

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Jhamine Caroline de Oliveira Freitas**

**Atividade antifúngica de espilantol frente a uma espécie de *Candida albicans* resistente a multidrogas**

Juiz de Fora

2019

Jhamine Caroline de Oliveira Freitas

**Atividade antifúngica de espilantol frente a uma espécie de *Candida albicans* resistente a multidrogas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Freitas, Jhamine Caroline de Oliveira.

Atividade antifúngica de espilantol frente a uma espécie de *Candida albicans* resistente a multidrogas / Jhamine Caroline de Oliveira Freitas. -- 2019.

97 p. : il.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Atividade antifúngica. 2. Resistência fúngica. 3. *Candida albicans*. 4. Candidíase. 5. Espilantol. I. Pinto, Priscila de Faria, orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.

“Atividade antifúngica de espilantol frente a uma espécie de  
*Candida albicans* resistente a multidrogas”

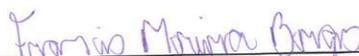
**Jhamine Caroline de Oliveira Freitas**

**ORIENTADORA:** Priscila de Faria Pinto  
**COORIENTADOR:** Rodrigo Luiz Fabri

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

Aprovada em 26/07/2019

  
\_\_\_\_\_  
Danielle Cristina Zimmermann Franco  
(Universidade Presidente Antônio Carlos - UNIPAC)

  
\_\_\_\_\_  
Francis Moreira Borges  
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

  
\_\_\_\_\_  
Priscila de Faria Pinto  
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

  
\_\_\_\_\_  
Rodrigo Luiz Fabri  
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Dedico este trabalho aos meus pais,  
minhas irmãs e à toda a minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter me dado saúde, força e fé para superar as dificuldades e por ter me guiado e iluminado até este momento.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pelas oportunidades oferecidas e por me conceder essa especial formação de mestre.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Em especial, à minha orientadora Priscila de Faria Pinto e ao meu coorientador Rodrigo Luiz Fabri pela paciência, apoio, confiança e incentivo. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem vocês. Muito obrigada por todos os ensinamentos, dúvidas esclarecidas, companheirismo e amizade.

Aos meus avós, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço à minha mãe Juçara e meu pai Ailton, que pela arte de amar um ao outro me geraram e souberam me amar, me educar, me transmitindo os mais valiosos saberes, compartilhando comigo cada vitória, cada derrota, cada lágrima e alegrias. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Jhanini e Jade, pelo companheirismo e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu marido Igor, por ser meu maior amigo e incentivador na conclusão deste trabalho. Pela paciência em momentos de dúvidas, irritabilidade e ansiedade, e por nunca ter duvidado da minha capacidade, transmitindo-me muita força, amor, compreensão e carinho.

Aos meus amigos, especialmente ao Ari, Kézia, Olívia, Lara, por dividirem comigo os momentos de maiores dificuldades e também de alegrias. Adoro vocês!

Ao Ari, meu grande amigo, por me auxiliar e ajudar na execução dos experimentos no laboratório. Você tem todo o meu respeito e admiração, continue sendo esta pessoa humilde que sempre quer o bem das outras pessoas, você vai muito longe. Muito obrigada por tudo!

A todos do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos que contribuíram, seja de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho, em especial ao Delfino, que sempre se mostrou eficiente para solucionar qualquer problema que acontecesse no laboratório, sempre quis me ajudar de alguma forma e que cuida com tanto carinho desse local de trabalho, tornando-o organizado e agradável.

Ao Thiago e à professora Rossana do Laboratório de Biologia Celular, e a Natália e ao professor Guilherme do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados pela parceria nos experimentos e por ceder seu tempo e conhecimento.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

E a todos meus amigos que, direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui.

## RESUMO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Essas, por sua vez, apresentam uma crescente resistência frente aos antifúngicos disponíveis atualmente, o que impulsiona a busca por novas substâncias antifúngicas de origem vegetal. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de espilantol, um composto isolado de diversas espécies vegetais, frente à linhagem de *Candida albicans* ATCC® 10231, resistente a múltiplas drogas e determinar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Desse modo, foram realizados ensaios de microdiluição seriada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e do efeito dessa concentração sobre o crescimento dessa levedura, análises da curva de crescimento fúngico, densidade e viabilidade celular, avaliação da permeabilidade do envoltório celular (captação de cristal violeta, extravasamento de nucleotídeos, proteção do sorbitol e ligação ao ergosterol exógeno), e o ensaio de sinergismo de espilantol com dois antifúngicos azólicos (fluconazol e itraconazol) pelo teste de *checkerboard*. Foi avaliada também a viabilidade celular em linhagens de fibroblastos (NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT) tratados com espilantol. Por fim, as análises das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas deste composto foram determinadas por testes *in silico*, utilizando ferramentas computacionais. Espilantol apresentou uma CIM de 200 µg/mL, com efeito fungistático sobre *C. albicans*. Além disso, ele levou a uma maior inibição do crescimento fúngico e uma redução significativa no número de células fúngicas. Espilantol também causou uma significativa diminuição na atividade metabólica das leveduras, reduzindo assim, o número de células viáveis. Após o tratamento das células fúngicas com este composto, ocorreu um aumento na captação de cristal violeta, demonstrando assim, que o espilantol altera a permeabilidade das mesmas, levando a um aumento na liberação de nucleotídeos. Obteve-se um valor de CIM de 800 µg/mL nos ensaios de sorbitol e ergosterol, o que indica uma possível atuação de espilantol no envoltório celular da levedura. Um excelente efeito sinérgico entre espilantol e fluconazol ( $\Sigma CIF=0,265$ ) e entre espilantol e itraconazol ( $\Sigma CIF= 0,0019$ ) também foi observado. Os resultados de viabilidade celular mostraram que o espilantol, nas concentrações testadas, não apresentou toxicidade às linhagens de fibroblastos e queratinócitos. Já os estudos *in silico* demonstraram que ele apresenta características que permitem a sua administração por via oral. Com base nos resultados obtidos, nota-se que o espilantol possivelmente está agindo em nível de envoltório celular da levedura e pelas análises *in silico*, é possível afirmar que ele apresentou resultados satisfatórios, com características que permitem sua classificação como um bom candidato a fármaco. Diante do exposto, podemos ressaltar o grande potencial científico e terapêutico dessa substância, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas causadas pelo gênero *Candida*.

**Palavras Chaves:** Atividade antifúngica. Resistência fúngica. *Candida albicans*. Candidíase. Espilantol.

## ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by yeast belonging to the genus *Candida*. These, in turn, are increasingly resistant to antifungals available today, which drives the search for new antifungal substances of plant origin. Thus, the aim of the present study was to evaluate the in vitro antifungal activity of spilanthol, a compound isolated from several plant species, against the multidrug resistant *Candida albicans* ATCC® 10231 strain and to determine its physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Thus, serial microdilution assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the effect of this concentration on the growth of this yeast, fungal growth curve analysis, cell density and viability, cell envelope permeability evaluation (uptake crystal, nucleotide extravasation, sorbitol protection and binding to exogenous ergosterol), and the spilanthol synergism assay with two azole antifungals (fluconazole and itraconazole) by the checkerboard test. Cell viability was also evaluated in fibroblast (NIH / 3T3) and keratinocyte (HaCaT) strains treated with spilanthol. Finally, the analyzes of the physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of this compound were determined by in silico tests using computational tools. Spilanthol had a MIC of 200 µg / mL, with fungistatic effect on *C. albicans*. In addition, it led to greater inhibition of fungal growth and a significant reduction in the number of fungal cells. Spilanthol also caused a significant decrease in yeast metabolic activity, thereby reducing the number of viable cells. After treatment of the fungal cells with this compound, there was an increase in violet crystal uptake, thus demonstrating that spilanthol alters their permeability, leading to an increase in nucleotide release. A MIC value of 800 µg / mL was obtained in the sorbitol and ergosterol assays, which indicates a possible spilanthol activity in the yeast cell envelope. An excellent synergistic effect between spilanthol and fluconazole ( $\Sigma$ CIF = 0.265) and between spilanthol and itraconazole ( $\Sigma$ CIF = 0.0019) was also observed. Cell viability results showed that spilanthol at the tested concentrations showed no toxicity to fibroblast and keratinocyte strains. Already in silico studies have shown that it has characteristics that allow its administration orally. Based on the results obtained, it can be noted that spilanthol is possibly acting at the yeast cell envelope level and by in silico analyzes, it can be stated that it presented satisfactory results, with characteristics that allow its classification as a good drug candidate. Given the above, we can highlight the great scientific and therapeutic potential of this substance, opening new perspectives for the treatment of infectious diseases caused by the genus *Candida*.

**Keywords:** Antifungal activity. Fungal resistance. *Candida albicans*. Candidiasis. Spilanthol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das espécies de <i>Candida</i> . .....	26
<b>Figura 2-</b> Imagem ilustrativa da espécie <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 visualizada por microscopia eletrônica de varredura. 2A) no aumento de 2000 X e 2B) no aumento de 5000 X.....	29
<b>Figura 3-</b> Principais mecanismos de ação dos antifúngicos. ....	32
<b>Figura 4-</b> Biossíntese de ergosterol nas células fúngicas.....	35
<b>Figura 5-</b> Representação dos transportadores da família ABC ( <i>ATP-Binding Cassette</i> ) e do transportador MSF ( <i>Major Superfamily Facilitator</i> ).....	38
<b>Figura 6-</b> Modelo de desenvolvimento de biofilme proposto para <i>Candida albicans</i> . ....	43
<b>Figura 7-</b> Estrutura química do espilantol ( $C_{14}H_{23}NO$ ).....	44
<b>Figura 8-</b> Rota biossintética do espilantol. ....	45
<b>Figura 9-</b> Esquema ilustrativo do ensaio de <i>checkerboard</i> com espilantol e os antifúngicos, fluconazol e itraconazol, frente à <i>Candida albicans</i> . ....	54
<b>Figura 10-</b> Fórmula utilizada para calcular o índice de concentração inibitória fracionada ( $\Sigma C_{IF}$ ) entre o espilantol e os antifúngicos fluconazol e itraconazol. ....	55
<b>Figura 11-</b> Efeito de espilantol (ESP) no crescimento fúngico de <i>C. albicans</i> ATCC® 10231. Os fungos cultivados foram corados com o kit <i>LIVE/ DEAD Yeast Viability</i> e contados sob microscopia de fluorescência para avaliação da densidade e da viabilidade celular. A nistatina (NIS) foi usada como controle positivo. As letras indicam diferença estatística com os grupos tratados com veículo de ESP (a) e tratados com nistatina (b) (ANOVA seguido de Bonferroni, $P < 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. ....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito de CIM para o espilantol e os antifúngicos frente à espécie <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231. ....	60
<b>Tabela 2-</b> Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de espilantol contra <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 na presença e ausência de sorbitol e ergosterol exógeno pelo ensaio de microdiluição em caldo. ....	70
<b>Tabela 3-</b> Índice de Concentração Inibitória Fracionada ( $\Sigma$ CIF) e seu efeito... ..	72
<b>Tabela 4-</b> Parâmetros físico-químicos do espilantol encontrados após busca nas plataformas <i>pkCSM</i> , <i>Molinspiration</i> ® e <i>Swiss ADME</i> .....	76
<b>Tabela 5-</b> Parâmetros farmacocinéticos de espilantol analisados pela plataforma <i>pkCSM</i> .....	80
<b>Tabela 6-</b> Principais possíveis alvos farmacodinâmicos de espilantol utilizando a plataforma <i>Way2Drug</i> .....	84

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC® 10231 na presença de espilantol (ESP) e Nistatina (NIS). Para construção da curva de crescimento fúngica (controle) foi utilizado o veículo de espilantol. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média ± desvio padrão..... 63
- Gráfico 2-** Permeabilidade celular por percentagem (%) de captação de cristal violeta por *Candida albicans* ATCC® 10231. Culturas tratadas com espilantol (ESP) ou nistatina (NIS) foram avaliadas pela permeabilidade de captação de cristal violeta. Controle negativo foi tratado com veículo de espilantol. Letras indicam diferença estatisticamente em relação ao controle negativo (CC) (a) e positivo (NIS) (b). ANOVA seguido por Bonferroni, P <0,05). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média ± desvio padrão..... 67
- Gráfico 3-** Liberação de nucleotídeos de *Candida albicans* ATCC® 10231 sob efeito de espilantol (ESP) e nistatina (NIS). (A) Representa as curvas de extravasamento de nucleotídeos medido por densidade óptica em 260 nm por um período de 4 horas, em intervalos de 1 hora e (B) área sob a curva. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle (a) e NIS (b) (ANOVA seguido de Bonferroni, P <0,05). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média ± DP. .... 69
- Gráfico 4-** Avaliação do perfil de viabilidade celular em linhagens de fibroblastos (NIH/3T3) tratados com espilantol. Letras indicam diferença estatisticamente em relação ao controle negativo (a) e solvente (b). ANOVA seguido por Bonferroni, P <0,05). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média ± desvio padrão. .... 74
- Gráfico 5-** Avaliação do perfil de viabilidade celular em linhagens de queratinócitos (HaCaT) tratados com espilantol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média ± desvio padrão. ... 74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
ΣCIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Standard Laboratory Institute</i>
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DAPI	4",6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-Padrão
ESP	Espilantol
FLU	Fluconazol
LAG	Fase de Latência
LOG	Fase Exponencial
NIS	Nistatina
PBS	Solução tampão de <i>Phosphate</i> <i>Buffered Saline</i>
PH	Potencial hidrogeniônico
SB	Sabouraud
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
μ	micro
μg	micrograma
μL	microlitro
g	grama
mg	miligrama
mL	mililitro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
β	beta
™	trade mark

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 GÊNERO <i>Candida</i> spp. ....	23
2.2 ESPÉCIE <i>Candida albicans</i> .....	27
2.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS .....	31
2.4 RESISTÊNCIA FÚNGICA .....	36
2.5 CÉLULAS PLANCTÔNICAS X BIOFILMES .....	40
2.6 ESPILANTOL .....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	48
3.1 OBJETIVO GERAL .....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
4.1 MATERIAL DE ESTUDO .....	49
4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS.....	49
4.2.1 Linhagem fúngica e cultivo celular .....	49
4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	49
4.2.3 Efeito da CIM sobre o crescimento fúngico.....	50
4.2.4 Determinação da curva de crescimento .....	50
4.2.5 Determinação da densidade e da viabilidade celular .....	51
4.2.6 Ensaio sobre o envoltório celular.....	51
4.2.6.1 Permeabilidade da membrana com cristal violeta .....	52
4.2.6.2 Extravasamento de membrana (“Liberação” de nucleotídeos) ..	52
4.2.6.3 Ensaio de proteção do sorbitol.....	53
4.2.6.4 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno.....	53
4.2.7 Ensaio de sinergismo ( <i>Checkerboard</i> ).....	53
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE ÀS LINHAGENS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS .....	55

4.3.1 Linhagens de células e condições de cultivo.....	55
4.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT .....	56
4.4 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> .....	57
4.4.1 Avaliação das propriedades físico-químicas de espilantol.....	57
4.4.2 Avaliação das propriedades farmacocinética e farmacodinâmica de espilantol .....	58
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e seu efeito sobre <i>C. albicans</i> .....	59
5.2 Determinação da curva de crescimento de <i>C. albicans</i> .....	62
5.3 Determinação da densidade e da viabilidade celular de <i>C. albicans</i> .....	64
5.4 Ensaio sobre o envoltório celular.....	66
5.4.1 Permeabilidade da membrana com cristal violeta .....	66
5.4.2 Extravasamento de membrana (“liberação” de nucleotídeos) .....	68
5.4.3 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno e de proteção do sorbitol .....	69
5.5 Ensaio de sinergismo ( <i>Checkerboard</i> ).....	70
5.6 Avaliação da viabilidade celular em linhagens de fibroblastos e queratinócitos .....	73
5.7 Estudos <i>in silico</i> .....	75
5.7.1 Avaliação das propriedades físico-químicas de espilantol.....	75
5.7.2 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de espilantol. ....	77
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as doenças fúngicas invasivas surgiram como um importante desafio médico em todo o mundo (ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019), sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade, acompanhadas de altos custos para os sistemas de saúde (PARENTE-ROCHA et al., 2017).

Recentemente, cerca de cinco milhões de espécies fúngicas foram classificadas e destas, estima-se que 300 são capazes de estabelecer doença em mamíferos. Como patógeno humano, foi relatado que, globalmente, as infecções fúngicas causam atualmente 1,5 milhão de mortes por ano (SHARMA et al., 2019).

As doenças causadas por fungos podem ocorrer em pessoas saudáveis, porém, pacientes imunocomprometidos são o principal grupo de risco para as infecções fúngicas invasivas (PARENTE-ROCHA et al., 2017). Desse modo, essas infecções tornaram-se um grande problema de saúde pública (PAIS et al., 2019).

Os dois fungos frequentemente responsáveis por causar infecções fúngicas invasivas em seres vivos são do gênero *Candida* e *Aspergillus* (ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019), sendo as leveduras do gênero *Candida* spp. os principais patógenos causadores de septicemia e elevadas taxas de mortalidade (SAKAGAMI et al., 2019). Destas, *Candida albicans* e *Candida glabrata* são as duas espécies mais comumente isoladas no mundo inteiro (PAIS et al., 2019).

Entre os patógenos fúngicos do gênero *Candida* associados a humanos, os mais notáveis são *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, e os emergentes *Candida haemulonii* e *Candida auris*. Estes fungos causam uma variedade de doenças, podendo levar a infecções invasivas graves incluindo candidíases e candidemias (SHARMA et al., 2019).

O surgimento de espécies multirresistentes como *Candida glabrata* e o novo patógeno *Candida auris* representa um séria ameaça para pacientes criticamente doentes e a resistência adquirida após exposição equinocandinas parece estar em ascensão (CORTEGIANI; MISSERI; CHOWDHARY, 2019).

*C. auris* possui multirresistência intrínseca em relação aos antifúngicos triazólicos, equinocandinas e poliênicos, por isso, representa uma ameaça global de saúde (NAMI et al., 2019).

Dentre essas leveduras, *Candida albicans* é responsável pela maioria das infecções fúngicas invasivas, sendo classificada como uma levedura comensal, facilmente encontrada na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento. Quando ocorre uma disbiose da microbiota, devido a uma série de fatores predisponentes, essa levedura pode se tornar patogênica e invadir tecidos do hospedeiro, gerando doenças (SANTANA et al., 2013).

Vários fatores contribuem para que a infecção fúngica se instale, dentre os quais podemos destacar a *Diabetes mellitus*, rompimento das barreiras cutânea e mucosa, uso prolongado de antimicrobianos, disfunção dos neutrófilos, desordem metabólica, defeito na imunidade mediada por células, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), exposição direta aos fungos leucemia, queimaduras, transplantes, tratamento quimioterápico, desnutrição aguda, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), uso de sondas, resistência a antifúngicos, dentre outros (BARBEDO e SGARBI, 2010; ALTHAUS et al., 2015).

Nos últimos anos, a incidência e a gravidade das doenças fúngicas tem aumentado devido ao crescente uso de diversos agentes antifúngicos disponíveis comercialmente, o que tem levado ao desenvolvimento de uma resistência fúngica a estes fármacos, dificultando ou até mesmo impossibilitando o tratamento dessas infecções (KATHIRAVAN et al., 2012; MENEZES et al., 2013).

Isso tem ocorrido, porque, embora o arsenal de drogas antifúngicas tenha se expandido, os medicamentos antifúngicos disponíveis atualmente não atendem aos crescentes requisitos de tratamento, além do uso indiscriminado dos mesmos, e por estes motivos, torna-se importante o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas que apresentem eficácia, segurança e baixo custo (BOSTROM et al., 2012; KATHIRAVAN et al., 2012; ANEJA et al., 2016).

Nesse contexto, a descoberta de novos fármacos antifúngicos é de extrema importância, principalmente oriundos de produtos naturais, pois cada vez mais, os fungos têm desenvolvido mecanismos de resistência aos

medicamentos já existentes. Desta forma, os produtos naturais podem ser utilizados como uma alternativa, pois as plantas apresentam em seus metabólitos, diferentes moléculas com variadas estruturas e propriedades químicas, sendo estas, possíveis fontes de novos fármacos. Portanto, a pesquisa de produtos naturais tem se tornado um campo produtivo em moléculas com diferentes atividades biológicas, devido à busca por novas opções terapêuticas para o tratamento de diferentes doenças (MARZZOCO e TORRES, 2007; BARBOSA e FARIA, 2014; FREITAS, 2014).

Diversos produtos de origem vegetal mostram um potencial interessante, no que se refere a sua atividade antifúngica, entre eles podemos citar o espilantol, uma alquilamida bioativa encontrada em algumas espécies vegetais, como a *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, também conhecida como jambu (BARBOSA et al., 2016).

O espilantol exerce diversos efeitos farmacológicos, tais como as atividades analgésica, neuroprotetora, antioxidante, antimutagênica, antitumoral, anti-inflamatória, inseticida, anestésica, antibacteriana, antifúngica, entre outras (FREITAS BLANCO et al., 2016). Porém, apesar do grande número de atividades bioativas e aplicações, existem apenas alguns produtos comerciais baseados em espilantol disponível para fins farmacológicos (SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018).

Por este motivo, avaliar a atividade antifúngica de espilantol frente às formas planctônicas de *Candida albicans* torna-se importante e necessário, devido à crescente resistência de leveduras pertencentes a esse gênero frente aos antifúngicos atualmente disponíveis no mercado, visando impulsionar a busca por novos compostos antifúngicos de origem vegetal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *Candida* spp.

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales e Família Saccharomycetidae (MYCOBANK, 2019). É composto por cerca de 200 espécies, porém, apenas 20 delas são responsáveis por causar doenças em humanos (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016; SHARMA et al., 2019).

Existem sete espécies principais de *Candida* spp. de importância clínica (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida krusei* e *Candida kyfer*), sendo que, dentre as espécies do gênero, *C. albicans* é a mais virulenta para o homem e a mais frequentemente isolada. Além disso, ela tem sido relatada como a mais prevalente, seguida de *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SILVA, 2011; KATHIRAVAN et al., 2012). Atualmente, uma nova espécie, *C. auris* emergiu como um patógeno altamente resistente a múltiplos fármacos, causando uma séria ameaça à saúde global (SHARMA et al., 2019).

