

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

Guilherme Fernando da Silva

**Avaliação da atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de
Xylosma prockia frente a *Candida parapsilosis***

Governador Valadares – Minas Gerais

2022

Guilherme Fernando da Silva

**Avaliação da atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de
Xylosma prockia frente a *Candida parapsilosis***

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Governador Valadares, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Gabriella Freitas Ferreira

Governador Valadares – Minas Gerais

2022

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

da Silva, Guilherme Fernando.

Avaliação da atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de *Xylosma prockia* frente a *Candida parapsilosis* / Guilherme Fernando da Silva. -- 2022.

31 p.

Orientadora: Gabriella Freitas Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2022.

1. *Candida parapsilosis*. 2. *Xylosma prockia*. 3. atividade antifúngica. 4. candidemia. I. Freitas Ferreira, Gabriella, orient. II. Título.

Guilherme Fernando da Silva

**Avaliação da atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de
Xylosma prockia frente a *Candida parapsilosis***

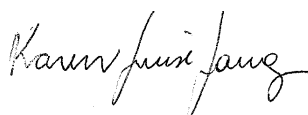
Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Universidade Federal de Juiz
de Fora – Campus Governador Valadares,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Farmacêutico.

Aprovada em 16 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Karen Luise Lang
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Michel Rodrigues Moreira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
Introdução.....	7
Materiais e Métodos	10
Desenho Experimental e Linhagem Utilizada.....	10
Obtenção do Extrato e das Frações Vegetais	10
Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	11
Determinação da Curva de Morte	12
Quantificação de Ergosterol	12
Ensaio de Peroxidação Lipídica	13
Quantificação da Produção de ERO e ERN	14
Análise Estatística.....	14
Resultados e Discussão	15
Teste de Concentração Inibitória Mínima	15
Ensaio de Curva de Morte	16
Ensaio de Quantificação de Ergosterol	18
Ensaio de Peroxidação Lipídica	19
Ensaio de Quantificação da Produção de ERO e ERN	21
Conclusão	23
Referências Bibliográficas	24
Anexos	25

Este artigo foi elaborado segundo as normas do jornal "Revista Fitos®" apresentadas em anexo.

**Avaliação da atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de
Xylosma prockia frente a *Candida parapsilosis***

Evaluation of the antifungal activity of ethyl acetate fraction from *Xylosma prockia* leaves against *Candida parapsilosis*

da Silva, Guilherme Fernando¹; Lang, Karen Luise²; Folly, Mariany Lopes da Costa²; Rosa, Queila da Silva³; de Freitas, Gustavo José Cota³; Santos, Daniel Assis³; Ferreira, Gabriella Freitas^{1*}

Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia¹; Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Laboratório de Química, Física e Fluidos²; Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Laboratório de Pesquisa em Micologia³.

Correspondência: gabriella.freitas@ufjf.br

Resumo

Candida parapsilosis está entre os agentes etiológicos mais comuns da candidemia, com um percentual de 19% dos casos no Brasil. A terapia disponível para o tratamento da candidíase é limitada devido à alta toxicidade e a elevada resistência fúngica aos fármacos disponíveis clinicamente. *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. é uma planta nativa do Brasil com poucas informações sobre seu potencial farmacológico. Nesse trabalho, os efeitos antifúngicos *in vitro* da fração acetato de etila das folhas de *X. prockia* foram avaliados frente à *C. parapsilosis* (ATCC 22.019). O ensaio de curva de morte mostrou que a fração apresenta caráter fungicida e é tempo-dependente. Na quantificação de ergosterol sugere-se que a fração não interfere na síntese do esteroide. Já os ensaios de peroxidação lipídica e de quantificação de espécies reativas mostraram que a fração induz danos nitrosativos na membrana celular. Os resultados deste estudo fornecem evidências de que a fração acetato de etila das

folhas de *X. prockia* pode ser uma fonte de substâncias com potencial atividade antifúngica.

Palavras-Chave: *Candida parapsilosis*. *Xylosma prockia*. atividade antifúngica. candidemia

Abstract

Candida parapsilosis is among the most common etiological agents of candidemia, with a percentage of 19% of cases in Brazil. The therapy available for the treatment of candidiasis is limited due to high toxicity and high fungal resistance to clinically available drugs. *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. is a plant native to Brazil with little information about its pharmacological potential. In this work, the in vitro antifungal effects of the ethyl acetate fraction of *X. prockia* leaves were evaluated against *C. parapsilosis* (ATCC 22.019). The death curve test showed that the fraction has a fungicidal character and is time-dependent. In the quantification of ergosterol, it is observed that the fraction does not interfere with the synthesis of the steroid. The lipid peroxidation assays and quantification of reactive oxygen species and nitrosative species showed that the fraction causes cell membrane peroxidation and nitrosative damage by inducing reactive nitrogen species, respectively. The results of this study provide evidence that the ethyl acetate fraction of *X. prockia* leaves can indeed be a potential source of substances with antifungal potential.

Keywords: *Candida parapsilosis*. *Xylosma prockia*. antifungal activity. Candidemia

Introdução

A candidíase é uma infecção fúngica provocada pelo gênero *Candida*, que são leveduras que colonizam habitualmente a pele e a mucosa humana e acomete homens e mulheres, principalmente, em idade fértil^[16]. As infecções sistêmicas causadas por *Candida* são denominadas de candidemia e são consideradas mais graves e de difícil manejo terapêutico. De acordo com Bassetti et al.^[13] a candidemia

é a quarta doença associada à assistência à saúde mais frequente dentre as infecções disseminadas de origem fúngica que se desenvolve em pacientes gravemente enfermos em unidades de terapia intensiva (UTI). Em 2019, estimativas demonstraram a ocorrência de até 55% de casos de candidemia em pacientes sob cuidados intensivos no Brasil, sendo que destes há uma incidência cumulativa de 3,5 a 10 episódios por 1.000 admissões na UTI, com uma tendência crescente ao longo do tempo^[13]. Dentre os agentes etiológicos mais comuns da candidemia, *C. parapsilosis* está entre os principais agentes etiológicos, com um percentual de 19% dos casos, superada apenas por *C. albicans* e *C. glabrata*.^[13]

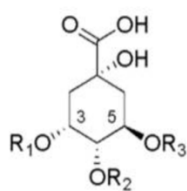
No estudo de prevalência pontual *Extended Prevalence of Infection in Intensive Care*, EPIC II, conduzido por Kett et al.^[14] em 1.265 UTIs e em 76 países, a mortalidade por candidemia (43%) foi maior do que as de infecções de corrente sanguínea causadas por bactérias Gram-positivas (25%) e bactérias Gram-negativas (29%). Ademais, o arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento das formas leves e graves da candidíase é estreito devido a dois fatores importantes: resistência fúngica e efeitos adversos^[12,15]. Rex e seus colaboradores^[15] em uma revisão sobre os mecanismos de resistência aos azólicos elencaram possibilidades para o aparecimento de resistência fúngica: um organismo colonizador ou infeccioso inicialmente suscetível sofre mutação e se torna resistente ou o indivíduo é infectado com uma espécie ou cepa inerentemente resistente. O uso de derivados azólicos indiscriminadamente para casos leves de candidíase parece estar relacionado ao aparecimento de cepas resistentes, devido ao tempo de tratamento incorreto, dose administrada menor que a necessária e a condição clínica do paciente.

