



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DOUTORADO

ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA

**ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy
*in vitro, in vivo e in silico***

São Luís, MA
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DOUTORADO

ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA

**ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy:
AVALIAÇÃO *in vitro*, *in vivo* e *in silico***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Quintino Rocha

São Luís-MA
2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

MOTTA, ELIZANGELA ARAUJO PESTANA.

ATIVIDADE ANTI-Candida DE *Vismia guianensis* Aubl. Chosy
in vitro, in vivo e in silico / ELIZANGELA ARAUJO PESTANA
MOTTA. - 2020.

154 f.

Coorientador(a): CLAUDIA QUINTINO ROCHA.

Orientador(a): ROSANE NASSAR MEIRELES GUERRA.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2020.

1. CaCYP51. 2. *Candida albicans*. 3. *Candida*
glabrata. 4. *Vismia guianensis*. 5. *Vismionia*. I. GUERRA,
ROSANE NASSAR MEIRELES. II. ROCHA, CLAUDIA QUINTINO. III.
Título.

ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA

ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Vismia guianensis* (Aubl.)

Chosy: AVALIAÇÃO *in vitro*, *in vivo* e *in silico*

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Claudia Quintino da Rocha (Co-orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

“Pesquisar é acordar para o mundo.”

(Marcelo Lamy)

In memoriam

A minha mãe Elcinéa Araujo Pestana

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a Deus por ter me guiado por um caminho que mesmo cheio de obstáculos tornou-se possível alcançar.

À minha família, em especial ao meu pai, Adelson Trindade Pestana, motivador e incentivador sempre. A meus irmãos, Elizana Araujo Pestana, Elianderson Araujo Pestana, Luadyna Ribeiro Pestana e Leandro Vieira de Paula Pestana por entender muitas vezes meu distanciamento em conciliar estudos e trabalho.

Agradeço, também a meu marido, Luis Carlos Motta Junior e a minha filha, Luana Pestana Motta, por estarem ao meu lado e serem meus pilares e inspiração para concluir mais essa etapa da minha vida.

Meus agradecimentos aos meus anjos, Josivan Regis Farias, um ser humano incrível e disponível sempre; Anderson França da Silva por todo apoio no desenvolvimento do trabalho mesmo com todas as suas tarefas; Luis Douglas Miranda Silva com toda gentileza e delicadeza para ajudar no que eu precisava; Aluísio Oliveira obrigada pela disponibilidade e carinho do acompanhamento desde o início. A minha amiga, Patrícia Costa Santos Alves pelo apoio e ajuda na pesquisa, além de todas as conversas nos bastidores.

Aos colegas de turma da pós-graduação, 2016-2020, em especial a Alberto Jorge do Laboratório de Farmacognosia I pelo auxílio e paciência durante o desenvolvimento da pesquisa, foi essencial.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas e da Saúde que contribuíram nesse processo quer ser direta ou indiretamente, com conhecimento, mas também com palavras confortantes e incentivadoras.

Agradecimento ao Professor Dr. Eduardo B. de Almeida Jr., curador do Herbário do Maranhão, pela identificação e catalogação da espécie vegetal.

À professora Dra. Cristina Monteiro por ter cedido os isolados clínicos e pela participação na minha banca de qualificação, assim como o prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior, o prof. Dr. Valério Monteiro e a profa Mayara Cristina Pinto da Silva por todas as contribuições.

À minha co-orientadora, professora Claudia Quintino Rocha, pelas orientações e apoio no desenvolvimento da pesquisa e pela disponibilidade, disponibilizando um pouco do seu conhecimento gigantesco e a seus alunos do laboratório de Estudos Avançados de Fitomedicamentos. E agradeço a minha amiga de anos, professora Dra. Rita de Cássia Silva Luz do departamento de química por ter me direcionado a você.

À minha professora e orientadora, Rosane Nassar Guerra, pelos ensinamentos, pelas críticas, pelos elogios, pelo crescimento e por tudo que conseguimos alcançar e acima de tudo por toda a paciência e carinho durante todos esses anos. Você foi uma mãe sempre e com muita compreensão. Minha eterna gratidão por ter me esperado e por ter me orientado.

A banca de defesa de tese pelo aceite e disponibilidade em participar desse momento gratificante e gradioso para mim.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa no Maranhão (FAPEMA) pelo incentivo financeiro no apoio a publicação da pesquisa.

A Universidade Federal do Maranhão, por mais uma vez me deu oportunidade de estudar e graduar nessa casa, em especial ao programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas e da Saúde.

A todos que fazem parte do LIF/UFMA, pelas conversas e companheirismo e apoio nas horas que pareciam que não daria certo.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 Infecção por <i>Candida</i> | 20 |
| 2.1.1 Fatores de virulência..... | 23 |
| 2.1.2 Biofilme..... | 25 |
| 2.1.3 Tratamento farmacológico..... | 27 |
| 2.2 Plantas com atividade <i>anti-Candida</i> | 31 |
| 2.2.1 <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Chosy..... | 33 |
| 2.3 Bioinformática estrutural..... | 37 |
| 3. OBJETIVOS | 49 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 49 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 49 |
| 4. RESULTADOS | 50 |
| 4.1 Capítulo I – Artigo 1..... | 50 |
| 4.2 Capítulo II – Artigo 2..... | 70 |
| 4.3 Capítulo III – Artigo 3..... | 109 |
| 4.4 Capítulo IV – Patente..... | 143 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 144 |
| ANEXOS | 145 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANFO B – Anfotericina B

ASD – Agar Sabouraud Dextrose (*Sabouraud Dextrose Agar*)

ATCC – Coleção de Cultura Tipo Americana (*American Type Culture Cell*)

BSA – Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

BVS – Biblioteca Virtual de Saúde

Ca(R)Flu – *Candida albicans* resistente ao Fluconazol

Ca(S)Flu – *Candida albicans* sensível ao Fluconazol

CDR1 – Gen de *Candida* resistente a droga 1 - *Candida Drug Resistance* gene 1

CDR2 – Gen de *Candida* resistente a droga 2 - *Candida Drug Resistance* gene 2

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CMC – Candidíase mucocutânea crônica

CSLM - Microscopia confocal de varredura a laser

CYP450 – Citocromo que absorvem o comprimento de onda a 450nm

CaCYP51 – Lanosterol 14-alfa-demetilase Citocromo P450 de *Candida albicans*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EHVG – Extrato hidroetanólico das folhas de *Vismia guianensis*

ERG11 – Gen 11 de biossíntese do ergosterol - Ergosterol biosynthesis gene 11

ERG5 - Gen 5 de biossíntese do ergosterol biosynthesis gene 5

ERG3 - Gen 3 de biossíntese do ergosterol biosynthesis gene 3

ESI - Ionização por eletrospray

FIA – Injeção em fluxo contínuo

FICI – Índice de concentração de fração inibitória

FLU - Fluconazol

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-UV - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta

IL– Interleucina

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)

CIM – Concentração Inibitória Mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*)

MDR1 – *Multidrug Resistance* no gene 1

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina

MSⁿ – Múltiplos Estágios

OD – Densidade Óptica (*Optical Density*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*)

PDB - Banco de Dados de Proteínas

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLB - Enzima Fosfolipase (*Phospholipase B*)

RPMI - Instituto Memorial Roswell Park (*Roswell Park Memorial Institute*)

SAP – Enzima Proteinase (*Secreted Aspartyl Proteinases*)

DP - Desvio-Padrão

SiSGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SNC – Sistema Nervoso Central

UFC – Unidades formadoras de Colônia (*Colon forming Units*)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UV/Vis – Ultravioleta no visível

VN – Vermelho Neutro

YNB – Base de Nitrogênio de Levedura (*Yeast Nitrogen Base*)

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|---|----|
| Figura 1. Aspecto macroscópico da secreção das exoenzimas: proteinase (A) e fosfolipase (B)..... | 24 |
| Figura 2. Transição de <i>Candida albicans</i> de microrganismo comensal para a forma virulenta e subsequente infecção..... | 24 |
| Figura 3. Variação morfológica de <i>Candida albicans</i> : hifas (a-d), pseudo-hifas (b-e) e blastoconídeos..... | 25 |
| Figura 4. Etapas de formação do biofilme de leveduras..... | 26 |
| Figura 5. Visualização dos biofilmes em microscopia eletrônica: Biofilme em formação (A) e Biofilme formado (B)..... | 27 |
| Figura 6. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos tradicionais e seus locais de ação..... | 28 |
| Figura 7. Diferentes mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos tradicionais: (a) alteração do alvo enzimático; (b) aumento do efluxo fármaco, (c) alterações composição da membrana e (d) redução de esteróis na membrana plasmática..... | 29 |
| Figura 8. Biossíntese comparativa de esteroides estruturais de membrana de diferentes classes de seres vivos..... | 30 |
| Figura 9. Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Vismia</i> | 33 |
| Figura 10. Distribuição geográfica da espécie <i>Vismia guianensis</i> conforme registro na rede de banco de dados <i>speciesLink</i> | 35 |
| Figura 11. <i>Vismia guianensis</i> com suas flores (A) e folhas (B)..... | 36 |

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fluxograma do processo de seleção de artigos pesquisados (2009-2019) | 56 |
|---|----|

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Percentual do pó das folhas secas de *Vismia guianensis*, após a moagem e tamisação, utilizando diferentes tipos de malhas.....83
- Figura 2.** Cromatogramas dos hidromódulos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* por HPLC com detecção no ultravioleta (HPLC–UV/Vis), com picos e áreas definidos..... 85
- Figura 3.** Espectro de primeira ordem para a análise por injeção direta em fluxo (FIA-ESI-IT-MS) obtidos em modo negativo para o extrato de *Vismia guianensis*.....86
- Figura 4.** Estruturas químicas de compostos identificados de *Vismia guianensis*.....88
- Figura 5.** Atividade citotóxica das diferentes concentrações do extrato das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG) avaliado por hemólise de eritrócitos (A), sobre células RAW264.7, por MTT (B) e com vermelho neutro (C).....89
- Figura 6.** Efeito do EHVG sobre a curva de morte de *Candida albicans* SC 5314(A) e *Candida glabrata* ATCC 2001 (B), em concentrações que corresponderam a CIM ou 2×CIM.....91
- Figura 7.** O tratamento com EHVG inibe a adesão de *C. glabrata* ATCC 2001 (A) e a *C. albicans* ATCC 90028 (B) e *C. albicans* SC 5314 com efeito semelhante a Anfotericina B (ANFO B) e ao Fluconazol (FLU).....92
- Figura 8.** Efeito inibitório do EHVG na formação de biofilmes jovens (A; C; E) e maduros (B; D; F), em comparação ao controle não tratado.....93
- Figura 9.** Percentual de inibição da formação de biofilme por MTT de *Candida* spp.....94
- Figura 10.** Percentual de redução da formação de biomassa por Cristal Violeta (CV) de *Candida* spp.....95
- Figura 11.** Representação esquemática das interações identificadas no *docking* molecular na interação entre Vismiona D e a estrutura do CaCYP51. Figura obtida com o PoseView.....97
- Figura 12.** Conformação espacial obtida após o acoplamento molecular de Vismiona D (azul) e posaconazol (verde) com CaCYP51 (PDB: 5FSA), mostrando os vários sítios de ligação em comum entre o composto e o antifúngico. Imagem obtida com a quimera USCF.....97

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Atividade antifúngica do EHVG contra as linhagens de *Candida albicans* ATCC 10231 (I); *Ca(S)Flu* (II) e *Ca(R)Flu* (III), mostrando a formação de halos correspondentes as zonas de inibição do extrato utilizado em diferentes concentrações..... 121
- Figura 2.** Efeito do EHVG sobre a curva de crescimento de cepas de *Candida albicans* ATCC 10231; *Ca(S)Flu* ou *Ca(R)Flu*.....124
- Figura 3.** Efeito inibitório do Extrato das folhas de *Vismia guianensis* – EHVG sobre o biofilme em formação. As culturas tratadas com EHVG foram comparadas àquelas tratadas com Anfotericina B (ANFO B) ou Fluconazol (FLU).....125
- Figura 4.** Fotomicrografias comparativas de *Candida albicans* ATCC 10231 tratados com 1×CIM e 2×CIM.....126
- Figura 5.** Fotomicrografias comparativas de *Ca(S)Flu* tratados com 1×CIM e 2×CIM127
- Figura 6.** Fotomicrografias comparativas de *Ca(R)Flu* tratados com 1×CIM e 2×CIM.....128
- Figura 7.** Comparação das amostras de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu* em meio sólido para observação morfológica tratadas com EHVG, Anfotericina B e Fluconazol, 1×CIM e 2×CIM.....130
- Figura 8.** Comparação da atividade da enzima hemolisina em três linhagens diferentes de *Candida albicans* ATCC 10231, (*Ca(S)Flu* e (*Ca(R)Flu*)132
- Figura 9.** Percentual de sobrevivência dos animais hígidos (SHAM) comparados aos imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com de *Candida albicans* (ATCC 10231) tratados com EHVG concomitante a indução da sepse (EHVGc) ou 6 horas após (EHVGa) e não tratados (PBS).133

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Diferentes espécies de <i>Vismia</i> com alguns constituintes químicos e estudos realizados..... | 34 |
|---|----|

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação das atividades farmacológicas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Vismia guianensis</i> | 58 |
|---|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Detalhamento das linhagens e isolados testados..... | 77 |
| Tabela 2. Valores de rendimento dos diferentes hidromódulos do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Vismia guianensis</i> | 84 |
| Tabela 3. Identificação dos compostos de <i>Vismia guianensis</i> por MS ⁿ | 86 |
| Tabela 4. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração fungicida mínima (CFM) e a atividade fungicida ou fungistática do extrato das folhas de <i>Vismia guianensis</i> sobre linhagens de <i>Candida</i> spp..... | 90 |
| Tabela 5. Energias de ligação livre e constante de inibição dos compostos do extrato bruto de <i>Vismia guianensis</i> usando a estrutura de CaCYP51 de <i>Candida albicans</i> (PDBID 5FSA) como ligante na docagem molecular..... | 96 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Organização dos grupos a serem utilizados para o experimento <i>in vivo</i> de sepe fúngica..... | 120 |
| Tabela 2. Medidas dos halos referente a cada dose e o efeito inibitório do EHVG sobre <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231, Ca(S)Flu e Ca(R)Flu), após 24 horas..... | 122 |
| Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EHVG frente as linhagens ATCC 10231, Ca(R)Flu e Ca(S)Flu de <i>Candida albicans</i> em relação ao Fluconazol..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4. Combinação (<i>Checkboard</i>) do extrato (EHVG) com controle positivo (ANFO B e FLU) | 123 |
| Tabela 5. Ação do EHVG sobre as enzimas fosfolipase e proteinase considerando a intensidade de secreção das enzimas por três linhagens de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), (<i>Ca</i> (S)Flu) e (<i>Ca</i> (R)Flu)..... | 131 |
| Tabela 6. Expectativa de vida de animais com sepse induzida por <i>Candida albicans</i> e tratados com extrato de <i>Vismia guianensis</i> (EHVG)..... | 133 |

RESUMO

Vismia guianensis (Aubl.) Chosy, espécie vegetal típica de região amazônica, é utilizada popularmente para tratar infecções da pele, como cicatrizante e purgativo. Investigou-se a ação anti-*Candida* do extrato hidroalcoólico das folhas de *V. guianensis* (EHVG) *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. O EHVG foi obtido por maceração das folhas em álcool (70%), por 7 dias, seguido por rotaevaporação e liofilização. O EHVG foi submetido a avaliação fitoquímica e a caracterização cromatográfica por HPLC-UV e FIA-ESI-IT-MSⁿ. A citotoxicidade do EHVG foi avaliada pelas técnicas de MTT, vermelho neutro e pela determinação da atividade hemolítica. A ação antifúngica do EHVG foi avaliada *in vitro*, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) utilizando linhagens padrão de *Candida albicans*, *C. glabrata* e linhagens clínicas de *C. albicans*. Avaliou-se também os efeitos do EHVG sobre os principais fatores de virulência incluindo ação sobre: a adesão fúngica, biofilmes jovem e maduro e a cinética de crescimento fúngico. Em outro grupo de experimentos, determinou-se a ação do extrato sobre as enzimas proteolíticas, em cepas de *Candida albicans* sensíveis Ca(S)Flu ou resistentes Ca(R)Flu ao Fluconazol, e o efeito sinérgico do EHVG associado a Anfotericina B e ao Fluconazol. A avaliação *in vivo* determinou a sobrevida de camundongos Swiss, fêmeas, imunossuprimidos com ciclofosfamida, 48 horas antes da infecção letal por *C. albicans* (3×10^8), que foram tratados com EHVG (5mg/kg), em seguida a infecção, ou 6 horas depois. Para análise *in silico*, por docagem molecular e simulações por dinâmica molecular, selecionou-se a enzima CaCYP51 de *C. albicans* como alvo de quatro compostos identificados no EHVG. Nesse ensaio o Posoconazol foi usado como controle positivo. Foram identificados na triagem fitoquímica do EHVG catequinas, saponinas, antocianinas, antocianidinas, benzoquinonas e flavonóides e a caracterização química do EHVG, permitiu identificar como compostos majoritários: vismiona D, antraquinona F, kaempferol, quercetina e ácido elágico. O EHVG apresentou baixa citotoxicidade, nas várias concentrações testadas e inibiu, eficientemente, o crescimento tanto das formas planctônicas como dos biofilmes jovens e maduros de *C. albicans* e *C. glabrata*. O EHVG apresentou sinergismo com Fluconazol e com Anfotericina B, quanto a ação anti-*Candida*, sendo efetivo até mesmo para o isolado clínico resistente ao fluconazol (Ca(R)Flu). Animais tratados com EHVG, em qualquer intervalo, apresentaram melhor sobrevida e maior expectativa de vida, com eficácia semelhante as drogas padrão. Na análise *in silico* os 4 compostos testados apresentaram afinidade com a enzima CaCYP51, mas a Vismiona D apresentou melhores resultados quanto a afinidade, sendo inclusive superior ao Posoconazol. Conclui-se que o EHVG apresenta atividade anti-*Candida*, *in vitro* e *in vivo*, confirmando os ensaios *in silico*, possivelmente porque é capaz de inibir mecanismos de virulência de *Candida albicans* e *C. glabrata*, sendo efetivo até mesmo em linhagem de *C. albicans* resistente ao Fluconazol. Conclui-se, também, que a ação anti-*Candida*, pode estar relacionada a combinação de pelo menos 4 compostos químicos presentes no extrato, sendo vismiona D o mais efetivo deles. Em conjunto, os dados mostram que *Vismia guianensis* é um importante alvo para a bioprospecção de novas drogas com ação anti-*Candida*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; Fluconazol; CaCYP51; *Vismia guianensis*, Vismiona.