Cada uma destas espécies possuem fatores específicos que contribuem para que estes fungos estejam bem adaptados como um patógeno ao hospedeiro. Processos como morfogênese celular, adesão à superfície celular, troca fenotípica, formação de biofilme, resistência a drogas antifúngicas e secreção de enzimas hidrolíticas estão bem estabelecidos como mecanismos de virulência que auxiliam no sucesso destes microrganismos (SHARMA et al., 2019).

As leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas invasivas, as quais são responsáveis por elevados índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo (ANDRADE, 2017), além disso, constituem a terceira causa mais comum de infecções relacionadas à saúde (CORTEGIANI; MISSERI; CHOWDHARY, 2019).

Elas são eucarióticas e possuem parede celular composta mananas, glucanas e quitina, sendo esta parede responsável pela morfologia final da célula, e membrana plasmática fosfolipídica que contém vários esteróis, com predomínio do ergosterol. Devido à parede celular rígida, sua nutrição é feita a

partir de fontes de carbono absorvidas do ambiente (SILVA et al., 2012; SANTANA et al., 2013).

As espécies de *Candida* spp. podem reproduzir-se assexuadamente por gemulação, dando origem à uma célula de forma oval, característica das leveduras (blastóporo ou blastoconídea) ou podem crescer sob a forma filamentosa por meio da produção de tubos germinativos resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudo-hifas (SILVA et al., 2012).

Certas espécies desse gênero possuem a capacidade de sofrer transições morfológicas celulares complexas, o que é freqüentemente ligado à virulência desses patógenos. Entre *Candida* spp., apenas algumas espécies possuem essa capacidade, alternando entre leveduras e estados de crescimento filamentosos. Destas, *C. albicans* é facilmente capaz de fazer a transição entre estados de crescimento de levedura, pseudo-hifa e hifa, sob diversas condições ambientais (SHARMA et al., 2019).

A habilidade que alguns fungos desse gênero possuem de alternar entre a forma de levedura e a forma filamentosa é conhecida como pleomorfismo, sendo a formação de micélio relacionada com o aumento da virulência. Isso se deve porque as hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastoconídeos, devido a variabilidade antigênica de sua superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando assim, a fagocitose pelo sistema imune (SANTANA et al., 2013).

A formação de hifa ainda desempenha um papel importante na colonização e formação de biofilmes, pois as hifas contribuem para a invasão de tecidos e para a fuga de fagócitos (PAIS et al., 2019). As leveduras, quando fagocitadas por macrófagos e neutrófilos, produzem hifas e estas secretam proteases que matam estas células fagocíticas (SANTANA et al., 2013).

Estas espécies são consideradas microrganismos comensais, que fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis, onde colonizam a pele, mucosas do trato gastrointestinal, urinário, bucal e vaginal. Entretanto, devido à um desequilíbrio do sistema imune ou da microbiota natural, estas leveduras podem se tornar patogênicas e gerarem altos índices de infecções (PEIXOTO et al., 2014; SHARMA et al., 2019), podendo estas serem superficiais, na pele, em mucosas e sistêmicas (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016).

A mudança do comensalismo para a patogênese entre *Candida* spp. em vários locais do corpo é atribuído a muitos determinantes de virulência entre os quais estão a adesão ao tecido hospedeiro, a resposta ao estresse do ambiente, secreção de hidrolases e produção de biofilme (HOUDAILL et al., 2019). Essa transformação do fungo, de comensal para patogênico, ocorre principalmente em pacientes no ambiente hospitalar, onde tem-se o aumento do número de procedimentos invasivos, o uso intensivo de antimicrobianos de amplo espectro e o maior número de pessoas debilitadas e suscetíveis a vários microrganismos oportunistas (ALTHAUS et al., 2015).

Os indivíduos mais suscetíveis a serem acometidos por espécies de *Candida* são pacientes transplantados, infectados pelo vírus HIV e em tratamento quimioterápico (ANDRADE, 2017). Além disso, neutropenia, desnutrição, uso prolongado de cateteres, queimaduras e cirurgias extensas são alguns dos fatores mais comuns para a colonização por estas leveduras (ALTHAUS et al., 2015).

As infecções causadas por microrganismos do gênero *Candida* são denominadas candidíases ou candidoses e são consideradas doenças oportunistas, podendo apresentar características superficiais e sistêmicas (ANDRADE, 2017). A mortalidade associada a essas infecções situa-se entre 30% e 40% (CASTRO et al., 2016).

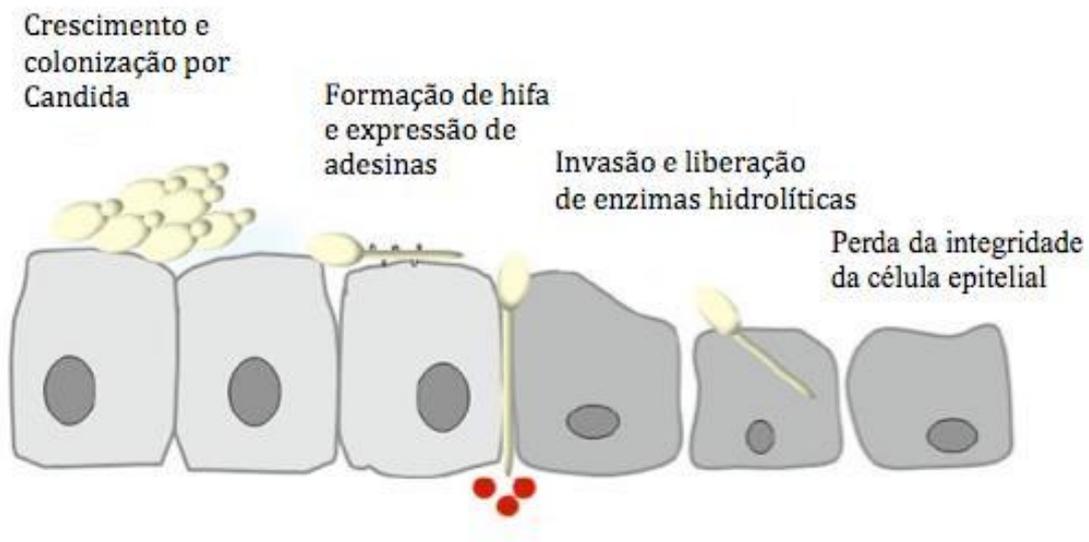
As diversas espécies desse gênero apresentam variados graus de patogenicidade e sensibilidade a antifúngicos e podem desenvolver mecanismos de resistência aos principais antifúngicos disponíveis para uso clínico contra infecções, o que dificulta e limita o tratamento (ALTHAUS et al., 2015; ANDRADE, 2017).

Embora a patogenicidade ou virulência desses microrganismos seja determinada geneticamente, esta é expressa somente quando existe fatores predisponentes, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura adequados ao seu crescimento e proliferação (ABÍLIO et al., 2014).

A gravidade das infecções depende, além de outros fatores, dos mecanismos de virulência expressos pelo fungo como a capacidade de aderência à superfícies celulares do hospedeiro, formação de biofilme, morfogênese, produção e secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, lipases e hemolisinas) (**Figura 1**), além da resistência aos

antifúngicos. Esses fatores de virulência podem variar de acordo com o tipo, local e estágio da infecção (SANTANA et al., 2013; ANDRADE, 2017).

**Figura 1-** Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das espécies de *Candida*.



Fonte: ANDRADE, 2017.

As enzimas hidrolíticas desempenham um papel fundamental na adesão, penetração, invasão e danos aos tecidos do hospedeiro e são associadas com a patogenicidade da *Candida*, sendo secretadas aspartil-proteases (saps), fosfolipases e hemolisinas (HOUDAIL et al., 2019).

As saps permitem que o patógeno degrade as barreiras do hospedeiro e invada o tecido circundante, facilitando a adesão do microrganismo a tecidos e seus danos estão relacionados com alterações na evasão do sistema imune do hospedeiro. Fosfolipases permitem que *C. albicans* adquira nutrientes em nichos pobres em nutrientes e contribua para a invasão, além disso, contribuem para a adesão a tecidos hospedeiros e hidrolisam uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos causando destruição da membrana da célula (PAIS et al., 2019; HOUDAIL et al., 2019). Já as hemolisinas, degradam hemoglobina, facilitando a aquisição de ferro, que é fundamental para a sobrevivência da levedura. Além disso, a adesão de *Candida* no epitélio ou em

dispositivos médicos foi considerada como um estágio inicial na formação de biofilme (HOUDAIL et al., 2019).

Um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *Candida* é a sua versatilidade de adaptação a diferentes habitats para crescimento e formação de comunidades microbianas, constituindo biofilmes (VASCONCELOS, 2013).

Cada espécie de *Candida* possui características bem diferentes em termos de características de virulência e perfis de susceptibilidade antifúngica. *C. glabrata*, por exemplo, apresenta elevados níveis de resistência intrínseca e adquirida aos antifúngicos azólicos, devido à superexpressão de transportadores de resistência a múltiplos fármacos ativados pelo fator de transcrição Pdr1; enquanto que, *C. albicans* são mais suscetíveis ao tratamento com azóis. Além disso, *C. albicans* possui várias características de virulência ausentes em *C. glabrata*, como a formação de hifas (PAIS et al., 2019).

Frequentemente, *Candida* spp., são encontradas em forma de leveduras quando estão em biofilmes microbianos e na forma filamentosa quando em estados de crescimento. Os biofilmes de *Candida* tendem a ser mais resistentes às defesas do hospedeiro e a agentes antimicrobianos, particularmente azóis, sendo formados de múltiplas camadas de células microbianas e uma matriz de material extracelular que podem variar entre as espécies, consistindo de polissacarídeos, incluindo  $\beta$ -1,3-glucano,  $\beta$ -1,6-glucano, mananas e proteínas (SHARMA et al., 2019).

## 2.2 ESPÉCIE *Candida albicans*

*Candida albicans* é a espécie de maior relevância dentro do gênero *Candida*, pois é considerado um patógeno oportunista, que pode causar infecções disseminadas em pacientes portadores do vírus HIV, usuários de corticosteróides, transplantados e com câncer (CASTRO et al., 2016), sendo frequentemente isolada em ambientes hospitalares em todo o mundo (LINDBERG et al., 2019).

Esta levedura está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário de outras espécies do gênero que possuem uma distribuição limitada (SANTANA et al., 2013). Infecções causadas por essa espécie estão entre as doenças fúngicas mais comuns e a sua capacidade de

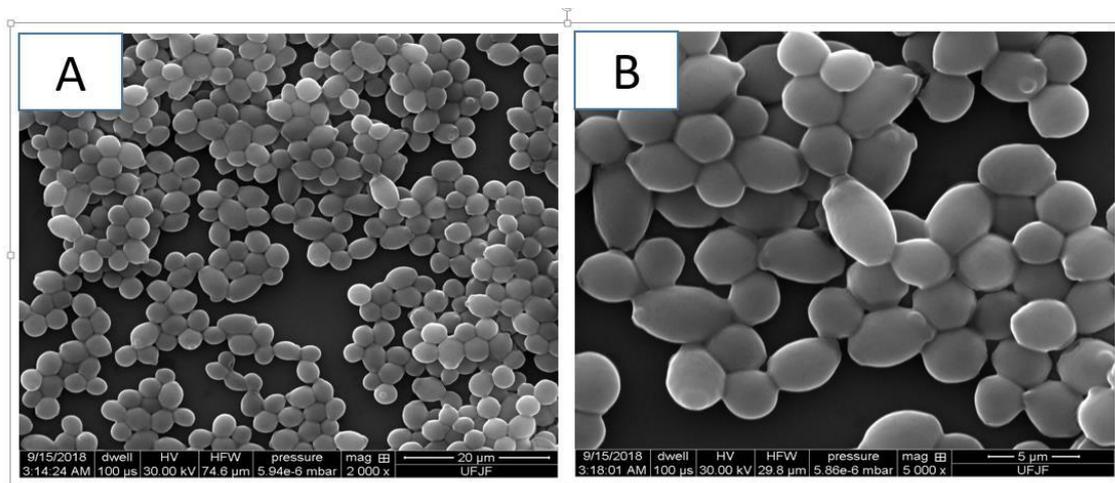
se desenvolver dentro do corpo humano e de resistir à diversas terapias antifúngicas faz dela um importante patógeno. (PAIS et al., 2019).

É a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em diversos países, sendo a principal levedura responsável por candidemias na América Latina (MENEZES et al., 2013) e a maior causadora de candidíase vulvovaginal (HOUDAIL et al., 2019). Difere das espécies não-*albicans*, na sensibilidade aos antifúngicos e na produção de fatores de virulência (ALTHAUS et al., 2015).

É considerado um fungo diplóide, que não apresenta nenhum ciclo de vida terrestre (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016). Faz parte da microbiota humana, sendo um microrganismo comensal facilmente encontrado na cavidade bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital, e na pele (SANTANA et al., 2013). Em determinadas circunstâncias, quando ocorre um desequilíbrio biológico, devido a fatores patológicos, fisiológicos, mecânicos e imunológicos, pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos do hospedeiro, e assim, ela adquire a capacidade de causar infecções crônicas e superficiais em indivíduos saudáveis, as chamadas candidíases (KATHIRAVAN et al., 2012; SANTANA et al., 2013).

*C. albicans* possui colônia úmida, cremosa, de odor específico, aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura ágar Sabouraud, forma tubos germinativos, e apresenta capacidade fermentativa e de assimilação de carbono. Cresce em temperaturas variando entre 20 °C a 38 °C, sendo sua proliferação favorecida em pH ácido. Microscopicamente as células leveduriformes são de formato esférico, ovóide ou alongado (**Figura 2**) e apresentam-se como gram-positivas em preparações coradas pela coloração de Gram (SANTANA et al., 2013; MELO, 2017).

**Figura 2-** Imagem ilustrativa da espécie *Candida albicans* ATCC® 10231 visualizada por microscopia eletrônica de varredura. 2A) no aumento de 2000 X e 2B) no aumento de 5000 X.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

*C. albicans* é definida como pleomórfica em seus padrões de crescimento, tendo a habilidade de se apresentar em diferentes morfologias. Na fase de levedura (crescimento isotrópico), esta é unicelular e pode gerar um broto a partir do qual se formam hifas verdadeiras. Entre a forma de brotamento e filamentosa, o fungo pode exibir várias morfologias durante seu crescimento, formando pseudo-hifas (crescimento apical) (BARBEDO e SGARBI, 2010; VASCONCELOS, 2013).

Variações de temperatura e de pH podem induzir essa mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa, o que representa uma resposta ou condição adaptativa do fungo para sobreviver em condições biológicas diversificadas. Ela também pode formar estruturas de resistência, denominadas clamidoconídios (clamidósporos) quando se encontra em um local onde não há todas as condições necessárias para seu desenvolvimento. As mudanças fenotípicas da *C. albicans* são condições importantes para o processo de invasão ao hospedeiro tornando o fungo mais virulento durante os processos infecciosos (BARBEDO e SGARBI, 2010; VASCONCELOS, 2013).

Enquanto outros fungos se encontram na natureza na forma de micélio e causam doenças no homem apenas na fase leveduriforme, *C. albicans* é patogênica na forma de hifa e de levedura. Devido ao seu desenvolvimento

filamentoso, a hifa é a morfologia que melhor transpõe barreiras, principalmente o tecido epitelial. Já a levedura, devido sua morfologia arredondada, é a melhor para a disseminação eficiente (BARBEDO e SGARBI, 2010).

É a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos, apresentando uma diversidade de fatores de virulência e por isso tem grande reconhecimento patogênico (BARBEDO e SGARBI, 2010). A espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, porém, casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que usam por tempo prolongado estes medicamentos (ALTHAUS et al., 2015).

Desde que haja um correto funcionamento do sistema imune, a manutenção da integridade das barreiras teciduais e a relação harmônica da microbiota natural podem existir numa relação de equilíbrio entre o hospedeiro e *C. albicans*. Do contrário, o fungo começa a produzir toxinas e enzimas e desenvolvendo a capacidade de aderência a outras células (SANTANA et al., 2013).

Essa transição ainda não está bem estabelecida, mas estudos apontam que a capacidade desse microrganismo em produzir fatores de virulência aliada ao sistema imune do hospedeiro não completamente funcionante podem ser os fatores que auxiliam na instalação da doença (CASTRO et al., 2016). *C. albicans* possui vários fatores de virulência que facilitam a colonização e a infecção do hospedeiro (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016).

Os principais fatores de virulência descritos para esta levedura são aderência, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, a capacidade de danificar células hospedeiras, formação de biofilmes, polimorfismo, tigmotropismo (sensoriamento de contato), variabilidade fenotípica, secreção de enzimas extracelulares (proteínases, fosfolipases e hemolisinas), produção de toxinas e resistência à antifúngicos (SANTANA et al., 2013; ANEJA et al., 2016; HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016; ANDRADE, 2017).

De forma geral, a versatilidade em se adaptar a diferentes habitats e a capacidade de formar biofilme são os principais fatores atribuídos à virulência

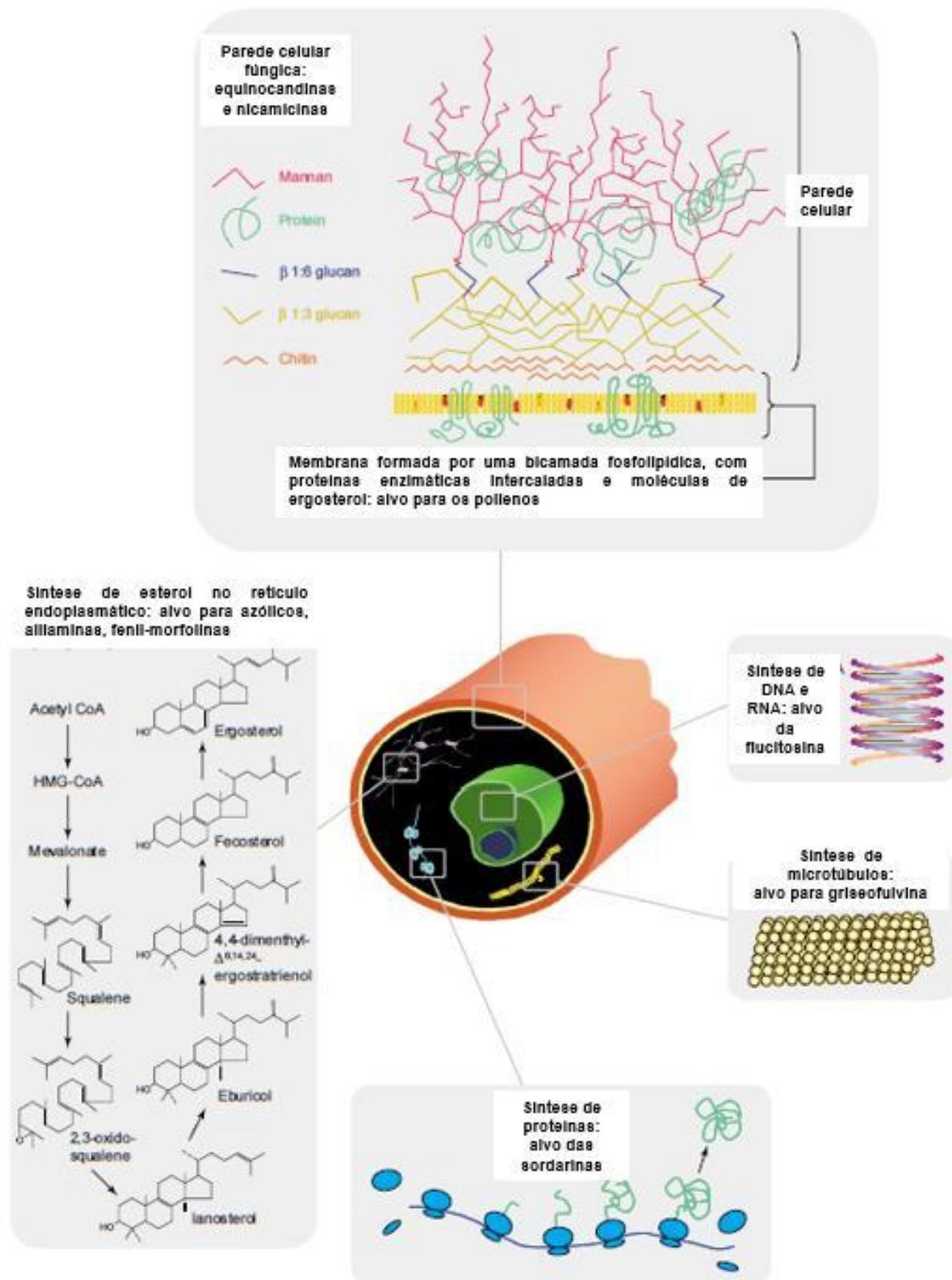
da *C. albicans* (JESUS, 2013). Esses fatores de virulência podem variar de acordo com o tipo, local e estágio da infecção (ANDRADE, 2017).

### 2.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS

Para considerarmos que uma droga seja um agente antifúngico ideal, a mesma deve apresentar alta atividade, agindo com máxima especificidade na célula fúngica, nas quais, os alvos de atuação sejam essenciais para o crescimento e a viabilidade celular. Além disso, deve possuir amplo espectro de ação, ação fungicida, não induzir à resistência e apresentar baixa toxicidade para o hospedeiro. No entanto, nenhum agente antifúngico disponível satisfaz todos estes requisitos (VASCONCELOS, 2013).

De acordo com o seu mecanismo de ação, os antifúngicos podem ser classificados em quatro classes principais, os poliênicos, que atuam na membrana plasmática agindo como disruptores de ergosterol (anfotericina B e nistatina); as pirimidinas, que promovem a inibição da síntese de ácidos nucléicos (flucitosina); os azólicos, que inibem a síntese de ergosterol (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol) e as equinocandinas, que por sua vez, inibem a síntese de glucanos da parede celular de diversos fungos (caspofungina, micafungina e anidulafungina). Além desses, existem os inibidores da esqualeno epoxidase (morfolinas e alilaminas); inibidores da síntese de quitina (nicomicina, polioxinas), inibidores da síntese de proteínas (sordarinas) e os inibidores da síntese de microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012; JESUS, 2013; SHARMA et al., 2019; ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019). (**Figura 3**).