Os poliênicos apresentam menos casos de resistência fúngica, em contrapartida o uso clínico de anfotericina B, o maior representante da classe, está intimamente ligado com processos tóxicos de extrema importância^[12]. A nefrotoxicidade é o principal evento adverso da terapia com anfotericina B. A perda de função renal é uma complicação relativamente comum, assim como outros eventos, como hipocalcemia e hipomagnesemia^[12]. O público mais susceptível aos efeitos tóxicos da terapia com anfotericina B corresponde a pacientes pertencentes ao grupo de risco compostos por pacientes oncológicos internados em unidades de cuidados intensivos, imunossuprimidos e recém-nascidos^[6]. Para Dal, Sanches e Chassot^[6], este público se concentra intimamente ligado ao ambiente hospitalar e, essa circunstância

relacionada ao fato de que *C. parapsilosis* é comumente encontrada com alta prevalência em hospitais, explica a evolução dos casos de candidemias.

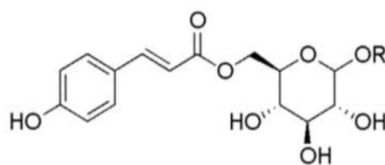
O difícil manejo farmacoterapêutico devido a fragilidade metabólica e imunológica dos pacientes pertencentes ao grupo de risco, o pequeno arsenal de fármacos e o alto número de casos de morbimortalidade hospitalar reforçam a necessidade de se encontrar novas moléculas com características promissoras para integrar o processo terapêutico na candidíase. Produtos Naturais (PN) constituem uma fonte promissora para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que as plantas são conhecidas por produzir substâncias destinadas à defesa frente a agressores externos. Adicionalmente, metabólitos secundários isolados de produtos naturais têm importância histórica na descoberta de fármacos para o tratamento de várias doenças, além de muitos terem sido utilizados como protótipos para o desenvolvimento de um grande número de fármacos atualmente em uso^[3,7]. *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. é uma espécie nativa do Brasil, com predominância geográfica principalmente nas regiões de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e apresenta efeitos antifúngicos, antibacterianos, propriedades antiespasmódicas, narcóticas e sedativas para alguns extratos e compostos isolados da planta^[3]. Poucos estudos são encontrados na literatura sobre a taxonomia, morfologia e principalmente sobre suas propriedades antimicrobianas. O principal estudo sobre a atividade antimicrobiana do extrato e das frações da planta foi conduzido por Folly et al.^[3] e seus colaboradores, que descreveram em um trabalho inédito as propriedades antifúngicas contra células de *Cryptococcus* spp. e descobriram compostos majoritários que compõem a fração acetato de etila, alvo de nosso estudo e que estão elencados na figura 1. Os compostos majoritários encontrados são moléculas que pertencem ao grupo dos cafeoilquínicos e seus derivados, cafeol glicosídeos e cumarínicos glicosídeos.

Figura 1: Compostos detectados na fração acetato de etila das folhas de *Xylosma prockia*



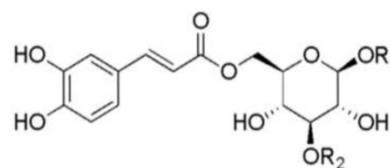
Type I: Caffeoyl-quinic acid derivatives

- 2 : R₁=R₂=H, R₃= caffeoyl
 3 : R₁:caffeoyl, R₂=R₃=H
 11 : R₁, R₂= glucosyl, H, R₃=caffeoyl
 13 : R₁=R₂=caffeoyl, R₃=H



Type II : p-coumaroyl glycosides

- 4 : R=H
 5 : R=H
 9 : R=C₆H₇O
 10 : R=C₆H₇O
 12 : R=C₆H₇O



Type III : caffeoyl glycosides

- 1: R₁=R₂=H
 6 : R₁=C₆H₇O, R₂=H
 7 : R₁=C₆H₇O, R₂=H
 8 : R₁=C₆H₇O, R₂=H
 14 : R₁=C₆H₇O, R₂=deoxyhexose
 15 : R₁=C₆H₇O, R₂=deoxyhexose

Fonte: Folly et al. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03114> [3]

Com o intuito de aumentar o leque de informações sobre produtos naturais com ação antifúngica realizou-se neste estudo a avaliação da atividade antifúngica das folhas de *X. prockia* pela primeira vez contra *C. parapsilosis*, e seus possíveis mecanismos de ação também foram investigados.

Materiais e Métodos

Desenho Experimental e Linhagem Utilizada

Para a realização dos testes *in vitro* de *Xylosma prockia* frente ao comportamento fúngico foram utilizadas culturas de células de *Candida parapsilosis* ATCC (*American Type Culture Collection*) de número 22.019 pertencentes ao catálogo do laboratório de microbiologia da Universidade Vale do Rio Doce, gentilmente cedidas para este estudo. Foi realizada uma triagem com o extrato etanólico vegetal e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água de modo a escolher a fração que apresentasse menor concentração inibitória mínima. Desse modo, a fração acetato de etila foi selecionada para a execução dos experimentos de curva de morte, quantificação de ergosterol, peroxidação lipídica e dosagem de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Obtenção do Extrato e das Frações Vegetais

As folhas de *X. prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) foram coletadas em Governador Valadares (18°51'04"S, 41°56'58"W), Minas Gerais, Brasil, em dezembro de 2015. A

exsicata foi identificada pelo botânico Dr. Ronaldo Marquete e depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (código RB 773293), em agosto de 2018. A pesquisa foi autorizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN; nº A66F830). O extrato etanólico e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água utilizadas nesse estudo foram os mesmos utilizados no artigo publicado por Folly et al.^[3]. Para a obtenção do extrato etanólico, o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar e posteriormente triturado em moinho de facas^[3]. As folhas secas em pó foram extraídas com etanol 96°GL por 5 dias^[3]. Após extração minuciosa, o extrato foi concentrado em rotaevaporador a temperatura inferior a 60 °C sob pressão reduzida e o extrato etanólico obtido foi dissolvido em água e foi realizado uma partição líquido-líquido por ordem de solubilidade^[3]. Para isso, foram utilizados na partição, na respectiva ordem, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e por fim água^[3]. As frações resultantes foram concentradas em rotaevaporador a temperatura inferior a 60°C sob pressão reduzida^[3].