ABSTRACT

Vismia guianensis (Aubl.) Chosy, a typical plant species from the Amazon region, is popularly used to treat skin infections, as healing and purgative. We investigated the anti-*Candida* effect of hydroethanolic extract from the leaves of *V. guianensis* (EHVG) *in vitro*, *in vivo*, and *in silico*. The leaves were macerated in alcohol (70%), for 7 days, followed by evaporation and lyophilization to obtain the EHVG. The EHVG was submitted to phytochemical screening and chromatographic characterization by HPLC-UV and FIA-ESI-IT-MSⁿ. The EHVG cytotoxicity was evaluated by neutral red, MTT, and by determination of hemolytic activity. The antifungal activity *in vitro* was assessed by the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide (CFM) using standard strains of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and clinical isolates of *C. albicans*. It was also evaluated *in vitro* the effects of EHVG on the virulence factors such as fungic adhesion, young and mature biofilms, and fungal growth kinetics. In another group of experiments, we determined the effect of EHVG on the proteolytic enzymes using two *C. albicans* strains, one sensitive (Ca(S)Flu), and the other resistant (Ca(R)Flu) to Fluconazole. The synergistic effect of EHVG with Amphotericin B or Fluconazole was also determined. The *in vivo* evaluation was performed in Swiss female mice, immunosuppressed with cyclophosphamide, 48 hours before the lethal infection by *C. albicans* (3×10^8). Groups treated with EHVG (5mg/kg), at the time of infection, or 6 hours later, were compared to the untreated control group. The *in silico* analysis was performed by molecular docking and molecular dynamics simulations, using the enzyme CaCYP51 from *C. albicans* as the target and four compounds identified in the EHVG. Posaconazole was the positive control in this assay. According to the phytochemical screening, EHVG is rich in catechins, saponins, anthocyanins, anthocyanidins, benzoquinones, and flavonoids. After the chemical characterization of EHVG, it was possible to identify as the main compounds: vismiona D, anthraquinone F, kaempferol, quercetin, and ellagic acid. EHVG presented low cytotoxicity at the various concentrations and efficiently inhibited the growth of both planktonic forms and biofilms formation. The EHVG presented a synergistic effect when associated either to Fluconazole or Amphotericin B and showed an anti-*Candida* effect even in the Ca(R)Flu strain. Animals treated with EHVG, always, presented better survival and longer life expectancy, with similar efficacy to standard drugs. The four evaluated compounds showed high affinity for the enzyme CaCYP51 after *in silico* analysis. However, Vismiona D presented better results, even superior to Posaconazole. We conclude that EHVG exhibits anti-*Candida* activity, *in vitro* as *in vivo*, confirming the *in silico* assays, probably because it can inhibit the various fungus virulence mechanisms, even in the Fluconazole resistant strain. It is possible to suggest that the anti-*Candida* action may be due to the combination of at least four chemical compounds present in the extract, but vismione D, seems to be the most effective. Based on this, it is reasonable to propose *Vismia guianensis* as an essential target for bioprospecting new drugs for the *Candida* infections treatment.

Keywords: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; Fluconazole; CaCYP51; *Vismia guianensis*, Vismione.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são ubíquos na natureza e existem como saprófitos, de vida livre, que não derivam de benefícios óbvios de parasitar humanos ou animais. Antes que um fungo específico possa ser confirmado como a causa de uma doença, ele deve ser isolado, a partir de amostras seriadas, para que os elementos fúngicos, morfológicamente consistentes com o isolado, possam ser observados e identificados nos tecidos retirados da lesão (KOBAYASHI, 2019).

Candida albicans está entre as espécies fúngicas mais prevalentes da microbiota humana e coloniza de modo assintomático indivíduos saudáveis, podendo ser facilmente encontrada na mucosa oral, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento. (SANTANA et al., 2013; 40; GUZMANA et al., 2011; MUTHAMIL et al., 2018; SHARMA et al., 2019, SHARMA et al., 2016).

A incidência das infecções fúngicas vem aumentando, significativamente, nos últimos anos, sendo *Candida albicans* responsável pela maioria das infecções invasivas, com incidência global estimada em 750.000 casos/ano, e com um índice de mortalidade superior a 40% (BEN-AMI, 2018).

O aumento no número de pacientes susceptíveis, como: pacientes submetidos a tratamentos imunossupressivos; pessoas que fazem uso prolongado e/ou abusivo de antibióticos de amplo espectro, de pessoas que usam de cateteres e sondas, ou ainda o crescimento das cirurgias vasculares, têm favorecido o aumento da prevalência desta infecção com o índice de mortalidade variando entre 40 a 60% mesmo após tratamento (ABRÃO et al., 2010; COLOMBO et al., 2017) Assim, a candidíase é a quarta causa de infecção nosocomial no mundo, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente e a de maior relevância médica, em função da sua prevalência tanto em hospedeiros hígidos, como naqueles com alguma alteração de base ou comprometimento imunitário (BEN-AMI, 2018).

Em geral, infecções fúngicas e as doenças que elas causam são acidentais, pois alguns fungos desenvolveram uma relação comensal com humanos e fazem parte da microbiota nativa, como é o caso das várias espécies de *Candida*, especialmente *Candida albicans*. (KOBAYASHI, 2019).

Nesse contexto, infecção por *Candida albicans*, normalmente, depende de sua capacidade em formar biofilmes, que são comunidades de células que se ligam a superfícies dos tecidos e dos dispositivos médicos implantados (LOHSE et al, 2018). Tratamentos variados

são utilizados para esse tipo de infecção, no entanto, tem sido crescente o número de casos com resistência aos antimicrobianos disponíveis. Dessa forma, a busca de novos medicamentos, originados de plantas, surgem como perspectiva na bioprospecção de novos compostos a serem utilizados em conjunto, ou isoladamente, com os antifúngicos atuais, no controle das infecções ocasionadas por *Candida albicans* e por outras espécies do mesmo gênero (BALUNAS; KINGHORN, 2005; BRANDÃO et al, 2010).

Vismia guianensis, uma planta da família Clusiaceae, apresenta ação antimicrobiana e antifúngica. Essa ação tem sido associada, especialmente, ao látex alaranjado que exsuda da quebra dos galhos e das folhas. Popularmente, essa espécie é utilizada para tratar feridas, ulcerações, afecções de pele, dermatomicoses e herpes, principalmente na região amazônica (CAMELO et al., 2011). Entre os compostos já identificados nas folhas, estão as antraquinonas, flavonóides, xantonas e benzofenonas, sendo as antraquinonas os compostos mais frequentes (GUERRA, 1997; POLITI et al, 2004; BARBOSA et al., 2011; TALA et al, 2013). Essa espécie vegetal apresenta também, alguns outros constituintes farmacologicamente ativos, tais como as vismionas e a ferruginina, que apresentam atividade imunossupressora (GUERRA, 1997), atividade antioxidante (ÁLVAREZ et al, 2008), antibacteriana (OLIVEIRA, 2009) e antifúngica (SOUZA, 2014).

Considerando a grande utilização da espécie vegetal *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy pela população, bem como seus efeitos biológicos já descritos, avaliou-se nesse estudo a atividade anti-*Candida*, verificando a natureza da atividade antifúngica, se fungicida ou fungistática, bem como os efeitos sobre a adesão, formação de biofilmes, na perspectiva de contribuir com dados que possam direcionar a busca de compostos com ação anti-*Candida*.

Assim, a hipótese norteadora do presente estudo foi: *V. guianensis* tem atividade antifúngica e por isso pode controlar o desenvolvimento da infecção e assegurar a sobrevivência na sepse letal ocasionada por *Candida* spp.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecção por *Candida*

As infecções fúngicas são consideradas um grave problema de saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos (OLIVEIRA-SANTOS, 2018). As infecções por *Candida* correspondem a quarta principal causa de infecções nosocomiais (GUZMANA et al., 2011; NETEA et al., 2015; SHARMA et al., 2016; MUTHAMIL et al.,

2018). Além disso, os fungos do gênero *Candida* são responsáveis por 15% das infecções relacionadas aos cuidados em saúde e entre 70 e 90% de todas as infecções fúngicas invasivas, as quais, frequentemente, evoluem para casos fatais, resultando em sepse e choque séptico. Entre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é a uma das principais responsáveis por todos os tipos de candidíase, possivelmente porque *C. albicans* é uma das poucas espécies fúngicas que crescem bem a 37 °C, enquanto a maioria dos fungos cresce melhor entre 20 e 30 °C. Está entre as espécies fúngicas mais prevalentes na microbiota humana, pois coloniza, de modo assintomático, indivíduos saudáveis e assim vive em equilíbrio com o seu hospedeiro (LOHSE et al., 2017; MUTHAMIL et al., 2018; GULATI et al., 2018).

Normalmente, *C. albicans* pode ser encontrada em várias partes do corpo, sendo mais frequente na mucosa vaginal, cavidade oral, trato gastrointestinal e urinário. Entretanto, a quebra das barreiras, físicas ou imunológicas, pode resultar em infecção oportunista, generalizada, patogênica e altamente resistente a antibioticoterapia disponível no mercado, levando a proliferação do fungo e ao aparecimento de sinais e sintomas da infecção, entre os quais se incluem: placas brancas na boca, garganta e língua, dor e ardor ao urinar e corrimento branco e espesso, entre outros (LOHSE et al., 2018).

Nos últimos anos, a prevalência da infecção por *C. albicans* vem aumentando, em virtude do número crescente de pacientes que fazem uso de drogas imunossupressoras; antibióticos de amplo espectro, por longos períodos, ou de forma abusiva. Também devido ao aumento no número de pacientes infectados pelo vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e de pessoas que têm dispositivos implantados, como cateteres e sondas. Todas essas situações têm contribuindo para o aumento da resistência fúngica e do número de casos com infecções sistêmicas, além do aumento na mortalidade associada a essas infecções (ABRÃO et al., 2010; ROMANI, 2011; UNDERHILL; ILIEV, 2014, BEN-AMI, 2018; GULATI et al., 2018; SHARMA et al., 2019).

No Brasil, de acordo com a Rede Brasileira de Estudo de Infecções Fúngicas, *C.albicans* foi responsável por 41% das infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (NUCCI et al., 2010; SARDI et al., 2013) e a infecção sistêmica foi associada às elevadas taxas de morbi-mortalidade, sobretudo entre os pacientes imunocomprometidos, como ocorre em outros países no mundo (SHARMA et al., 2016; SHARMA et al., 2019). A proporção de pacientes com infecções graves ocasionadas por *C. albicans* que evoluem para sepse, chega a 30% e para choque séptico 38%, principalmente em pacientes críticos, como aqueles internados em UTIs (GUZMANA et al., 2011; QUENOT et al., 2013).

A variabilidade das espécies é um grande desafio para o controle da infecção, pois há uma considerável variabilidade geográfica, de centro para centro, e mesmo, de unidade para unidade, quanto a prevalência de cepas patogênicas de *Candida*. De fato, a candidíase não é uma, mas várias doenças, com cada espécie de *Candida* e cada linhagem, apresentando suas próprias características em relação ao tropismo tecidual, propensão a causar doença invasiva, virulência e susceptibilidade antifúngica (SHARMA et al., 2016; COLOMBO et al., 2013). Por isso, o conhecimento prático da epidemiologia local e das taxas de resistência antifúngica é fundamental para a tomada de decisões terapêuticas a ser adotada, enquanto se aguarda a cultura e dados de suscetibilidade (PAPPAS et al., 2016).

Os fungos podem induzir um amplo espectro de respostas no hospedeiro o que pode resultar em infecções graves e sepse (DELALOYE; CALANDRA, 2014), em especial, nos pacientes com defeitos congênitos ou adquiridos na imunidade celular, os quais são mais susceptíveis a candidíase mucocutânea. Já as infecções sistêmicas têm sido mais comumente associadas à neutropenia ou aos defeitos congênitos que afetam a função dos neutrófilos (ASHMAN et al., 2004). Além disso, defeitos genéticos na via da Interleucina 17 (IL-17) têm sido associados a candidíase mucocutânea crônica (CMC), uma condição caracterizada por infecções recorrentes ou persistentes da pele, unhas, mucosa genital e oral (TRAUTWEIN-WEIDNER et al., 2015).

Nesse contexto, o local da infecção, seja a candidíase oral, vulvovaginal, ou candidíase invasiva quando alcança a corrente sanguínea afeta órgãos vitais do organismo e pode ser fator determinante na evolução dessa infecção (MUTHAMIL et al., 2018). As principais espécies de *Candida*, associadas as doenças incluem *Candida albicans* e outras espécies, classificadas coletivamente como *Candida* não-albicans (SHIGEMURA et al., 2012).

Existem pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* que causam doenças humanas, mas 90% das doenças invasivas são causadas pelas mais comuns, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*. Cada um destes microrganismos tem mecanismos individuais que lhes asseguram potencial de virulência específico, diferenças quanto a susceptibilidade antifúngica e quanto a epidemiologia. Entretanto, no global todas essas infecções são geralmente referidas como candidíase invasiva (SENEVIRATNE et al., 2016).

Segundo Pappas et al., (2016), a infecção invasiva ocasionada pelas diferentes espécies de *Candida* é amplamente reconhecida como uma das principais causas de morbimortalidade nos ambientes hospitalares, em grande parte associada ao progresso médico, pois a infecção sistêmica por *Candida*, nessas unidades, torna-se facilmente fatal, não somente nos

pacientes imunocomprometidos, tais como pacientes com diabetes e AIDS, mas também naqueles com o sistema imune normal (SHIGEMURA et al., 2012).

As espécies de *Candida* são classificadas como leveduras e fazem parte da divisão de Ascomycota. *C. albicans* é um fungo polimórfico, que cresce como levedura unicelular, ou nas formas de pseudo-hifas multicelulares ou hifa de filamentosas. A transformação de leveduras para a hifa é um importante fator de virulência de *C. albicans* tanto nas avaliações *in vitro*, como nas *in vivo* (GU et al., 2020).

2.1.1 Fatores de virulência de *Candida* spp.

As espécies de *Candida* spp. apresentam grande adaptabilidade, pois são capazes de crescer em ambientes com diferentes exigências quanto à disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, osmolaridade e quantidade de oxigênio (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018). Esses microrganismos expressam vários fatores e desenvolveram mecanismos que permitem a colonização ou infecção do hospedeiro, incluindo uma série de estratégias específicas voltadas a evadir dos vários mecanismos imunológicos, sobretudo em indivíduos susceptíveis, pois *C. albicans*, microrganismo comensal em humanos, pode, por exemplo, estimular tanto respostas regulatórias como inflamatórias (GU et al., 2020).

As infecções por *Candida* spp. são favorecidas pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro e sua evolução está relacionada aos fatores de virulência, os quais aumentam a eficácia fúngica em estabelecer infecções nas mucosas ou em causar infecções sistêmicas, dependendo da natureza das condições clínicas e imunológicas do hospedeiro (SHARMA et al., 2019).

A patogenicidade das espécies de *Candida* spp. pode ser atribuída aos seus vários fatores de virulência, os quais incluem: aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas entre outros. No caso de infecções por *Candida albicans* incluem-se, ainda, entre os mecanismos de escape a expressão de invasinas, adesinas e candidalinas; secreção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilmes resistentes a drogas. Há ainda os produtos dos genes da aspartil-proteinase (SAP) e da fosfolipase (PLB) (Figura 1). Em conjunto, essas estratégias representam um grande risco para a saúde humana. (SARDI et al., 2012; SHARMA et al., 2019).

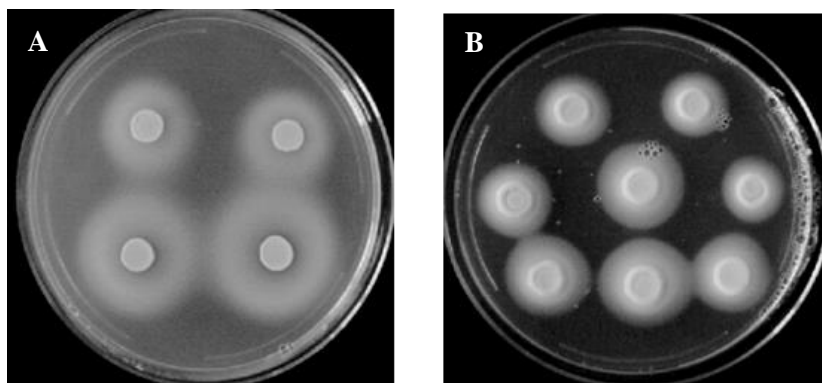


Figura 1. Aspecto macroscópico da secreção das exoenzimas: proteinase (A) e fosfolipase (B) (MARDEGAN et al., 2006).

As espécies de *Candida*, em especial *Candida albicans*, após produzirem exoenzimas aumentam a capacidade de estabelecer colônias e/ou infecção, inibindo a fagocitose de macrófagos e neutrófilos e induzindo reações inflamatórias, além de degradarem imunoglobulinas e outras proteínas presentes na matriz extracelular, atividades que, em conjunto, facilitam a adesão e invasão (RYAN; RAY, 2016 - Figura 2).