**Figura 3-** Principais mecanismos de ação dos antifúngicos.



Fonte: Adaptado de ODDS, BROWN e GOW, 2003.

As duas principais estruturas celulares fúngicas que são consideradas importantes alvos de ação antifúngica são a parede celular e a membrana plasmática. A parede celular é uma estrutura ausente nas células de mamíferos, sendo constituída de hidratos de carbono (tais como glicanos, quitina, mananos, quitosana, ácido poliglicurônico ou celulose), proteínas e de lipídios. Ela tem a função de proporcionar à célula fúngica resistência mecânica suficiente para resistir a alterações de pressão osmótica, além de permitir a plasticidade adequada para favorecer o crescimento e a divisão celular, e de manter a forma e a integridade das células fúngicas (VASCONCELOS, 2013).

A membrana plasmática atua como uma barreira semipermeável no transporte ativo e passivo de substâncias na célula. É constituída na sua maior parte por lipídios (do tipo fosfolipídios, glicolipídios e esteróis), proteínas, podendo ambos estarem ligados a açúcares, sendo o ergosterol o principal esterol de leveduras. O ergosterol é importante para a integridade e a fluidez da membrana, permitindo que muitas enzimas da mesma possam exercer corretamente a sua função, as quais incluem a síntese de quitina, importante para a divisão e o crescimento celular (VASCONCELOS, 2013).

Os antifúngicos poliênicos podem agir diretamente sobre membranas contendo ergosterol (em doses fungistáticas) ou se agregarem com os esteróis da membrana fúngica (em doses fungicidas). Quando age diretamente sobre membranas contendo ergosterol ocorre um efluxo de íons  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ , aumentando assim a permeabilidade da membrana e a entrada de prótons que produzirão acidificação no interior da mesma, promovendo assim, a inibição do crescimento fúngico. Já quando eles se agregam com os esteróis da membrana, por meio do mecanismo de peroxidação lipídica, há a formação de poros aquosos, por meio do qual extravasam constituintes citoplasmáticos, como o íon potássio, destruindo assim o gradiente de prótons da membrana (JESUS, 2013).

Além disso, os polienos possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo assim compostos anfipáticos que possuem estrutura molecular única, sendo capazes de direcionar a ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica. Exercem efeito fungicida sobre *C. albicans*, porém seu uso clínico tem sido limitado devido a sua forte nefrotoxicidade e baixa solubilidade, causada

por semelhanças estruturais entre o ergosterol e o seu análogo, colesterol em mamíferos (SHARMA et al., 2019).

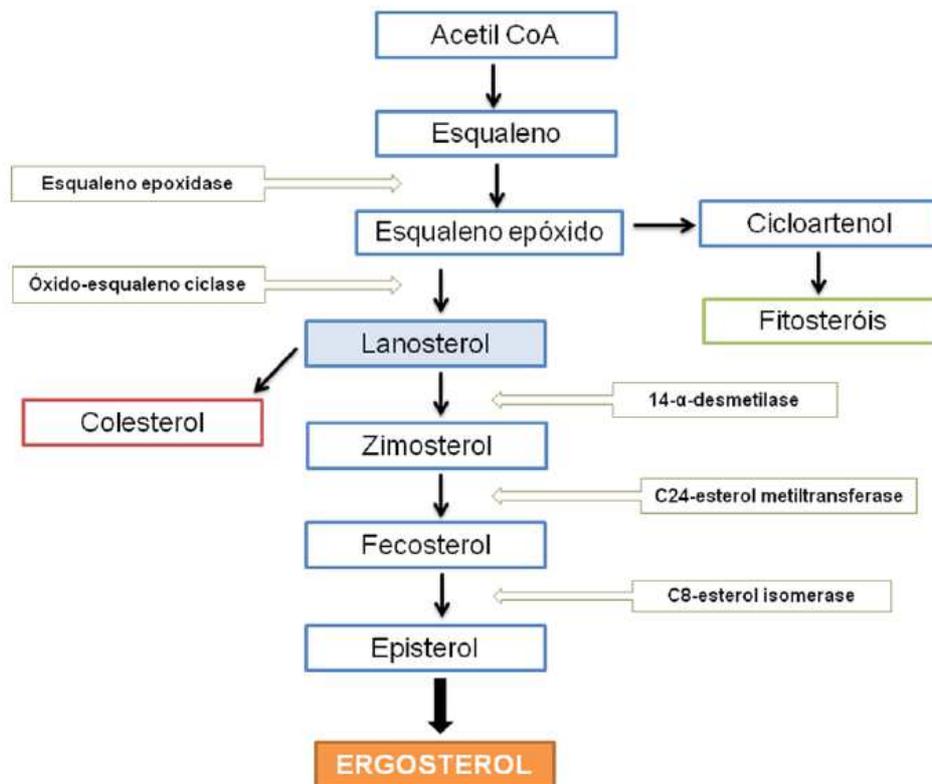
Os polienos atuam basicamente, ligando-se ao ergosterol na camada lipídica, levando à formação de poros na membrana celular, e assim, em última instância, causando à permeabilização celular fúngica (PAIS et al., 2019).

Os azólicos são os antifúngicos mais utilizados, devido sua menor toxicidade e o baixo custo (MENEZES et al., 2013). Estes agem inibindo a enzima lanosterol dependente do citocromo P450 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol fúngico (**Figura 4**). Com a inibição desta, ocorre o acúmulo de lanosterol, 3,6-diol esterol e ausência de ergosterol. O esgotamento do ergosterol e acúmulo de esteróis metilados tóxicos na membrana resultam em alteração na fluidez e permeabilidade da mesma, juntamente com a interrupção atividade de enzimas ligadas à ela, levando à inibição crescimento e replicação fúngica (JESUS, 2013; ANEJA et al., 2016).

Em *Candida*, os azóis exercem o seu efeito fungistático agindo especificamente na enzima lanosterol 14-dimetilase, anteriormente citada (que nesse gênero é codificada pelo Gene ERG11). Estes fármacos, contém um átomo de nitrogênio livre que se liga ao grupo heme no sítio ativo do Erg11, impedindo a desmetilação do lanosterol, bloqueando dessa forma a produção de ergosterol (SHARMA et al., 2019).

A substituição do anel imidazólico pelo triazólico nos antifúngicos azóis fez com que eles apresentassem vantagens como, polaridade aumentada, melhor solubilidade, reduzida ligação às proteínas plasmáticas, especificidade aumentada e tendência destes medicamentos para enzimas fúngicas, que eventualmente potencializam a sua eficácia (NAMI et al., 2019).

**Figura 4-** Biossíntese de ergosterol nas células fúngicas.



Fonte: VASCONCELOS, 2013.

As equinocandinas são a única nova classe de antifúngicos a chegar à clínica em décadas (PAIS et al., 2019). Exibem baixa toxicidade contra o hospedeiro e agem na parede celular do fungo atuando como inibidores não competitivos do complexo enzimático (1,3)  $\beta$ -D- glucano sintase o que resulta na inibição da síntese do carboidrato  $\beta$ -1,3-glucano (principal componente da parede celular fúngica). A inibição da (1,3)  $\beta$ -D- glucano sintase causa perda da integridade da parede celular, seguida de instabilidade osmótica e morte celular por lise. Portanto, um efeito fungicida é conseguido pela interrupção da síntese da parede celular. Diferentemente dos antifúngicos azólicos, as equinocandinas tem essa ação fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* (SHARMA et al., 2019; PAIS et al., 2019; NAMI et al., 2019).

Além disso, as equinocandinas têm demonstrado ter ação contra biofilmes de *Candida*, pois a inibição da produção de polissacarídeo pode levar a lise e dissolução da matriz extracelular. Esta é uma característica extremamente importante, uma vez que as infecções associadas ao biofilme

são muito difíceis de tratar e são recorrentes em pacientes com dispositivos médicos, como marca-passos ou cateteres (PAIS et al., 2019).

Já o análogo da pirimidina (flucitosina) é raramente utilizada em monoterapia antifúngica contra infecções por *Candida*, devido ao rápido e frequente desenvolvimento de resistência. Ela atua bloqueando a biossíntese de RNA e DNA em fungos. Normalmente, é usada em combinação com outros antifúngicos, como a anfotericina B para o tratamento de infecções de *Candida* resistentes a medicamentos (SHARMA et al., 2019).

## 2.4 RESISTÊNCIA FÚNGICA

O tratamento das infecções fúngicas torna-se cada vez mais difícil, principalmente devido ao aumento da resistência entre as espécies de *Candida* a agentes antifúngicos disponíveis atualmente (azólicos, poliênicos e equinocandinas) (SHARMA et al., 2019; LINDBERG et al., 2019).

A resistência aos antifúngicos pode ser definida em termos microbiológicos e clínicos (PURISCO, 2010). A resistência microbiológica, é um fenômeno verificado *in vitro*, onde ocorre reduzida susceptibilidade do microrganismo ao agente antimicrobiano de tal forma que, a concentração inibitória mínima do fármaco ultrapassa o limite superior do ponto de corte definido para esse microrganismo. Já a forma clínica é definida como persistência ou progressão de uma infecção, mesmo com o uso de um agente antifúngico que demonstre uma concentração inibitória mínima baixa contra o patógeno causador da doença. Fatores do hospedeiro, farmacológicos e ligados ao próprio fungo podem determinar a ocorrência desse tipo de resistência clínica (JESUS, 2013).

A resistência microbiológica subdivide-se em dois tipos: intrínseca, (ou primária) e adquirida (ou secundária). A resistência intrínseca está presente em um organismo que não teve nenhuma prévia exposição ao fármaco, e a resistência adquirida é aquela desenvolvida em resposta à exposição a um antifúngico e que, geralmente depende de uma alteração na expressão de genes (JESUS, 2013). Diferentes tipos de mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à um antifúngico (KATHIRAVAN et al., 2012).

Os mecanismos que contribuem para a resistência intrínseca são a formação de biofilme e a impermeabilidade da parede celular; já para a

resistência adquirida é a superexpressão do sítio-alvo e alterações da via; e os mecanismos que contribuem para ambas as resistências são a incompatibilidade de alvos, sistemas de efluxo de drogas e a resposta ao estresse (ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019).

As células fúngicas têm a capacidade de adquirir resistência antifúngica através de mutações aleatórias ou pela instabilidade do genoma, sendo que, o principal fator predisponente de resistência adquirida é a exposição a antifúngicos fungistáticos, especialmente em concentrações sub-terapêuticas (ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019).

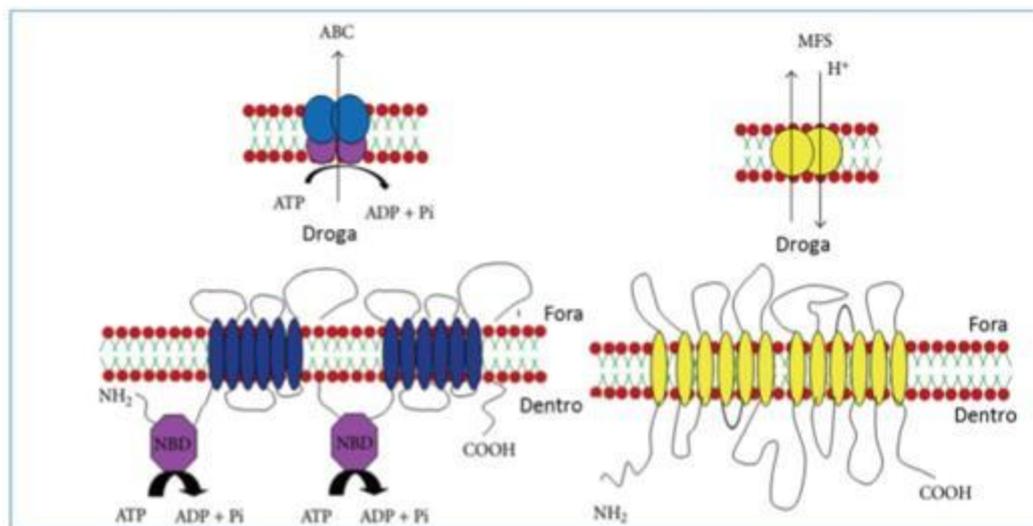
O tratamento de linhagens fúngicas resistentes é considerado um grande desafio, uma vez que os mecanismos moleculares que levam à resistência antifúngica são complexos (PARENTE-ROCHA et al., 2017). As bombas de efluxo tem sido o mecanismo de resistência mais comumente mencionado, principalmente para os antifúngicos pertencentes a classe dos azólicos (PRASAD e RAWAL, 2014). Essas são proteínas que possuem mecanismos de transporte ativo, que retiram o fármaco do interior para o exterior da célula (NEVES et al., 2011).

Existem dois tipos de proteínas em fungos envolvidas no efluxo de drogas, que são os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) codificadas pelo gene CDR e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*) codificadas pelo gene MDR (**Figura 5**). Os transportadores da família ABC possuem dois domínios citosólicos denominados de NBDs (*Nucleotide Binding Domains*), que são responsáveis pela hidrólise de ATP, o que facilita a retirada da droga do meio intracelular e estão associados com o efluxo de todos os azóis. Por outro lado, os transportadores MSF não utilizam a hidrólise de ATP, mas um gradiente de prótons para expelir as drogas e parecem estar envolvidos apenas com a resistência ao fluconazol (CUENCA-ESTRELLA, 2010; PFALLER, 2012; ARAÚJO NETO, 2014).

No gênero *Candida spp*, por exemplo, o mecanismo associado com a resistência aos fármacos é a indução de bombas de efluxo, estando as expressões de MDR ou CDR associadas com a resistência aos azóis em *C. albicans* (MDR1, CDR1, CDR2), *C. glabrata* (CgCDR1, CgCDR2), ou *C. dubliniensis* (CdMDR1, CdCDR1). A indução dos genes CDR tende ainda, a afetar quase todos os antifúngicos, enquanto que as bombas de efluxo

codificadas por genes MDR são geralmente seletivas para fluconazol (PFALLER, 2012).

**Figura 5-** Representação dos transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e do transportador MSF (*Major Superfamily Facilitator*).



Legenda: As principais bombas de efluxo descritas para leveduras que apresentam resistência aos azólicos. (A) Transportador *ATP-Binding Cassette* mostrando os domínios citosólicos dentro do citoplasma (NBDs) e os domínios transmembrana instalados na membrana plasmática da célula fúngica. (B) Transportador *Major Superfamily Facilitator* instalado na membrana da célula fúngica mostrando o efluxo de uma droga antifúngica por meio da diferença de gradiente de prótons.

Fonte: Adaptado de ARAÚJO NETO, 2014.

Em *C. albicans*, os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) codificadas pelo gene CDR e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*) codificadas pelo gene MDR tem demonstrado contribuir para a resistência a várias drogas. Além disso, a expressão de CDR1 e CDR2, bem como a expressão de MDR1 e outro transportador da superfamília MF, FLU1, mostrou regular positivamente em cepas de *C. albicans* resistentes aos azólicos. Outro fator que contribui para a resistência antifúngica é a presença de células “persistentes”, que, devido ao seu estágio de dormência, não apresentam um alvo ativo para antifúngicos. Além disso, enzimas superóxido dismutases de *Candida spp.* desempenham um papel importante na resistência desta levedura ao miconazol (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016).

Devido ao seu perfil de segurança e disponibilidade em formulações orais e intravenosas, os azóis são os medicamentos de primeira linha contra a maioria das espécies de *Candida*. No entanto, a natureza fungistática dos azóis impõe uma forte seleção direcional para a evolução da resistência. (PAIS et al., 2019).

A resistência aos antifúngicos azólicos pode ser atribuída superexpressão de bombas de efluxo mediadas pela ativação da expressão de ligantes ATP cassete (ABC), ou transportadores da principal superfamília facilitadora (MFS) ou a alterações na enzima alvo lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase por superexpressão ou mutações em seu gene codificador ERG11 (HOUDAILL et al., 2019).

*C. albicans* pode desenvolver resistência contra os azóis através da regulação positiva das bombas de efluxo Cdr1, Cdr2 e Mdr1, inativação do Erg3 que sintetiza o esteróide tóxico (DMCDD) e regulação positiva ou mutações no gene que codifica os alvos azólicos, ERG11. Além disso, foi demonstrado recentemente que a *C. albicans* também pode ganhar resistência aos azóis alterando a composição esfingolipídica *in vitro* (PAIS et al., 2019).

Resistência aos azólicos é mais incomum em *C. albicans* (<5%), mas é mais prevalente em *C. glabrata* (4-16%), *C. parapsilosis* (4-10%) e *C. tropicalis* (4-9%) (CORTEGIANI, MISSERI E CHOWDHARY, 2019).

Quatro mecanismos principais de resistência a azólicos em *Candida* foram relatados na literatura. Estes são as mutações pontuais no gene ERG11 em diferentes regiões de "hotspot" que conferem pobre ou insuficiente ligação a azóis; superregulação transcricional do gene ERG11 resultando na produção de ergosterol elevada ou amplificação do gene ERG11; superexpressão ou amplificação de múltiplas classes de bombas de efluxo, incluindo os transportadores ABC, CDR1 e CDR2 e o principal facilitador da superfamília de proteínas (MFS), tais como genes transportadores MDR1, que podem ser superexpressadas em isolados de *Candida* resistentes aos azóis; e regulação e indução de numerosas respostas celulares ao estresse por vias como a calcineurina, proteína fosfatase, e a chaperona molecular Hsp90 (SHARMA et al., 2019).

Já a resistência à equinocandinas está associada a uma resistência cruzada a azóis (CORTEGIANI; MISSERI; CHOWDHARY, 2019) e também a

mutações que ocorrem nos genes FKS (incluindo o gene essencial FKS1 e seu parálogo FKS2). Estes genes FKS codificam para a subunidade catalítica (1,3)  $\beta$ -D-glucano sintase, que é o alvo de ligação das equinocandinas. Portanto, mutações nesses genes conferem uma alteração estrutural que resulta em má ligação da equinocandina ao seu receptor. Em *C. albicans*, mutações dentro da FKS1 são suficientes para conferir resistência à equinocandinas (SHARMA et al., 2019).

A resistência antifúngica a polienos é rara, mas tem sido relatada em diversas espécies de *Candida*, devido principalmente a alterações na composição da membrana esterólica. Em *C. albicans*, foi relatada resistência devido a mutações na enzima C-5,6-desaturase, que bloqueia a biossíntese do ergosterol e leva ao acúmulo de um esteroide alternativo na membrana da célula fúngica (SHARMA et al., 2019).

Já a resistência à flucitosina, tem sido relacionada com mutações pontuais nos genes FUR1, FCY1 (codificando enzimas envolvidas na via da pirimidina) e FCY2 (codificando uma citosina permease) tanto em *C. albicans* quanto em *C. glabrata*. Além disso, a deleção de FPS1 ou FPS2, que codifica as aquagliceroporinas, leva ao acúmulo de flucitosina nas células de *C. glabrata* (PAIS et al., 2019).

## 2.5 CÉLULAS PLANCTÔNICAS X BIOFILMES

Os fungos leveduriformes e filamentosos podem se apresentar em dois tipos de fenótipos diferentes na natureza: planctônico ou sésil. O fenótipo planctônico caracteriza-se pela forma livre de desenvolvimento dos fungos, enquanto a forma sésil pelo desenvolvimento de um grupo de diferentes cepas, sob uma matriz polissacarídica rica em canais em toda a sua extensão que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio, denominado biofilme (JESUS, 2013).

Os biofilmes são comunidades complexas de um ou mais microrganismos distintos que convivem em associação e estão aderidos em superfícies bióticas ou abióticas, envolvidos por uma matriz extracelular de exopolissacarídeos (EPS) (JESUS, 2013; SOUZA, 2015). Esses biofilmes, são altamente organizados em comunidades estruturadas de microrganismos, irreversivelmente ligadas a superfície e incorporado em uma matriz extracelular

auto-produzida. Vivendo dentro de um biofilme, os microrganismos tem a vantagem de proteção durante o seu desenvolvimento e sobrevivência em condições ambientais hostis (HOUDAII et al., 2019).

Alguns fatores como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, auto indutores do *quorum sensing*, temperatura e a presença de compostos orgânicos e inorgânicos estimulam o processo de formação de biofilme, que se inicia, quando os microrganismos em estado planctônico recebem algum estímulo, que os leva a aderir a alguma superfície sólida (SOUZA, 2015). Além desses fatores, a formação de biofilmes também depende da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o curso da infecção (JESUS, 2013).

Os biofilmes podem ser formados por apenas uma espécie de microrganismo (monoespécie) ou por mais de uma espécie (multiespécies), sendo este último de extrema importância, pois os subprodutos metabólicos produzidos por um organismo podem servir de suporte para o crescimento de outros (SOUZA, 2015).

As células planctônicas, quando comparadas aos biofilmes, são mais susceptíveis às adversidades do ambiente e a agentes antimicrobianos. Essa resistência pode ser explicada porque as células sésseis (em biofilme) expressam genes diferentes daquelas planctônicas, apresentando assim propriedades diferentes (como por exemplo, fornecem proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos) e também pela própria estrutura do biofilme, pois células em biofilmes estão embebidas em uma matriz exopolimérica, o que dificulta a difusão de agentes antimicrobianos (SOUZA, 2015; SANTOS, 2015).

O desenvolvimento de um biofilme é um processo complexo e inclui duas fases de adesão, reversível e irreversível. A adesão reversível acontece pela fraca interação entre o microrganismo e a superfície, nessa fase, os microrganismos são facilmente removidos, sendo a adesão considerada reversível pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. Já a adesão irreversível resulta da fixação de apêndices celulares como pilus, flagelos, fímbrias, proteínas adesinas e substâncias poliméricas extracelulares à superfície sólida, portanto a morfologia das células exerce fundamental importância no processo de ancoragem e aderência das células à

superfície. Esse tipo de adesão pode ocorrer em poucas horas de interação entre o microrganismo e a superfície (SANTOS, 2015).