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos das folhas de *X. prockia*, de anfotericina B e de fluconazol foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI M27-A3)^[1]. O inóculo fúngico foi preparado com solução salina estéril a 0,9% a partir de colônias isoladas de culturas de *C. parapsilosis* e ajustada a transmitância em 77% em espectrofotômetro a 530 nm. A suspensão fúngica foi diluída em meio RPMI-1640 estéril tamponado com MOPS até atingir a quantidade de $1.0 \times 10^3 - 5.0 \times 10^3$ UFC/mL. As frações vegetais, o extrato etanólico e anfotericina B foram diluídos em DMSO e fluconazol foi diluído em água destilada estéril atingindo a concentração de 1.000 µg/mL. As soluções-estoque foram diluídas em RPMI-1640. A concentração final de fluconazol variou entre 0,50-256 µg/mL, anfotericina B entre 0,03-16 µg/mL e o extrato vegetal e as frações vegetais entre 0,50-256 µg/mL. Um volume de 100 µL do fármaco antifúngico ou da droga vegetal foi transferido aos poços de uma placa de microdiluição de 96 orifícios estéril, juntamente com 100 µL de inóculo fúngico ou 100 µL de RPMI-1640 (controle positivo). Para cada placa, foram realizados controle negativos, onde adicionou-se 200 µL de RPMI-1640 em orifícios da placa. A placa foi

incubada em estufa bacteriológica por 48h a 35°C e a leitura foi realizada visivelmente. A CIM foi considerada como a última diluição sem crescimento visível para anfotericina B e drogas vegetais. Já para fluconazol foi considerada a CIM onde se observou 50% de crescimento visível como CIM. Os testes foram realizados em duplicata, em dois dias diferentes.

Determinação da Curva de Morte

A curva de morte de *C. parapsilosis* foi realizada para avaliar o comportamento fúngico frente à fração acetato de etila. O mesmo experimento foi realizado paralelamente com anfotericina B para comparação dos resultados. O teste foi conduzido conforme proposto por Ferreira et al.^[2] com modificações. As culturas de células de *C. parapsilosis* foram subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas a 48h a 35°C. Após o crescimento, colônias isoladas foram utilizadas para preparar um inóculo fúngico de modo semelhante ao ensaio de CIM, e 100 µL deste inóculo foi transferido para uma placa de 96 orifícios. Separadamente diluições da fração acetato de etila que compreenderam a concentração inibitória mínima, subinibitória mínima e o dobro da concentração inibitória mínima foram preparadas. Para cada teste foi preparado um controle positivo e um controle negativo do mesmo modo que realizado na determinação da CIM. A placa de 96 orifícios foi incubada em estufa bacteriológica por 48 horas a 35°C e durante a incubação leituras foram realizadas em tempos pré-estabelecidos que compreenderam o tempo 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Três alíquotas de 10 µL de cada teste da placa de 96 orifícios foram plaqueadas pelo método gota escorrida em meio ASD e incubadas por 48h a 35°C. As leituras foram realizadas a partir do crescimento visível e o número de colônias foi anotado para quantificação de UFC/mL conforme proposto por Folly et al.^[3]. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). Os testes foram realizados em triplicata, em dois dias diferentes.

Quantificação de Ergosterol

A extração dos esteróis intracelulares de *C. parapsilosis* foi realizada para a quantificação de ergosterol presente nas células fúngicas. O experimento foi realizado conforme proposto por Ferreira et al.^[3] com modificações. A cultura de células de *C.*

parapsilosis foi inoculada em placa contendo meio ASD por 48 horas a 35°C. Uma suspensão fúngica foi preparada utilizando a escala 2 de MacFarland. Dessa suspensão fúngica, 1 mL foi transferido para tubos cônicos, os quais foram levados a centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante da suspensão fúngica centrifugada foi descartado. Paralelamente foram preparadas soluções contendo CIM de fluconazol e CIM da FAE com meio RPMI-1640. Um controle negativo também foi preparado apenas com meio RPMI-1640. As células centrifugadas foram tratadas por 3 horas a 35°C. Após o tratamento, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e as células foram lavadas com 1 mL de solução salina a 0,9% três vezes. Um volume de 1,5 mL de solução alcoólica de KOH a 25% foi adicionado aos tubos contendo o *pellet* fúngico e agitados vigorosamente em vórtex durante 1 minuto. Os tubos foram incubados a 85°C em banho maria por 1 hora e resfriados a temperatura ambiente. A extração dos esteróis ocorreu com a adição de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de heptano seguidas de agitação vigorosa em vórtex por 3 minutos e a fase orgânica foi lida em 230 e 282 nm em espectrofotômetro UV-visível. O teor de ergosterol foi calculado utilizando uma equação matemática proposta por Arthington-Skaggs et al.^[4] que compreende: % dihidroergosterol = (absorbância em 230 nm / 518), % dihidroergosterol + % ergosterol = (absorbância em 280 nm / 290) e % ergosterol = (% dihidroergosterol + ergosterol - % dihidroergosterol). O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg/L como média ± desvio padrão (SD).

Ensaio de Peroxidação Lipídica

As células de *C. parapsilosis* foram submetidas à extração lipídica para avaliação da peroxidação induzida pela FAE. A metodologia utilizada se baseou em Ferreira et al.^[2] com modificações. Uma suspensão de células foi preparada do mesmo modo em que no ensaio de ergosterol e 1 mL da suspensão fúngica foi transferida para tubos falcon e levada a centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi tratado com 1 mL de CIM do extrato vegetal, 1 mL de anfotericina B (controle positivo) e 1 mL RPMI-1640 (controle negativo). O tratamento foi realizado durante 3 horas em incubação a 35°C. Após o tratamento, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e as células foram lavadas com 1 mL de solução salina a 0,9% três vezes. O *pellet* resultante foi tratado e homogeneizado com

1 mL ácido fosfórico gelado a 1%. 400 µL do homogenato obtido foi misturado com 400 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% contendo 0,1 mM de BHT e 50 mM de NaOH, seguido de adição de 200 µL de ácido fosfórico a 7%, sendo que durante a manipulação e a execução do teste as soluções foram mantidas geladas. Os tubos cônicos foram aquecidos durante 1h em banho maria a 100°C, seguidas de banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL de butanol e as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex e centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 rpm. A camada orgânica foi separada e lida a 532 nm em espectrofotômetro. As concentrações de TBAR foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM⁻¹ cm⁻¹ [2]. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em µM como média ± desvio padrão (SD).

Quantificação da Produção de ERO e ERN

A mensuração da produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e reativas de nitrogênio (ERN) foi realizada em parceria com o laboratório de micologia da UFMG. Conforme proposto por Ferreira et al. [2], quantidades endógenas de ERO e ERN foram mensuradas utilizando o ensaio fluorométrico com sondas específicas. As células fúngicas subcultivadas em ASD a 35°C durante 48 horas foram diluídas em solução salina até atingir a concentração de 1,0 x 10⁵ UFC/mL e tratadas com a fração acetato de etila durante 3 horas em RPMI sem vermelho de fenol. Incubou-se com 10 mM das sondas de diacetato de 2',7' - diclorofluorescina para quantificação de ERO e 20 mM de dihidrorodamina para quantificação de ERN. Também foi realizado um controle de crescimento com os fungos sem o tratamento com a fração acetato de etila e um controle positivo com anfotericina B. A fluorescência foi medida com um fluorômetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader, Biotek) usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 500 nm. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em UA/UFC como média ± desvio padrão (SD).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou pelo

teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Para as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p > 0,05$).