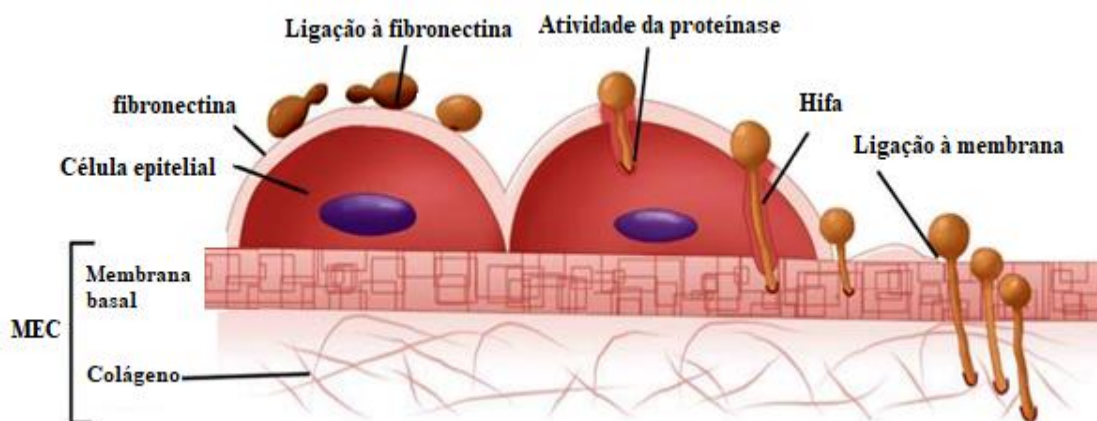


Figura 2. Transição de *Candida albicans* de microrganismo comensal para a forma virulenta e subsequente infecção, adaptado de Ryan; Ray (2016).

Nos seres humanos grande parte do ferro está armazenada intracelularmente como ferritina, ou encontra-se complexado ao grupamento heme. Há também uma pequena quantidade de ferro extracelular ligada às proteínas de transporte de ferro, a transferrina e a lactoferrina. Assim, outro importante fator de virulência é a aquisição do ferro, um nutriente essencial ao desenvolvimento do organismo humano e, também de muitos microrganismos.

Muitas espécies do gênero *Candida* produzem hemolisina para captar ferro, o que resulta na destruição de hemácias do hospedeiro. Assim, a produção da hemolisina, seguida da aquisição de ferro, facilita a invasão e o desenvolvimento da candidíase disseminada (SARDI et al., 2012; SENEVIRATNE et al., 2016). *Candida* sp. capta ferro do hospedeiro para estabelecer o processo infeccioso, esse processo resulta em carência de ferro no organismo, afetando o funcionamento do sistema imune e, por isso, contribui para o aparecimento e o agravamento de algumas infecções (MANNNS et al., 1994; OUFU et al., 2020). Esse fator de virulência associado a produção de proteinases e formação de biofilme, estão associadas às elevadas taxas de mortalidade em decorrência das candidíases sistêmicas (MUTHAMIL et al., 2018).

2.1.2 Formação de Biofilmes

Muitas das infecções, associadas ou adquiridas nos hospitais, estão relacionadas à formação de biofilmes, que se formam tanto nas superfícies dos hospedeiros, como em diversas superfícies abióticas, incluindo cateteres e outros dispositivos. O biofilme é uma comunidade de microrganismos, altamente estruturados, composto por diferentes tipos de células fungicas incluindo: leveduras; pseudo-hifas e hifas verdadeiras, todas contidas numa matriz extracelular (Figura 3) (ROSCETTO et al., 2018; GULATI et al., 2018). Essa matriz própria é composta por polissacarídeos, lipídios, proteínas e DNA extracelular (MUTHAMIL et al., 2018).

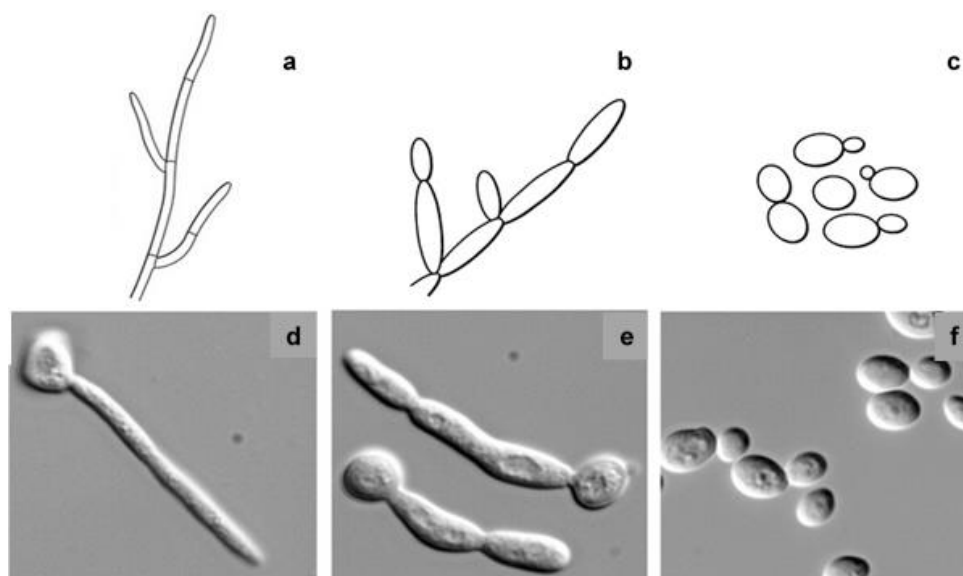


Figura 3. Variação morfológica de *Candida albicans*: hifas (a-d), pseudo-hifas (b-e) e blastoconídios (c-f) (adaptado de THOMPSON et al., 2001).

A capacidade de formar biofilmes aumenta o poder de resistência dos fungos aos mecanismos imunológicos e a ação de antifúngicos, ou seja, uma vez formado, estes biofilmes servem como reservatórios para gerar infecções disseminadas. Os biofilmes de *Candida*

albicans se dividem em quatro estágios: (i) adsorção; (ii) aderência a uma superfície, etapa que consiste na primeira etapa do processo patogênico; (iii) proliferação na superfície; (iv) maturação em biofilme complexo, e (v) dispersão de células do biofilme para semear novos nichos, como mostra a Figura 4 (SARDI et al., 2012; RIBEIRO, 2016; LOHSE et al., 2017).

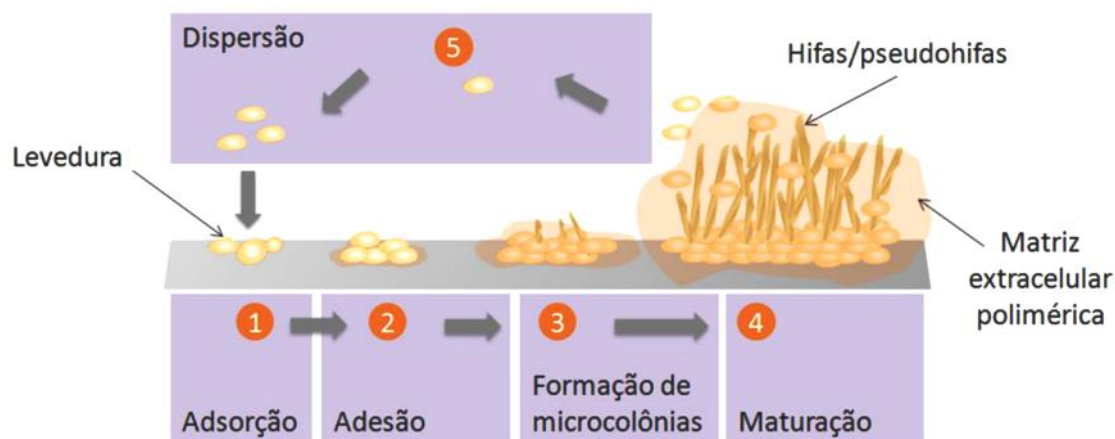


Figura 4. Etapas de formação do biofilme de leveduras com base na descrição de Harding et al. (2009) (RIBEIRO, 2016).

Ao contrário dos organismos planctônicos, as células envolvidas na matriz dos biofilmes exibem uma resistência aumentada, em cerca de 1.000 vezes, para os agentes antifúngicos (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018). A transição de levedura para hifas também tem papel significativo na invasão tecidual e evasão de fagocitose, pois permite a colonização de um grande espectro de ambientes, com condições altamente variáveis, porque envolve a expressão de genes hifa-específicos (GULATI et al., 2018; DARTEVELLE et al., 2018).

Os ensaios *in vitro* têm sido utilizados como etapa inicial para identificar compostos que inibem a formação de biofilme, antes mesmo desses compostos serem testados quanto à toxicidade em culturas celulares e em modelos *in vivo*. Portanto, os ensaios *in vitro* para testar compostos antifúngicos sobre a formação de biofilmes permitem uma triagem rápida, e de alto rendimento, a partir de bibliotecas de linhagens padrão ou linhagens clínicas das espécies de *Candida*. Embora existam variações metodológicas entre os diferentes ensaios de biofilme *in vitro*, de forma geral, todos envolvem etapas semelhantes: aderência das células a uma superfície, com lavagem para remover células fracamente aderidas, seguido pelo crescimento, que pode variar dependendo do ensaio (LOHSE et al., 2017).

Segundo Gulati et al., (2018) há protocolos que permitem observar os biofilmes no microscópio, enquanto outros usam peso seco para medir a massa do biofilme ou a avaliação por densidade óptica. Já a microscopia de varredura a laser (CSLM) (Figura 5) examina a

arquitetura de um biofilme, ou pelo menos, as partes do biofilme (DARTEVELLE et al., 2018, NGUYEN et al., 2018).

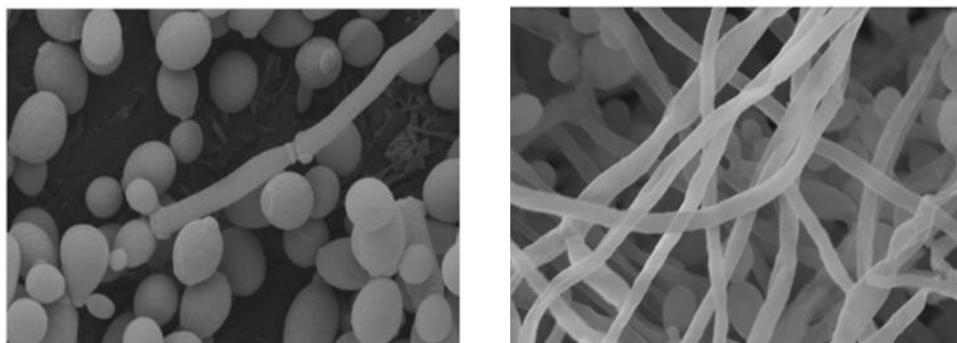


Figura 5. Visualização dos biofilmes em microscopia eletrônica: Biofilme em formação (A) e Biofilme formado (B) Fonte: (TSUTSUMI-ARAI et al., 2019).

Os ensaios colorimétricos avaliam a biomassa, ou peso seco do biofilme (SENEVIRATNE et al., 2016; ROSCETTO et al., 2018). Outros ensaios avaliam a formação de biofilme com base na viabilidade celular, usando marcadores colorimétricos como XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazolium] (SILVA et al., 2016, GULATI et al., 2018) ou MTT [Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio] (RODRIGUES et al., 2014, SANTANA et al., 2013) ou ainda, por a incorporação de cristal violeta ao biofilme e determinação do número de células dispersas, a partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) (PIERCE et al., 2008; DEMITTO et al., 2012). Outros ensaios avaliam o crescimento em câmara microfluídica (JIN et al., 2003, COSTA et al., 2017), ligação ativa a uma superfície abiótica (COSTA et al., 2017), ou a capacidade de drogas em penetrar no biofilme (FOKOU et al., 2014).

Todas essas técnicas são utilizadas para verificar a atividade farmacológica de agentes com potencial ação antifúngica, a partir da observação dos efeitos sobre a inibição ou sobre o crescimento de biofilmes, verificação importante na prospecção de novas drogas a serem incorporadas ao tratamento farmacológico, incluindo compostos isolados ou não.

2.1.2 Tratamento Farmacológico

O tratamento das infecções por *Candida sp*, no geral, e *C. albicans*, em especial, incluem antifúngicos azóis, tais como, Fluconazol, Cetoconal, Itraconazol, Variconazol e Posaconazol, além de outros fármacos como a Anfotericina B, Nistatina, Griseofulvina e Caspofungina, com diferentes mecanismos de ação sobre os fungos, pois podem atuar na

membrana, no núcleo ou na parede celular incluindo ação sobre o ergosterol, como mostra a Figura 6 (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; BEN-AMI, 2018, MUTHAMIL et al., 2018).

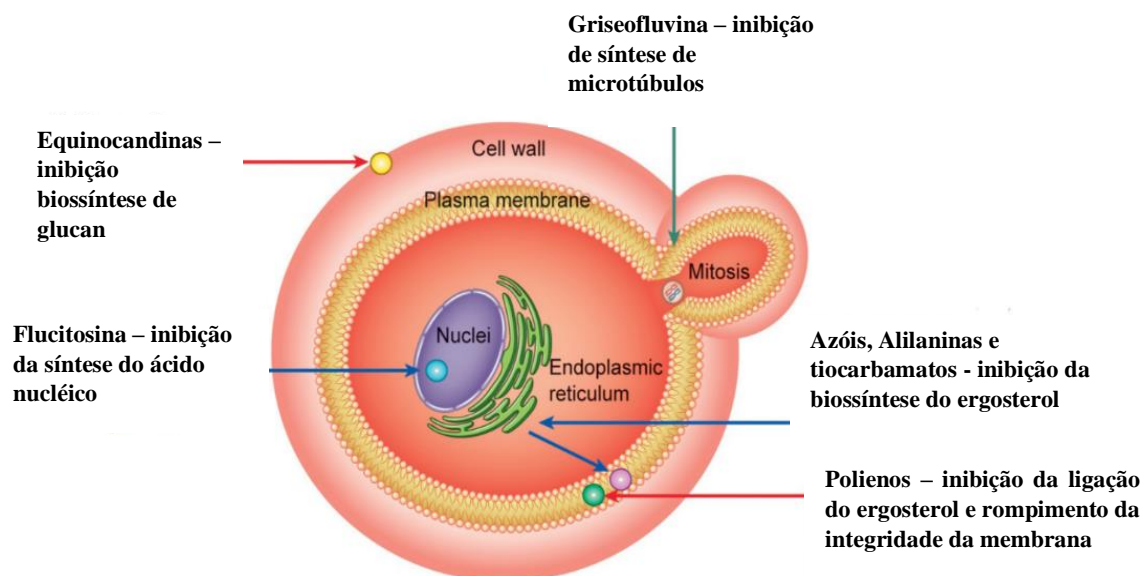


Figura 6. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos tradicionais e seus locais de ação (OLIVEIRA-SANTOS et al, 2018).

Os azóis, como o Fluconazol, inibem a síntese do ergosterol no retículo endoplasmático dos fungos. Interferem na enzima lanosterol 14- α -demetilase, envolvida na transformação de lanosterol em ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática dos fungos. Já os polienos, como a Anfotericina B, ligam-se ao ergosterol e causam a ruptura estrutural da membrana, com conseqüente o extravasamento de constituintes intracelulares, o que resulta na morte desses microrganismos. A Flucitosina inibe a enzima timidilato-sintetase interferindo no DNA. As equinocandinas inibem a (1,3) β -D-glucan-sintase, enzima que produz 1,3- β -D-glucan, carboidrato presente na parede celular fúngica. Alilaminas e tiocarbamatos inibem a enzima esqualeno-epoxidase, que participa da síntese de ergosterol. A Griseofulvína interrompe a produção de microtúbulos, inibindo assim a mitose fúngica (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; BEN-AMI, 2018).

As células fúngicas desenvolveram diferentes mecanismos de resistência às múltiplas drogas disponíveis no mercado (Figura 7), Embora várias classes de medicamentos estejam disponíveis, a terapia antifúngica tem eficácia limitada devido à alta resistência a múltiplas drogas, altos custos com a saúde, toxicidade e efeitos colaterais desagradáveis (SHARMA et al., 2019), incluindo:

(a) alteração do alvo enzimático, o que afeta a expressão dos genes que codificam as enzimas da via biossintética do ergosterol - levando a uma fraca ligação de drogas tóxicas aos locais alvo na enzima afetando a ação de drogas como a flucitosina, equinocandinas e azóis;

(b) super-expressão das proteínas do fármaco que levam ao aumento do efluxo, interferindo na ação dos azóis;

(c) alterações nas propriedades biológicas e/ou na composição da membrana, o que afeta a importação normal de medicamentos (flucitosina);

(d) redução de esteróis na membrana plasmática (polienos).

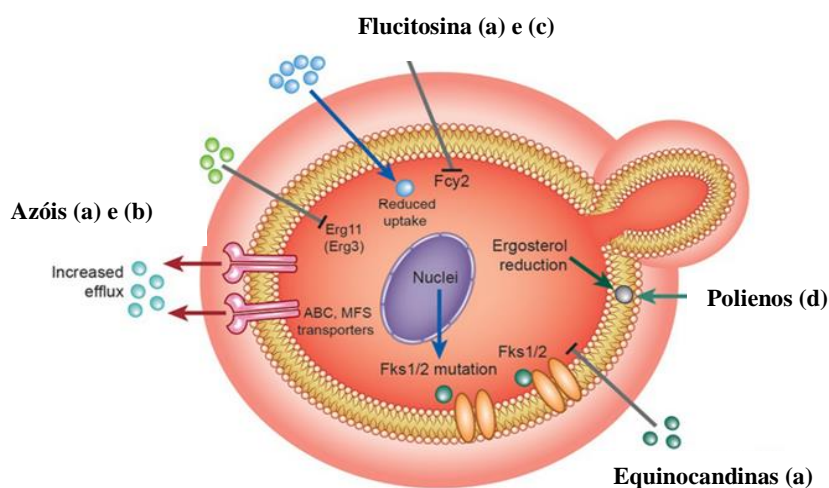


Figura 7. Diferentes mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos tradicionais: (a) alteração do alvo enzimático; (b) aumento do efluxo fármaco, (c) alterações composição da membrana e (d) redução de esteróis na membrana plasmática (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018).