Muitas infecções causadas por *C. albicans* envolvem o crescimento de fungos em biofilmes. Estas têm um grande impacto na saúde pública, porque os microrganismos organizados em biofilmes apresentam uma menor susceptibilidade às terapias antifúngicas convencionais (VASCONCELOS, 2013). Além disso, as células de *C. albicans* associadas ao biofilme contêm paredes celulares que são duas vezes mais grossas, e contêm mais carboidratos e  $\beta$ -1,3-glucanas, do que as células em sua forma planctônica (SHARMA et al., 2019).

*C. albicans* produz mais biofilme que outras espécies do gênero (BARBEDO e SGARBI, 2010), podendo formá-los em superfícies abióticas e bióticas (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016). Biofilmes de *C. albicans* em superfícies bióticas são constituídos por dois tipos celulares, que são as leveduras e células filamentosas. Estes biofilmes são gerados devido à mudanças na imunidade do hospedeiro ou na ecologia do ambiente em que o fungo se encontra (VASCONCELOS, 2013).

A habilidade de *C. albicans* em formar biofilmes está intimamente associada à capacidade de causar infecções, e pode ser considerado um importante fator de virulência, pois biofilmes estão associados à resistência contra o sistema imune do hospedeiro e a antifúngicos (BARBEDO e SGARBI, 2010).

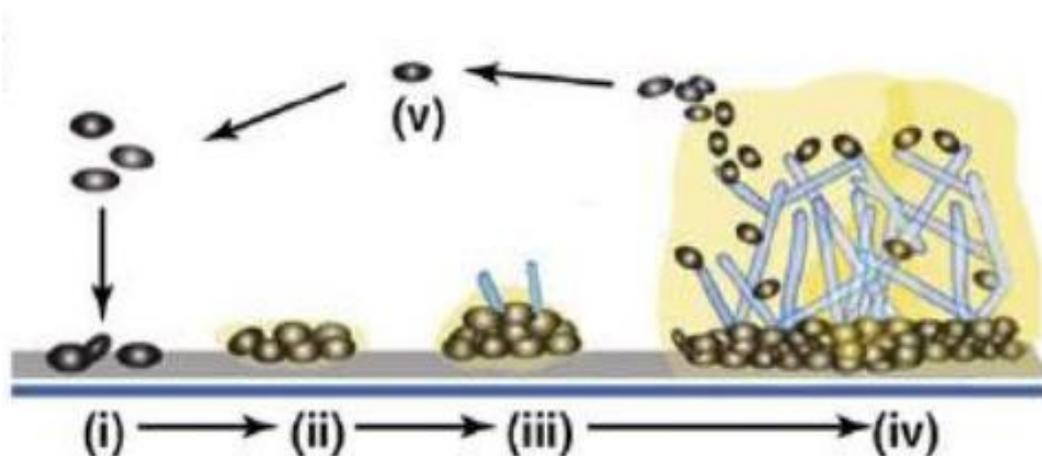
Os biofilmes de *C. albicans* podem ser regulados por moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (ex: farnesol) ou por genes específicos, que afetam a morfogênese, aderência e virulência (gene *caace2*), genes diretamente relacionados com o desenvolvimento de hifas (*not4*), ou aquele relacionado com a adesão e penetração na célula hospedeira (*hwp1*) (JESUS, 2013). Vários fatores são responsáveis pelo aumento da resistência dos fungos quando estão em biofilme, como por exemplo, a taxa de crescimento reduzida das células fúngicas, regulação positiva das bombas de efluxo de drogas, a presença de células persistentes e uma matriz extracelular impermeável (HOFS, MOGAVERO e HUBE, 2016).

Os mecanismos de resistência de um biofilme aos agentes antimicrobianos ainda não são completamente compreendidos e podem variar

de acordo com os microrganismos presentes nesta estrutura e com a natureza do agente antimicrobiano (VASCONCELOS, 2013).

O modelo de biofilme proposto para a *C. albicans* abrange cinco etapas distintas de desenvolvimento: adsorção das leveduras à superfície, aderência à superfície, formação de microcolônias, maturação do biofilme e dispersão das células do biofilme maduro (**Figura 6**) (JESUS, 2013).

**Figura 6-** Modelo de desenvolvimento de biofilme proposto para *Candida albicans*.



Legenda: Modelo de biofilme proposto para a *C. albicans* com cinco etapas distintas de desenvolvimento: (i) adsorção das leveduras à superfície; (ii) aderência à superfície; (iii) formação de microcolônias (iv); maturação do biofilme e (v) dispersão das células do biofilme maduro.

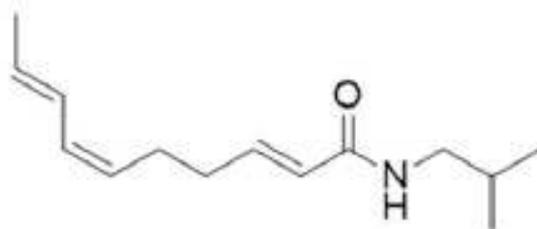
Fonte: JESUS, 2013.

## 2.6 ESPILANTOL

O espilantol (**Figura 7**), também conhecido como “affinin” é uma alquilamida bioativa encontrada em diversas plantas da família Asteraceae, entre elas, *Heliopsis longipes*, *Welelia parviceps* e em espécies do gênero *Acmella* (*A. ciliata*, *A. oppositifolia*, *A. radicans*, *A. brachyglossa*, *A. oleracea*, *A. paniculata*, *A. uliginosa*) (PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; BARBOSA et al., 2016; SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018).

Essa substância também pode ser encontrada em plantas da família Solanaceae e Piperaceae, sendo considerado o principal composto responsável pelas atividades biológicas do extrato destas (ALONSO, 2016). O espilantol encontra-se distribuído de maneira variável em toda a parte aérea do jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen), porém, em maior concentração nas flores (CHENG et al., 2015).

**Figura 7-** Estrutura química do espilantol (C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO).

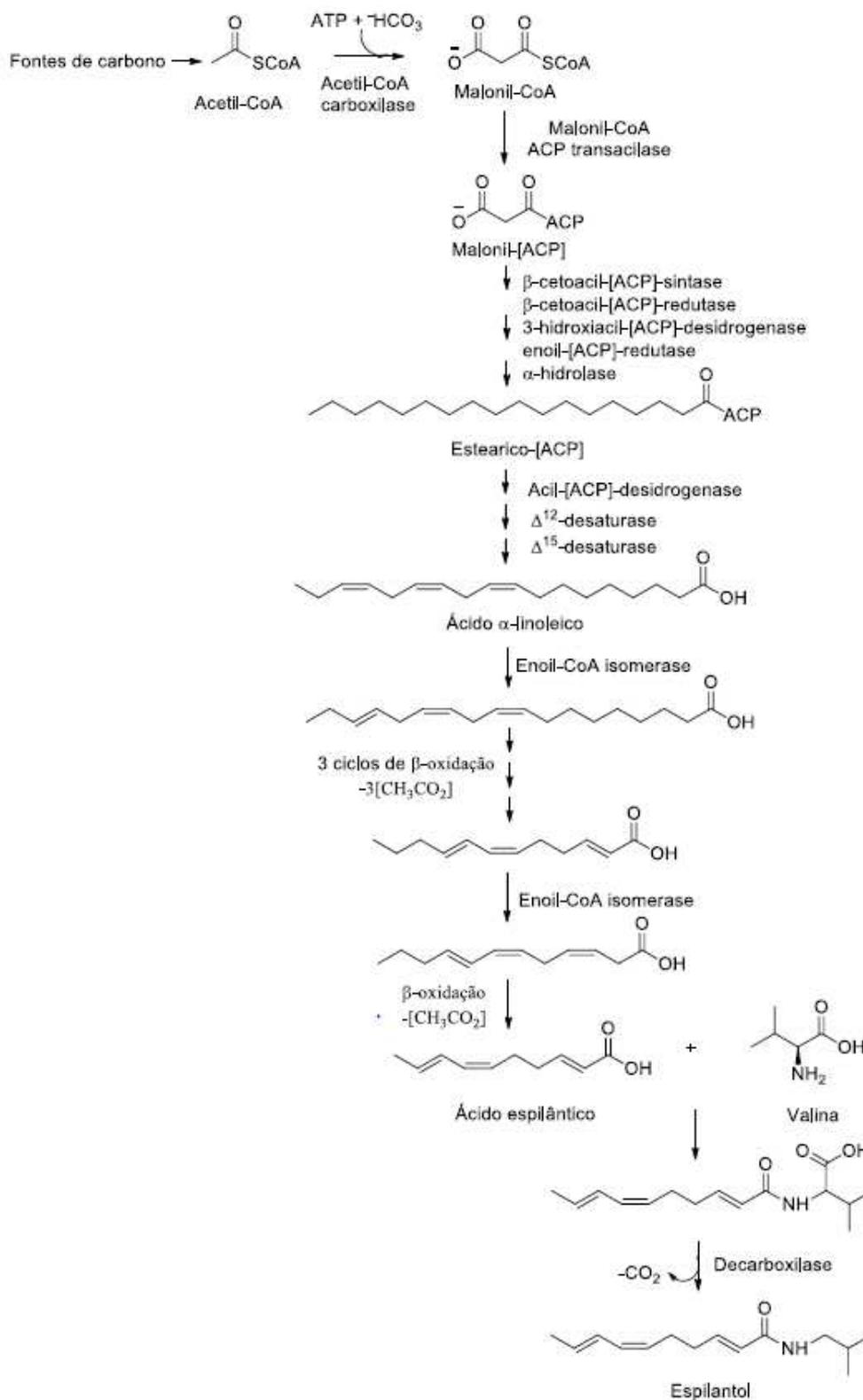


Fonte: ARAÚJO et al., 2018.

O espilantol é uma alquilamida alifática (de cadeia aberta), e esses tipos de alquilamidas têm se mostrado bastante promissoras como compostos medicinais, flavorizantes e inseticidas. Elas também têm apresentado a capacidade de excitar neurônios sensoriais diferentes dos excitados pela capsaicina e outros condimentos pungentes semelhantes (SILVEIRA, 2017).

Alquilamidas são um grupo de metabólitos secundários encontrados em muitas famílias de plantas, incluindo Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae e Rutaceae. Acredita-se que, nas plantas, essas substâncias atuem como hormônios, regulando o crescimento e formação das raízes. Esses metabólitos secundários formam uma classe distinta de produtos naturais, nos quais, através de uma ligação peptídica, diferentes aminoácidos são combinados com ácidos graxos insaturados (SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018). O espilantol é formado, biossinteticamente, a partir do ácido  $\alpha$ -linolênico e do aminoácido valina (**Figura 8**) (SILVEIRA, 2017).

**Figura 8-** Rota biossintética do espilantol.



Fonte: SILVEIRA, 2017.

Essas alquilamidas provocam ainda, efeitos de formigamento e pungência, geralmente acompanhados por salivação e anestesia, o que tem provocado grande interesse no estudo dessas substâncias (SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018). A peça chave para esta propriedade sensorial é uma ligação dupla com configuração Z na cadeia ácida, além disso, o tamanho da cadeia carbônica e o padrão das insaturações também influenciam na sensação de pungência (SILVEIRA, 2017).

Além disso, o espilantol é um composto anfifílico, com um grupamento amida relativamente polar e um grupo acil menos polar, podendo assim, ser extraído de plantas por solventes tanto polares como etanol e metanol, quanto por solventes apolares como hexano, ou até mesmo por CO<sub>2</sub> supercrítico. Após a extração, pode ser purificado por cromatografia em camada delgada (CCD) ou por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (BARBOSA et al., 2016).

Suas propriedades sensoriais são amplamente utilizadas em composições de higiene bucal, produtos pessoais, produtos de limpeza, alimentos e bebidas (SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018), também apresentam efeito analgésico, e por isso, as plantas que o possui são frequentemente chamadas de “plantas da dor de dente”. Os grupos farmacofóricos importantes para a sua atividade analgésica, formigamento e efeitos de “dar água na boca” são os grupamentos amida e acila insaturada (alcenil) (BARBOSA et al., 2016).

Várias atividades farmacológicas já foram atribuídas ao espilantol, podemos citar, além das descritas acima, as atividades antinociceptiva, neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anti-câncer, antifúngica, antibacteriana, antirugas, anticonvulsivante, afrodisíaca, inibidora da lipase pancreática, diurética, vasorelaxante, antivírus da imunodeficiência humana (BARBOSA et al., 2016), inseticida contra *Periplaneta americana*, *Plutella xylostella* e *Tuta absoluta* (DUBEY, et al., 2013), antimalárica (DUBEY, et al., 2013; BARBOSA et al., 2016), larvicida contra *Aedes aegypti* (DUBEY, et al., 2013; ARAÚJO et al., 2018), *Helicoverpa zea neonates* (BARBOSA et al., 2016), *Culex quinquefasciatus* (DUBEY, et al., 2013; ARAÚJO et al., 2018) e *Anopheles albimanus* (DUBEY, et al., 2013), antimoluscicida (BARBOSA et al., 2016), antiartrítica (ESCOBEDO-MARTINEZ et al., 2017), anestésica (DUBEY,

et al., 2013; FREITAS-BLANCO et al., 2016) cicatrizante (YAMANE et al., 2016) e acaricida (CRUZ et al., 2016), além de possuir efeitos sobre o SNC e o sistema imune (GERTSCH, 2008; HAJDU, 2014; VERYSER et al., 2014).

Além disso, é capaz de penetrar na pele após administração tópica, ser absorvido pelo intestino endotelial, mucosa oral e atravessar a barreira hematoencefálica. Pode aumentar a penetração da cafeína, fortetosterona e cinco micotoxinas na pele e ainda melhorar o desempenho sexual em ratos (BARBOSA et al., 2016; SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018).

Apesar do grande número de atividades bioativas e aplicações, existem apenas alguns produtos comerciais baseados em espilantol disponíveis para fins farmacológicos (SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018). Assim, o espilantol ou extratos de plantas que o contêm podem ser adicionados à pasta de dente e utilizados como analgésico oral em géis bucais (Buccaldol®, da Alphamega, França) ou como anti-inflamatório (Indolphar®, do ID Phar, Bélgica) e em tinturas para tratamento tópico de infecções (tintura de Vogel spilanthes contendo Etanol a 65%, da Biohorma, Bélgica) (VERYSER et al., 2014; SILVEIRA, SANDJO e BIAVATTI, 2018). Além disso, ele pode ser utilizado como um creme antirrugas que pode substituir o botox em aplicações cosméticas (DEMARNE e PASSARO, 2009) e em alguns produtos antienvhecimento (Gatuline®, SYN®-COLL, ChroNOLine™) (HAW e KENG, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de espilantol frente a uma espécie de *Candida albicans* (ATCC<sup>®</sup> 10231) resistente a múltiplas drogas e propor suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito dessa concentração sobre *C. albicans*;
- Investigar a interferência de espilantol na curva de crescimento de *C. albicans*;
- Avaliar a densidade e a viabilidade celular de *C. albicans* tratados com espilantol;
- Avaliar o efeito de espilantol sobre o envoltório celular (parede e membrana) de *C. albicans*;
- Avaliar o sinergismo de espilantol com os antifúngicos fluconazol e itraconazol frente a *C. albicans*.
- Avaliar a viabilidade celular de espilantol frente às linhagens de fibroblastos (NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT).
- Propor as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas de espilantol.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL DE ESTUDO

O espilantol foi gentilmente cedido pelo professor Mário Geraldo de Carvalho pertencente ao Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com um teor de 98% de pureza (BARBOSA, 2016).

### 4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

#### 4.2.1 Linhagem fúngica e cultivo celular

Em todos os experimentos realizados foi utilizada a espécie *Candida albicans* (ATCC<sup>®</sup> 10231), caracterizada por ser resistente a Anidulafungina, Voriconazol, Itraconazol e Fluconazol (ATCC, 2018). Este microrganismo foi gentilmente cedido pelo Professor Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), Campus Divinópolis.

Esta levedura foi armazenada e mantida em criotubos contendo caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e glicerol a uma temperatura de -20°C para preservação de suas características biológicas.

#### 4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio para verificar a concentração inibitória mínima (CIM) de espilantol foi realizado utilizando uma técnica de microdiluição seriada em caldo descrita pelo CLSI (2017) com algumas modificações. A levedura *C. albicans* foi cultivada previamente a 35 °C por 24h em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). Em seguida, colônias desta mesma levedura foram transferidas para um tubo de vidro contendo caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e foram mantidas em estufa a 35°C por 24h. Diluições sucessivas de 200 a 1,56 µg/mL da amostra foram preparadas à partir de uma solução estoque de espilantol à 0,4 mg/mL em DMSO 5% e Tween 5%. Foram transferidos 80µL dessas diluições para as microplacas de 96 poços, que já continham 100µL de meio de cultura (CSB). Em seguida, o inóculo na escala turbidimétrica padrão de 0,5 McFarland ( $2 \times 10^6$  UFC/mL) foi preparado em solução salina e à partir deste, foi realizada uma diluição de 1:99 visando obter  $2 \times 10^4$  UFC/mL. Para

completar o volume final de 200µL em cada poço da microplaca, foram adicionados 20µL desse inóculo previamente diluído. As placas foram então, incubadas a 35 °C por 24h e 48 h. De forma similar, foram realizados simultaneamente com o controle de crescimento (CSD + levedura + veículo de espilantol) e o controle de esterilidade (CSD). A Nistatina foi usada como controle positivo com concentrações de 160 a 1,25 µg/mL. A CIM foi calculada como a maior diluição capaz de inibir completamente o crescimento fúngico nos poços das microplacas. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### **4.2.3 Efeito da CIM sobre o crescimento fúngico**

O efeito da CIM sobre o crescimento da levedura *C. albicans* foi determinado por uma modificação do método de Spencer e Spencer (2004). Foram retirados das microplacas, das quais se realizou a concentração inibitória mínima (CIM), um volume de 10 µL da concentração das amostras que visualmente não apresentaram crescimento no ensaio da CIM. Estes volumes foram inoculados em placas de ASD recém-preparadas, que foram posteriormente incubadas em estufa a 35°C por 24h. O efeito da CIM sobre o crescimento da levedura foi reportado como fungicida ou fungistático.

#### **4.2.4 Determinação da curva de crescimento**

A curva de crescimento para *C. albicans* foi realizada de acordo com a metodologia de Babii et al. (2016) e Campos et al. (2018) com algumas modificações. A levedura foi cultivada à 35°C por 24h em CSD e esta foi utilizada para preparar o inóculo em água estéril na concentração de  $2 \times 10^6$  UFC/mL (escala turbidimétrica padrão de 0,5 McFarland). Em seguida, à partir deste inóculo, foi realizada uma diluição de 1:99 visando obter  $2 \times 10^4$  UFC/mL. Tubos de CSD acrescidos com concentrações de espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM) foram preparados e adicionados ao inóculo diluído. Estes tubos foram incubados a 35°C e a densidade óptica foi registrada à 600 nm nos tempos de 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h. O gráfico foi traçado com base em variações de turbidez ao longo das horas de incubação. Nistatina (em valores de CIM) foi utilizada como controle positivo. Cepas fúngicas inoculadas em CSD foram utilizadas como controle do crescimento fúngico. O branco das

amostras foi preparado utilizando apenas o CSD + espilantol ou CSB + nistatina. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.5 Determinação da densidade e da viabilidade celular**

A densidade e a viabilidade das leveduras foram avaliadas pelo kit LIVE/DEAD<sup>®</sup> Yeast Viability (Molecular Probes, USA), que consiste de dois marcadores fluorescentes, o calcofluor white (CW) e o FUN-1. Cepas fúngicas de *C. albicans* foram inoculadas em tubos de CSD contendo espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM), incubadas a 35°C por 24 h. Cepas inoculadas em apenas CSD ou nistatina (valores de CIM) serviram como controles de crescimento e positivos, respectivamente. As leveduras em suspensão (1 mL de cada amostra, n = 3) foram coradas com 1 µL de FUN 1 e 5 µL de CW. Após incubação à 35°C por 30 min no escuro, as amostras foram preparadas por citocentrifugação (Shandoncytopsin 4, ThermoElectron) a 452 x g por 10 minutos (SILVA, et al. 2014). Em seguida, as lâminas resultantes foram analisadas em microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus). Em 10 campos aleatórios, a contagem de células totais foi realizada com o filtro fluorescente U-MWU2 (CW) e a de células metabolicamente ativas com filtro U-MWB (FUN-1). A densidade celular foi dada pela quantidade total de células e a proporção células vivas/ativas e mortas/inativas foi estabelecida. A viabilidade celular foi avaliada pela atividade metabólica intracelular das leveduras. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.6 Ensaios sobre o envoltório celular**

Após verificação da atividade antifúngica do espilantol frente à *C. albicans*, avaliou-se a influência de espilantol sobre a célula fúngica. Os ensaios consistiram em avaliar a capacidade do espilantol em romper a integridade da membrana (medição da permeabilidade da membrana com cristal violeta e extravasamento de membrana com “liberação” de nucleotídeos), parede celular (ensaio de proteção do sorbitol) e ligação específica a um esteróide de membrana (ensaio de ligação ao ergosterol exógeno).