Resultados e Discussão

Teste de Concentração Inibitória Mínima

A triagem de atividade antifúngica foi realizada com o extrato etanólico e com frações das folhas de *X. prockia* (tabela 1). De acordo com Ríos e Recio^[5] extratos vegetais que apresentam CIM menores que 100 µg/mL são considerados promissores para a descoberta de novas moléculas potencialmente ativas. Dentre as frações testadas, as frações diclorometano, acetato de etila e butanólica podem ser consideradas promissoras, pois apresentaram CIM inferior a 100 µg/mL. FAE foi selecionada para continuidade dos ensaios por ser a mais potente, apresentando CIM de 16 µg/mL, frente a *C. parapsilosis*. Estudos avaliando a atividade antifúngica de *X. prockia* são escassos na literatura, sendo o mais recente estudo conduzido por Folly et al.^[3], que avaliou o comportamento da fração vegetal na criptococose. Estudos utilizando frações e extrato de *X. prockia* contra espécies de *Candida sp.* não foram encontrados na literatura, tornando este estudo inédito na pesquisa da atividade antifúngica de *X. prockia* frente *Candida parapsilosis*. Somada à essa perspectiva, há uma demanda urgente e crescente para a busca constante de novos agentes antifúngicos, sendo que derivados naturais são alvos de estudos pelo seu comportamento nas plantas, uma vez que sabidamente substâncias são produzidas para a proteção destas, e estes metabólitos apresentam elevada importância no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de diversas doenças^[7]. No presente estudo (tabela 1), *X. prockia* apresentou promissora atividade antifúngica, sua fração acetato de etila apresentou CIM menor que 100 µg/mL conforme discutido anteriormente, e este valor se aproxima aos valores encontrados para os fármacos consagrados na literatura para o tratamento da candidíase^[2,3,11].

TABELA 1: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. parapsilosis* do extrato etanólico e das frações em butanol (FB), água (FA), diclorometano (FD), acetato de etila (FAE) e hexano (FH) de *X. prockia*, de anfotericina B (ANFB) e fluconazol (FLC).

Linhagem	CIM µg/mL			
	EE	FB	FA	FD
<i>C. Parapsilosis</i> ATCC 22.019	64	32	>128	64
	FAE	FH	ANFB	FLC
	16	>128	2	4

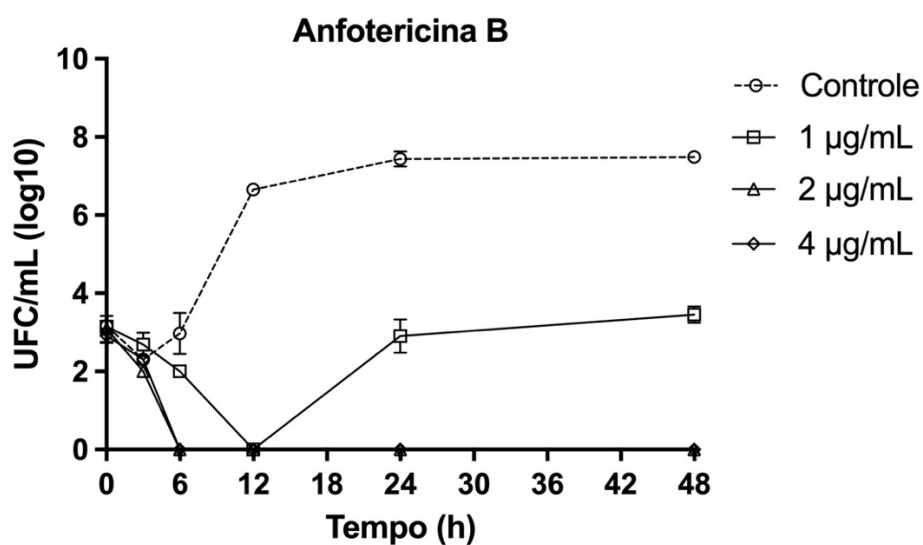
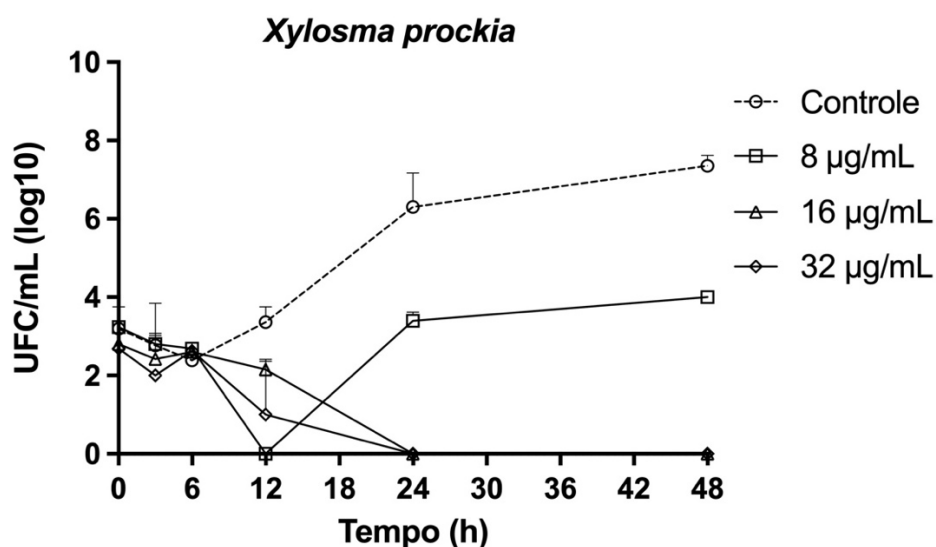
Nota: A CIM representa a concentração da fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. ATCC: American Type Culture Collection.

Ensaio de Curva de Morte

A curva de morte de células fúngicas representa a avaliação do comportamento farmacodinâmico da fração em estudo e fornece dados sobre o comportamento fungicida ou fungistático, além de predizer informações acerca da existência de dose dependência e/ou tempo dependência. De acordo com Buffé, Araújo e Dalla-Costa^[18] se o efeito sobre a morte celular é maior quando ocorre aumento da concentração do antimicrobiano, independentemente do tempo de exposição a ele, essa substância é caracterizada como tempo-dependente, mas se o tempo de exposição for o fator mais importante, a substância é classificada como tempo-dependente^[18]. Em nosso estudo (figura 1) a fração acetato de etila mostrou tempo-dependente, uma vez que a morte celular variou de acordo com o tempo de exposição à fração, alcançando a inibição total do crescimento após 24 horas tanto para a concentração inibitória (16 µg/mL) e com o dobro da concentração inibitória (32 µg/mL). No entanto, a fração não se mostrou dose-dependente, uma vez que não houve variação significativa na redução de células fúngicas com o aumento da concentração da fração. Observamos também suposta adaptação fúngica ao estresse promovido pela concentração subinibitória (8 µg/mL) da fração acetato de etila até o tempo de 6 horas de tratamento. Nas primeiras 3 horas, houve um decaimento na concentração fúngica, provavelmente proveniente do primeiro contato do fungo com o meio. Já nas 3 horas posteriores houve um aumento significativo da concentração, o que indica uma possível tentativa de adaptação e fuga do estresse causado pela fração. Nas concentrações inibitória e o dobro da concentração inibitória mínima o comportamento da fração prediz ação fungicida em 24 horas de tratamento, cuja concentração fúngica se aproxima de zero e não há tendência de crescimento nos intervalos avaliados até 48 horas de tratamento. Em relação a concentração subinibitória da fração, o comportamento a partir de 12 horas de tratamento segue o mesmo comportamento do controle realizado, apresentando forte crescimento até 24 horas de tratamento, e mantendo o