O recente surgimento de espécies de *Candida* multirresistentes aos fármacos disponíveis complica a seleção de terapia antifúngica, pois ainda não há dados prospectivos para guiar essas terapias (PAPPAS et al., 2016). Vários são os mecanismos que envolvem mutações ou modificações nos alvos genéticos de ligação desses fármacos, tais como: mutação nos fatores de transcrição, principalmente CDR1 (*Candida Drug Resistance* gene 1) e CDR2 (*Candida Drug Resistance* gene 2), além do MDR1 (*Multidrug Resistance* no gene 1), responsável pela bomba de efluxo. Há também a mutação ou superexpressão do gene ERG11 (*Ergosterol biosynthesis* gene 11) e ERG5 (*Ergosterol biosynthesis* gene 5) ou ERG3 (*Ergosterol biosynthesis* gene 3), envolvidos na biossintese do ergosterol. O ERG3, também conhecido como citocromo P450 lanosterol 14 α -desmetilase (CYP450_{14DM} ou CYP51), ao sofrer a mutação pode evitar que ocorra a ligação dos azóis a essa enzima, que é responsável pela biossintese do ergosterol (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018).

As enzimas do citocromo P450 (CYP450), pertencem a uma superfamília ampla e diversificada de heme proteínas, encontradas em todos os indivíduos vivos, tanto eucariontes quanto procariontes, que possuem a função de transferir elétrons no meio biológico, de oxidar substâncias tornando-as mais polares e também estão envolvidas na síntese e no metabolismo de drogas, toxinas e componentes celulares. Entre os substratos de enzimas do citocromo P450 encontram-se os esteroides, biomoléculas que atuam na manutenção das propriedades das membranas celulares dos organismos vivos. Os esteroides, classe de moléculas indispensável à manutenção da vida, são derivados do isopreno, e atuam na membrana celular modulando sua fluidez, integridade e permeabilidade. A biossíntese desses esteroides difere significativamente entre os Reinos, sendo o óxido de esqualeno um intermediário comum a todos os eucariotos (Figura 8) (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

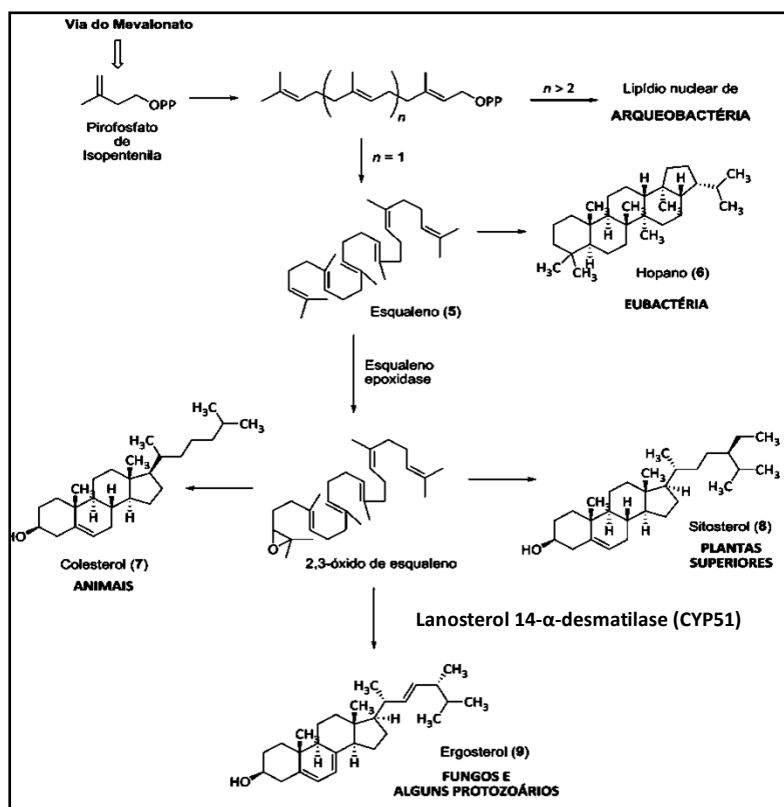


Figura 8. Biossíntese comparativa de esteroides estruturais de membrana de diferentes classes de seres vivos (SUETH-SANTIAGO, 2015).

A partir óxido de esqualeno, há uma divergência de rotas biossintéticas que dão origem a diferentes esteroides: no reino animal, o principal esteroide é o colesterol. Nos fungos, o principal esteroide é o ergosterol e nas plantas, o sitosterol. Assim, no caso dos fungos, substâncias capazes de inibir a enzima CYP51 ou CYP450_{14DM}, têm uma vantagem como alvo

na bioprospecção de drogas com ação antifúngica, já que esses alvos podem atuar na conversão para o ergosterol (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

O uso excessivo de agentes antifúngicos está listado entre os principais motivos para o aumento da resistência de fungos (DARTEVELLE et al., 2018). Portanto, o desenvolvimento de novas moléculas alternativas aos agentes antifúngicos convencionais constitui, uma possibilidade de reduzir esse problema de saúde pública.

As espécies vegetais ainda representam as maiores fontes de substâncias bioativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos, tais como esteroides, terpenóides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, triterpenos, polifenóis e saponinas. Vale lembrar que essa é, talvez, a fonte mais antiga de medicamentos para o homem.

A busca de medicamentos originados de plantas necessita de abordagens multidisciplinares, pois engloba diversos conhecimentos que vão desde aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; BRANDÃO et al., 2010). A utilização popular das plantas é, geralmente, um fator decisivo na pesquisa de novas substâncias ativas, o que tem resultado, ao longo do tempo, no desenvolvimento de vários medicamentos (ALVAREZ et al., 2008).

2.2 Plantas com atividade anti-*Candida*

A busca por alternativas terapêuticas para tratamento de infecções ocasionadas por fungos tem merecido atenção nos últimos anos e as plantas e suas moléculas bioativas surgem como promissoras formas de reduzir a resistência de fungos do gênero *Candida* (GIORDANI et al., 2015).

Alves et al (2009) mostraram que várias plantas de uso medicinal, incluindo a aroeira do sertão, malva e goiabeira, apresentavam ação sobre biofilme dental e sobre a candidíase oral. Jovito (2016) mostrou, a partir de ensaios *in vitro*, que extrato etanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (baraúna) apresentava atividade anti-biofilme e era citotóxico para *Candida albicans* (ATCC 60193); *Candida krusei* (ATCC 31135) e *Candida tropicalis* (ATCC 750), mesmo não apresentando toxicidade para as células humanas não infectadas.

No estudo de revisão realizado por Freire et al (2016) sobre candidíase oral, as plantas mais estudadas, no período de levantamento realizado entre 2000 e 2016, foram *Melaleuca atnerfolia* (árvore-de-chá), *Allium sativum* (alho) e *Ricinus communis* (mamona), seguidas *Punica granatum* (romã), *Uncaria tomentosa* (unha de gato) e *Cymbopogon citratus* (Capim-santo), sendo que todas apresentaram significativa atividade antifúngica *in vitro*.

Outro estudo realizado com o extrato das folhas de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) mostraram que o extrato, comercialmente adquirido, apresentou ação anti- *Candida albicans* e algumas bactérias, quando utilizado na concentração de 200mg/mL. Os resultados mostraram redução no número de unidades formadoras de colônias e, ainda, que o extrato foi efetivo tanto na redução do biofilme mono, como no polimicrobiano, mantendo a viabilidade celular acima de 50% (OLIVEIRA et al., 2017).

Os resultados obtidos por Rodrigues et al., (2014), mostraram que 74 extratos apresentaram CIM entre 0,06 e 1mg/mL, quando testado quanto ação anti-*Candida albicans* (ATCC 11006), *Candida glabrata* (2001) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Nesse estudo foram avaliados extratos de 28 plantas da floresta amazônica, preparados com solventes de diferentes polaridades, sobretudo extratos aquosos, diclorometano e metanólico contra as espécies com destaque para as espécies das famílias Arecaceae, Apocynaceae, Salicaceae e Utiaceae.

Vários outros autores investigaram a ação anti-*Candida* de compostos de origem vegetal isolado incluindo: Geraniol - álcool presente no óleo essencial de algumas plantas (SHARMA et al., 2016); Berberine - alcaloide isolado de raízes, rizomas e cascas (SILVA et al., 2016); Licochalcone-A - polifenol encontrado em raízes de licorice *Glycyrrhiza sp* (SELEEM et al., 2016); Acido quínico - derivado *Syzygium cumini*, sozinho e associado (sinergismo) ao ácido undecanoico (MUTHAMIL et al., 2018) e o β -citronelol - monoterpênóide presente no óleo essencial de algumas espécies (SHARMA et al., 2019). Na maioria dos estudos a atividade antifúngica, bem como a descrição dos prováveis mecanismos de ação, incluíram a redução do biofilme em formação ou pré-formado e a inibição das enzimas proteinase e hemolisina, todos considerados fatores de virulência.

Alguns levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos sobre plantas de uso medicinal com atividade antifúngica, especialmente, anti-*Candida*, indicam que as diferentes partes botânicas de *V. guianensis*, são usadas popularmente para tratar feridas, dermatomicoses, coceiras como cicatrizante, purgativo. Estudos in vitro e in vivo mostraram que essa espécie apresenta ação anti-leishmaniose, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, além do uso etnoveterinário (RITTER et al., 2012; SANTOS et al., 2012; BIESKI et al., 2015; MANS et al., 2016; LAGO et al., 2016; ODONNE et al., 2017; REIS, 2017; RICARDO et al., 2017; ROJAS et al., 2019; VIZA JR et al., 2019). Em conjunto esses dados mostram o potencial que algumas plantas possuem como possível alternativa para produção de drogas com efeito anti-*Candida*, incluindo entre elas *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy.

2.3 *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy

O gênero *Vismia* compreende 52 espécies, com ampla distribuição nas Américas Central e Sul. Em relação a distribuição geográfica no Brasil, espécies desse gênero pode ser encontradas em localizadas em estados das várias regiões geográficas do país, tais como: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Goiás, Mato Grosso, Espírito Santo. Também está presente em diferentes domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, conforme mostra a Figura 9 (RODRIGUES, 2013; NOBRE et al, 2015; VOGEL et al, 2020).

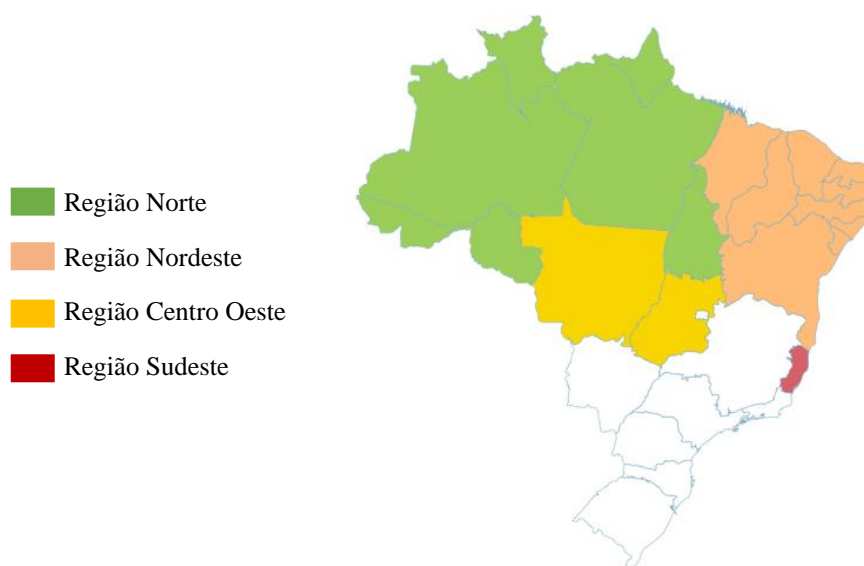


Figura 9. Distribuição geográfica de espécies do gênero *Vismia* (VOGEL et al., 2020).

Os membros do gênero *Vismia* são reconhecidas fontes de compostos fenólicos incluindo: antronas preniladas, antraquinonas, xantonas e benzofenonas (TALA et al., 2013). Alguns metabólitos secundários já foram isolados e caracterizados em espécies pertencentes a esse gênero incluindo: flavonoides, flavonóis, xantonas, antronas, antraquinonas, benzofenonas, lignanas, esteroides, monoterpênicos e triterpênicos (BARBOSA et al., 2013). Os metabólitos mais preponderantes são as antraquinonas, classe de substância mais isolada do gênero, representadas principalmente pelas vismiaquinonas (A e B), as quais geralmente são coloridas e se caracterizam por serem pós com granulometria muito fina (VIZCAYA et al., 2011; RODRIGUES, 2013).

Entre as espécies mais estudadas do gênero *Vismia* destacam-se: *Vismia laurentii*, *V. orientalis* Engl, *V. baccifera* (L.) Planch; Triana, *V. jefensis* N. Robson, *V. macrophylla*

Kunth, *V. latifolia* Choisy (syn. *Hypericum latifolium* Aubl.) (VIZCAYA et al., 2012; RODRIGUES, 2013), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes espécies de *Vismia* conforme constituintes químicos identificados (RODRIGUES, 2013).

| Constituinte químico | Espécie | Referencias |
|-------------------------------|---|--|
| Antraquinona | <i>V.guianensis</i> syn <i>V. reichardtiana</i> | Gonçalves; Mors, 1981; Guerra, 1997; Epifano et al., 2007, Tala et al., 2013 |
| | <i>V. japurensis</i> | Miraglia et al., 1981 |
| | <i>V. martiana</i> | Nagem; Faria de Jesus, 1990 |
| | <i>V.parviflora</i> | Nagem; Faustino., 1997 |
| | <i>V.baccifera</i> | Hussein et al., 2003 |
| | <i>V. laurentii</i> | Nguemeving et al., 2006 |
| Antronas | <i>V.baccifera</i> var <i>ferruginea</i> | Delle Monache et al., 1979 |
| | <i>V. decipiens</i> | Gonzales et al., 1980 |
| | <i>Psopernun corimbiferum</i> | Delle Monache et al., 1985 |
| | <i>Psopernun febrifugum</i> | Botta et al., 1983 |
| | <i>V. laurentii</i> | Nguemeving et al., 2006 |
| | <i>V. guaramirangae</i> | Delle Monache et al., 1983 |
| | <i>V.guianensis</i> syn <i>V. reichardtiana</i> | Botta et al., 1986 |
| | <i>V.baccifera</i> | Hussein et al, 2003 |
| Antranoides prenilados | <i>V.baccifera</i> var <i>ferruginea</i> | Delle Monache et al., 1979 |
| | <i>V. decipiens</i> | Gonzales et al., 1980 |
| Benzofenonas | <i>V. macrophyla</i> | Hussein et al., 2003 |
| | <i>V.guianensis</i> syn <i>V. reichardtiana</i> | Botta et al., 1986 |
| | <i>V. decipiens</i> | Gonzales et al., 1980 |
| Flavonoides | <i>V. guaramirangae</i> | Camelle et al., 1983 |
| | <i>V cayennensis</i> | Euller et al., 1999 |
| | <i>V.guianensis</i> syn <i>V. reichardtiana</i> | Seo et al, 2000 |
| | <i>V. laurentii</i> | Nguemeving et al., 2006 |

V. guianensis syn *V. reichardtiana* conhecida como árvore-da-febre, goma-lacre, pau-de-lacre, lacre-branco, têm importância econômica devido ao látex amarelo-alaranjado, ou goma resinal, que exsuda do seu caule. Esse látex era anteriormente utilizado para fechar correspondências, daí o nome popular da espécie “lacre”. Atualmente o látex é utilizado para obtenção de tintas e esmaltes (BITTRICH et al. 2015).

Dados etnobotânicos mostram que o látex também tem sido utilizado para o tratamento de feridas, herpes e de infecções fúngicas da pele, por algumas tribos indígenas e pela população dos Estados do Amazonas, Pará e Maranhão. Além do látex, as folhas e o caule de *V. guianensis* tem sido usado no tratamento de dermatoses, feridas, ulcerações na pele, e ainda, como laxativo, tônico, antipirético e antirreumático (CAMELO, 2011; RODRIGUES,

2013; BITTRICH et al. 2015). A Figura 10 mostra a distribuição *V. guianensis* no estado do Maranhão, segundo registro realizado nacional no banco de dados da rede *speciesLink*.

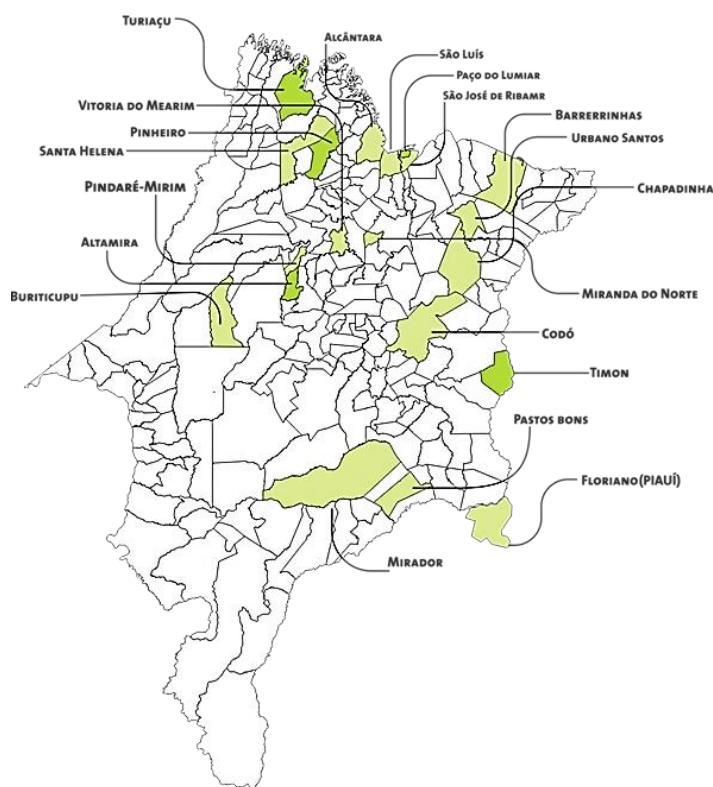


Figura 10. Distribuição geográfica da espécie *Vismia guianensis* conforme registro na rede de banco de dados *speciesLink* (Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=p>). Mapa de autoria própria.