#### 4.2.6.1 Permeabilidade da membrana com cristal violeta

Mudanças na permeabilidade da membrana fúngica também foram avaliadas por ensaio de cristal violeta (CV) conforme descrito por Campos et al. (2018). A linhagem fúngica recém-crescida ( $10^6$  células/mL) (de acordo com os padrões de turbidez de McFarland) em CSD foi inoculada posteriormente em tubos acrescidos com concentração de espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM) a 35 °C e nistatina (valor de CIM), seguido de incubação por 4 h. As suspensões de células fúngicas foram centrifugadas a 1000g por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em 10 µg/mL de solução de cristal violeta preparado em água estéril e incubado 10 min a 35 °C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 1000g por 15 min e a densidade óptica do sobrenadante foi medida em um comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro. A densidade óptica do sobrenadante do grupo de células não tratadas normais foi usado como controle de crescimento. O valor da densidade óptica da solução de cristal violeta foi considerado como 100%. A porcentagem de captação de violeta de cristal foi expressa da seguinte forma: (valor de densidade óptica da amostra/valor de densidade óptica da solução de CV) x 100 = porcentagem de captação de cristal violeta. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.2.6.2 Extravasamento de membrana (“Liberação” de nucleotídeos)

O experimento foi realizado de acordo com Campos et al. (2018). A linhagem *C. albicans* foi incubada em CSD a 35 °C durante 24h. A cultura foi então, lavada e ressuspensa em solução tampão fosfato (PBS) 10 mM (pH 7,4), atingindo a densidade final de cerca de  $10^6$  células/mL. As amostras fúngicas foram então incubadas com espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM) e nistatina (valor de CIM) em diferentes intervalos de tempos (0, 1, 2, 3 e 4h); as amostras incubadas com PBS 10 mM (pH 7,4) foram utilizadas como controle. Após a incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 10,000 g durante 10 min e realizou-se a leitura dos sobrenadantes em um espectrofotômetro numa densidade óptica de 260 nm, a uma temperatura ambiente de 25 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.6.3 Ensaio de proteção do sorbitol**

Após a determinação dos valores de CIM pelo ensaio de diluição seriada, o ensaio de parede foi realizado utilizando o sorbitol como protetor osmótico, conforme metodologia de Frost et al. (1995) e Campos et al. (2018). Uma microdiluição em série foi realizada em uma microplaca estéril de 96 poços utilizando CSD duplamente concentrado e enriquecido com sorbitol à 0,8 M. A solução estoque de espilantol foi diluída em concentrações variando de 1600 a 12,5 µg/mL. Nistatina (20 a 0,156 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Os valores de CIM foram determinados após 24h de incubação a 35°C. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.6.4 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno**

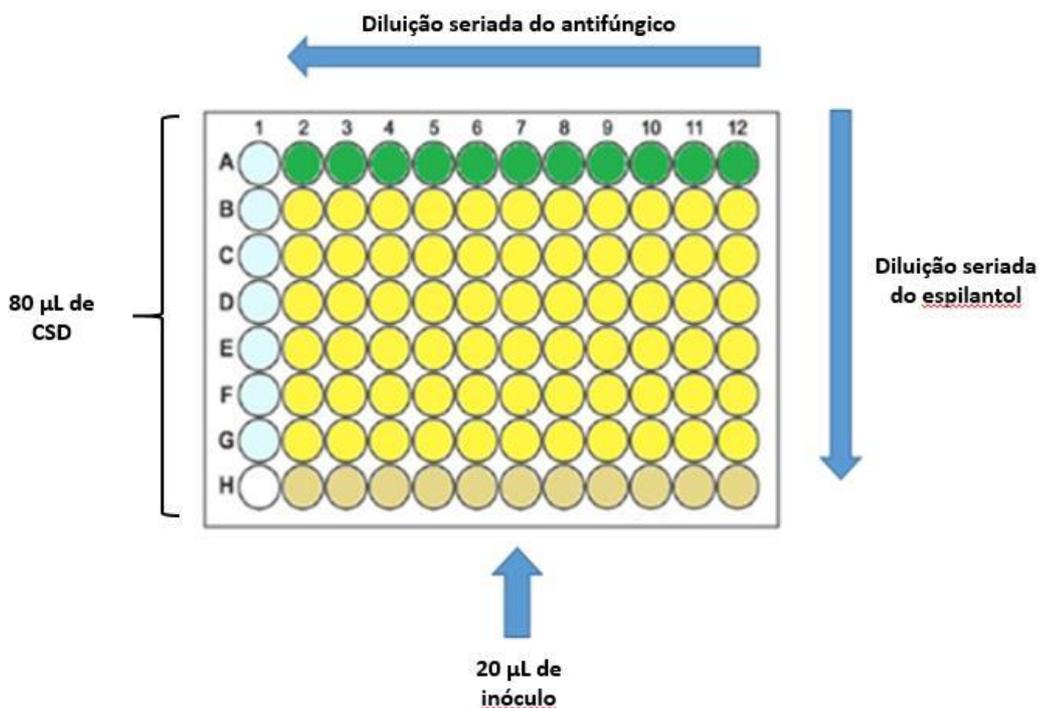
A CIM do espilantol na presença de ergosterol exógeno foi determinada seguindo a metodologia de Frost et al. (1995) e Campos et al. (2018). Uma microdiluição em série foi realizada em uma microplaca estéril de 96 poços utilizando CSD duplamente concentrado enriquecido com ergosterol (400 µg/mL). A solução estoque de espilantol foi diluída em concentrações variando de 1600 a 12,5 µg/mL. Nistatina (20 a 0,1562 µg/mL) foi usada como controle positivo. Os valores de CIM foram determinados após 24h de incubação a 35°C. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.7 Ensaio de sinergismo (*Checkerboard*)**

O sinergismo foi testado utilizando uma técnica bidimensional de concentrações em série de compostos testes, de acordo com a metodologia descrita por Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005). O teste foi realizado em CSD usando placas de microdiluição de 96 poços contendo espilantol (800 µg/mL) e os antifúngicos fluconazol (40000 µg/mL) e itraconazol (800 µg/mL) em concentrações em série. As suspensões fúngicas foram preparadas para produzir inóculos finais de  $2 \times 10^3$  UFC/mL. Os poços das microplacas foram preenchidos com 80 µL de CSD. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100 µL dos antifúngicos para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100 µL da solução de

espilantol para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 contém apenas o espilantol e a linha H apenas os antifúngicos. Posteriormente foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica em cada poço (Figura 9). A leitura da microplaca foi realizada após 24h de incubação a 35°C.

**Figura 9-** Esquema ilustrativo do ensaio de *checkerboard* com espilantol e os antifúngicos, fluconazol e itraconazol, frente à *Candida albicans*.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O *checkerboard* foi utilizado como base para calcular o índice de concentração inibitória fracionada ( $\Sigma\text{CIF}$ ), que é a soma dos CIF's do espilantol e dos antifúngicos (Figura 10). Os resultados foram interpretados da seguinte forma: <0,5 sinergismo; 0,5 a 1 efeito aditivo; 1-2 indiferente ou nenhum efeito; e > 2 antagonismo. As diluições testadas no Índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foram baseadas no CIM do espilantol e dos antifúngicos (CAMPOS, 2017).

**Figura 10-** Fórmula utilizada para calcular o índice de concentração inibitória fracionada ( $\Sigma$ CIF) entre o espilantol e os antifúngicos fluconazol e itraconazol.

$$\Sigma\text{CIF} = \text{CIF}_{\text{ESPILANTOL}} + \text{CIF}_{\text{ANTIFÚNGICO}}$$

$$\text{CIF}_{\text{ESPILANTOL}} = \frac{\text{CIM do espilantol combinado com o antifúngico}}{\text{CIM do espilantol}}$$

$$\text{CIF}_{\text{ANTIFÚNGICO}} = \frac{\text{CIM do antifúngico combinado com o espilantol}}{\text{CIM do antifúngico}}$$

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### 4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE ÀS LINHAGENS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS

#### 4.3.1 Linhagens de células e condições de cultivo

A linhagem de fibroblastos (NIH/3T3) e de queratinócitos (HaCaT), gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Frederico Pittella Silva do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e em meio DMEM e Ham's F-12 (proporção 1:1), respectivamente, ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% da solução dos antibióticos [Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)] em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência.

Em seguida, removeu-se o meio, lavou-se com PBS e adicionou-se 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5% às garrafas de cultura dos fibroblastos e queratinócitos, as quais foram incubadas por 4 e 10 minutos, respectivamente, à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% da solução de antibióticos para inativação da enzima. Recolheu-se o meio contendo as

células e transferiu para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL, procedendo a centrifugação à 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. As suspensões de células foram diluídas diretamente no corante Azul de Trypan 10x para a contagem em câmara de Neubauer para iniciar o ensaio de viabilidade celular.

#### **4.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT**

Para a avaliação da viabilidade, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de  $5 \times 10^3$  células/poço e  $1 \times 10^4$  células/poço para NIH/3T3 e HaCaT, respectivamente, e incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, removeu-se o meio e adicionou-se 150 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham' F-12 suplementado (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) em cada poço. Em seguida, foram adicionados 50 µL de espilantol previamente diluído em solução de DMSO para a concentração final de 0,5% (v/v), de modo a obterem-se concentrações de espilantol variando entre 200 µg/mL a 12,5 µg/mL (em quadruplicata). Como controles foram utilizados meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 (controle negativo) e meio DMEM acrescido do solvente (solução de DMSO a 0,5% (v/v))(controle solvente). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular por meio do ensaio de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). O ensaio para avaliação de viabilidade é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium (MTT) (amarelo) a formazan (coloração violeta). Após o tempo de cultura de 48 horas, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado acrescido de 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL), sendo incubada por 2:30 h à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido esse tempo, o precipitado de formazan formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a absorbância (Abs) foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) à 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata. A viabilidade celular (%)

dos fibroblastos e queratinócitos após tratamento foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância média dos controles tratados com DMSO}} \times 100$$

Como se pode observar, o cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

#### 4.4 ESTUDOS *IN SILICO*

Com intuito de avaliar as propriedades físico-química, farmacocinética e farmacodinâmica de espilantol, foram utilizados cinco softwares livres disponíveis em plataformas online gratuitas (*pkCSM*, *Molinspiration*®, *Way2Drug*, *SwissADME* e *Swiss Target Prediction*). Os procedimentos estão descritos a seguir.

##### 4.4.1 Avaliação das propriedades físico-químicas de espilantol

A estrutura química do espilantol foi desenhada no software livre *Molinspiration Chem Informatics*® (<http://www.molinspiration.com/>). Este software calcula, com base em descritores moleculares, propriedades físico-químicas como Log P, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, massa molecular e número de violações à regra dos 5 de Lipinski. Também gera, automaticamente, a notação SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) das moléculas. Esta notação descreve a natureza e a topologia da estrutura molecular do espilantol e foi necessária para alimentar os softwares utilizados para calcular as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas desse composto.

#### 4.4.2 Avaliação das propriedades farmacocinética e farmacodinâmica de espilantol

A notação SMILES então, foi inserida na versão dos softwares livres *pkCSM*, *Way2Drug*, *SwissADME* e *Swiss Target Prediction*. Para avaliar os parâmetros de absorção, foram utilizados os modelos de permeabilidade em células Caco-2 (célula de carcinoma do colo intestinal), absorção intestinal pelo intestino humano, substrato para glicoproteína P, inibição de glicoproteínas P I e II e permeação cutânea. No que diz respeito a distribuição de espilantol, foram avaliados o seu volume de distribuição em organismo humano, sua permeabilidade na barreira hematoencefálica e no sistema nervoso central (SNC). No metabolismo do composto foi observado se o mesmo seria substrato e/ou inibidor de enzimas do complexo citocromo P 450 (CYP 450). Para avaliar parâmetros relacionados com a excreção, foi avaliada a capacidade de inibição de transporte renal de cátions orgânicos. O perfil citotóxico foi traçado através do teste de toxicidade AMES, toxicidade em *Tetrahymena pyriformis*, dose máxima tolerada em humanos e hepatotoxicidade.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A atividade do espilantol foi apresentada com intervalo de confiança mediano de 95%. Cada ponto de dados representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas entre o tratamento e o controle foram avaliadas pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni ( $P > 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e seu efeito sobre *C. albicans*

Testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas podem ser usados não somente na pesquisa de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos pela verificação da atividade antifúngica de amostras complexas, como extratos vegetais e de substâncias puras. Estes testes são de extrema importância, devido ao aumento de sérias infecções fúngicas e ao concomitante aparecimento de resistência aos agentes antifúngicos (STOPPA et al., 2009).

Para a avaliação da atividade antifúngica de produtos naturais, são realizadas várias metodologias como a bioautografia, a difusão em ágar e a diluição em ágar e em caldo. Porém, a metodologia proposta pela organização americana *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras é a diluição em caldo, pois esta apresenta alta reprodutibilidade, é barata, 30 vezes mais sensível que outros métodos utilizados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser utilizada para grande número de amostras e deixa um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008; STOPPA et al., 2009; CLSI, 2017).

O teste de microdiluição em caldo foi empregado a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de espilantol. A CIM pode ser definida como a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. Elas são consideradas excelentes ferramentas para determinar a suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. As CIM's também são utilizadas em laboratórios de diagnóstico para determinar a atividade *in vitro* de amostras clínicas a drogas antimicrobianas. A sensibilidade do microrganismo teste, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento da linhagem são fatores que influenciam nos valores de CIM (ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; ANDREWS, 2001).

Já a concentração fungicida mínima (CFM) corresponde àquela concentração da amostra capaz de impedir o crescimento de um fungo em

subculturas livres de substâncias antifúngicas, o que prediz a morte do mesmo e a ação fungicida da amostra (SPENCER e SPENCER, 2004).

É importante ressaltar que a linhagem de *C. albicans* utilizada neste estudo (ATCC® 10231) possui resistência aos antifúngicos anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol (ATCC, 2018), representando um grande desafio para a prática clínica. Desse modo, inicialmente foi verificado a atividade de dois antifúngicos azólicos frente a essa cepa, fluconazol e itraconazol, a fim de confirmar a resistência relatada na literatura. Após, foram testados a nistatina, um antifúngico poliênico, usado como controle positivo neste trabalho e o espilantol. Os valores de CIM e os efeitos dessas concentrações para os antifúngicos e o espilantol frente a *C. albicans* encontram-se na **Tabela 1**.

**Tabela 1-** Concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito de CIM para o espilantol e os antifúngicos frente à espécie *Candida albicans* ATCC® 10231.

Amostra	CIM (µg/mL)	Efeito
Nistatina	2,5	Fungistático
Fluconazol	10000	Fungistático
Itraconazol	200	Fungistático
Espilantol	200	Fungistático

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Pode-se observar que o espilantol demonstrou eficácia significativa contra *C. albicans* com valor de CIM de 200 µg/mL, melhor que o fluconazol (CIM = 10.000 µg/ mL) e semelhante ao itraconazol (CIM = 200 µg/mL). Um efeito de inibição do crescimento (fungistático) foi observado, no valor de CIM, para todas as substâncias testadas. A CFM não pôde ser determinada nas concentrações testadas.

Estes resultados confirmaram a resistência de *C. albicans* para fluconazol e itraconazol e uma sensibilidade para nistatina (CIM = 2,5 µg/mL), considerando que a resistência ao fluconazol pode ser designada por um CIM ≥ 64 µg/mL (PFALLER et al., 2006) e para o itraconazol por um CIM ≥ 1 µg/mL

(PINJON et al., 2003). Já a nistatina, é considerada resistente a *C. albicans* em concentrações  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  (KURIYAMA et al., 2005).

Ainda não existe um consenso, que classifique o nível de concentração inibitória mínima aceitável para produtos naturais quando comparados com antimicrobianos padrões, tanto que, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antimicrobianos, enquanto outros consideram com bom potencial aqueles com níveis de inibições superiores. Entretanto, Simões, Bennett e Rosa (2009) considera que compostos fitoquímicos podem ser classificados como antimicrobianos com base em testes de suscetibilidade que produzem valores de CIM até 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Dessa forma, o espilantol pode ser classificado como um bom inibidor, ou seja, possui uma promissora atividade antifúngica. Não foi possível encontrar a CFM tanto de espilantol quanto de nistatina. Mas observamos que, o CIM dessas substâncias tiveram efeitos fungistáticos, ou seja, houve uma inibição do crescimento fúngico sem causar a morte celular.

A atividade antifúngica do espilantol é conhecida. Mejía et al. (2015) realizaram um estudo antimicrobiano com a fração clorofórmica do extrato etéreo das flores de *Acmella oleracea*, rico em espilantol, frente à *Candida albicans* e obtiveram uma CIM de 312,5  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrando que este composto possui atividade antifúngica, que provavelmente se dá, segundo Jang et al. (2008) devido as regiões insaturadas 2E, 6Z e 8Z, presente em sua estrutura. Esta afirmação pôde ser confirmada, por um estudo realizado por estes mesmos autores que comprovaram que, análogos saturados do espilantol, como pelitorina e fagaramida não apresentam atividade antifúngica por não possuírem as mesmas regiões insaturadas que o mesmo.

Alcantara et al. (2015) estudaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico das flores de *A. oleracea* e suas frações, ricas em espilantol, contra bactérias e fungos patogênicos presentes na pele e no trato gastrointestinal de animais domésticos. A fração clorofórmica do extrato etanólico das flores de *A. oleracea* foi testada contra *Candida albicans* ATCC 0175, obtendo-se uma CIM de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Com base nesses estudos, pode-se observar o potencial antifúngico de espilantol contra *C. albicans*, de forma que, foi encontrado um CIM menor que o da literatura e que a linhagem em estudo é resistente diferindo dos demais

trabalhos. Por esse motivo, foi realizado outros ensaios com este composto, a fim de corroborar com os dados encontrados e propor possíveis mecanismos de ação para o mesmo.

## 5.2 Determinação da curva de crescimento de *C. albicans*

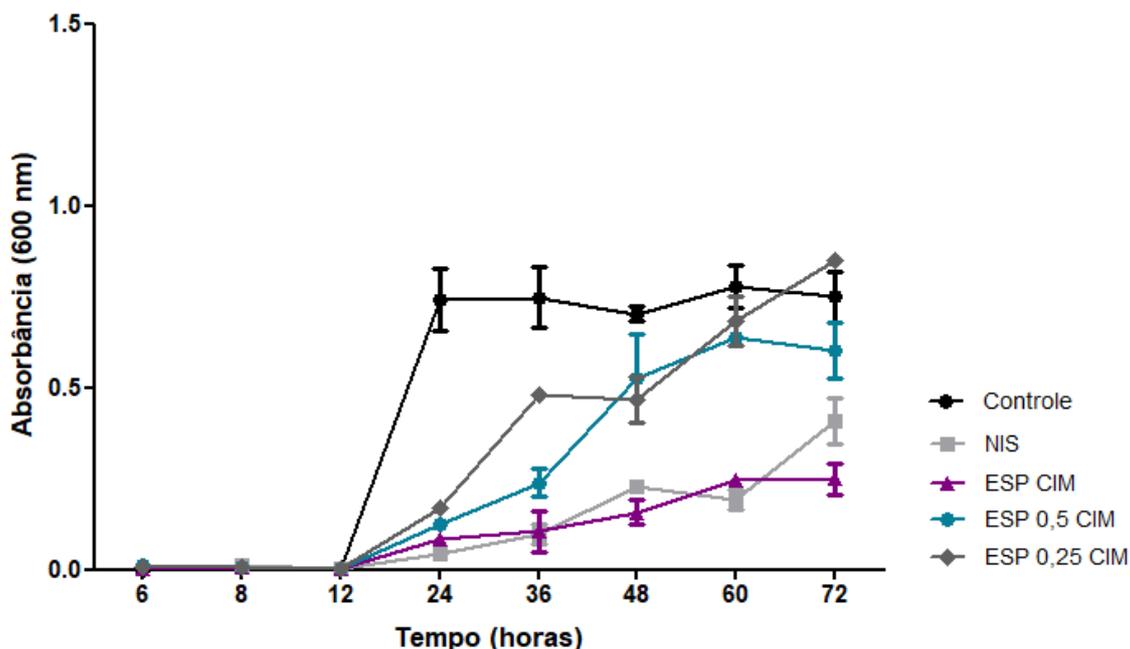
O ensaio para determinar a curva de crescimento de *C. albicans* ATCC® 10231 se baseia na contagem de células de leveduras por turbidimetria, na presença da amostra teste em intervalos periódicos de incubação (ANDRADE, 2017).

A curva de crescimento permite determinar a taxa de crescimento de uma cultura celular. Esta taxa é dada, pela variação do número de células por unidade de tempo, sendo possível dividir a curva em quatro diferentes fases: fase de latência (lag), fase exponencial (log), fase estacionária e fase de declínio ou morte celular (TORTORA et al., 2012; IRFAN et al., 2017).

A fase lag corresponde ao período de tempo em que o número de células sofre pequenas variações, a fase log corresponde ao período em as células iniciam seu processo de divisão, sendo caracterizada pelo crescimento acentuado e grande atividade metabólica, a fase estacionária se dá quando o número de células que morrem é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável, e a fase de declínio corresponde ao período em que o número de mortes excede o número de células novas (TORTORA et al., 2012).

Na curva de crescimento para *C. albicans* obtida (**Gráfico 1**) pode-se observar uma relação entre a absorbância e os tempos de 6 a 72 h. Para esta análise foi feita uma curva padrão das cepas fúngicas sem os tratamentos e somente com o veículo das amostras, observando a fase “lag”, com pouca divisão celular, onde os microrganismos estão se adaptando ao meio (6 a 12 h) e a fase exponencial “log”, com crescimento acentuado e grande atividade metabólica (12 a 24 h). Dessa forma, o veículo não afetou o crescimento da linhagem em estudo.

**Gráfico 1-** Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup> 10231 na presença de espilantol (ESP) e Nistatina (NIS). Para construção da curva de crescimento fúngica (controle) foi utilizado o veículo de espilantol. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

As curvas de crescimento fúngica na presença de nistatina e espilantol tiveram um aumento da fase “lag” em comparação ao controle de crescimento. Além disso, foi observada uma diminuição de crescimento celular na fase “log”, principalmente na presença de espilantol na concentração de CIM.

Vale ressaltar que o espilantol (valor de CIM) manteve a mesma quantidade de células entre 60 e 72 h, alcançando a fase estacionária, o que não foi visto para nistatina, demonstrando uma atividade promissora quando comparada ao controle positivo. Além disso, reduziu a fase log, porém manteve o crescimento fúngico, indicando novamente ter efeito fungistático. Já as subdoses foram menos efetivas e após 72 h de experimento tiveram a mesma absorbância que o controle de crescimento.