crescimento celular estável até 48 horas de tratamento. Apesar dos resultados *in vitro* se mostrarem promissores, estudos *in vivo* devem ser realizados, uma vez que podemos encontrar discrepâncias quando a fração é estudada em um organismo complexo. O estudo realizado com anfotericina B na avaliação da morte celular fúngica ilustrado na figura 1 demonstrou a atividade fungicida já conhecida na literatura. Nas primeiras 6 horas de tratamento a concentração inibitória foi capaz de decrescer a concentração fúngica próximo a zero, não sendo observado posterior crescimento até 48 horas de tratamento. Em suma, podemos avaliar que o comportamento gráfico de FAE se assemelha ao comportamento da ANFB (Figura 1), sendo este achado de extrema relevância, uma vez que torna a fração um forte promissor, já que ambos apresentam comportamento semelhante e a anfotericina possui grande desvantagem em relação aos seus efeitos colaterais, principalmente relacionados ao metabolismo hepático, nefrológico e hematológico^[12]. Um estudo com mais linhagens da espécie fúngica e com tempo maior de tratamento deve fornecer informações mais ricas e confirmatórias acerca desta hipótese.

FIGURA 1: Curva de morte de células de *C. parapsilosis* tratadas com fração acetato de etila e anfotericina B.



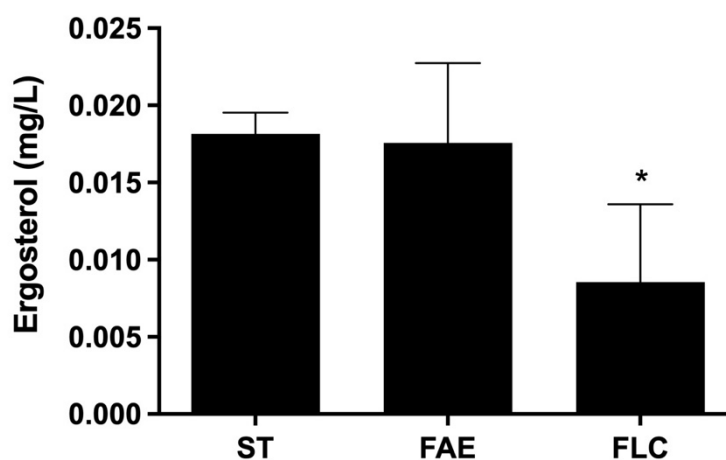
Nota: Resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC) em razão do tempo. Cada símbolo representa a média das porcentagens de crescimento + desvio padrão. Resultados obtidos em triplicata. UFC: unidade formadora de colônia, h: horas.

Ensaio de Quantificação de Ergosterol

O ensaio de quantificação de ergosterol na membrana celular fúngica é um importante experimento para avaliar um potencial mecanismo de ação de *X. prockia*. Fármacos azólicos como o fluconazol, tem como alvo a interrupção da produção de ergosterol na célula fúngica. Segundo França et al.^[8], a inibição da síntese de ergosterol ocorre pela inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase, chave na biossíntese de esteróis,

em humanos representados pelo colesterol e nas células fúngicas pelo ergosterol. O ergosterol é um importante esteroide para a manutenção da estrutura e da função da membrana plasmática, dependendo deste para o crescimento, desenvolvimento e proliferação fúngica. No presente estudo, os dados observados sobre a quantificação de ergosterol (figura 2) revelaram que *X. prockia* não diminuiu as concentrações de ergosterol (dados: ST: 0,018 mg/L \pm 0,001; FAE: 0,017 mg/L \pm 0,005). Já para fluconazol encontramos uma redução significativa dos níveis de ergosterol (0,008 mg/L \pm 0,005), o que já era esperado. Este achado sugere que o provável mecanismo de ação de FAE não está relacionado à interrupção da síntese de ergosterol. Além disso, estes dados reforçam a provável ação fungicida encontrada no ensaio de curva de morte, uma vez que o mecanismo de inibição da síntese de ergosterol prediz uma ação fungistática, como acontece com fluconazol.

FIGURA 2: Quantificação de ergosterol na membrana celular de *C. parapsilosis* tratada com a fração acetato de etila e fluconazol.



Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação dos níveis de ergosterol expressos em mg/L. Resultados obtidos em triplicata. *: indicam significância estatística ($p > 0,05$). ST: sem tratamento, FAE: concentração inibitória mínima da fração acetato de etila, FLC: concentração inibitória mínima de fluconazol.

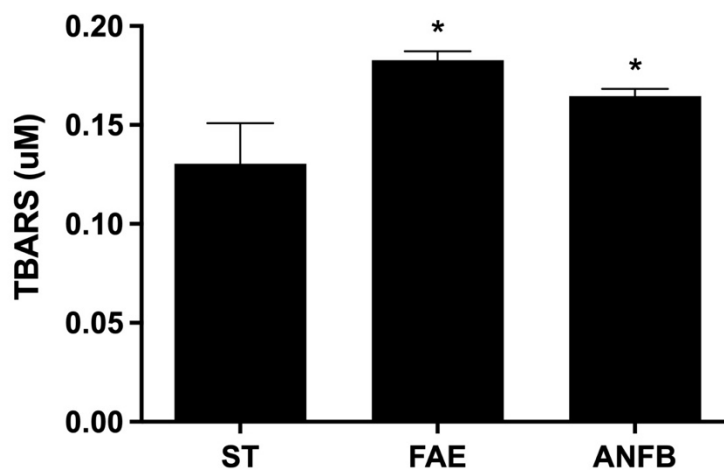
Ensaio de Peroxidação Lipídica

Um alvo de extrema importância no mecanismo de ação dos fármacos poliênicos é a peroxidação lipídica na membrana celular fúngica. A anfotericina B, representante e pertencente ao grupo dos poliênicos, tem ação fungicida e liga-se ao ergosterol na membrana celular fúngica, alterando a permeabilidade seletiva da célula, originando

poros permeáveis à saída de água e íons potássio, amônio e fosfato, além de açúcares e proteínas, ocorrendo, a seguir, deterioração metabólica e morte celular^[2,9]. Com base neste mecanismo, foi realizado um teste utilizando um biomarcador da peroxidação lipídica, o TBAR³, sendo as células desafiadas à reatividade ao ácido tiobarbitúrico. Em nosso estudo, *X. prockia* apresentou significativa peroxidação lipídica frente às células sem tratamento (figura 3), sendo ainda a peroxidação maior do que a encontrada para a anfotericina B, fármaco estudado e sabidamente conhecido pelo seu mecanismo de peroxidação lipídica pela atuação no ergosterol^[2] (dados: ST: 0,130 $\mu\text{M} \pm 0,020$; FAE: 0,182 $\mu\text{M} \pm 0,004$; ANFB: 0,164 $\mu\text{M} \pm 0,004$). Os dados desse experimento revelam o potencial de FAE causar peroxidação lipídica nas células fúngicas, considerando este um provável mecanismo de ação da fração. Em um estudo sobre os mecanismos de ação da anfotericina B, Gonçalves^[17] relata que o grupo carbonila presente na molécula do fármaco provavelmente faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila presente na molécula de ergosterol e que formam-se poros aquosos na membrana, onde o centro hidrofílico da molécula de ANFB cria um canal iônico transmembrana, mecanismo pelo qual o fármaco causa danos através da formação de poros na membrana celular.