V. guianensis caracteriza-se por apresentar frutos marrons quando jovens e verdes quando maduros. As folhas apresentam colorações diferentes na parte superior e inferior (Figura 11). Tem como sinônimos relevantes: *Hypericum guianense* Aubl., *Vismia guianensis* var. *acuminata* (Lam.) M. E. Berg, *Vismia acuminata* (Lam.) Pers., *Vismia caparosa* Kunth, *Vismia ferruginea* Kunth, *Vismia reichardtiana* (Kuntze) Ewan. (BITTRICH et al. 2015; RODRIGUES, 2013). Apresenta a seguinte classificação botânica:

Família: Clusiaceae

Subfamília: Hypericoideae

Tribo: Vismieae

Gênero: *Vismia*

Espécie: *Vismia guianensis*



Figura 11. *Vismia guianensis* com suas flores (A) e folhas (B).

Segundo Politi et al., (2004) estão presentes quatro classes de metabólitos secundários como componentes principais nas folhas da *V. guianensis*: antraquinonas, flavonóides, xantonas e benzofenonas, sendo que as antraquinonas, cujo esqueleto base é a emodina: 1,3,8-trihidroxi-6- metil-antraquinona, são os compostos predominantes, além de uma vismiona (GUERRA, 1997; POLITI et al., 2004) e ferruginina A (GUERRA, 1997), constituintes esses considerados também como parte da estratégia de defesa da planta (CAMELO, 2011).

V. guianensis tem propriedades farmacológicas já descritas as quais incluem: atividade imunossupressora (GUERRA, 1997), antioxidante e anti-inflamatória (GUERRA, 1997; ÁLVAREZ et al., 2008; NOBRE et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017), antimicrobiana (OLIVEIRA, 2009; VASCONCELOS et al., 2011) e antifúngica (OLIVEIRA, 2009; RODRIGUES, 2013; SOUZA, 2014; OLIVEIRA et al., 2017).

Entretanto, ainda são escassos os estudos que mostrem como os principais compostos bioativos presentes nas folhas de *V. guianensis* controlam a infecção fúngica por *Candida* spp, bem como são também escassos os estudos que avaliam seu efeito *in vivo*, *in silico* e possíveis mecanismos de ação.

Nesse contexto, a química medicinal busca a descoberta de moléculas bioativas, de reconhecido papel central no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), é uma disciplina com base em química, envolvendo a invenção, a descoberta, o planejamento a

identificação, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos, como por exemplo das plantas de uso medicinal. Além da descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também incorpora os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade. Assim, são desejáveis na bioprospecção de novos compostos bioativos e no desenvolvimento de novas drogas, iniciativas multidisciplinares integradas, empregando alvos moleculares específicos em microrganismos associados a doenças infecciosas, incluindo-se a bioinformática estrutural (GUIDO et al., 2010).

2.4 Bioinformática Estrutural

A convergência de tecnologias genômicas e o desenvolvimento de fármacos planejados contra alvos moleculares específicos resulta em muitas oportunidades para o uso da bioinformática. A bioinformática estrutural tem crescido como método eficaz no desenvolvimento de novas drogas, seja por cristalografia de proteínas, por modelagem molecular, dinâmica molecular ou *docking* e *screening* virtual. Esses métodos possibilitam a construção de modelos com os receptores-alvo, baseados na homologia sequencial e na similaridade estrutural (GUIDO et al., 2010).

O *docking* ou ancoramento molecular está entre as técnicas computacionais disponíveis para o planejamento de fármacos. Esta técnica permite estabelecer as características de interação entre um ligante (micromolécula) e um alvo biológico (biomacromolécula). Deste modo, a técnica pode ser usada no entendimento do metabolismo de fármacos, incluindo as interações do tipo ligante-proteína (OLIVEIRA et al., 2014). Essa técnica também permite investigar as estruturas químicas e as possíveis orientações que determinada molécula pode assumir, no interior do sítio ligante de um biorreceptor, ou na ligação entre duas macromoléculas, P. ex: proteína-proteína ou proteína-DNA (DE OLIVEIRA et al., 2014; SILVA, 2018).

Os protocolos de bioinformática têm sido usados na avaliação e seleção de novas moléculas anti-*C. albicans*, em associação com as investigações *in vitro*. Assim, os cálculos de docagem molecular podem auxiliar na seleção dos compostos mais promissores para o tratamento das candidíases, utilizando, em sua maioria, derivados e análogos das moléculas com conhecido potencial anti-*Candida*. Um dos alvos mais usados inclui os inibidores da enzima 14- α -Desmetilase (CYP51) (DAVOOD, 2013; SANTOS et al, 2018). Essas enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, em

razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e suas consequentes disfunções em humanos.

O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor, no caso das enzimas, permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD) podem ser utilizados, para explorar as propriedades e características dos ligantes bioativos. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode gerar informações úteis no planejamento de novas moléculas bioativas, por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (GUIDO et al., 2010).

Assim, considerando as observações acima elencadas a hipótese condutora desse estudo foi: *Vismia reichardtiana* apresenta ação antimicrobiana e, por isso tem ação anti-*Candida*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRÃO FY, PONTES NP, SILVA MRR, LINO JR RS, SOUZA PHH, SOUZA LKH. Atividade *in vitro* de Fluconazol e itraconazol em biofilme de *Candida albicans*. Trabalho de conclusão de curso do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP). 15p., 2010.
2. AHMAD A, KHAN A, MANZOOR N, KHAN LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis* 2010; 48: 35-41.
3. ÁLVAREZ ER, GIL JHG, JÍMENEZ OJG, POSADA CMA, ROJANO BA, GARCÍA CMP, DURANGO DLR. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae* 2008; 15 (1): 165-172.
4. ALVES PM, QUEIROZ LMG, PEREIRA JV, PEREIRA MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42 (2): 222-224.
5. ASHMAN RB, FARAH CS, WANASAENGSAKUL S, HU Y, PANG G, CLANCY RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunology and Cell Biology* 2004; 82:196-204. doi: 10.1046/j.0818-9641.2004.01217.x
6. BALUNAS MJ, KINGHORN AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science* 2005; 78: 431.
7. BARBOSA MF, JEANNE E, LANTOVOLOLONA R, TALONTSI FM, WABO HK, TANE P, LAATSCH H. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2013; 50: 310–312.
8. BARBOSA WLR, VASCONCELOS F, VIEIRA JMS, SILVA JUNIOR JOC. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)* 2011; 2 (12): 3224-3229.
9. BEN-AMI R. Treatment of invasive candidiasis: a narrative review. *Journal of Fungi* 2018; 4:97.
10. BIESKI IGC, LEONTI M, ARNASON JT, FERRIER J, RAPINSKI M, VIOLANTE IMP, BALOGUN SO, PEREIRA JFCA, FIGUEIREDO RCF, LOPES CRAS, DA SILVA DR, PACINI A, ALBUQUERQUE UP AND MARTINS DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.025>.

11. BITTRICH V, TRAD RJ, CABRAL FN, NASCIMENTO-JR JE, SOUZA VC. 2015. Hypericaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/floradobrasil/FB25586>>. BFG. Growing knowledge: na overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 2015; 66 (4):1085-1113.
12. BRANDÃO HN, DAVID JP, COUTO RD, NASCIMENTO JAP, DAVID JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova* 2010; 33 (6):1359-1369.
13. CAMELO SRP, COSTA RS, RIBEIRO-COSTA RM, BARBOSA WLR, VASCONCELOS F, VIEIRA JM dos S, SILVA JUNIOR JOC. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2011; 2 (12): 224-3229.
14. CAMELO SRP. Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de ciências da saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2011.
15. COLOMBO AL, GARNICA M, CAMARGO LFA, CUNHA CA, BANDEIRA AC, BORGHI D, CAMPOS T, SENNA AL, DIDIER MEV, DIAS VC, NUCCI M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 2013, 51, 38–44. doi: 10.3109/13693786.2012.698024.
16. COLOMBO, A L; ALMEIDA JÚNIOR, JN; SLAVIN, MA; CHEN, SC-A; SORREL, TC. *Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *The Lancet*, 2017; 17: PE344-E356.
17. COSTA MDCMFD, SILVA AGD, SILVA APSD, LIMA VLM, BEZERRA SILVA PC, ROCHA SKLD, NAVARRO DMDAF, CORREIA MTDS, NAPOLEÃO TH, SILVA MVD, PAIVA PMG. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. *Medicines (Basel)*, 2017; 3.
18. DARTEVELLE P, EHLINGER C, ZAET A, BOEHLER C, RABINEAU M, WESTERMANN B, CIANFÉRANI JS, YOUSSEF SH, METZ-BOUTIGUE MH, MARBAN C. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Scientific Reports* 2018; 8: 9235. doi:10.1038/s41598-018-27417
19. DAS SK, SAMANTARAY D, PATRA JK, SAMANTA L, THATOI H. Antidiabetic potential of mangrove plants: a review. *Frontiers in Life Science* 2016; 9 (1):75–88.
20. DAVOOD A, IMAN M. Molecular docking and QSAR study on imidazole derivatives as 14-demethylase inhibitors. *Turkish Journal of Chemistry* 2013; 37: 119 – 133. doi:10.3906/kim-1204-8.

21. DE OLIVEIRA RG, ALENCAR-FILHO EB ; VASCONCELLOS MLA. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. *Química Nova* 2014; 37: 69-73.
22. DELALOYE J and CALANDRA T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*, 2014; 51: 161–169.
23. DEDITTO, F.O., AMARAL, C.R., BIASI, R.P., GUILHERMETTI, E., SVIDZINSKI, T.I.E., BAEZA, L.C. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. Em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* outubro, 2012; (5): 315-321.
24. DORNAS WC, OLIVEIRA TT, RODRIGUES-DAS-DORES RG, SANTOS AF, NAGEM TJ. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009; 19: 488-500.
25. FOKOU JBH, DONGMO PMJ, BOYOM FF, MENKEM EZ, BAKARGNA-VIA I, TSAGUE IFK, KAMDEM MS, ZOLLO PHA and MENUT C. Antioxidant and antifungal activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* from Yaoundé and Dschang (Cameroon). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014; 2: 257-268. 10.13140/2.1.2169.4087.
26. FREIRE JCP, NÓBREGA MTC, OLIVEIRA-JÚNIOR K, FREIRE SCP, DIAS-RIBEIRO E, LIMA EO. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. *Archives of Health Investigation* 2016; 5: 307-310. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v5i6.1790>.
27. GIORDANI, C.; SANTIN, R; CLEFF, M.B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2015, 17: 175-185.
28. GUERRA, R.N.M. Atividade imunossupressora dos frutos de *Vismia reichardtiana* (tese de Doutorado em Ciências – Imunologia). Universidade de São Paulo, 1997.
29. GU ZQ, YAOTSENG K, HUAN YU. *Candida* gut commensalism and inflammatory disease. *Medicine in Microecology* 3 (2020) 1000082. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2020.100008>.
30. GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas *Estudos Avançados*, 2010, 24: 81-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>
31. GULATI M, LOHSE MB, ENNIS CL, GONZALEZ RE, PERRY AM, BAPAT P, VALLE AREVALO A, RODRIGUEZ DL, NOBILE CJ. (2018). *In vitro* culturing and

screening of *Candida albicans* biofilms. Current Protocols in Microbiology, e60. doi: 10.1002/cpmc.60

32. GUZMANA JA, TCHOKONTEB R, SOBELC JD. Septic shock due to candidemia: Outcomes and predictors of shock development. Journal of Clinical and Medical Research 2011;3(2):65-71.

33. JIN Y, YIP HK, SAMARANAYAKE YH, YAU JY, SAMARANAYAKE LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. Journal of Clinical Microbiology; 2003, 41: 2961-7. DOI: 10.1128/jcm.41.7.2961-2967.2003.

34. JOVITO VC. Atividades anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Dissertação apresentada na Universidade Federal da Paraíba: João Pessoa, 2016. 47p.

35. KOBAYASHI GS. Disease Mechanisms of Fungi. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8103/>. Acesso em: 01/07/2019.

36. LAGO JHG, TEZOTO J, YAZBEK PB, CASSAS F, SANTOS JFL, RODRIGUES E. Exudates used as medicine by the “caboclos river-dwellers” of the Unini River, AM, Brazil – classification based in their chemical composition. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2016; 26: 379–384.

37. LOHSE MB, GULATI M, JOHNSON AD, NOBILE CJ. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. Nature Review of Microbiology 2018; 16:19–31.

38. LOHSE MB, GULATI M, VALLE AREVALO A, FISHBURN A, JOHNSON AD, NOBILE CJ. 2017. Assessment and optimizations of *Candida albicans in vitro* biofilm assays. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61: e02749-16. <https://doi.org/10.1128/>

39. MARDEGAN, R. D. C., KLEIN, M. I., GOLVEA, M. B., RODRIGUES, J. A. O., GONÇALVES, R. B., & HÖFLING, J. F. Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. Brazilian Journal of Microbiology, 2006; 37(1), 26-32.

40. MANS DRA, BEERENS T, MAGALI I, SOEKHOE RC, SCHOONE GJ, OEDAIRADJSINGH K, HASRAT JA, VAN DEN BOGAART E, SCHALLIG HDFH. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. Journal of Ethnopharmacology 2016;180: 70–77.

41. MANN S, J. M., MOSSER, D. M., & BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infection and Immunity. 1994; 62 (11): 5154 –5156.
42. MUTHAMIL S, BALASUBRAMANIAM B, BALAMURUGAN K AND PANDIAN SK (2018) Synergistic effect of quinic acid derived from *Syzygium cumini* and undecanoic acid against *Candida* spp. biofilm and virulence. Frontiers Microbiology, 2018, 9: 2835. doi: 10.3389/fmicb.2018.02835.
43. NETEA MG, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, VAN DE VEERDONK FL. Immune defense against *Candida* fungal infections. Nature Review Immunology, 2015,15: 630-42. doi: 10.1038/nri3897. DOI: 10.1038/nri3897.
44. NGUYEN TNY, PADUNGROS P, WONGSRISUPPHAKUL P, SA-ARD-IAM N, MAHANONDA R, MATANGKASOMBUT O, CHOO MK, RITPRAJAK P. Cell wall mannan of *Candida krusei* mediates dendritic cell apoptosis and orchestrates Th17 polarization via TLR-2/MyD88-dependent pathway. Scientific Reports, 2018; 8: 17123.
45. NOBRE VF, ROCHA ML, ALMEIDA DMM, LUCHESE AM, OLIVEIRA ATS, BARBOZA ACM. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico das folhas de *Vismia guianensis* Aubl em camundongos. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, 2015; 14: 69-73.
46. NUCCI M, QUEIROZ-TELLES F, TOBÓN AM, RESTREPO A, COLOMBO AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clinical Infectious Diseases, 2010; 51: 561-70. doi: 10.1086/655683.
47. ODONNE G, HOUËL E, BOURDY G AND STIEN D. Healing leishmaniasis in Amazonia: review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies, Journal of Ethnopharmacology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.048>.
48. OLIVEIRA AH. Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd). Irwin; Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2009.
49. OLIVEIRA JR, DE JESUS D, FIGUEIRA LW, OLIVEIRA FE, SOARES CP, CAMARGO SEA, JORGE AOC, OLIVEIRA LD. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. Experimental Biology and Medicine, 2017; 242: 625-634.

50. OLIVEIRA-SANTOS GC, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, DE SOUSA CARTÁGENES MDS, FILHO AKDB, DO NASCIMENTO FRF, RAMOS RM, PIRES ERB, DE ANDRADE MS, ROCHA FMG and DE ANDRADE MONTEIRO C (2018) *Candida* Infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers Microbiology*, 2018; 9:1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351.
51. OUFİ ZS, MOHAMMED AB, ABDULLA SK. Molecular Identification and Hemolytic Activity of *Candida* Species Isolated from Urine of Healthy and Diabetic Women in Kurdistan of Iraq. *Science Journal of University of Zakho*, March-2020; 8(1), 1-6,
52. PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, SCHUSTER MG, VAZQUEZ JA, WALSH TJ, ZAOUTIS TE, SOBEL JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. IDSA GUIDELINECID. 2016:62 (15 February).
53. PIERCE CG, UPPULURI P, TRISTAN AR, WORMLEY JR FL, MOWAT E, RAMAGE G, LOPEZ-RIBOT JL. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008; 3(9): 1494–1500. doi:10.1038/nprot.2008.141.
54. POLITI M, SANOGO R, NDJOKO K, GUILLET D, WOLFENDER J-L, HOSTETTMANN K, MORELLI I. HPLC-UV/PAD; HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical Analysis*, 2004; 15:355-364.
55. RYAN, K.J.; RAY, C.G. *Sherris Medical Microbiology*. 6 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2016.
56. QUENOT JP, BINQUET C, KARA F, MARTINET O, GANSTER F, NAVELLOU JC, CASTELAIN V, BARRAUD D, COUSSON J, LOUIS G, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Critical Care*, 2013; 17: R65; PMID:23561510; <http://dx.doi.org/10.1186/cc12598>
57. REIS AJ, MATA-SANTOS T, CARRION LL, RODRIGUES K, FENALTI JM, MESQUITA DWO, SCAINI CJ, MARTINS D, MESQUITA ASS, SILVA PEA, NUNEZ CV, RAMOS DF. Avaliação das atividades antifúngica, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção* (2016);6: SUPLEMENTO - II Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Promoção da Saúde. <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v1i1.8188>.