### 5.3 Determinação da densidade e da viabilidade celular de *C. albicans*

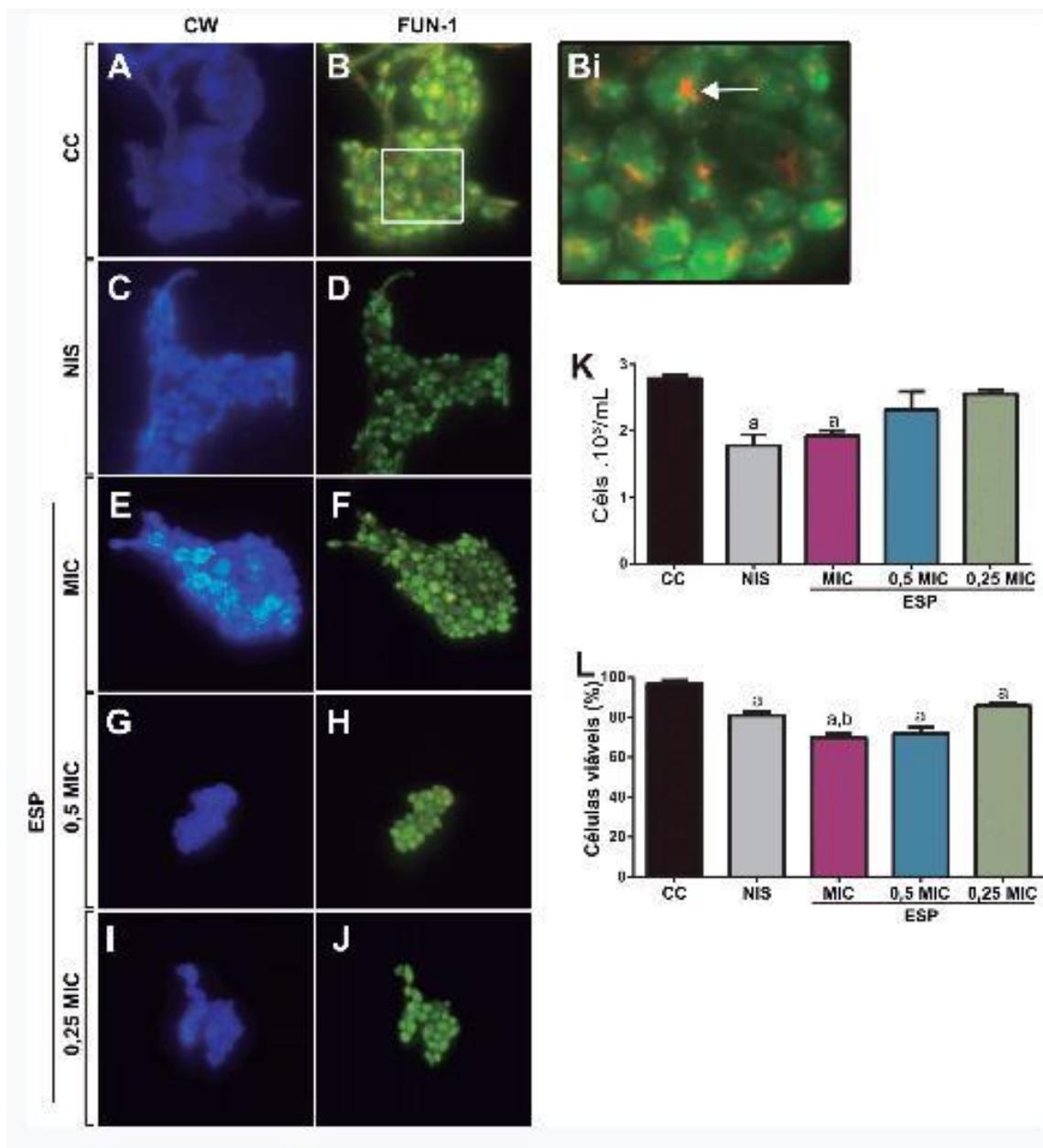
Para avaliar o efeito do espilantol sobre a densidade e a viabilidade das leveduras foi utilizado o kit *LIVE/DEAD<sup>®</sup> Yeast Viability* (Molecular Probes, USA), que consiste de dois marcadores fluorescentes, o Calcofluor White (CW) e o FUN-1. O Calcofluor White M2R é um fluorocromo que se liga à celulose e a quitina da parede celular do fungo e marca a mesma com fluorescência azul, independentemente do estado metabólico celular. Dessa forma, consegue-se investigar possíveis danos causados na parede celular fúngica, pois a difusão do corante fluorescente por todo o citoplasma é sugestiva de perda da integridade da parede celular (SILVA et al., 2018).

Já o FUN-1 marca o citoplasma de todas as leveduras em verde-amarelado, mas apenas em células com a membrana plasmática íntegra e função metabólica normal, a fluorescência do FUN-1 é convertida e marca vacúolos intracelulares em vermelho-alaranjado. Por isso, células vivas exibem fluorescência vermelha e células mortas exibem fluorescência verde (SOARES et al., 2013).

A microscopia de fluorescência após a coloração com o kit, mostrou que o tratamento com espilantol e a nistatina (valor de CIM) induziram uma diminuição significativa da densidade celular quando comparado ao controle negativo, indicando assim, uma atividade fungistática, inibindo o crescimento das células fúngicas (**Figura 11- A, C, E, G, I, K**). Estes resultados, corroboram com os encontrados nos ensaios de CIM e de curva de crescimento, e demonstram o potencial do espilantol como uma possível alternativa no tratamento de infecções causada por *C. albicans* ATCC<sup>®</sup> 10231.

Em relação à viabilidade das células fúngicas, foi observada uma diferença significativa da nistatina e do espilantol em valores de subdoses (0,5 CIM e 0,25 CIM) em relação ao controle negativo, e do espilantol (valor de CIM) em relação ao controle negativo e a nistatina (**Figura 11- B, D, F, H, J, L**).

**Figura 11-** Efeito de espilantol (ESP) no crescimento fúngico de *C. albicans* ATCC® 10231. Os fungos cultivados foram corados com o kit LIVE/ DEAD Yeast Viability e contados sob microscopia de fluorescência para avaliação da densidade e da viabilidade celular. A nistatina (NIS) foi usada como controle positivo. As letras indicam diferença estatística com os grupos tratados com veículo de ESP (a) e tratados com nistatina (b) (ANOVA seguido de Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Legenda: As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD Yeast Viability, que consiste em dois marcadores Calcofluor White (CW; A, C, E, G e I), e com o FUN1 (B, D, F, H e J). O CW tem afinidade pela parede celular e marca todas as leveduras em azul (filtro de excitação UV - emissão em fluorescência azul). O FUN-1 marca todas as células em verde (filtro de excitação GFP - emissão em fluorescência verde), porém em células metabolicamente ativas a frequência de emissão no vacúolo citoplasmático é alterada para vermelho (Bi, cabeça de seta branca). As leveduras foram contadas em ambos os filtros no microscópio (10 campos aleatórios) e a proporção de células ativas estabelecidas (L).

A atividade metabólica das leveduras diminuiu significativamente com o tratamento com espilantol, principalmente com espilantol no valor de CIM, quando comparados ao controle negativo e ao controle positivo. A porcentagem de células inviáveis no controle negativo foi pequena e o tratamento com o espilantol causou uma maior diminuição no número de células viáveis quando comparado a nistatina e ao controle negativo indicando um maior dano no envoltório celular (parede e membrana) da levedura.

Por meio da viabilidade celular, pode-se identificar diretamente a perda da integridade do envoltório celular, onde estas são incapazes de manter um potencial eletroquímico, sendo consideradas como inviáveis. A visualização é possível devido ao uso do corante FUN-1. Os resultados obtidos confirmam o efeito de CIM para *C. albicans* ATCC® 10231, demonstrando uma ação majoritária em inibir o crescimento dessas leveduras.

## **5.4 Ensaios sobre o envoltório celular**

### **5.4.1 Permeabilidade da membrana com cristal violeta**

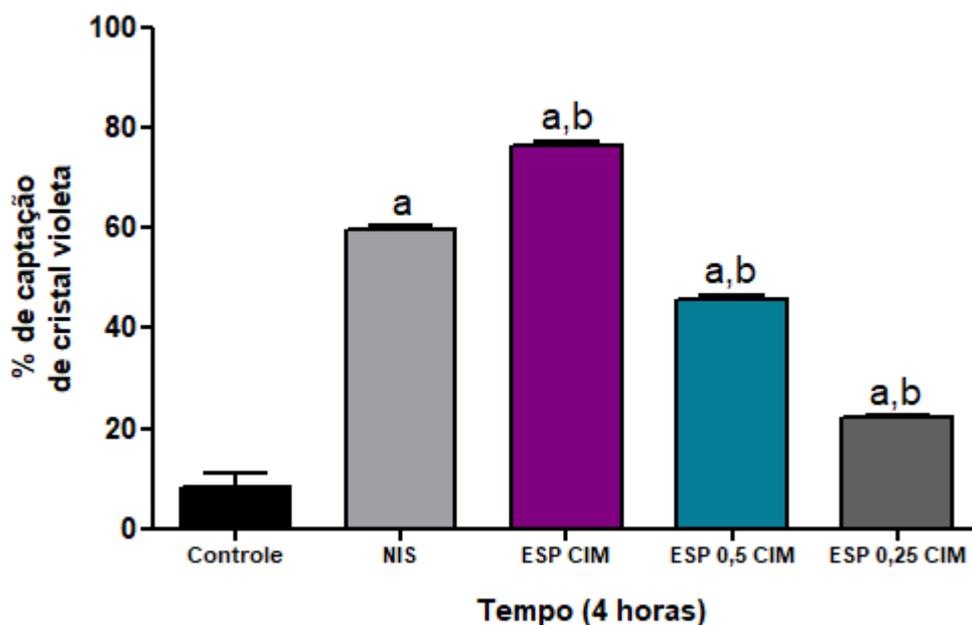
O cristal violeta tem baixa penetrabilidade em células normais, mas se acumula em microrganismos e outras células com envoltório celular lesionado (AHMAD et al., 2014; HALDER et al., 2015). A captação celular de cristal violeta é facilmente aumentada quando o envoltório da célula está danificado e não é detectada quando o envoltório está intacto (CAMPOS et al., 2018).

Os resultados (**Gráfico 2**) indicam um aumento da permeabilidade celular fúngica, que pode ser observado pelo aumento na captação de cristal violeta, após o tratamento com o espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM)

e nistatina, em comparação com o controle. Observa-se que, esse aumento na captação de cristal violeta pela célula fúngica tratada com espilantol é dose dependente, sendo maior a captação no valor de CIM.

O espilantol na concentração de CIM foi mais eficaz que a nistatina, levando a quase 80% na captação de cristal violeta. Isso ocorreu, provavelmente, devido a distúrbios da membrana celular do fungo e da parede celular defeituosa. As subdoses de espilantol (0,5 CIM e 0,25 CIM) apresentaram diferenças significativas em relação ao controle e a nistatina, sendo a porcentagem de captação de cristal violeta nessas concentrações menor que a porcentagem de captação observada com o espilantol e o controle positivo (valor de CIM).

**Gráfico 2-** Permeabilidade celular por porcentagem (%) de captação de cristal violeta por *Candida albicans* ATCC® 10231. Culturas tratadas com espilantol (ESP) ou nistatina (NIS) foram avaliadas pela permeabilidade de captação de cristal violeta. Controle negativo foi tratado com veículo de espilantol. Letras indicam diferença estatisticamente em relação ao controle negativo (CC) (a) e positivo (NIS) (b). ANOVA seguido por Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 5.4.2 Extravasamento de membrana (“liberação” de nucleotídeos)

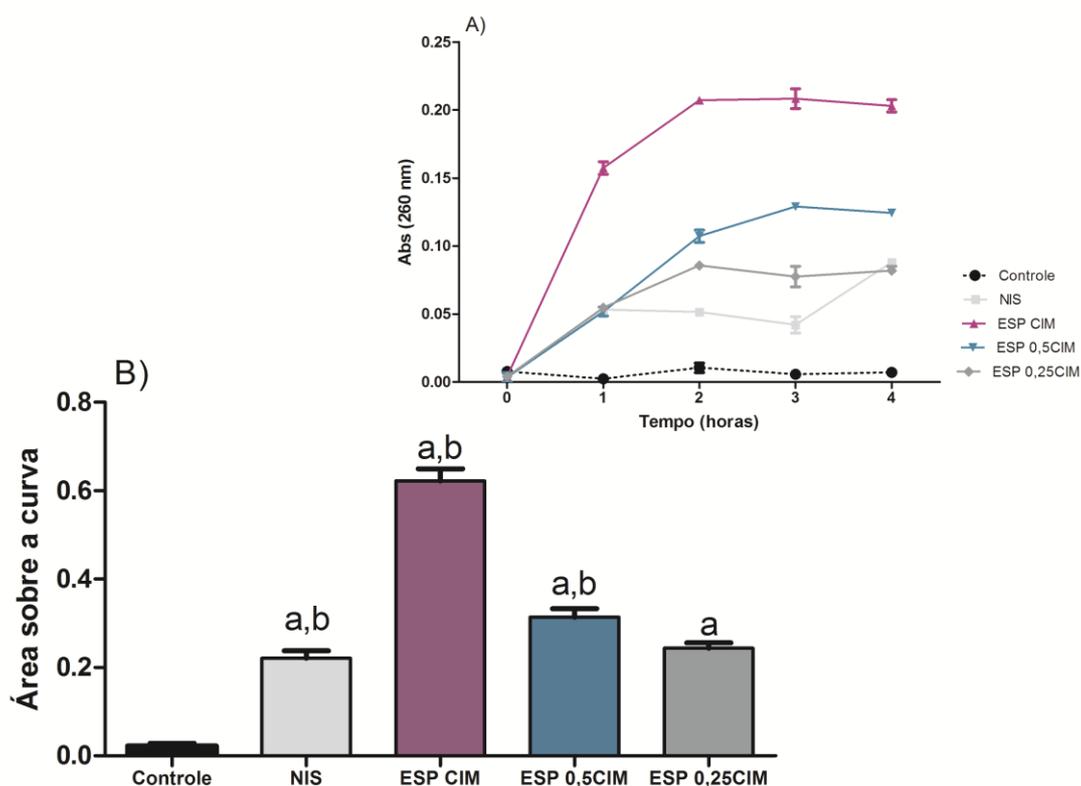
A liberação de nucleotídeos do interior para o exterior da célula ocorre, devido à lesão celular e indica ruptura da membrana (CAMPOS et al., 2018). Esse extravasamento serve como indicador da desorganização da membrana celular. O efeito da permeabilidade celular, em termos de vazamento celular, pode ser avaliado por meio da liberação do componente intracelular das células para o meio, utilizando um tampão (MELO, 2017).

Dessa forma, o efeito do espilantol sobre a quantidade total de nucleotídeos liberados de *C. albicans* ATCC® 10231 foi avaliado por absorvância a 260 nm, comprimento de onda que representa o espectro de absorvância máximo para nucleotídeos (SANTOS, 2010).

Os resultados mostram que tanto a nistatina, quanto o espilantol (valor de CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM) provocaram um aumento na liberação de nucleotídeos (componentes intracelulares) de *C. albicans* ATCC® 10231 em comparação com o controle de crescimento (**Gráfico 3A**), sugerindo um dano no envoltório celular, favorecendo a permeabilidade das células fúngicas, gerando esse aumento no número de nucleotídeos liberados.

O tratamento com espilantol aumentou 25 vezes a liberação de nucleotídeos de *C. albicans*, enquanto a nistatina aumentou a liberação 8 vezes, comparando com o controle do crescimento (**Gráfico 3B**). Esse resultado ressalta ainda mais a atuação do espilantol contra *C. albicans* ATCC® 10231, além de possibilitar evidências de um possível mecanismo de ação em envoltório celular fúngico.

**Gráfico 3-** Liberação de nucleotídeos de *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup> 10231 sob efeito de espilantol (ESP) e nistatina (NIS). (A) Representa as curvas de extravasamento de nucleotídeos medido por densidade óptica em 260 nm por um período de 4 horas, em intervalos de 1 hora e (B) área sob a curva. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle (a) e NIS (b) (ANOVA seguido de Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  DP.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 5.4.3 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno e de proteção do sorbitol

Os esteróis são componentes essenciais das membranas celulares eucarióticas, sendo o ergosterol, o principal constituinte das membranas das células fúngicas. Ele atua como um bioregulador da fluidez, assimetria e da integridade da membrana fúngica. Também regula a permeabilidade da membrana e age como uma espécie de “hormônio” estimulando o crescimento fúngico (KATHIRAVAN et al., 2012; CAMPOS 2018).

A propriedade do espilantol de se ligar diretamente ao ergosterol foi verificada pela adição de ergosterol exógeno ao método de determinação de CIM. Quando um antifúngico se liga preferencialmente ergosterol exógeno adicionado no teste, em vez de estar ligado ao ergosterol da membrana, isso resulta em valores aumentados de CIM (CAMPOS, 2018). Os valores de concentração inibitória mínima na presença de excesso de ergosterol estão representados na **Tabela 2**. Podemos observar que o espilantol teve um aumento de 4 vezes em seu valor de CIM, indicando que a amostra possivelmente age em membrana celular.

A presença do sorbitol como estabilizador osmótico da parede celular também promove aumento do valor de CIM dos compostos que atuam sobre a parede (ESCALANTE et al., 2008). Os valores de CIM para o espilantol no ensaio com adição de sorbitol podem ser observados na **Tabela 2**. O valor de CIM para o espilantol foi aumentado significativamente quando comparado ao valor de CIM obtido sem a adição de sorbitol, indicando que essa substância afeta a parede celular, atuando no ergosterol, corroborando assim, com os ensaios de extravasamento de nucleotídeos e de captação celular de cristal violeta.

**Tabela 2-** Atividade antifúngica *in vitro* de espilantol contra *Candida albicans* ATCC® 10231 na presença e ausência de sorbitol e ergosterol exógeno pelo ensaio de microdiluição em caldo.

<b>Amostras</b>	<b>CIM</b>	<b>CIM com sorbitol</b>	<b>CIM com ergosterol</b>
Espilantol*	200	800	800
Nistatina*	2,5	-	20
Fluconazol*	10.000	10.000	-

\*Concentração em µg/mL

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### **5.5 Ensaio de sinergismo (*Checkerboard*)**

Alguns estudos têm demonstrado que produtos naturais oriundos de plantas apresentam atividade contra linhagens de patógenos resistentes aos

antimicrobianos, bem como apresentam ter efeito sinérgico (STOPPA et al., 2009).

Zago et al. (2009), destaca que, o uso associado de plantas medicinais com antimicrobianos tradicionais permite inibir ou intensificar o efeito terapêutico das drogas tradicionais. Estes autores relatam também a capacidade de haver sinergismo, com substâncias sintéticas, em produtos naturais que não tenham uma ação antimicrobiana sintética.

Quando comparado ao uso de apenas um antimicrobiano, algumas terapias combinadas possuem múltiplas vantagens, podendo ser utilizada para minimizar a toxicidade do fármaco, para expandir o espectro de ação do antimicrobiano, prevenir o surgimento de microrganismos resistentes ou até mesmo para obter atividade antimicrobiana sinérgica (ODDS, 2003).

O sinergismo antifúngico entre o espilantol e os antifúngicos fluconazol e itraconazol foram estudados por meio de células planctônicas de *C. albicans* ATCC® 10231 em um ensaio denominado *Checkerboard*. Este teste tem sido a maneira mais comum para se caracterizar a atividade de combinações antimicrobianas em laboratório, por meio do cálculo do índice de concentração inibitória fracionada ( $\Sigma$ CIF). O uso desta técnica bidimensional permite avaliar o sinergismo existente entre essas duas substâncias, a fim de combinar as concentrações de ambos, possibilitando a utilização de menores concentrações e conseqüentemente, obter menores efeitos tóxicos sobre o organismo humano quando estes forem utilizados (JOHNSON et al., 2004). A associação entre eles foi importante para otimizar o efeito antimicrobiano de ambos, promovendo uma atividade sinérgica (**Tabela 3**).

**Tabela 3-** Índice de Concentração Inibitória Fracionada ( $\Sigma$ CIF) e seu efeito.

Amostras	CIM	CIM em combinação de	CIM em combinação de
		espilantol com fluconazol	espilantol com itraconazol
<b>Espilantol</b>	200	3,125	0,25
<b>Fluconazol</b>	10000	2500	-
<b>Itraconazol</b>	200	-	0,125
<b><math>\Sigma</math>CIF</b>	-	0,265	0,0019
<b>Efeito</b>	-	Sinérgico	Sinérgico

$\Sigma$ CIF- soma das concentrações inibitórias fracionadas – o efeito combinatório é avaliado da seguinte forma: sinergismo  $\Sigma$ CIF  $\leq$  0,5; aditivo  $\Sigma$ CIF  $>$  0,5 e  $\leq$  1; indiferente  $\Sigma$ CIF  $>$  1 e  $\leq$  2.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2019).

Os índices de concentração inibitória fracionada ( $\Sigma$ CIF = 0,265  $\mu$ g/mL) e ( $\Sigma$ CIF = 0,0019) encontrados para o fluconazol e o itraconazol, respectivamente, revelaram uma possível interação do espilantol com os antifúngicos fluconazol e itraconazol, sendo esta interação caracterizada como uma ação sinérgica ( $\leq$ 0,5  $\mu$ g/mL). Por meio desses resultados, pode-se observar uma diminuição no valor de CIM para o fluconazol (CIM de 10.000  $\mu$ g/mL para 2500  $\mu$ g/mL) e para o espilantol (CIM de 200  $\mu$ g/mL para 3,125  $\mu$ g/mL). O mesmo ocorreu com o itraconazol (CIM de 200  $\mu$ g/mL para 0,125  $\mu$ g/mL), sendo a associação espilantol + itraconazol considerada promissora, pois se observa uma diminuição de 1600 vezes no valor de CIM para *C. albicans* resistente.

Existem vários mecanismos envolvidos na obtenção de uma atividade sinérgica, podemos destacar dentre eles, a inibição de proteínas carreadoras, a inibição simultânea da parede celular e membrana plasmática, o aumento da penetração de um agente antifúngico proporcionado pela ação de outro antifúngico na membrana celular fúngica e a inibição de diferentes estágios nas vias bioquímicas fúngicas que são essenciais à sobrevivência celular (JOHNSON et al., 2004).