Vale ressaltar que Folly et al.^[3], analisou a citotoxicidade da fração aceto de etila em células mononucleares do sangue periférico em um ensaio de viabilidade celular. Os autores identificaram que não houve citotoxicidade significativa nas células tratadas com a fração, o que torna ainda mais promissora a atividade anticandíase observada em nosso estudo.

FIGURA 3: Avaliação da fração acetato de etila e de anfotericina B sobre a peroxidação lipídica em células de *C. parapsilosis*.



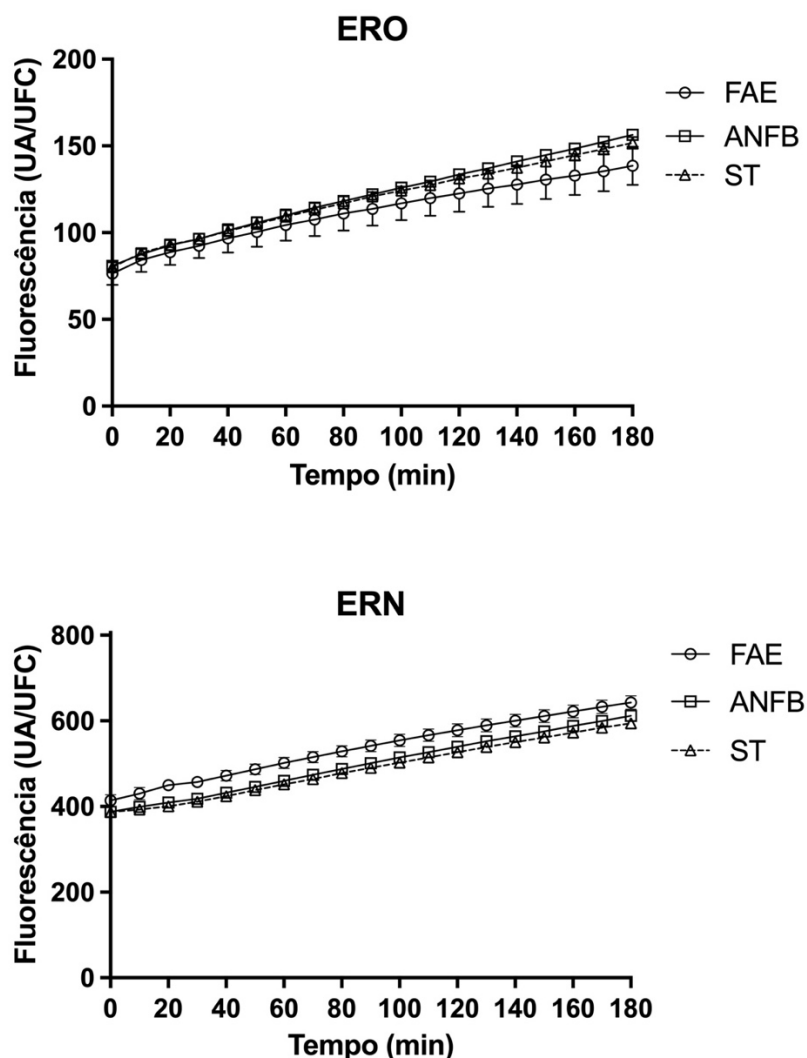
Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação da peroxidação lipídica expressos em μM . Experimento realizado em triplicata. *: indicam significância estatística ($p > 0,05$). ST: sem tratamento, FAE: concentração inibitória mínima da fração acetato de etila, ANFB: concentração inibitória mínima de anfotericina B.

Ensaio da Quantificação da Produção de ERO e ERN

No intuito de analisar a possibilidade da indução de estresse oxidativo e nitrosativo nas células de *C. parapsilosis* induzidas por FAE, foi realizada a mensuração da produção de ERO e ERN através da emissão de fluorescência. Em condições normais, o ânion superóxido (O_2^-) é convertido pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que logo é convertido pela ação das enzimas catalase, glutatona peroxidase ou ascorbato peroxidase em água (H_2O), formando o sistema antioxidante de neutralização de espécies reativas do oxigênio^[9]. Nesse sistema, pode haver geração de espécies oxidativas que são representadas principalmente pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), formado pela reação de haber-weiss; pelo peróxido de hidrogênio formado pela ação da SOD; e pelo ânion superóxido, formado pela recepção de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, como acceptor fina^[9]. A espécie reativa nitrosativa é representada pelo peroxinitrito (ONOO^-) que é formado pela reação do óxido nítrico e o ânion superóxido^[2,3,9]. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio do sistema antioxidante com a produção de espécies reativas^[2,3]. Em um estudo avaliando o papel oxidativo e nitrosativo em células de *C. gattii*, Ferreira et al.^[2] evidenciou um importante papel de fármacos na inibição de enzimas do sistema antioxidante, principalmente em SOD. Em um trabalho de revisão, Falci e Pasqualotto^[12] revelaram evidências que mostram que a anfotericina B induz o estresse oxidativo celular e o aumento na formação de radicais livres evidenciado pela expressão dos genes de estresse celular, por mecanismos ainda não completamente conhecidos. Em nosso estudo (figura 4), observamos que FAE eleva as concentrações de peroxinitritos, mas não observamos aumento na produção de espécies oxidativas, como ocorre com anfotericina B. A hipótese para este mecanismo é que o ânion superóxido esteja sendo desviado para a produção de peroxinitrito junto com óxido nítrico, diminuindo as concentrações de espécies reativas de oxigênio. Os dados evidenciam que provavelmente não há um único mecanismo de ação para a FAE e que possivelmente a sua ação fungicida induzida pela peroxidação lipídica é combinada com o dano oxidativo induzido por espécies nitrosativas, já que se sabe

que antimicrobianos, como a anfotericina B, apresentam mais de um mecanismo de ação^[2,12]. Em um estudo com *C. albicans*, Peralta et al.^[10] testou o efeito de um flavonoide obtido de *Dalea elegans* sobre a formação de biofilmes e seus dados revelaram que a substância gerou estresse nitrosativo na espécie fúngica testada, causando a diminuição de biofilmes, caracterizando um possível mecanismo de ação.

FIGURA 4: Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas por *C. parapsolisis* após tratamento com a fração acetato de etila e anfotericina B.



Nota: Resultados expressos em Intensidade de Fluorescência (UA/UFC) em razão do tempo. Cada símbolo representa a média das porcentagens de crescimento + desvio padrão. UFC: unidade formadora de colônia, min: minutos, UA: unidade arbitrária, ST: sem tratamento, FAE: concentração inibitória mínima da fração acetato de etila, ANFB: concentração inibitória mínima de anfotericina B.

Conclusão

O presente estudo descreve em caráter inédito a ação antimicrobiana da FAE das folhas de *Xylosma prockia* frente culturas de *Candida parapsilosis* ATCC 22.019. A fração mostrou potente inibição do crescimento das leveduras, característica promissora para que seja uma fonte de substâncias antifúngicas. As análises realizadas nesse estudo demonstraram que o estresse nitrosativo parece ser importante para causar a morte celular. No entanto, ressalta-se que mais estudos são necessários para determinar o mecanismo de ação da FAE.