58. REIS CB, DAMASCENO AA. Potencial antimicrobiano in vitro dos metabólitos produzidos pela *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy, frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade do Estado do Amazonas (Amazonas), 2017.
59. RICARDO LM, PAULA-SOUZA J, ANDRADE A, BRANDÃO MGL. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2017; 27: 388–400.
60. RIBEIRO, LH de F. Potencial biotecnológico do óleo essencial de *Vitex gardneriana* na prevenção e controle de biofilmes de espécies de *Candida* de importância clínica. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
61. RITTER RA, MONTEIRO MVB, MONTEIRO FOB, RODRIGUES ST, SOARES ML, SILVA JCR, PALHA MDC, BIONDI GF, RAHAL SC, TOURINHO MM. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Para state, eastern Amazon, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 144: 346–352.
60. RODRIGUES IC. Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy com atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM) 2013.
61. RODRIGUES K, RAMOS DF, CARRION LL, CURSINO LMC, JEFREYS MF, PEDROZA LS, OSÓRIO MIC, OLIVEIRA JL, ANDRADE JIA, FERNANDES CC, NUNEZ CV, SILVA PEA. Antifungal activity of brasilian amazona plants extracts against some species of *Candida* spp. *International Journal of Phytopharmacology*, 2014; 5: 445-453.
62. ROJAS J, BUITRAGO A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. 2019. Capítulo 1. Bioactive Compounds. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3>.
63. ROMANI L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11:275–288.
64. ROSCETTO E, CONTURSI P, VOLLARO A, FUSCO S, NOTOMISTA E, CATANIA MR. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antinmicrobial peptide from a archaeal protein against *Candida* spp. Clinical isolates. *Scientific Reports* 2018; 8:1-11.
65. SANTANA DP, RIBEIRO EL, MENEZES ACS, NAVES PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* mai/ago, 2013;12: 229-233.

66. SANTOS GCO, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, CARTAGENES MSS, FILHO, AKD, NASCIMENTO FRF, RAMOS RM, PIRES ERB, ANDRADE MS, ROCHA FMG MONTEIRO CA. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in Microbiology*, 2018; 9.
67. SANTOS JFL, PAGANI E, RAMOS J, RODRIGUES E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, July 2012; 142 (13):503-515.
68. SARDI JCO, DUQUE C, HOFLING JF, GONÇALVES RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Medical Mycology*, 2012; 50: 467-475.
69. SARDI JCO, SCORZONI L, BERNARDI T, ALMEIDA AMF, MENDES MJS, GIANNINI M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62:10–24.
70. SELEEM D, BENSO B, NOGUTI J, PARDI V, MURATA RM. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of Lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *Plos One*, 2016;10.
71. SENEVIRATNE CJ, RAJAN S, WONG SW, TSANG DNC, LAI CKC, SAMARANAYAKE LP, JIN L. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. *Frontiers in Microbiology*, 2016; 7.
72. SHARMA Y, KHAN LA., MANZOOR N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *Journal de Mycologie Médicale*, 2016; 26: 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.04.004>
73. SHARMA Y, RASTOGI SK, PERWEZ A, RIZVI MA, MANZOOR N. β -citronellol alters cell surface properties of *Candida albicans* to influence pathogenicity related traits. *Medical Mycology*, 2019, 0, 1–14.
74. SHIGEMURA BG, SHANKARAN S, SCHELONKA RL, SAHA S, BENJAMIN JR, DK, SANCHEZ PJ, ADAMS-CHAPMAN THORSEN P, SKOGSTRAND K EHRENKRANZ RA, HOUGAARD DM, GOLDBERG RN, TYSON JE, DAS A, HIGGINS RD, CARLO WA; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Cytokine profiles of preterm neonates with fungal and bacterial sepsis. *Pediatric Research*, 2012; 72: 212-20.

75. SILVA AR. DE; ANDRADE NETO JB, SILVA CR DA, CAMPOS RDS, COSTA SILVA RA, FREITAS DD, NASCIMENTO FBSA DE, ANDRADE LND, SAMPAIO LS GRANGEIRO TB, MAGALHÃES HIF, CAVALCANTI BC, MORAES MO, NOBRE JUNIOR HV. Berberine antifungal activity in Fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016; 60: 3551-3557.
76. SILVA FD, *Docking molecular* para determinação de fármacos com maior afinidade aos alvos candidatos para o tratamento de adenocarcinoma gástrico. Dissertação apresentada às Faculdades Promove: Belo Horizonte, 2018. 81p.
77. SOUZA MSR. Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Dissertação de Mestrado (UFPB/CCS), João Pessoa, 94p. 2014.
78. SUETH-SANTIAGO V, FRANKLIM TN, LOPES ND, LIMA MEF. CYP51: Uma Boa Ideia? *Revista Virtual de Química*, 2015; 7: 539-575.
79. TALA MF, JEANNE E, LANTOVOLOLONA R, TALONTSI FM, WABO HK, TANE P, LAATSCH H. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. / *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013; 50:310–312.
80. THOMPSON D.S., CARLISLE P.L., KADOSH D. (2011) Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 10(9):1173-1182.
81. TRAUTWEIN-WEIDNER K, GLADIATOR A, KIRCHNER FR, BECATTINI S, RÜLICHE T, SALLUSTO F, LANDMANN, SL. (2015) Antigen-Specific Th17 Cells Are Primed by Distinct and Complementary Dendritic Cell Subsets in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathology*, 11: e1005164. doi: 10.1371/journal.ppat.1005164.
82. TSUTSUMI-ARAI, C., TAKAKUSAKI, K., ARAI, Y., TERADA-ITO, C., TAKEBE, Y., IMAMURA, T., & SATOMURA, K. Grapefruit seed extract effectively inhibits the *Candida albicans* biofilms development on polymethyl methacrylate denture-base resin. *PloS one*, 2019; 14(5).
83. UNDERHILL DM, ILIEV ID. The microbiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews in Immunology*, 2014; 14: 405–416. doi:10.1038/nri3684.
84. *Vismia guianensis*. Localizações registradas no *speciesLink*. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>. Acessado em: 07/08/2018.
85. VIZCAYA M, MORALES A, ROJAS J, NUÑEZ R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2011;11:12-34.

86. VOGEL ELY C, SHIMIZU GH.; MARTINS MV, MARINHO LC. Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25586>>. Acesso em: 13 Abr. 2020).
87. VIZA JUNIOR GA, GUIMARÃES MSA, BAPTISTA AMG, BAPTISTA AB. Plantas medicinais e leshimanirose cutânea: uma revisão. Revista Cereus, 2019; 11 (4): 84-98 .DOI: 10.18605/2175-7275/cereus.v11n4p84-98 .

3. OBJETIVOS

3.1 Geral: Investigar o efeito anti-*Candida* de *Vismia guianensis* (Aubl) Chosy em ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

3.2 Específicos

Capítulo 1

- Realizar o levantamento bibliográfico sobre o potencial farmacológico de *Vismia guianensis* (Aubl) Chosy.

Capítulo 2

- Identificar os metabólitos secundários, bem como os constituintes químicos majoritários presentes no extrato das folhas de *V. guianensis*;
- Caracterizar quimicamente os compostos presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *V. guianensis*;
- Verificar *in vitro* os efeitos de *Vismia guianensis* em linhagens de *Candida* ssp.;
- Investigar a atividade fungicida e/ou fungistática de *V. guianensis*;
- Avaliar o efeito do extrato na cinética de crescimento de *Candida albicans* *in vitro*;
- Determinar a capacidade de *Vismia guianensis* em controlar adesão e biofilme;
- Avaliar *in silico* a interação de compostos presentes no extrato com um alvo molecular de *Candida albicans*.

Capítulo 3

- Verificar os efeitos do extrato bruto de *V. guianensis* em linhagens de *Candida albicans* padrão, sensível e resistente ao Fluconazol;
- Analisar o efeito de *V. guianensis* sobre a cinética de crescimento de em linhagens de *Candida albicans* padrão, sensível e resistente ao Fluconazol;
- Avaliar o efeito inibitório de *V. guianensis* sobre atividade das exoenzimas liberadas por cepas de *Candida albicans* padrão, sensível e resistente ao Fluconazol;
- Investigar o efeito de *V. guianensis* na sepse experimental fúngica *in vivo*;

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo 1

**POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA ESPÉCIE VEGETAL *Vismia guianensis*
(AUBL.) CHOSY**

PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF *Vismia guianensis* (AUBL.) CHOISY

Fitoterapia

The Journal for the Study of Medicinal Plants

Qualis: B1 (Medicina I) Fator de impacto: 2.527

ABSTRACT

Plants are the primary sources of active substances with therapeutic properties due to the vast structural diversity of metabolites they produce. The aim of this study was to investigate the ethnopharmacology, biological activity, and pharmacological potential of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. The primary databases used were: Pubmed, Virtual Health Library, and Google Scholar considering the publications for the last ten years. As a result, we found 12 references concerning the pharmacological activity of *Vismia guianensis*. Most of them evaluated the anti-inflammatory and antimicrobial activity, with emphasis on the anti-bacterial effect. Some studies investigated the antitumoral effect of *Vismia guianensis*. Many studies were based on *in vitro* assays evaluating the hydroalcoholic extract from the leaves activity. The phenolic compounds, including anthraquinones, and terpenoids, were frequently identified. In conclusion, *Vismia guianensis* presents advantages as a promising plant with therapeutic potential for the development of new drugs with anti-microbial and anti-inflammatory, and cancer, activities possibly related to the presence of anthraquinone and other chemical compounds produced as a result of secondary metabolism.

Keywords: *Vismia guianensis*; Lacre; antimicrobial; anti-inflammatory; Biological activity

PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF THE VEGETABLE SPECIES *Vismia guianensis* (AUBL.) CHOISY

MOTTA, Elizangela Araujo Pestana^a; ROCHA, Claudia Quintino^b; GUERRA, Rosane Nassar Meireles^c

^aImmunophysiology Laboratory, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga – elifarmabr@gmail.com

^bNatural Product Laboratory, Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanganga - claudiarocha3@yahoo.com.br

^cImmunophysiology Laboratory, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga – roguerra@globo.com

1. INTRODUCTION

The popular use of plants, in general, is a decisive factor in the search for new active substances, mainly because several of the existing medicines today were obtained from plant origin compounds based on research in several systems, including traditional medicine, Chinese and Indian, among others [1], [2], [3].

The genus *Vismia* comprises 52 species, amply distributed in Central and South America. Regarding geographical distribution in Brazil, it can be found in several regions, such as, north (Amazonas, Acre and Pará); northeast (Maranhão, Ceará, Bahia and Paraíba) and central-west (Goiás and Mato Grosso) in different phytogeographic domains, such as Amazonia, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest [4,5]. Among the most researched species are *Vismia laurentii*, *Vismia orientalis* Engl, *Vismia baccifera* (L.) Planch; Triana, *Vismia jefensis* N. Robson, *Vismia macrophylla* Kunth, *Vismia latifolia* Choisy (syn. *Hypericum latifolium* Aubl.) [6,7].

Some secondary metabolites have already been isolated and characterized in species belonging to this genus including: flavonoids, flavonols, xanthones, anthraxes, anthraquinones, benzophenones, lignans, steroids, monoterpenes and triterpenes⁵, with the most evident metabolites being anthraquinones, which represent the class of most isolated substances in the genus. The vismiaquinones (A and B) stand out, which are usually colored and are characterized by being very fine-grained powders [4],[7],[8],[9].

The vegetable species *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, belonging to the family Cluseaceae, subfamily Hypericoideae, tribe *Vismieae* and genus *Vismia*, is popularly known as: lacre, arvore-da-febre, goma-lacre, pau-de-lacre and lacre-branco, with significant

importance of yellow-orange latex exuding from the stem. This latex has been used by some tribes in the state of Amazonas and Pará to treat wounds, herpes and fungal infections on the skin, such as ringworm. From the latex a resinous gum called “gamboge” is used, used in paintings and in obtaining nail polish. Relevant synonyms: *Hypericum guianense* Aubl., *Vismia guianensis* var. *acuminata* (Lam.) ME Berg, *Vismia acuminata* (Lam.) Pers., *Vismia caparosa* Kunth, *Vismia ferruginea* Kunth, *Vismia reichardtiana* (Kuntze) Ewan^{[4], [10], [11], [12], [13]}.

Ethnobotanical surveys carried out in different Brazilian municipalities, particularly in the state of Pará, report its popular use in dermatose treatment. There is also a description of the use as laxative and purgative. In addition, leaves are used as a tonic, antipyretic and antirheumatic^{[14], [15], [16]}.

Members of the genus *Vismia* are recognized as rich sources of phenolic compounds such as prenylated anthraxes, anthraquinones, xanthenes and benzophenones^[8]. And in the same way these compounds were identified from leaves, stem barks and roots of *V. guianensis*, in addition to anthraxes, triterpenoids, sesquiterpenes, lignans and flavonoids, among others^{[10], [11], [17]}. In the latex that is extracted from the stem, some compounds have also been identified, such as lupeol, friedelin and betulinic acid^[13].

According to Politi et al., (2004)^[18] in the leaves of *V. guianensis*, four classes of secondary metabolites are present, as main components: anthraquinones, flavonoids, xanthenes and benzophenones. The largest number of compounds found belongs to the class of anthraquinones, whose base skeleton of that class is emodine: 1,3,8-trihydroxy-6-methyl-anthraquinone.

Considering ethnobotanical relevance of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, and due to the scarcity of data regarding scientific approaches regarding its pharmacological properties, this study sought to review the works published in the last 10 years, and also *in vivo* studies *in vitro* studies, its chemical composition and main pharmacological activities.

2. MATERIAL AND METHODS

This is an integrative and descriptive bibliographic review on *V. guianensis*, based on works published on different platforms. The search took place in different and independent periods. The survey was divided into the following stages:

First stage, exploratory phase: We sought to identify publications that covered the subject in question, limiting publications to the last 10 years, in the following databases: Publisher Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (PubMed), Virtual Health

Library (VHL), Google Scholar, Science Direct and Scopus, with the following descriptors: “*Vismia guianensis*”; “*lacre*”; “Pharmacological activity” combined or not with the inclusion, also in the English language (Medical Subject Headings - Mesh). And a search was also carried out in the patent bank, Google Patents, with the descriptors “*Vismia*”; “*Vismia guianensis*” and “pharmacological activity”.

Second stage, in the selective phase: The publications were selected according to year of publication, the references that addressed *V. guianensis* and its use and application; access to the full texts and publications in Portuguese, English and Spanish were included.

Third stage, analytical phase: The publications were read and organized according to the relevance of the topic that addressed studies in vitro and in vivo and without repetition in the databases. The bibliographic content was carefully analyzed independently, in order to contemplate the proposed objectives in order to have an exact interpretation and analysis of the researched sources. Finally, the results were presented in a table format for better categorization using Microsoft software version 2017.

3. RESULTS

691 references were evaluated in the exploratory phase, followed by 154 in the selective phase and finally, n=15 in the analytical phase. In relation to the PubMed database, it was found that 56 publications were described using only the descriptor *Vismia*, with 40 of the references found dealing with other species of the genus, the most cited being: *V. laurentii*; *V. bacciferous*; *V. macrophylla*; *V. cauliflora*; *V. mexicana*; *V. orientallis*. However, two publications in this bunch were reviews, one on the genus *Vismia* and the other referring to the three species (*V. laurentii*; *V. baccífera*; *V. macrophylla*). In the end, 15 articles were selected when the searches were restricted to publications that addressed only the species *Vismia guianensis* and pharmacological activity.

41 references were found on the Virtual Health Library (VHL) platform, with only 11 remaining in the selective phase, but after comparing publications already found in the PubMed database, only one reference remained in the analytical stage. The same occurred in Google Scholar that despite having presented 32 references in the first stage, only 9 described results with *Vismia guianensis* in the analytical phase. Both in Science Direct, with 54 references, and in the Scopus database, with 52 references, presented approaches by *V. guianensis* in agriculture/livestock or mentioned in the bases mentioned above and 7 dealt with ethnopharmacological or ethnobotanical surveys. Thus, at the end of the selection and analysis steps, only one reference remained for SCOPUS database (Figure 1).

Regarding the search on the Google Patents platform, no results were found for *Vismia guianensis*, however, using only the descriptor Vismia, records were found for the species *Vismia laurentii* and *Vismia rubescens*.