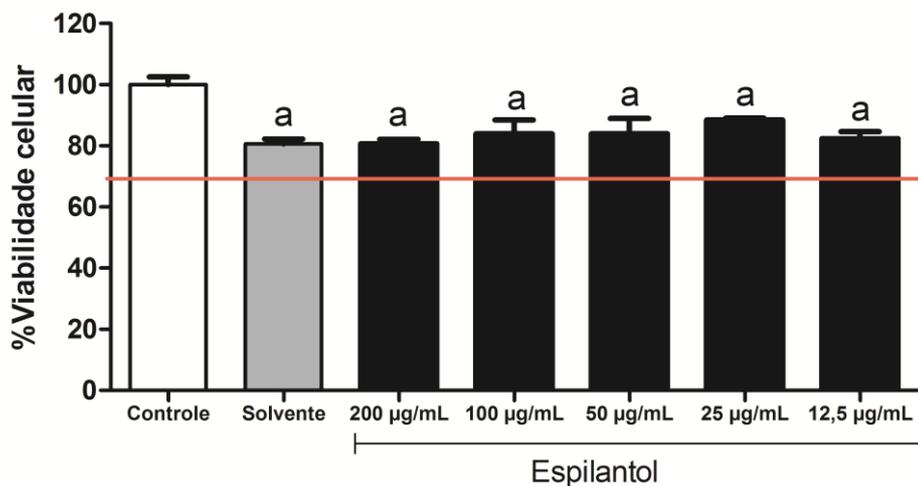
A ação sinérgica do espilantol com o fluconazol e o itraconazol pode estar relacionada com um ou mais mecanismos citados, podendo destacar a atuação em ergosterol e sorbitol, onde o espilantol apresentou um resultado satisfatório. Esse resultado enfatiza ainda mais a importância do uso do espilantol como alternativa terapêutica tanto na monoterapia quanto em combinação, retardando assim, o desenvolvimento de resistência fúngica.

### **5.6 Avaliação da viabilidade celular em linhagens de fibroblastos e queratinócitos**

A viabilidade celular foi avaliada em linhagens de fibroblastos (NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT) pelo ensaio de MTT. Nenhuma das concentrações testadas para o espilantol reduziu significativamente a viabilidade celular dos fibroblastos (**Gráfico 4**).

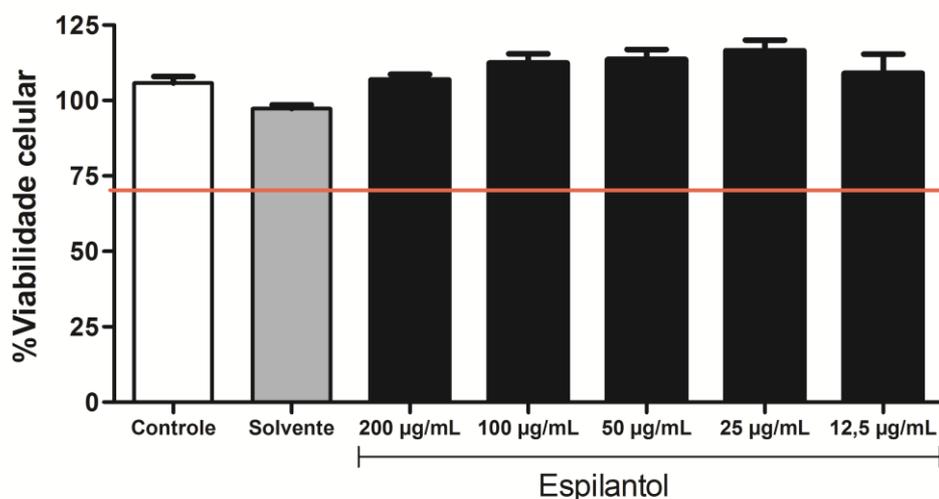
A concentração de CIM (200 µg/mL) foi a que apresentou maior diferença estatística em relação ao controle, sendo as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL as que proporcionaram maior percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, com mais de 80% de viabilidade. Já para a linhagem de queratinócitos (HaCaT), todas as concentrações de espilantol avaliadas demonstraram ser não significativas, apresentando mais de 100% de viabilidade em relação ao controle tratado apenas com meio DMEM (**Gráfico 5**).

**Gráfico 4-** Avaliação do perfil de viabilidade celular em linhagens de fibroblastos (NIH/3T3) tratados com espilantol. Letras indicam diferença estatisticamente em relação ao controle negativo (a) e solvente (b). ANOVA seguido por Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**Gráfico 5-** Avaliação do perfil de viabilidade celular em linhagens de queratinócitos (HaCaT) tratados com espilantol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O ideal de terapias medicamentosas, é que estas não apresentem toxicidade as células do organismo humano. O percentual de viabilidade aceitável foi determinado de acordo com a ISO10993-5:2009, que estabelece que na investigação de citotoxicidade de substâncias *in vitro*, a viabilidade celular não deve ser reduzida para valores inferiores a 70%. Este estudou demonstrou que, nas concentrações avaliadas, espilantol não reduziu a viabilidade de células normais- fibroblastos e queratinócitos (viabilidade acima de 70% para todas as concentrações).

Dessa forma, o espilantol apresenta-se como um composto promissor para ser empregado em formulações de uso tópico, que possam ser utilizadas para candidíases, pois, segundo os experimentos realizados, o mesmo tem efeito fungistático contra *C. albicans* resistente. Por este motivo, foram utilizadas células HaCaT pois estas, são uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados, que mantém a capacidade de diferenciação epidérmica e são muito empregados para o estudo de produtos cosméticos, uma vez que representam um tipo celular que está em abundância na camada mais externa da pele (a epiderme), e que, portanto, é mantida em contato com substâncias ativas capazes de permear o estrato córneo e os fibroblastos, pois são o tipo celular mais abundante na derme humana (ANDRÉO, 2014).

## **5.7 Estudos *in silico***

### **5.7.1 Avaliação das propriedades físico-químicas de espilantol**

Com o intuito de avaliar a capacidade do espilantol em ser um bom candidato a ser administrado por via oral, foram analisadas as características físico-químicas desta molécula pelos softwares onlines gratuitos nas plataformas *pkCSM*, *Molinspiration*® e *Swiss ADME*.

Para prever a biodisponibilidade oral de uma droga, Lipinski e colaboradores desenvolveram uma regra, identificando parâmetros dos compostos que levam a problemas de absorção e permeabilidade. Essa regra, conhecida como “*regra dos 5 de Lipinski*” é baseada em características físico-químicas dos compostos analisados, tais como massa molecular, lipofilicidade ( $\log P$ ) e número de grupos doadores e aceptores de ligação hidrogênio

(LIPINSKI, 2004). Contudo, moléculas que violam mais do que duas destas regras podem ter problemas de biodisponibilidade oral (LIPINSKI, et al 1996; GRANATO, 2017).

Outros pesquisadores identificaram outros parâmetros importantes e reforçaram essas regras para que um composto tenha uma biodisponibilidade oral ideal, como o número de ligações rotacionáveis, pois uma flexibilidade na molécula é importante para a passagem através das membranas biológicas (PASSAMANI, 2009).

Os resultados apresentados na **Tabela 4** demonstraram que o epilantol não violou nenhuma das regras de *Lipinski*, mostrando-se assim, ser um bom candidato para ser administrado por via oral, pois apresentou peso molecular menor que 500 Da, Log P menor que 5, número de ligações rotacionáveis menor do que 10, grupos de aceptores de hidrogênio menor do que 5 e grupos de doadores de hidrogênio menor do que 10.

**Tabela 4-** Parâmetros físico-químicos do epilantol encontrados após busca nas plataformas *pkCSM*, *Molinspiration*® e *Swiss ADME*.

Parâmetros	Plataforma <i>pkCSM</i>	Plataforma <i>Molinspiration</i> ®	Plataforma <i>Swiss ADME</i>	Valores de Referência
Peso molecular	221,344	221,34	221,34	≤ 500 Da
Log P	3,2273	3,49	3,36	≤ 5
Ligações rotacionáveis	7	7	8	≤ 10
Grupos aceptores de hidrogênio	1	2	1	≤ 5
Grupos doadores de hidrogênio	1	1	1	≤ 10
Número de violações	-----	0	-----	≤ 2

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A lipofilicidade (log P) é uma das propriedades farmacológicas mais importantes, com grande impacto nos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Ela é definida pela IUPAC, como uma propriedade que

descreve um equilíbrio de particionamento de moléculas de soluto entre a água e um solvente orgânico imiscível (SANTOS et al., 2018).

A lipofilicidade de uma molécula e seu peso molecular também influencia na sua biodisponibilidade oral. Compostos com um peso molecular relativamente elevado e uma alta hidrofiliicidade resultam numa biodisponibilidade oral muito baixa, sendo na maioria dos casos inferior a 1% (ZUPANCIC; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2017).

O espilantol apresenta-se como um composto com elevada lipofilicidade ( $\log P < 5$ ) e baixo peso molecular ( $< 500$  Da), o que facilita a sua biodisponibilidade oral. Isso é de grande importância pois, a via preferida para a administração de medicamentos é a via oral, devido ao seu baixo custo, alta adesão e conforto para o paciente (MALEKI et al., 2017).

### **5.7.2 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de espilantol.**

Após ter demonstrado ser um bom candidato para administração por via oral, foram analisadas as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do espilantol. A farmacocinética estuda os processos de absorção, distribuição, metabolismo e a excreção de fármacos (HELDT; LOSS, 2013). Já a farmacodinâmica, está relacionada com o mecanismo de ação e por isso, estuda os efeitos das interações moleculares que regulam o reconhecimento de um fármaco pelo receptor (GOLAN, 2009), sendo possível através dela, entender as variações dos efeitos terapêuticos e das respostas farmacológicas (BOBROFF et al., 2009; BOULLATA; HUDSON, 2012).

A absorção é definida como a passagem de um fármaco de seu local de administração para o plasma e é determinada pela ionização e a lipossolubilidade de uma molécula. Os principais fatores que afetam a absorção de um composto são a motilidade gastrointestinal, fluxo sanguíneo esplênico, tamanho da partícula e os fatores físico-químicos (HANG et al., 2011).

Sabe-se que, a primeira barreira que uma substância bioativa deve ultrapassar para alcançar a circulação e apresentar uma boa biodisponibilidade é a barreira intestinal humana (PASSAMANI, 2009). Porém para que isto ocorra, a substância deve apresentar alta solubilidade e lipofilicidade, pois substâncias lipofílicas conseguem atravessar as membranas biológicas e

alcançar seu sítio de ação. Ao contrário de substâncias ionizadas (carregadas), que possuem baixa lipofilicidade e por isso possuem dificuldade em atravessar as membranas e serem absorvidas (WATERBEEMD, 2003; HOU et al., 2007).

Os resultados encontrados (**Tabela 5**) revelaram uma alta absorção intestinal humana de espilantol, o que caracteriza um processo importante para que os fármacos possam alcançar a corrente sanguínea e chegar aos seus alvos teciduais de ação (TRIFUNOVI et al., 2016).

Observa-se também uma boa permeabilidade cutânea e permeabilidade em células Caco-2 (células do carcinoma do cólon intestinal humano, utilizada como modelo *in vitro* para mimetizar a absorção intestinal de fármacos) (**Tabela 5**). Porém, é importante ressaltar que, alguns resultados de permeabilidade em células Caco-2, não condizem com a absorção intestinal humana *in vivo*, pois, apesar de apresentarem correlações com os enterócitos do intestino como algumas enzimas metabólicas e alguns sistemas de transporte, essas células apresentam limitações, como por exemplo, a expressão dos transportadores nem sempre mimetizam o modelo *in vivo* e elas apresentam menor porosidade paracelular em comparação ao intestino delgado (FREDLUND, WINIWARTER, e HILGENDORF, 2017).

Já a distribuição de um composto é a passagem que ocorre da corrente sanguínea para o líquido intersticial e intracelular e esta pode ser afetada tanto por propriedades físico-químicas das substâncias quanto por fatores fisiológicos. Isso ocorre porque substâncias pouco lipossolúveis têm dificuldade em atravessar a membrana biológica, sendo assim, menos distribuídas. O contrário, também ocorre com substâncias muito lipossolúveis, que podem até acumular em tecidos adiposos, prolongando a permanência do fármaco no organismo, além disso, a ligação com as proteínas também pode alterar a distribuição e limitar o acesso a locais de ação intracelular (GOODMAN E GILMAN, 2005).

Quanto à distribuição do espilantol, os resultados revelaram que este, apresenta um baixo volume de distribuição em humanos e consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e penetrar o sistema nervoso central (SNC), porém, não apresenta nenhuma afinidade por glicoproteínas P.

A BHE é uma importante barreira física que possui camadas de células que apresentam junções estreitas que reduzem a passagem de íons e outros

pequenos solutos hidrofílicos através de suas fendas. Dessa forma, ela consegue impedir a passagem de células e de algumas substâncias do sangue para o cérebro, protegendo-o contra agentes infecciosos e compostos tóxicos (ABBOTT, 2013).

Em geral, para que um fármaco consiga atravessar a BHE e alcançar o SNC, ele deve apresentar algumas características como lipofilicidade ( $\text{Log } P \leq 5$ ), menor polaridade, menos flexibilidade, menor volume e peso molecular ( $\leq 400$  Da), baixa capacidade de ligação à hidrogênio (com número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio  $\leq 7$  e número de grupos doadores de ligação hidrogênio  $\leq 3$ ); e número de ligações rotáveis menor que 10. (ABREU, 2008; GABATHULER, 2010; PAJOUESH E LENZ, 2005). No estudo realizado com o espilantol, observa-se que ele foi classificado como permeável na BHE pelas características moleculares que ele possui.

Após as etapas de absorção e distribuição, os compostos são metabolizados pelo fígado (por meio das enzimas do citocromo P450) onde são biotransformados para que possam, posteriormente, serem excretados. O intestino delgado também pode participar desse processo de metabolização que é dividido em duas principais fases: a fase I e a fase II (KLOTZ, 2009). Na fase I um fármaco sofre modificações que resultam em compostos mais hidrofílicos. Na fase II, ocorrem algumas reações onde os compostos formados na fase I são conjugados com substâncias mais polares, facilitando desta maneira sua excreção (DE WILDT, TIBBOEL, e LEEDER, 2014). Os resultados demonstraram que o espilantol não é substrato para as enzimas CYP450 2D6, CYP450 3A4, e não apresenta inibição das enzimas CYP450 1A2, CYP450 2C19, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 3A4 (**Tabela 5**).

As isoformas das enzimas CYP450 com maior número de substratos são: CYP450 1A2; 2C9; 2D6; 2C19 3A4 (DANTON et al., 2013; HABENSCHUS, 2016). É importante ressaltar que, a inibição ou a indução de algumas destas enzimas poderia levar à interação medicamentosa. Na inibição enzimática, o fármaco administrado não é metabolizado ou pouco metabolizado, o que leva a seu acúmulo no organismo gerando toxicidade. Já na indução enzimática, ocorre um aumento da expressão das enzimas do CYP450, de forma que o fármaco é altamente metabolizado, gerando então diminuição da sua concentração plasmática e conseqüentemente redução no

seu efeito farmacológico (PARAMASHIVAM et al., 2015). Entretanto, o espilantol foi classificado como não inibidor das enzimas CYP450, e como não substrato da CYP450 3A4 (enzima responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos disponíveis).

**Tabela 5-** Parâmetros farmacocinéticos de espilantol analisados pela plataforma *pkCSM*.

Parâmetros	Espilantol	Valores de referência
<b>Absorção</b>		
Permeabilidade em células Caco-2	1,241	>0,90 (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s) indica alta permeabilidade em células Caco-2
Absorção intestinal em humanos	93,70%	<30% Indica que é pouco absorvido
Substrato para glicoproteína P (transportador ATP-binding cassette)	Não	Sim ou não (variável categórica)
Inibidor de glicoproteína P I e II	Não	Sim ou não (variável categórica)
Permeabilidade cutânea	-2,064	logKp > -2,5 indica baixa permeabilidade cutânea
<b>Distribuição</b>		
Volume de distribuição em humanos (VDss)	0,02	Baixa distribuição log VDss < -0.15 e alta distribuição log VDss > 0.45
Permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE)	0,62	logBB > 0.3 indica que a substância atravessa a barreira hematoencefálica enquanto que logBB < -1 indica que ela é pobremente distribuída no cérebro
Permeabilidade no sistema nervoso central (SNC)	-1,298	logPS > -2 indicam penetração no sistema nervoso central enquanto que logPS < -3 indica que a droga é incapaz de penetrar no sistema nervoso central

<b>Metabolismo</b>		
CYP 450 1A2 inibidor	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 2C19 inibidor	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 2C9 inibidor	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 2D6 inibidor	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 3A4 inibidor	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 2D6 substrato	Não	Sim ou não (variável categórica)
CYP 450 3A4 substrato	Não	Sim ou não (variável categórica)
<b>Excreção</b>		
Substrato para transportador renal de cátions orgânicos II (TCO II)	Sim	Sim ou não (variável categórica)
<b>Toxicidade</b>		
Toxicidade AMES (potencial mutagênico)	Não	Sim ou não (variável categórica)
Toxicidade em <i>T. pyriformis</i>	2,017	> -0.5 log ug/L é considerado tóxico
Dose máxima tolerada em humanos	0,198	$\leq 0.477 \log(\text{mg/kg/dia})$ é considerada baixa e $\geq 0.477 \log(\text{mg/kg/dia})$ é considerada alta
Hepatotoxicidade	Não	Sim ou não (variável categórica)

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os transportadores renais de cátions orgânicos (TCO) são importantes no sistema de eliminação de fármacos e seus metabólitos, evitando desta maneira, a permanência de um medicamento por tempo indeterminado no organismo. Portanto, a inibição destes transportadores pode resultar no acúmulo de fármaco levando à nefrotoxicidade e lesão renal (YIN, DUAN e WANG, 2016).

Esse sistema de transporte envolve uma proteína transmembrana que liga uma ou mais moléculas ou íons, muda a conformação e os libera do outro lado da membrana. Podendo operar de forma passiva, sem qualquer fonte de energia, por difusão facilitada onde o transportador é do tipo “uniporter”, (HANG, 2011).

O TCO II é um transportador localizado nas células do túbulo proximal do rim, responsável por concentrar diversos fármacos nessas células, como por exemplo, a cisplastina, o que pode ser uma explicação para a sua

nefrotoxicidade seletiva. Alguns fármacos relacionados, como a carboplatina e a oxiliplatina, não são transportados pelo TCO II e são menos nefrotóxicos (HANG, 2011).

No entanto, o espilantol não foi classificado como inibidor deste sistema de transporte e sim como substrato para este transportador, o que significa que este consegue ser eliminado do organismo e não gera nefrotoxicidade. No que diz respeito à toxicidade de espilantol, este não apresentou toxicidade pelo teste de AMES (teste *in vitro* de *screening* utilizado para identificar substâncias capazes de induzir mutações gênicas) e por isso não apresenta potencial carcinogênico (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Além disso, o espilantol não apresentou toxicidade no teste *in silico* para *T. pyriformis* (protista ciliado frequentemente utilizado em estudos ecotoxicológicos) e nem hepatotoxicidade e sua dose máxima tolerada em humanos é considerada baixa, sendo assim um possível composto com alto índice terapêutico.

Devido as suas características biológicas únicas, o uso dessa espécie de protista pode ajudar a reduzir o número de animais utilizados em testes de toxicidade, pois eles podem ser usados como bioindicadores sensíveis e fáceis de manipular a níveis bioquímicos e populacionais, simulando uma cadeia alimentar microbiana para avaliar os efeitos diretos e indiretos dos efeitos tóxicos de compostos a um nível de comunidade. Além do seu uso em meio aquático, essa espécie apresenta diversas vantagens como bioindicadores para o estudo toxicológico de compostos químicos e orgânicos devido à facilidade de cultivo, o ciclo de vida curto, a falta de estágios complexos de desenvolvimento e o fato de membrana externa dos protozoários estarem em contato direto com o meio externo tornam esse grupo susceptível aos ensaios (GIOVANINI JUNIOR; CARVALHO, 2017).

Uma vez analisada a farmacocinética, torna-se necessário investigar os aspectos farmacodinâmicos. Estas características foram pesquisadas a princípio pela plataforma *Swiss Target Prediction* de forma a encontrar a principal classe de alvos farmacodinâmicos e depois pela plataforma *Way2Drug* para pesquisar os principais alvos moleculares que possam estar envolvidos com as atividades farmacológicas do espilantol. Foram pesquisados os possíveis alvos moleculares para fungos, e os resultados revelaram uma maior

capacidade do espilantol em agir como inibidor da acil CoA sintase, da ATPase transportadora de xenobióticos, de ribonuclease de levedura, da quinase do receptor acoplado à proteína G, de bomba, da síntese de DNA, da síntese de esteróides, da peptidoglicano glicosiltransferase, inibidor esteróide da N-acetilglicosaminatransferase, de moléculas de adesão celular, inibidor da síntese de ácidos graxos, da síntese de quitina e da síntese da parede celular (**Tabela 6**). Além disso, o espilantol age como potencializador da permeabilidade de membrana, regulador do metabolismo lipídico, antifúngico e substrato da glicoproteína P. Segundo a plataforma *Swiss Target Prediction* ([www.swisstargetprediction.ch](http://www.swisstargetprediction.ch)) as principais classes de alvos farmacodinâmicos encontrados são de receptores acoplados à proteína G família A (33,3%), proteases (26,7%), canais iônicos sensíveis à voltagem (20%) e receptores nucleares (20%).

