeric Kaurane Diterpene from *Xylopia Frutescens*." *Phytochemistry* 40.2 (1995): 607–609. Web.

Takahashi, Jacqueline A. et al. "Mono and Diterpenes from Seeds of *Xylopia Sericea*." *Química Nova* 24.5 (2001): 616–618. Web. 1 July 2018.

Tavares, Josean F. et al. "Composition and Molluscicidal Properties of Essential Oils from Leaves of *Xylopia Langsdorffiana* A. St. Hil. et Tul. (Annonaceae)." *Journal of Essential Oil Research* 19.3 (2007): 282–284. Web.

Taylor, Publisher, L P S Pimenta, and D D Mendonça. "Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters Aporphine Alkaloids and Feruloylamides from the Bark of *Xylopia Benthamii* R . E . Fries (Annonaceae)." November 2012 (2011): n. pag. Print.

Tong, Steven Y C et al. "Staphylococcus Aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management." *Clinical microbiology reviews* 28.3 (2015): 603–61. Web. 10 July 2018.

Trombetta, Domenico et al. "Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49.6 (2005): 2474–8. Web. 1 July 2018.

Turina, A.del V. et al. "Natural Terpenes: Self-Assembly and Membrane Partitioning." *Biophysical Chemistry* 122.2 (2006): 101–113. Web. 12 July 2018.

Turner, Siobhán A, and Geraldine Butler. “The Candida Pathogenic Species Complex.” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4.9 (2014): a019778. Web. 11 July 2018.

Vaillancourt, Katy et al. “In Vitro Antibacterial Activity of Plant Essential Oils against Staphylococcus Hyicus and Staphylococcus Aureus, the Causative Agents of Exudative Epidermitis in Pigs.” *Archives of Microbiology* (2018): n. pag. Web. 24 July 2018.

Vergis, Jess et al. “Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55.10 (2015): 1320–1323. Web. 4 July 2018.

Verhoeven, Paul O et al. “Detection and Clinical Relevance of *Staphylococcus Aureus* Nasal Carriage: An Update.” *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12.1 (2014): 75–89. Web. 1 July 2018.

Vilegas, Wagner et al. “Diterpenic Adducts from *Xylopi*a Species.” *Phytochemistry* 30.6 (1991): 1869–1872. Web.

Walker, Mark J et al. “Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A Streptococcus.” *Clinical microbiology reviews* 27.2 (2014): 264–301. Web. 10 July 2018.

Whibley, Natasha, and Sarah L. Gaffen. “Beyond Candida Albicans: Mechanisms of Immunity to Non-Albicans Candida Species.” *Cytokine* 76.1 (2015): 42–52. Web. 13 Aug. 2018.

Xiao, Jin et al. “The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm.” *PLoS pathogens* 8.4 (2012): e1002623. Web. 10 July 2018.

Xylopia, Raízes De et al. “Diterpenos Das Raízes de *Xylopi*a Nitida Dunnal. (Annonaceae).” 45.Ic (2001): 1997. Print.

Znaidi, Sadri et al. “A Comprehensive Functional Portrait of Two Heat Shock Factor-Type Transcriptional Regulators Involved in Candida Albicans Morphogenesis and Virulence.” Ed. Robert A. Cramer. *PLoS Pathogens* 9.8 (2013): e1003519. Web. 1