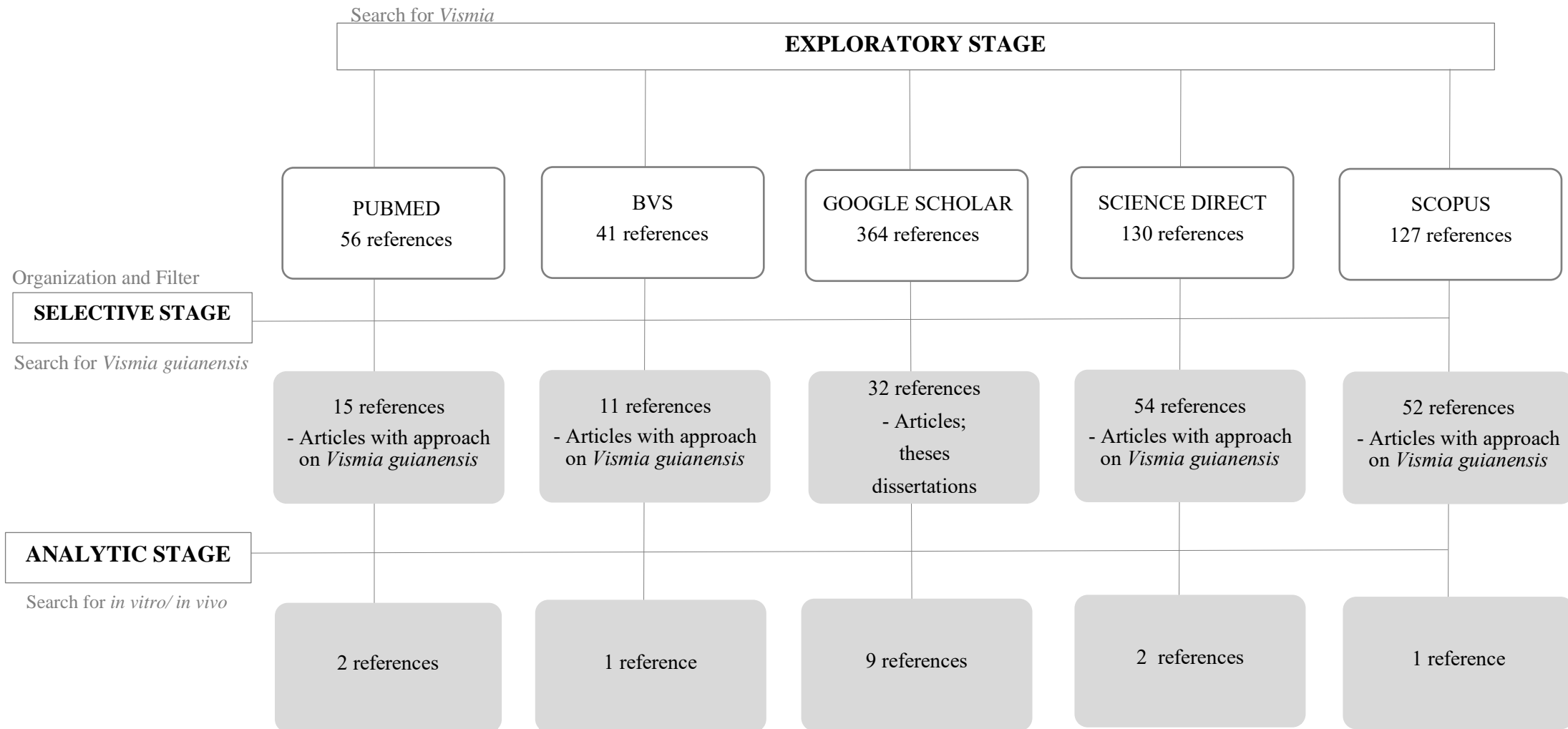


Figure 1 Selection process flowchart of researched references (2009-2019).

After refining the research found, references were organized in a table to better expose data, highlighting the part of the plant used, type of extract, researched pharmacological activity, isolated substances and tests studied, whether *in vivo* or *in vitro* (Table 1). It was observed that of all references (n = 15), 86.6% (n = 13) of studies carried out *in vitro* evaluation and of those only n = 11 carried out *in vitro*, which justifies the tendency of most researches that involve plants as a preliminary criterion before *in vivo* evaluation.

3.2. The most studied parts of *Vismia guianensis* and their relationship with biological activity and chemical characterization

Leaves correspond to the most used part (86.6%) in extract preparation, and to obtain fractions and oil. Probably, they are easiest to access in several periods throughout the year, independently of a specific season or period. Ethanol was the most used extractive solvent (53.3%).

The majority of works investigate the chemical composition, exception for only four among them. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS) or Ultraviolet-visible was the most used method to evaluate the chemical composition of the extracts. Although, Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), thin layer chromatography and phytochemical prospecting were also used.

The antimicrobial effect against fungi, bacteria or both was the most investigated activity, followed by the anti-inflammatory and antioxidant actions. Only one study investigated the anti-*Leishmania* and another one the anti-*Candida* activity for the aqueous extract and essential oil from the leaves, respectively.

The main pharmacological activities as well the kind of study and extract were summarized on Table 1.

Table 1: The pharmacological activities of *Vismia guianensis*.

| Extract | Part | Biological activity | Chemical constituents | Test Type | Reference |
|---|--------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|---|
| Ethanol | Leaves | Hypotensive | Not investigated | <i>In vivo</i> | Gomes et al, 2009 ^[16] |
| Ethanol, Hexane Fractions, Acetate and Butylica | Bark and Leaves | Antimicrobial and immunological | Anthraquinones, flavonoids, tannins and saponins | <i>In vitro and In vivo</i> | Oliveira 2009 ^[17] |
| Ethanol | Leaves | Antimicrobial | Saponins, tannins, phenolic compounds, catechins, steroids and triterpenoids; alkaloids | <i>In vitro</i> | Camelo, 2010 ^[44] |
| Ethanol | Leaves | Antimicrobial | Total Anthroquinones | <i>In vitro</i> | Camelo et al., 2011 ^[10] |
| Ethanol | Leaves | Antimicrobial | Benzophenones, xanthones and anthraquinones | <i>In vitro</i> | Vasconcelos et al, 2011 ^[48] |
| Essential Oil | Fruit | Antimicrobial and antioxidants. | Presence of 38 sesquiterpenoids, the main ones being β -Karyophyllene, α -copaene and δ -cadinene. | <i>In vitro</i> | Silvestre et al, 2012 ^[35] |
| Methanol and Hexane | Leaves | Antifungal | Anthraquinones, glycosylated anthraquinones, flavonoids, tannins, saponins | <i>In vitro</i> | Rodrigues, 2013 ^[4] |
| Ethanol, Fractions Óil | Leaves, branches Flowers | Antimicrobial | Kaempferol, Vismiaquinone A, β -sitosterol, Stigmasterol. 43 components were identified with the majorities for trans-caryophyllene, δ -cadinene and caryophyllene oxide | <i>In vitro</i> | Souza, 2014 ^[9] |
| Hexane | Leaves | Antinociceptive and Anti-inflammatory | Not investigated | <i>In vivo</i> | Nobre et al, 2015 ^[5] |
| Aqueous | Leaves | Anti- <i>Leishmania</i> | Not investigated | <i>In vitro</i> | Mans et al, 2016 ^[49] |
| Ethanol/ Hexane, Acetate, Methanol | Aerial Parts | Antioxidant | Vismiaquinone A, β -sinosterole and stigmasterol-bis- (2-methylheptyl) -ftlate and 15-ethoxy (15 relr) -porphyrinolactone, flavonoid and vitexin | <i>In vitro</i> | Lins et al., 2016 ^[36] |
| Ethanol | Leaves | Anti-Inflammatory and Antifungal | O-glucosyl-flavonoids and 16 prenylated benzophenone derivatives | <i>In vitro and in vivo</i> | Oliveira et al, 2017 ^[33] |
| Essential Oil | Leaves | Anti- <i>Candida</i> | Caryophyllene Oxide and Humulene-Epoxy I | <i>In vitro</i> | Costa et al, 2017 ^[50] |
| Ethanol | Leaves | Antimicrobial | Not investigated | <i>In vitro</i> | Reis, 2017 ^[2] |
| Petroleum ether /ethyl acetate / metanol | Fruits | Antioxidant | Not investigated | <i>In vitro</i> | Rojas et al, 2019 ^[51] |

4. DISCUSSION

The possible cause of the reduction in *in vivo* studies may be related to the replacement of experiments by *in vitro* methods since they do not depend on the creation and maintenance structure of laboratory animals with consequent cost reduction. One must also consider the numerous protests, worldwide, against the use of animals in experimental research^[19]. However, the replacement of animal models is still a distant reality for drug testing, as there is still a shortage of viable *in vitro* and *in silico* models to consider this substitution safe.

4.1 *Vismia guianensis* botanic and ethnobotanic data

Vismia guianensis is a shrub or small tree, with oval, oblong leaves, inflorescence in terminal panicle and fleshy globose fruit. It is a species native to South America, which can be found in secondary vegetation forests in the states of Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia and Minas Gerais, where it is popularly known as a lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco^[23]. It is commonly found in countries and regions of tropical America, such as: Colombia, Venezuela, Guyana and different areas of North and Northeastern Brazil^[24]. It plays an important role in the colonization of deforested areas, since they are usually the first plants to grow in these areas^[25].

According to ethnobotanical data, stem shavings are used as a purgative, and orange latex, obtained from breaking branches, leaves or fruits, is used in the treatment of superficial skin mycoses^[26]. The leaves have antipyretic and antirheumatic properties^[23]. It is also used by the population in the treatment of skin diseases, as a laxative, as a tonic as an antipyretic and antirheumatic agent^[10].

According to Hussain et al., (2012)^[22] species of the genus *Vismia* are popularly used to treat skin diseases such as dermatitis, leprosy, syphilis, herpes, scabies and eczema, and as an anticancer in breast cancer, of the central nervous system (CNS) and human lungs. However, data obtained so far has not been conclusive as to most of the activities attributed by the population. Reason why further studies are needed to establish safe extract use, two pharmacological actions and the main pharmacological targets, so that it is possible and *V. guianensis*, evaluating its cytotoxicity to normal cells, and investigating the main mechanism of action of the metabolites and or constituents associated with each of the effects.

4.2 Chemical constituents identified in *Vismia guianensis*

The extraction techniques and the nature of the solvent directly affect the yields, the identification and plant extract metabolite quantification, which can also interfere with their biological and pharmacological activity. Ethanol is the most used solvent to prepare vegetal extracts due to the good resolution to isolate and identify the majority of vegetal compounds. Additionally, ethanol is used in almost all industries, as it has low toxicity, easy evaporation to obtain extracts and low cost ^[20]. It is worth to mention that ^[21].

Table 1 shows that the majority of studies investigated the composition of *Vismia guianensis* extract, with exception of only among them. The identification of chemical constituents is important to the biological activity investigation, since they may contribute to elucidate the possible mechanisms associated with a given activity.

Hussain et al. (2012) ^[22] carried out a survey on the ethnopharmacological, phytochemical to investigate the genus *Vismia* therapeutic potential. This study identified as the main classes of phytochemicals in this genus: flavonoids, flavanols, xanthenes, anthrones, anthraquinones, benzophenones, lignans, steroids, monoterpenes and triterpenes. These compounds were identified by HPLC/MS, HPLC/UV-VIS and GC/MS. These data corroborate with the findings founding the similar compounds not only in the leaves, but also in other parts of *V. guianensis* ^[17; 44; 48].

Several secondary metabolites from *V. guianensis* were identified including: β -sitosterol, vismiona H ^[27]; quinones ^{[28], [29]}; vismiona ^[30]; diantrones ^[18]; anthraquinones ^{[18], [31]} and xanthoness ^[32].

Tala et al. (2013)^[8] investigated the chemical constituents present in *V. guianensis* seeds and identified in this vegetal part as main compounds: vismiaquinone, vismiaquinone B, laurentiquinone A, laurentiquinone B, laurentiquinone C, betulinic acid, stigmasta-4-en-3-one and a mixture of β -sitosterol and stigmata-5,22-dien-3-ol (anthraquinones and triterpenoids). It is important to emphasize that some of these compounds were also found in leaves ^[33]; flowers ^[9] and fruits ^{[34], [35]}.

According to Politi et al. (2004)^[18], anthraquinones, flavonoids, xanthenes and benzophenones were the principal classes of secondary metabolites identified in *Vismia guianensis* leaves. The anthraquinone, whose base skeleton is emodin: 1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone, seems to be a chemical marker from *Vismia* genus,

since a large number of compounds belonging to this class was identified in several *Vismia* species,

Lins et al, (2016)^[36], identified compounds such as Vismiaquinone A, β -sitosterol and stigmasterol-bis-(2-methyl-heptyl)-fate and 15-ethoxy (15 relR) -porphyrinolactone, and vitexin in latex exuding from the stem, confirming previous findings of Gonçalves; Mors (1981)^[37]; Delle Monache et al (1985)^[38] and Torres et al., (2008)^[34].

Quinones, such as vismiaquinone, works as *V. guianensis* chemical markers and are present in several parts, including: leaves Hussain et al., (2012)^[22], fruits ^[37], ^[38], ^[30], ^[34], latex, seeds ^[36] and flowers ^[9]. The quinones are also present in other species of the genus *Vismia*, for example in the seeds of *Vismia laurentii* ^[7].

Diniz et al., (2013)^[39] determined the mineral composition of *V. guianensis* leaves and found high levels of iron and zinc and low levels of calcium, copper and manganese. Inorganic constituents can exert some metabolic functions in the human body, with emphasis on iron and zinc. Iron is an abundant element on Earth, and is an essential component of every living organism^[52]. In the mammalian group the iron is required for the synthesis of oxygen transport proteins, in particular hemoglobin and myoglobin, and for the formation of heme enzymes and other iron-containing enzymes involved in electron transfer and oxidation-reductions ^[53]. Almost two-thirds of the mammalian body iron is found in the hemoglobin present in circulating erythrocytes, as mobilizable iron store, bound to muscular myoglobin, and in a variety of enzymes involved in the oxidative metabolism and many other cell functions^[54].

Zinc is a trace nutrient essential for all living organisms including plants, animals and for humans. This mineral is a structural component in proteins, and when included as nutritional supplement in humans has the potential to decrease diarrhea mortality in children and aged people, to reduce the incidence of infections and to improve immune functions ^[55], ^[56], ^[57]. Thus, these assessments must also be focused on the association of the main constituents and the biological activity with which they are associated.

4.3 Antimicrobial activity in *Vismia guianensis* and other species in the genus *Vismia*.

The anti-inflammatory and antimicrobial effect were the most reported biological activity of *Vismia guianensis* extracts. The results related to the antimicrobial effect evaluated the action on fungi and bacteria, Although, the majority of them

evaluated the anti-bacterial efficacy of extracts obtained from different parts, and with diverse polarity.

The aqueous extract of *V. guianensis* syn *V. reichardtiana* fruits has antimicrobial^[40], antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative strains. The same extract also showed antifungal activity^[33].

The methanolic extract from *Vismia rubescens* stem bark showed antimicrobial effect against *Salmonella typhi*; *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The same extract was also effective against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*^[41].

The hydroalcoholic extracts from leaves and bark of *Vismia guianensis* inhibited the growth of *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus subtilis*^[17], and the different extracts from leaves showed antifungal action against *Sporothrix schenckii*.^[4; 33]

Despite the ethnobotanical data related to the use of *V. guianensis* for the treatment of fungal infections, few studies related to this use have been found regarding *in vitro* or *in vivo* evaluation.

4.3 Antioxidant and anti-inflammatory activity in *V. guianensis* and other species from the genus *Vismia*

The search for therapeutic alternatives for antioxidant and anti-inflammatory activity is promising not only using *V. guianensis*, but other species of the same genus, such as *Vismia baccifera* ssp. *Ferrugine*, due to phenolic compound presence^[1].

Phenolic compounds can be characterized as flavonoids and non-flavonoids, with important antioxidant properties, and the most well-known flavonoids are: catechins, epicatechins, epigallocatechins, kaempferol, quercetin, mycetin, anthocyanins, rutin and naringenin. In the second compound group, non-flavonoids, the most well-known substances are phenolic acids, hydroxybenzoic acid, hydrokinamino acid and resveratrol^[42], observed, for example, in grapes (*Vitis labrusca* and *Vitis vinifera*)^[43], which were also detected in *V. guianensis* extracts^{[33], [35]}.

According to Camelo (2011)^[44], the secondary metabolites of *V. guianensis* also function as a defense mechanism, as they prevent insects and other animals from feeding on their sap, present in the organs and tissues most exposed to attack, such as leaves, flowers and the fruits. Concentration may therefore depend on a temporary response to some injury or pathogenic attack.

4. 4 Other *Vismia guianensis* biological activities

The aqueous extract of *V. guianensis* syn *V. reichardtiana* fruits showed immunomodulatory activity by interference on antibody and cytokine production [30], [45]. This extract was also effective as hypotensive [46], antioxidant [47], [35], anti-inflammatory, antifungal [33], and as antitumor agent for colon adenocarcinoma cells [1]

The immunomodulatory activity was related to the vismione content of the aqueous extract [30], and the antioxidant activity was related to the presence of γ -hydroxy-ferruginin. γ -hydroxy-ferruginin is a phenolic compound able to inhibit the human topoisomerase II- α action, activity knowing as a starting point for the development of antitumor drugs, suggesting that it has a potential anticancer effect, which makes it another target in prospecting for compounds with antitumor action [46].

Vismiaquinone showed anti-tumor action, *in vitro*, when tested in three cancer cell lines, with results similar to that of Doxorubicin, used as a positive control. Hussain et al., (2012) [22], also mention that the same compounds found in the leaves were identified in the roots of *V. guianensis* and that they also showed moderate antitumor activity in *in vitro* tests.

5. FINAL CONSIDERATIONS

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy, presents is a promising vegetable for to bioprospect new drugs, due to its pharmacological potential including the antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, anti-tumor, and immunomodulatory activities, detected in *in vitro* and *in vivo*. Those activities may be related to the presence of secondary metabolites as the anthraquinones, vismiaquinones and terpenoids, and the content of iron and zinc that are possible associated to those several biological activities. These compounds may be targets possible targets in the search for drugs with multiple effects and low toxicity to develop new formulations with better therapeutic value.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Laboratory of Immunophysiology from the Federal University of Maranhão for providing necessary research space for the research; the Foundation for the Support of Research and Scientific and Technological Development of Maranhão

(FAPEMA) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Financial code 01 - CAPES.

Compliance with ethical standards.