Referências Bibliográficas

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2008; 3.
2. Ferreira GF, Baltazar LD, Santos JR, Monteiro AS, Fraga LA, Resende-Stoianoff MA et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**. 2013; 68(8):1801-11. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt114>
3. Folly ML, Ferreira GF, Salvador MR, Sathler AA, da Silva GF, Santos JC et al. Evaluation of in vitro Antifungal Activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) Leaves Against *Cryptococcus* spp. **Front Microbiol**. 2020; 10:3114. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03114>
4. Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev**. 1999; 37(10):3332-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.37.10.3332-3337.1999>
5. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**. 2005; 100(1-2):80-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
6. Dal Guedes da Silva C, Sanches CG, Chassot F. *Candida parapsilosis*: resistência aos antifúngicos. **SaBios: Rev Saúde e Biol**. 2022;17(1):1-16. Disponível em: <https://doi.org/10.54372/sb.2022.v17.3113>
7. Njanje I, Bagla VP, Beseni BK, Mbazima V, Lebogo KW, Mampuru L, et al. Defatting of acetone leaf extract of *Acacia karroo* (Hayne) enhances its hypoglycaemic potential. **BMC Complement Altern Med**. 2017;17(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1987-6>

8. França RR, Carvalho AS, Branco FS, Pinto AC, Boechat N. Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 α -demethylase Against *Trypanosoma cruzi*. **Rev Virtual Quim**. 2014;6(5). Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140096>
9. Ferreira GF. O papel do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos antifúngicos em *Cryptococcus gattii* e sua influência na heterorresistência ao Itraconazol. **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**. 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/6994>
10. Peralta MA, da Silva MA, Ortega MG, Cabrera JL, Paraje MG. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. **Phytomedicine**. 2015;22(11):975-80. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.003>
11. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**. 2006;32(5):449-60. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1806-37132006000500013>
12. Falci DR, Pasqualotto AC. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin Biomed Res**. 2015;35(2):65-82. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/2357-9730.56021>
13. Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, Wolff M. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Semin Respir Crit Care Med**. 2019;40(04):524-39. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693704>
14. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL; Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Crit Care Med**. 2011;39(4):665-70. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ccm.0b013e318206c1ca>
15. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**. 1995;39(1):1-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.1>
16. Shanmugam K, RSD W. Condensed anisotropic diffusion for speckle reduction and enhancement in ultrasonography. **EURASIP Journal on Image and Video Processing**. 2012;11(9):1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1687-5281-2012-12>
17. Gonçalves AH. MECANISMO DE AÇÃO E TOXICIDADE DA ANFOTERICINA B NO TRATAMENTO DE MICOSES. **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**. 2011. Disponível em:
18. Buffé C, Araújo BV, Dalla-Costa TCT. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Cad Farm** 2001;17(2):97-109. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/19477>

Anexos

Revista Fitos

e-ISSN: 2446-4775 e ISSN: 1808-9569

Endereço: Av. Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Telefone: 21- 3348.5598

E-mail: revistafitos@far.fiocruz.br.

[Visualizar versão vigente online](#)

Última atualização: 31/03/2021

A Revista Fitos (Farmanguinhos/Fiocruz) é um periódico interdisciplinar de publicação trimestral que tem por objetivo publicar artigos científicos originais sobre Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biodiversidade e Saúde.

1. A Revista Fitos aceita artigos para as seguintes seções

1.1. Perspectiva: Análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância do tema, em geral a convite dos Editores, com o máximo de 2.200 palavras e até seis (6) referências.

1.2. Debate: Análise de temas relevantes do campo da Inovação, Biodiversidade e Saúde. A publicação é acompanhada por comentários críticos assinados por pesquisadores conceituados, convidados a critério da editoria, seguida de resposta do autor do artigo principal, com o máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações.

1.3. Artigo de pesquisa: Inclui estudos descritivos, de abordagens qualitativas e/ou quantitativas, incluindo os de pesquisa básica com animais de laboratório, estudos controlados e randomizados, caso-controle e transversais, outros. Texto com, no máximo, 6.000 palavras (excluindo tabelas/ figuras e referências) e, no máximo, trinta (30) referências. Artigos que relatam ensaios clínicos (clinical trials) deverão informar adesão ao CONSORT (<http://www.consort-statement.org/>) e ter cadastro em um dos Registros de Ensaios Clínicos listados pela Organização Mundial da Saúde ou no *National Institute of Health* (NIH) (www.clinicaltrials.gov). Em casos de submissão de estudos observacionais, solicita-se adesão aos guias do STROBE (<https://www.strobe-statement.org/index.php?id=strobe-home>) para a reparação do manuscrito.

1.4. Revisão: Avaliações críticas e ordenadas da literatura sobre temas pertinentes ao escopo da Revista Fitos, incluindo os tipos de revisões–narrativas, integrativas, sistemáticas e meta-análises. Os autores destes últimos, devem incluir no corpo do manuscrito o número do registro do protocolo da revisão no PROSPERO (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>). Para a elaboração do manuscrito os autores devem seguir as normas propostas pelo PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>). Autores podem também submeter à Equipe Editorial Científica uma proposta de artigo de revisão, com um roteiro. Se aprovado, o autor pode desenvolver o roteiro e submetê-lo para publicação. Artigos de revisão devem limitar-se a 8.000 palavras (excluindo tabelas/ figuras e referências) e, no máximo, quarenta (40) referências atuais.

1.5. Relato de Experiência: Descrição de experiência que contribua de forma relevante para a área de atuação, contextualizado, com objetividade e aporte teórico, incluindo resumo, introdução com marco teórico e objetivo(s), metodologia, descrição da experiência, discussão, agradecimento (quando houver). Texto contendo até 6.000 palavras e, no máximo, vinte (20) referências e, até quatro (4) figuras. As figuras podem ser organizadas sob a forma de prancha. Cada prancha será considerada como uma figura.

1.6. Comunicação Breve: Relato de resultados preliminares de pesquisa, ou ainda, de estudos originais que possam ser apresentados como revisão ou na estrutura de artigo, mas de forma sucinta, com o máximo de 1.700 palavras e até cinco (5) referências.

1.7. Monografia de Planta(s) Medicinal(is): Visam agrupar, padronizar e sistematizar o conhecimento das características e propriedades das plantas medicinais para orientar o registro em órgãos de regulamentação. Texto contendo até 3.500 palavras e, no máximo, vinte (20) referências.

1.8. Resenha: resenha crítica de livro, dissertações, teses e outros, publicado nos últimos dois anos com, no máximo, 1.200 palavras.

1.9. Carta ao Editor: Comentários com conteúdo crítico construtivo acerca de material previamente publicado na Revista Fitos. Deve ser diretamente submetida aos Editores Associados. Texto com até 700 palavras e, no máximo, seis (6) referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto a carta. Editoriais e comentários são encomendados a autoridades em áreas específicas. O Conselho Editorial também analisa propostas de comentários submetidas espontaneamente.