**Tabela 6-** Principais possíveis alvos farmacodinâmicos de espilantol utilizando a plataforma *Way2Drug*.

Potencial de ativação	Potencial de inibição	Alvo relacionado
0,73	0,009	Inibidor da acil CoA sintase
0,599	0,006	Inibidor da ATPase transportadora de xenobióticos
0,492	0,018	Potencializador da permeabilidade de membrana
0,512	0,042	Regulador do metabolismo lipídico
0,484	0,015	Inibidor de ribonuclease de levedura
0,504	0,048	Inibidor da quinase do receptor acoplado à proteína G
0,505	0,058	Inibidor geral de bomba
0,476	0,035	Antifúngico
0,413	0,037	Substrato da glicoproteína-P
0,397	0,004	Inibidor da ATPase
0,325	0,026	Inibidor da síntese de proteínas
0,296	0,055	Inibidor da síntese de DNA
0,199	0,168	Inibidor da síntese de esteróides
0,320	0,096	Inibidor da peptidoglicano glicosiltransferase
0,307	0,083	Inibidor de moléculas de adesão celular
0,209	0,129	Inibidor esteroide da N-acetilglicosaminatransferase
0,088	0,025	Inibidor da síntese de ácidos graxos
0,206	0,028	Inibidor da síntese de quitina
0,125	0,028	Inibidor da síntese da parede celular

## 6 CONCLUSÃO

O espilantol possui uma promissora atividade antifúngica demonstrando ter ação fungistática sobre uma linhagem de *Candida albicans* resistente a múltiplas drogas.

Este é o primeiro relato de estudos propondo a ação de espilantol no envoltório celular em uma linhagem de *C. albicans* altamente resistente aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Além disso, vale ressaltar que nesse trabalho foi utilizado o kit *LIVE/DEAD Yeast Viability* para determinar o efeito de espilantol na viabilidade e densidade celular para essa espécie. Técnica essa, muito pouco utilizada na área farmacêutica, e que neste estudo, demonstrou ser uma ferramenta importante na elucidação do local de ação da droga.

Diante de todos os ensaios realizados em células planctônicas de *C. albicans*, os resultados sugerem que este composto esteja agindo em nível de envoltório celular dessa levedura. Outro importante achado nesse trabalho, foi o sinergismo *in vitro* entre espilantol e os azólicos fluconazol e itraconazol, destacando a redução de 1600 vezes da CIM para o itraconazol quando este foi associado ao espilantol.

Com base nos resultados obtidos *in silico*, é possível afirmar que o espilantol apresentou resultados satisfatórios, com características que permitem sua classificação como um bom candidato a fármaco para ser administrado por via oral e tópica pois, os estudos das suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas demonstraram sua capacidade de permear por membranas biológicas e além disso, ele não apresentou toxicidade em linhagens de fibroblastos e queratinócitos.

Diante do exposto, espilantol possui um grande potencial científico e terapêutico, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por fungos do gênero *Candida*.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 36, n. 3, 437–449. 2013.

ABÍLIO, V.M.F.; MESQUITA, B.S.; SILVA, E.D.; CARVALHO, F.V.Q.; MACÊDO, L.L.A.; CASTRO, R.D. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento da candidíase oral. *Revista Cubana de Estomatologia*, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.

ABREU, Paula Alvarez - **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas**, 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

AHMAD, S.J.; LIAN, H.H.; BASRI, D.F.; ZIN, N.M. Mode of action of endophytic *Streptomyces* sp., SUK 25 extracts against MRSA; microscopic, biochemical and timekill analysis. *International Journal Pharmacology Science Review Research*, v.30, n., p.11–17, 2014.

ALCANTARA, B. N. et al. Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 4, p. 91-96, 2015.

ALONSO, Isabella Gonçalves. **Nova abordagem para a síntese total do espilantol e avaliação da atividade antinociceptiva**. 2016. 163 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

ALTHAUS, V.A.; REGGINATO, A.; BOSSETTI, V.; SCHMIDT, J.C. Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifúngicos de uso hospitalar. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 1, p. 7-17, 2015.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Revista Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANDRADE, Fernanda Almeida. **Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de *Candida***.2017. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ANDRÉO, Bruna Galdorfini Chiari. **Modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados à avaliação de toxicidade e eficácia de fitocosmético**. 2014. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara- SP, 2014.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.

ANEJA, B.; IRFAN, M.; KAPIL, C.; JAIRAJPURI, M.A.; MAGUIRE, R.; KAVANAGH, K.; RIZVI, M.M.; MANZOOR, N.; AZAM, A.; ABID, M. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: in vitro and in vivo studies. **Org Biomol Chem**. v. 14, n.45, p. 10599-10619, 2016.

ARAÚJO NETO. M.P. **Leveduras isoladas de *Macrobrachium amazonicum* e de ecossistemas aquáticos: detecção de resistência a derivados azólicos e o potencial uso desse camarão para o monitoramento ambiental.2014.111f.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

ARAÚJO, I.F.; ARAÚJO, P.H.F.; FERREIRA, R.M.A.; SENA, I.D.S.; LIMA, A.L.; CARVALHO, J.C.T.; FERREIRA, I.M.; SOUTO, R.N.P. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* L.R.K. Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany**. v. 177, p. 134-140, 2018.

ATCC. The Global Bioresource Center. <https://www.atcc.org/support/faqs/9c329/ATCC%2010231%20-%20drug%20resistant.aspx> (Acesso em 27 Julho. 2018).  
BABII, C.; BAHRIN, L.G.; NEAGU, A.N.; GOSTIN, I.; MIHASAN, M.; BIRSA, L.M.; STEFAN, M. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. **J. Appl. Microbiol.** 120, 630–663.2016.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, A. F. et al. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 321-325, 2016.

BARBOSA, A.F.; DE CARVALHO, M.G.; SMITH, R.E.; SABAA-SRUR, A.U.O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 26, n. 2016, p.128-133, 2016.

BARBOSA, M.B.; FARIA, M.G.I. Produtos naturais como nova alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase bucal. **Revista Uningá**, Maringá, v. 20, n. 1, p.103-107, 26 ago. 2014.

BITAR, D.; LORTHOLARY, O.; LE STRAT, Y.; NICOLAU, J.; COIGNARD, B.; TATTEVIN, P.; CHE, D.; DROMER, F. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001- 2010. **Emerg Infect Dis**. v.20, n. 7, p. 1149-1155, 2014.

BOBROFF, L.B.; LENTZ, A.; TURNER R. E. Food/drug and drug/nutrient interactions: What You Should Know About Your Medications [Internet]. University of Florida IFAS extension. 2009 [citado 2012 abr 10]. Disponível em: Acesso em : 01 julh. 2019

BOULLATA, J. I.; HUDSON, L.M. Drug-nutrient interactions: a broad view with implications for practice. *J Acad Nutr Diet*.v.12, n.4, p.506-17,2012.

BOSTROM, J.; HOGNER, A.; LLIN, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A.T. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* 55(5): 1817-30, 2012.

BOULOS, L.; PRÉVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J.; DESJARDINS, R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, v. 37, n.1, p. 77–86, 1999.

BUTLER G. Fungal sex and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, V.23, n.1, p.140, 2010.

CAMPOS, L. M.; MELO, L.; LEMOS, A.S.O.; GUEDES, M.C. M.R.; SILVA, T.P.; FIGUEIREDO, G.F.; REIS JUNIOR, J.L.; ROCHA, V.N.; MELO, R.C.N.; ARAÚJO, M.G.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Industrial Crops & Products*, v.123, p. 731-739, 2018.

CAMPOS, Lara Melo. **Potencial antimicrobiano in vitro de *Mitracarpus frigidus* frente à espécies de *Salmonella* spp.**: Estudo em células planctônicas e biofilme. 2017. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

CANNON, R. D., et al. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *J. Dent. Res.*, Washington, v. 74, n. 5, p. 1152-1160, 1995.

CASTRO, I.M.N.; VASCONCELOS JÚNIOR, A.A.; CUNHA, F.A.; CUNHA, M.C.S.O.; MENEZES, E.A. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p.216-222, 29 jan. 2016.

CHENG, Y.B.; LIU, R.H.; HO, M.C.; WU, T.Y.; CHEN, C.Y.; LO, I.W.; HOU, M.F.; YUAN, S.S.; WU, Y.C.; CHANG, F.R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. *Molecules*. v. 20, n. 4, p. 6970-6977, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI Document M27**, 4th ed.2017.

CORTEGIANI, Andrea; MISSERI, Giovanni; CHOWDHARY, Anuradha. What's new on emerging resistant *Candida* species. *Intensive Care Medicine*, Palermo- Itália, n. 45, p.512-515, 2019.

CRUZ, P. B. et al. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137-143, 2016.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169-176, 2010.

DANTON, A. C.; MONTASTRUC, F.; SOMMET, A.; DURRIEU, G.; BAGHERI, H.; BONDON-GUITTON, E.; ... MONTASTRUC, J. L. Importance of cytochrome P450 (CYP450) in adverse drug reactions due to drug-drug interactions: A Pharmacovigilance study in France. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 885–888. 2013

DEMARNE, F.; PASSARO, G. **Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition.** US Patent No. 7,531,193 B2, 2009.

DE WILDT, S. N.; TIBBOEL, D.; LEEDER, J. S. Drug metabolism for the paediatrician. **Archives of Disease in Childhood**, v. 99, n. 12, 1137–1142. 2014.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S.A.; SAHA, S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2013, p. 1-9, 2013.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720–1725, 2008.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S.L.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, M.M.; CASSANI, J.; TRUJILLO-VALDIVIA, A.; OROZCO-CASTELLANOS, L.M et al. *Heliopsis longipes*: anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 27, n. 2, p. 214- 219, 2017.

FREDLUND, L.; WINIWARTER, S.; HILGENDORF, C. *In Vitro* Intrinsic Permeability: A Transporter-Independent Measure of Caco-2 Cell Permeability in Drug Design and Development. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, 1601–1609. 2017

FREESE, H.M.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R. Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic River Warnow northeast Germany. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 117–127, 2006.

FREITAS, Renata Mendes. **Investigação do Potencial Químico e Farmacológico de *Xylopiá sericea* A. St.-Hil. (ANNONIACEAE).** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

FREITAS-BLANCO, V.S.; FRANZ-MONTAN, M.; GROppo, F.C.; DE CARVALHO, J.E.; FIGUEIRA, G.M.; SERPE, L.; SOUSA, I.M.O.; DAMASIO, V.A.G.; YAMANE, L.T.; DE PAULA, E.; RODRIGUES, R.A.F. Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. **PLoS One**. v. 11, n. 9, p.1-18, 2016.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, v.48, n.4, p. 306-310, 1995.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, 48-57. 2010

GERTSCH, J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. **Planta Med.**, v. 74, p. 638-650, 2008.

GIOVANINI JUNIOR, Nelson; CARVALHO, Mariana Barbosa de. A utilização de protozoários como organismos bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos e suas respostas à exposição a fármacos e outros compostos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**. São Paulo, p. 24-37.2017.

GOLAN, David E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOODMAN e GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. [tradução da 10.ed. original, Carla de Melo Vorsatz. et al] Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GRANATO, Juliana da Trindade. **Efeito antileishmanial de derivados esteroidais em *Leishmania sp.*** 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Imunologia e Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

HABENSCHUS, M. D. Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural grandisina utilizando microsomas hepáticos de humanos. 2016. 45 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

HAJDU, A. **An Ethnopharmacological survey conducted in the Bolivian Amazon, and identification of *N*-alkylamides and lignans from *Lepidium meyenii* and *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* with effects on the central nervous system.** 2014. 67f. Thesis, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacognosy, University of Szeged.

HALDER, S.; YADAV, K.K.; SARKAR, R.; MUKHERJEE, S.; SAHA, P.; HALDAR, S.; KARMAKAR, S.; SEN, T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v.4, n.672, p.1–14, 2015.

HANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p. Tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al.

HAW, A. B.; KENG, C. L. Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bioinsecticide plant, through proliferation of multiple shoots. **J. Appl. Hort.**, v. 5, p. 65-68, 2003.

HELDT, T.; LOSS, S. H. Interação fármaco-nutriente em unidade de terapia intensiva: uma revisão da literatura e recomendações atuais. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 25, n.2 p. 163- 167, 2013.

HOFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**. v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

HOU, T.; WANG, J.; ZHANG, W.; XU, X, - **ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification**. *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 208-218, 2007.

HOUDAIL. H et al. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. **Microbial Pathogenesis**, Cairo- Egito, n. 128, p.13-19, 2019.

IRFAN, M.; ALAM, S.; MANZOOR; ABID, M. Effect of quinoline based 1,2,3-triazole and its structural analogues on growth and virulence attributes of *Candida albicans*. **Plos One**, v.12, n.4, 2017.

ISO- International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medicinal devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3° ed, ISO, 2009.

JANG, K.H.; CHANG, Y.H.; KIM, D.D.; OH K.B.; OH, U.; SHIN, J, et-al. New polyunsaturated fatty acid amides isolated from the seeds of *Zanthoxylum piperitum*. **Arch Pharm Res**. v. 31, n. 5, p. 569-572, 2008.

JESUS, Roberta Stefanello de. **Avaliação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada**. 2013. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

JOHNSON, M.D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, J.R; Perfect and J.H. Rex. Combination Antifungal Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.

KATHIRAVAN, M.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KEPSER, M.E.; ERNST, E.J.; LEWIS, R.E. et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. ***Antimicrobial Agents And Chemotherapy***, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. ***Drug Metabolism Reviews***, v. 41, n. 2, 67–76. 2009

KURIYAMA et al. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. ***Oral Microbiology Immunology***, United Kingdom, n. 20, p.349-353, 02 maio 2005.

LINDBERG, Erika et al. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. ***Scientific Reports***. Suécia, p. 1-6. 07 mar. 2019.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 46, p. 3- 26. 1996.

LIPINSKI, C.A. - **Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution**. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, 337-341, 2004.

MALEKI, Aziz et al. Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs. ***Journal Of Controlled Release***. USA, p. 329-347. 28 set. 2017.

MARZZOCO, A.E.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 736, 2007.

MEJÍA, C.A.R.; OSORIO, J.C.C.; BARRERA, M.G.; REZEK, J.; VENEK, T. Actividad antimicrobiana y análisis de la composición química de una fracción de las flores de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. ***Revista Cubana de Plantas Medicinales***. v. 20, n. 4, p. 409-418, 2015.

MELO, Lívia de. **Avaliação da atividade anti-candida in vitro de *Mitracarpus frigidus***: estudo em células planctônicas. 2017. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

MENEZES, E.A.; CUNHA, M.C.S.O.; FERREIRA, E.B.; CAPELO, L.G.; BRAZ, B.H.L.; CUNHA, F.A. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* à antifúngicos sistêmicos. ***Revista de Patologia Tropical***, v. 42, n. 1, p.49-55, 27 mar. 2013.

MICOBANK Database. 2019. Disponível em:  
<<http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

MOLINSPIRATION Cheminformatics. 2019. Desenvolvido pela Universidade de Bratislava. Disponível em: <<https://www.molinspiration.com/>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

MOREIRA, Tatiana Maria de Souza. **Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)**. 2010. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MORTELMANS, K; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. ***Mutation Research***. 455 (1–2): 29- 60, 2000.

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

NAMI, Sanam et al. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***. Irã, p. 857-868, 2019.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

ODDS, F. C. Synergy, antagonismo, and what the checkerboard puts between them. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, v. 18, n. 1. p. 1, 2003.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. ***TRENDS in Microbiology***. v.11, n. 6, 2003.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 18, n.2, p. 301-307, 2008.

PAIS, Pedro et al. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. ***Microbial Cell***, Lisboa, Portugal, v. 6, n. 3, p.142-159, mar. 2019.

PAJOUHESH, H; LENZ, G.R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. ***NeuroRx***. 2(4): 541-553. 2005

PARAMASHIVAM, S. K.; ELAYAPERUMAL, K.; NATARAJAN, B. B.; RAMAMOORTHY, M. D.; BALASUBRAMANIAN, S.; DHIRAVIAM, K. N. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. ***Bioinformation***, v. 11, n. 2, p.73–84. 2015.

PARENTE-ROCHA, J.A.; BAILÃO, A.M.; AMARAL, A.C.; TABORDA, C.P.; PACCEZ, J.D.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, p-1-16, 2017.

PASSAMANI, Fabiana. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Fisicoquímico e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antiviral**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Medicamentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

PEIXOTO, J.V.; ROCHA, M.G.; NASCIMENTO, R.T.L.; MOREIRA, V.V.; KASHIWABARA, T.G.B. Candidíase - Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, jun.- ago. 2014.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, n.1, p.3-13, 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive mycoses in north America. **Crit Rev Microbiol**. V. 36, n. 1, p. 1- 53, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; SHEEHAN, D.J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, n. 2, p. 435–447, 2006.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOUOS, G.M. “Antimicrobial combinations” in *Antibiotics in laboratory medicine* ed. Lorian V., EDITOR. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, New York, p. 365-440, 2005.

PINHEIRO, M. T. et al. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 12, p. 562-569, 2015.

PINJON, E.; MORAN, G.P.; JACKSON, C.J.; KELLY, S.L.; SANGLARD, D.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, n. 8, p. 2424–2437, 2003.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Clin Microbiol**. 58(Pt 11): 1454-1462, 2009.

PINTO, N.C.C.; CAMPOS, L.M.; EVANGELISTA, A.C.S.; LEMOS, A.S.; SILVA, T.P.; MELO, R.C.N.; LOURENÇO, C.C.; SALVADOR, M.J.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Antimicrobial Annona muricata L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops & Products**, v.107, p. 332–340, 2017.

PKCSM - Pharmacokinetics. 2019. Disponível em: <<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

POROIKOV, Vladimir; DRUZHILOVSKY, Dmitry; VASILENKO, Vladimir. **Way2Drug**: Understanding Chemical- Biological Interactions. 2019. Disponível em: <<http://pharmaexpert.ru/Passonline/index.php>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

PRACHAYASITTUKAL, V., PRACHAYASITTUKAL, S., RUCHIWARAT, S., PRACHAYASITTUKAL, V. High therapeutic potential of Spilanthes acmella: a review. **EXCLI J.** n. 12, p. 291–312, 2013.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, n.202, p. 1-13, 2014.

PURISCO, S.U. **Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de Candida pouco frequentes como agentes de candidemia. 2010, 66f.** Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Concentração de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) - Programa de Pós graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo.

ROILIDES, E.; IOSIFIDIS, E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem?. **Clinical Microbiology And Infection**, Thessaloniki, Grécia, n. 25, p.790-791, 27 fev. 2019.

RUIZ, L.S.; PEREIRA, V.B.R. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. **Boletim do Instituto Adolfo Cruz**, v.26, n. 2, 2016.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.S.; NAVES, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SANTOS, Álvaro et al. Lipophilicity assesment in drug discovery: Experimental and theoretical methods applied to xanthone derivatives. **Journal Of Chromatography B**. p. 182-192. 01 jan. 2018.

SANTOS, J. **Nucleotídeo**. Trabalho apresentado ao curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SHARMA, Jehoshua et al. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **Journal Of Fungi**. Canadá, p. 2-28. 21 fev. 2019.

- SILVA, H.M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea.** Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- SILVA, S. M. F. Q.; PINHEIRO, S. M. B.; QUEIROZ, M. V. F.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CASTRO, J. G D.; PERIM, M. C.; CARREIRO, S. C. Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, jun. 2012.
- SILVA, T.P.; NOYMA, N.P.; DUQUE, T.L.A.; GAMALIER, J.P.; VIDAL, L.O.; LOBÃO, L.M.; CHIARINI, H.G.; ROLAND, F.; MELO, R.C.N. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105, n. 1, p.1-14, 2014.
- SILVA, Pollyanna Michelle da et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal Of Biological Macromolecules**. USA, p. 391-400. 2018.
- SILVEIRA, N.; SANDJO, L.P.; BIAVATTI, M.W.; Spilanthol-containing products: A patent review (1996–2016). **Trends in Food Science & Technology**. v. 74, p.107-111, 2018.
- SILVEIRA, Narjara. **Investigação fitoquímica e farmacológica das alcamidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini (Asteraceae).** 2017. 208 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- SIMÕES, M.; BENNETT, R.; ROSA, E. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 26, p. 746–757, 2009.
- SOARES, Fabyana A. et al. Molecular design, synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydro-4-oxoquinoline ribonucleosides as TcGAPDH inhibitors with trypanocidal activity. **Bioorganic And Medicinal Chemistry Letters**. USA, p. 4597-4601. 15 ago. 2013.
- SOUZA, Tenille Ribeiro de. **Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus*.** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- SPENCER, A. L. R.; SPENCER, J. F. T. Public health microbiology: methods and protocols, 1st ed., **Humana Press Inc.**, New Jersey, p. 568, 2004.
- STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L.A.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TRIFUNOVI, J.; BOR, V.; GOLO, S.; MIKOV, M. Retention data of bile acids and their oxo derivatives in characterization of pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p.194–202. 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 827, 2012.

SWISSADME. 2019. Desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <<http://www.swissadme.ch/>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

SWISS Target Prediction. 2019. Desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <<http://www.swisstargetprediction.ch/help.php>>. Acesso em: 01 jul. 2019.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E.; **ADMET in silico modeling: towards prediction paradise?**, *Nature Rev. Drug Discov.*,2(3): 192-204. 2003

VASCONCELOS, Laís César de. **Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* frente à ação antifúngica do timol**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

VELAZCO, G.; ORTIZ, R.; ARELLANO, L.; BUSTILLOS, L.; GONZÁLEZ, A. Evidencia microscópica de la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal. **Revista Cubana de Estomatología**. v. 46, n. 2, p. 1-8, 2009.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T. TATKE, P.; DESPIEGELEER, B. *N*-alkylamides: from plant to brain. **Func. Foods Health Dis.**, v. 4, p. 264-275, 2014.

YAMANE, L.T.; PAULA, E.; JORGE, M.P.; FREITAS-BLANCO, V.S.; JUNIOR, I.M.; FIGUEIRA, G.M. et al. Acmella oleracea and Achyrocline satureioides as Sources of Natural Products in Topical Wound Care. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2016.

YIN, J., DUAN, H.; WANG, J. Impact of Substrate-Dependent Inhibition on Renal Organic Cation Transporters hOCT2 and hMATE1 / 2-K-Mediated Drug Transport and Intracellular Accumulation s. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.359, p. 401-410. 2016.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, out./dez. 2009.

ZUPANCIC Ozbej; BERNKOP-SCHNÜRCH, Andreas. Lipophilic peptide character: What oral barriers fear the most. **Journal Of Controlled Release**. USA, p. 242-257. 10 jun. 2017.