2. Processo de Avaliação/Revisão por pares (“peer review”)

2.1. O conteúdo integral publicado na Revista Fitos (Farmanguinhos/Fiocruz) passa pelo processo de revisão por pares (*Peer review*). Inicialmente os manuscritos submetidos são direcionados aos editores científicos, para avaliação inicial quanto ao atendimento das normas requeridas para envio dos originais e o mérito do trabalho, decidindo assim, sobre a aprovação de sua submissão, com ou sem alterações. Na sequência, o artigo é enviado para um processo de avaliação por pares, duplo-cega, selecionados de um cadastro de revisores de instituições nacionais e internacionais. Após receber os pareceres dos avaliadores, os Editores Científicos/Associados decidirão pela aceitação do manuscrito sem modificações, pela devolução aos autores com sugestões de modificações ou pela rejeição. Os Editores Científicos/Associados têm a responsabilidade de reencaminhar o artigo aos autores para esclarecimentos, tantas vezes quanto necessário, e, a qualquer momento, por decisão dos Editores o documento pode ter sua recusa determinada. Cada nova versão é analisada pelos Editores Científicos, que detém o poder da decisão final.

3. Normas para submissão e apresentação do manuscrito

3.1. A Revista Fitos publica artigos científicos inéditos e originais, que não estejam em avaliação simultânea em nenhum outro periódico, cuja identificação fará com que o manuscrito seja desconsiderado para publicação.

3.2. Não há cobrança de taxas para submissão, avaliação e publicação dos artigos.

3.3. São aceitos manuscritos em português, inglês e espanhol.

3.4. Todos os artigos são publicados em formato PDF e HTML.

3.5. O conteúdo integral da Revista Fitos de livre acesso, está disponibilizado no site <http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/>, com licença de publicação CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.6. Os manuscritos deverão ser acompanhados pelo Termo de Cessão de Direitos Autorais preenchido e assinado individualmente, por todos os autores, e inserido no sistema no momento da sua submissão. [Baixe aqui o Termo.](#)

4. Formatação do Manuscrito

4.1. O manuscrito deve ser redigido com fonte Arial tamanho 12, em folha configurada em tamanho A4, com espaço 1,5 e margem de 3 cm de cada um dos lados, incluindo as referências bibliográficas e títulos/legendas de tabelas e ilustrações.

4.2. O arquivo deverá apresentar-se em formato digital, extensão “doc” ou “docx”. Arquivos em Adobe® PDF format (.pdf files) não serão aceitos.

4.3. No cabeçalho, antes do Título deve ser informado a seção: perspectiva, debate, artigo de pesquisa, revisão, relato de experiência, comunicação breve, monografia de planta(s) medicinal(is), resenha, carta ao editor.

4.4. A organização do manuscrito deve seguir a ordem: título, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e legendas, inseridas no corpo do texto), figuras (cada figura completa, com título e legendas, inseridas no corpo do texto). Para mais informações, [consultar Seções dos manuscritos.](#)

4.5. O Título e os Subtítulos, em negrito, deverá ter a primeira palavra escrita com a primeira letra maiúscula.

4.6. Não serão aceitas notas de rodapé.

4.7. Siglas devem ser escritas por extenso, quando aparecem a primeira vez no texto, incluindo Resumo e Abstract.

5. Fontes de Financiamento

5.1. Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado de auxílio à pesquisa.

6. Conflito de Interesses

6.1. Caso haja conflito de interesse, que envolva o manuscrito, este deverá ser informado no formulário de submissão.

7. Colaboradores e ORCID

7.1. Especificar as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo. Os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do ICMJE, que estabelece o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada; 4. Ser responsável por todos os aspectos do trabalho na garantia da exatidão e integridade de qualquer parte da obra. Essas quatro condições devem ser integralmente atendidas. ([Tutorial](#))

Todos os autores deverão informar o número de registro do ORCID no cadastro de autoria do artigo. Não serão aceitos autores sem registro.

7.2. Os autores mantêm o direito autoral da obra, concedendo à Revista Fitos o direito de primeira publicação.

8. Agradecimentos

8.1. Opcionais.

8.2. Devem ser breves e objetivos. Somente devem ser mencionadas as pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria.

9. Referências

9.1. As referências devem ser numeradas e ordenadas na sequência das citações no texto. As citações no texto devem ser identificadas por algarismos arábicos, entre chaves e sobrescritos. Seguir a sequência da numeração das citações, também, nas tabelas, caso haja.

9.2. Devem ser formatadas no estilo Vancouver, também conhecido como o estilo *Uniform Requirements*.

9.3. Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados podem ser citados desde que seja feita a indicação da revista e que o respectivo artigo está na pré-publicação em "Ahead of Print".

9.4. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtidas através da publicação da NLM "List of Serials Indexed for Online Users", disponível no endereço www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html. Para visualizar alguns exemplos do modelo adotado pela Revista Fitos. Para mais informações, [consulte o documento "Exemplos de Referências"](#).

10. Nomenclatura Científica

Para os nomes científicos devem ser seguidas as regras de nomenclatura botânica e zoológica, bem como as abreviaturas e convenções específicas.

10.1. Nomenclatura Botânica

Os nomes científicos de plantas devem ser escritos de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, sem abreviaturas no resumo/abstract e no corpo do texto, para cada espécie citada pela primeira vez, mas quando várias espécies pertencerem ao mesmo gênero basta citar apenas para a primeira (por exemplo, *Mentha piperita* e *M. acuta*). A autoria da espécie (por exemplo, L., Opiz) é necessária apenas na seção de Metodologia, de acordo com o The International Plant Names Index (www.ipni.org) e com a Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>). Cultivares ou variedades devem ser correlacionados ao nome científico (por exemplo, *Ximenia americana* var. *inermis*). Os autores devem informar na Metodologia/Material e Métodos o espécime e número do *voucher* de referência das plantas utilizadas ou outro material examinado.

11. Ética e Integridade em Pesquisa

12.1. Os manuscritos de pesquisas envolvendo animais e/ou seres humanos deverão ser acompanhados do Certificado de Aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa, emitidos pela instituição de origem do(s) autor(es), cujo número do protocolo deverá ser citado no texto.

12.2. As autorizações para acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado devem ser apresentadas e citadas no corpo do texto quando pertinente.

Antes de submeter o manuscrito é importante que o(a)s autore(a)s observem/verifiquem:

- a) **estilo científico**: deve ser informativo, racional, baseado em dados concretos, onde podem ser aceitos argumentos de ordem subjetiva, desde que explanados sob um ponto de vista científico;
- b) **vocabulário técnico**: a comunicação científica deve ser feita com termos comuns, que garantam a objetividade da comunicação. Porém, deve ser observado que cada área científica possui seu vocabulário técnico próprio;
- c) **correção gramatical**: a observação da correção do texto deve ser feita com cuidado, evitando-se o uso excessivo de orações subordinadas em único parágrafo, o excesso de parágrafos, lembrando que cada parágrafo encerra uma pequena ideia defendida no texto, logo, encerrada a ideia, muda-se o parágrafo.
- d) **testar todos os hiperlinks das referências**; passando o mouse por cima dos hiperlinks verifique se os endereços informados estão corretos ([Tutorial](#));

e) **realizar o checklist** para fazer a verificação final. [Baixe aqui o checklist](#).

Finalizamos, lembrando que a submissão do manuscrito só será aceita se o mesmo atender plenamente à Instrução aos Autores.