CONFLICTS OF INTEREST: There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] E.R. Álvarez, J.H.G. Gil, O.J.G. Jiménez, C.M.A. Posada, B.A. Rojano, C.M.P. García, D.L.R. Durango. Antioxidant activity and phenolic content of berry extracts from species *Vismia* (Guttiferae). *Vitae* 15(1) (2008)165-172.
- [2] C.B. Reis. In vitro antimicrobial potential of metabolites produced by *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, vs. micro-organismos *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris*. (2017). Undergraduate Monography, Universidade do Estado do Amazonas. Available at: <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/560>.
- [3] G.A. Viza Junior, M.S.A. Guimarães, A.M.G. Baptista, A.B. Baptista. Medicinal plants and cutaneous leishmaniasis: a review. *Revista Cereus*11(4)(2019)84-98,[https://doi.org/ 10.18605/2175-7275/](https://doi.org/10.18605/2175-7275/).
- [4] I.C. Rodrigues. Development and standardization of dry product by spraying *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy with antifungal activity. Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) - Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM) 2013.
- [5] V.F. Nobre, M.L. Rocha, D.M.M. Almeida, A.M. Lucchese, A.T.S. Oliveira, A.C.M. Barboza. Antinociceptive and anti-inflammatory hexanic extract activity of *Vismia guianensis* Aubl leaves in mice. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 14 (2015)69-73.
- [6] W.L.R. Barbosa, F. Vasconcelos, J.M.S. Vieira, J.O.C. Silva Junior. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2(12) (2011)3224-3229.
- [7] M. Vizcaya, A. Morales, J. Rojas, R. Nuñez. Bibliographic review on the chemical composition and genus pharmacological activities *Vismia* (Guttiferae). *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*.11 (2011)12-34.

- [8] M.F. Tala, E. Jeanne, R. Lantovololona, F.M. Talontsi, H.K. Wabo, P. Tane, H. Laatsch. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 50(2013)310–312.
- [9] M.S.R. Souza. Contribution to phytochemical knowledge about *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Master's Dissertation (UFPB/CCS), João Pessoa, 94p. 2014.
- [10] S.R.P. Camelo, R.S. Costa, R.M. Ribeiro-Costa, W.L.R. Barbosa, F. Vasconcelos, J.M. dos S. Vieira, J.O.C. Silva Junior. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *UPSR*.2(12)(2011)224-3229.
- [11] R.A. Ritter, M.V.B. Monteiro, F.O.B. Monteiro, S.T. Rodrigues, M.L. Soares, J.C.R. Silva, M.D.C. Palha, G.F. Biondi, S.C. Rahal, M.M. Tourinho. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Para state, eastern Amazon, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 144 (2012)346–352.
- [12] V. Bittrich, R.J. Trad, F.N. Cabral, J.E. Nascimento-Jr, V.C. Souza. (2015). Hypericaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/floradobrasil/FB25586>>. BFG.
- [13] J.H.G. Lago, J. Tezoto, P.B. Yazbek, F. Cassas, J.F.L. Santos, E. Rodrigues. Exudates used as medicine by the “caboclos river-dwellers” of the Unini River, AM, Brazil – classification based in their chemical composition. *Magazine, Brazilian Pharmacognosy* 26 (2016) 379–384.
- [14] S.R.P. Camelo. Pre-formulation and formulation studies *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Dissertation (Master's Degree) – Universidade Federal do Pará, Instituto of health sciences, Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Belém, 2011.
- [15] L.M. Ricardo, J. Paula-Souza, A. Andrade, M.G.L. Brandão. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). *Magazine, Brazilian Pharmacognosy*. 27(2017)388–400.
- [16] M.J.N. Gomes, S.N. Silva, R.M. Ribeiro, I.C. Abreu, M.O.R. Borges, A.C.R. Borges. Pharmacological leaf screening *Vismia reichardtiana* (O. KTZE) EWAN – Guttiferae. *Cadernos de Pesquisa*. 1(2009)5-10.
- [17] A.H. Oliveira. Atividade antimicrobiana e imunológica in vitro dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) and *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). 2009. 126 f. Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, 2009.

- [18] M. Politi, R. Sanogo, K. Ndjoko, D. Guilet, J-L. Wolfender, K. Hostettmann, I. Morelli. HPLC-UV/PAD; HPLC-MS Analyses of leaf and root extrats of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical Analysis*. 15(2004)355-364.
- [19] M.P.G. Mendes, C.A.D.E.J. Souza. Application of animal models in experimental biomedical research. *Magazine, FACIPLAC Health*, 4 (2)(2017).
- [20] W.A. Silva, V.R. Campos. Industrial Preparation Methods for Solvents and Chemical Reagents. *Virtual magazine, Chemistry*. 5 (2013)1007-1021.
- [21] V.B. Oliveira, M. Zuchetto, C.F. Oliveira, C.S. Paula, A.F.S. Duarte, M.D. Miguel, Miguel O.G. Effect of different extractive techniques on yield, antioxidant activity, total dosages and profile by HPLC-DAD of *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, dicksoniaceae. *Brazilian Magazine of Medicinal Plants*. 18 (1) supl. I (2016)230-239.
- [22] H. Hussain, J. Hussain, A. Al-Harrasi, M. Saleem, I.R. Green, T. Van Ree, A. Ghulam. Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, 2012; 50 (11):1448–1462.
- [23] H. Lorenzi, F.J. Matos. A. Medicinal plants of Brazil: Native and exotic. *Plantarum Institute, Nova Odessa: São Paulo*, (2002) 512.
- [24] G.F. Melo-De-Pinna, J.S. Almeida-Cortez. Morphology and anatomy of a leaf mine in *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae) in a fragment of Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*. 66 (2006) 759 – 763.
- [25] C. Uhl. Factors controlling succession following slash-and burn agriculture in Amazonia. *Journal of Ecology*. 75 (1987) 377.
- [26] M.L.S. Gonçalves. Contribution to the phytochemical study of lacre, *Vismia reichardtiana* (O. Ktze), Ewan-Guttiferae. Rio de Janeiro, RJ, (1970). (Master's Dissertation), Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [27] B. Botta, G. Delle Monache, F. Delle Monache; Marine Bettolo, F. Menichini. "Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guianeensis*". *Phytochemistry*. (25) (1986) 1217.
- [28] J.G. Gonzales, F.D. Delle Monache; G.D. Delle Monache; G.B. Marini-Bettolo. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. *Planta Médica*, 40 (1980) 347-350.
- [29] D. F. Delle Monache, et al. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxy and γ,γ -hidroxy-feruginin A. *Journal of Natural Products*. 43 (1980) 487-494.

- [30] R.N.M. Guerra. Atividade imunossupressora dos frutos de *Vismia reichardtiana*. (Tese de doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo(1997).
- [31] B.K. Grosse, V. Balasubramanian, G.J. Kapadia, Isolation and characterization of prenylated anthranoids from *Vismia guianensis*. In: 38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, The University of Iowa City, Iowa, July (1997) 26-30.
- [32] AR. Bilia, et al. New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guianensis*. Journal of Natural Products. 63 (2000) 16-21.
- [33] A.H. Oliveira, F-Neto. Carnevale, D.F. Portuondo, A. Batista-Duarte, I.Z. Carlosa. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. Journal of Ethnopharmacology 195 (2017) 266-274.
- [34] L.M.B. Torres, S.G. Pereira, R.N.M. Guerra. New vismione from berries of *Vismia reichardtiana* (O. Ktze) Ewan. Plants Treat, (2008) 74 - PB108. DOI: 10.1055/s-0028-1084453.
- [35] G.R. Silvestre, M.M. Moraes, A.C.S. Lins, M.T. Ralph, V. Filho-Lima, C.A. Camara, T.M.S. Silva. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. African Journal of Biotechnology. 11(41) (2012) 9888-9893.
- [36] A.C.S. Lins, M.F. Agra, D.C.O. Conceição, F.C.T. Pinto, C.A. Camara, T.M.S. Silva. Chemical constituents and anti-oxidant activity of the aerial parts of *Cusia paralicola* (Clusiaceae) and *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Revista Virtual magazine, Química 8 (1) (2016) 157-168.
- [37] M.L.S. Goncalves, W.B. Mors. Vismiaquinone, A A'-Isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana* Phytochemistry. 20 (1981) 1947-1950.
- [38] F. Delle-Monache. Chemistry and biological activity of the secondary metabolites of Vismieae. Revista Latinoamericana de Química. 16 (1985) 5-15.
- [39] V.W.B. Diniz, H.A. Dantas-Filho, R.C.S. Muller, K.G. Fernandes. Multivariate classification of medicinal herbs from the Amazon region and their infusions according to mineral composition. Química Nova. 36 (2) (2013) 257-261.
- [40] R.N.M. Guerra; F.R.F. Nascimento, M.J.C. Borges, O.V. Sousa; N.S. Mattar. Suppressing activity of *Vismia reicharditiana* on antibody production in mice infected with *S. mansoni*. In: XVII Annual Meeting of the Brazilian Federation of Experimental Biology Society. São Paulo, Summary. (1993).

- [41] J.D.E.D. Tamokou, M.F. Tala, H.K. Wabo, J.R. Kuate, P. Tane. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 124 (2009) 571–575.
- [42] M.T. Achkar, G.M. Novaes, M.J.D. Silva, W. Vilegas. Antioxidant property of phenolic compounds: importance in diet and food preservation. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 11 (2) (2013) 398-406.
- [43] L.T. Abe, R.V. Da Mota, F.M. Lajolo, M.I. Genovese. Phenolic compounds and antioxidant capacity of grape crops *Vitis labrusca* L. and *Vitis vinifera* L. *Food Science and Technology* 27 (2) (2007) 394-400.
- [44] S.R.P. Camelo. Pre-formulation and formulation studies on *Vismia guianensis* (Aubl.) (Seal). Dissertation (Master's degree) – Universidade Federal do Pará, Institute of health sciences, Post-graduate program in Pharmaceutical Sciences, Belém. (2010).
- [45] R.N.M. Guerra, M.L.S. Gonçalves. Preliminary studies on the introduction of the *Vismia reichardtiana* fruits in eating: Evaluation of effects on the immune system of C57BL/ 6. *Proceedings of the 1st Meeting of Maranhao Researchers, São Luís, MA.* (1991).
- [46] M.J.N. Gomes. Studies on pharmacological actions of the *Vismia reichardtiana* (O.Ktze) leaf, Ewan-Guttiferae. (Undergraduate Pharmacy Monograph), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil. (1992).
- [47] A.C.S. Lins. Inhibition of Human DNA Topoisomerase II- α by γ -Hydroxyferruginin A, a Prenylated Anthranoid Isolated from the Latex of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *Lab Science with laboratory techniques*. 4 (2007) 22-24.
- [48] F. Vasconcelos, J.M.S. Vieira, J.O.C. Silva Junior. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*. 2 (12) (2011) 3224-3229.
- [49] D.R.A. Mans, T. Beerens, I. Magali, R.C. Soekhoe, G.J. Schoone, K. Oedairadjsingh, J.A. Hasrat, E. Van Den Bogaart, H.D.F.H. Schallig. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. *Journal of Ethnopharmacology* 180 (2016) 70–77.
- [50] M.D.C. Costa, A.G.D. Silva, A.P.S.D. Silva, V.L.M. Lima, P.C. Bezerra Silva, S.K.L.D. Rocha, D.M.D.A.F. Navarro, M.T.D.S. Correia, T.H. Napoleão, M.V.D. Silva, P.M.G. Paiva. Essential Oils from leaves of medicinal plants of Brazilian flora: Chemical composition and activity against *Candida* species. *Medicines*. 3 (4) (2017).

- [51] J. Rojas, A. Buitrago. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. (2019). Chapter 1. Bioactive Compounds. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3>
52. P.T. Lieu, M. Heiskala, P.A. Peterson, Y. Yang. The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2 (2001) 1–87.
53. R.F. Hurrell. Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition* 51 (1997) S4–8.
54. K. E. Finberg. Unraveling mechanisms regulating systematic iron homeostasis. *American Society of Hematology* 1 (2011) 532–537.
55. H. Haase, E. Mocchegiani, L. Rink. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7 (2006) 421– 428.
56. A.S. Prasad, F.W Beck, B. Bao, J.T. Fitzgerald, D.C. Snell, J.D. Steinberg, L.J. Cardozo. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *American Journal of Clinical Nutrition* 85 (2007) 837– 844.
57. Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, Sweet MJ. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports* 33 (2013).

4.2 Capítulo 2

ATIVIDADE ANTI-*Candida* spp. DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy *in vitro* E *in silico*

E.A.P. MOTTA^a; C.Q. ROCHA^b; R.N.M. GUERRA^a

^aLaboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga – elifarmabr@gmail.com

^bLaboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanganga - claudiarocha3@yahoo.com.br

Industrial crops and products

Qualis medicina I – A2 e fator de impacto 4.191

RESUMO

Vismia guianensis (Clusiaceae) é uma planta de uso medicinal característica da região amazônica utilizada pela população, sobretudo as partes aéreas, para tratamento diversos, tais como inflamações e infecções de pele, seja na forma de chás ou banhos. Esse estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente o extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG) e avaliar a sua atividade anti-*Candida in vitro* e *in silico*. Após a coleta, identificação do material vegetal, produção do extrato hidroalcoólico em diferentes hidromódulos (maceração) e liofilização, foi realizada a caracterização química do extrato por HPLC-UV e FIA-ESI-IT-MSⁿ. Para os ensaios *in vitro*, foi realizado a citotoxicidade do extrato em culturas de células RAW 264.7 e hemácias. Determinou-se na avaliação *in vitro*, a concentração inibitória (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), curva de crescimento, adesão, a formação do biofilme jovem e maduro. Para avaliação do biofilme foi utilizado contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e técnicas colorimétricas, por MTT e cristal violeta e utilizou-se como controle positivo, Anfotericina B e Fluconazol. Na avaliação *in silico* utilizou-se *docking* molecular. A atividade anti-*Candida* foi avaliada contra três linhagens padrão de *Candida albicans* (ATCC90028; ATCC14053; SC 5314); e uma não-albicans (ATCC2001) e sete isolados clínicos. Obteve-se como resultado inicial, a escolha do hidromódulo 1:10 devido a melhor caracterização e obtenção dos compostos no extrato. Foram identificados como constituintes químicos, 14 substâncias, tais como, antraquinona F, vismiona D, kaempferol, quercetina, vitexina, ácido quínico, dentre outros. Para o ensaio de citotoxicidade o EHVG apresentou baixa toxicidade para células RAW e eritrócitos nas concentrações de 0,5 a 5 mg/mL. A partir da relação CIM/CFM o extrato apresentou potencial fungicida contra todas as linhagens de *Candida* testadas nesse estudo, sendo que as amostras mais sensíveis foram ATCC90028 e ATCC2001. Ao se realizar a avaliação do biofilme o extrato inibiu adesão fúngica de forma semelhante a Anfotericina B e ao Fluconazol, bem como inibiu a formação do biofilme jovem e maduro frente as linhagens ATCC90028, ATCC2001 e SC5314. Os resultados de *docking* molecular mostraram que antraquinona F, catequina, kaempferol e a vismiona D apresentaram afinidade pela enzima CaCYP51 de *C. albicans* sendo que a vismiona D foi o isolado com maior afinidade e com menor gasto de energia de ligação, mesmo em relação ao Posaconazol usado como controle positivo. Concluiu-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* apresenta ação fungicida para *Candida albicans* e *Candida glabrata* (não-albicans) e ainda, que essa atividade esteja relacionada a presença de vismiona D, devido sua elevada afinidade com a enzima CaCYP51, ressalta-se a importância da ação conjunta dos constituintes presentes no EHVG gerando um fitocomplexo.

Palavras-chaves: *Vismia guianensis*; Lacre; *Candida albicans*; Vismiona; Biofilme.

ABSTRACT

Vismia guianensis (Clusiaceae) is a plant of medicinal use characteristic of the Amazon region used by the population, especially the areas, for various treatments, such as inflammations and skin infections, whether in the form of teas or baths. This study aimed to chemically characterize the hydroalcoholic extract of the leaves of *Vismia guianensis* (EHVG) and evaluate its anti-*Candida* activity *in vitro* and *in silico*. After collection, identification of plant material, production of hydroalcoholic extract in different hydromodules (maceration) and lyophilization, the chemical characterization of the extract was carried out by HPLC-UV and FIA-ESI-IT-MSn. For *in vitro* assays, the extract was cytotoxic in cultures of RAW 264.7 cells and red blood cells. *In vitro* evaluation determined the inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), growth curve, adhesion, the formation of young and mature biofilm. Colony-forming units (CFU) counts and colorimetric techniques were used to evaluate the biofilm, using MTT and violet crystal, and Amphotericin B and Fluconazole were used as positive controls. Molecular docking was used in the silica evaluation. Anti-*Candida* activity was assessed against three standard strains of *Candida albicans* (ATCC90028; ATCC14053; SC5314); and one non-*albicans* (ATCC2001) and seven clinical isolates. As an initial result, the choice of 1:10 hydromodule was obtained due to better characterization and obtaining of compounds in the extract. 14 substances were identified as chemical constituents, such as anthraquinone F, vismione D, kaempferol, quercetin, vitexin, quinic acid, among others. For the cytotoxicity assay, the EHVG showed low toxicity for RAW erythrocyte cells at concentrations of 0.5 to 5 mg/mL. From the CIM/CFM ratio, the extract showed fungicidal potential against all *Candida* strains tested in this study, with the most sensitive samples being ATCC90028 and ATCC2001. When the biofilm was evaluated, the extract inhibited fungal adhesion in a similar way to Amphotericin B and Fluconazole, as well as inhibiting the formation of young and mature biofilm against the ATCC90028, ATCC2001 and SC5314 strains. The results of molecular docking showed that anthraquinone F, catechin, kaempferol and vismione D showed affinity for the enzyme *CaCYP51* from *C. albicans* and vismione D was the isolate with the greatest affinity and with the lowest energy expenditure, even in relation to the Posaconazole used as a positive control. It was concluded that the hydroalcoholic extract of the leaves of *Vismia guianensis* has a fungicidal action for *Candida albicans* and *Candida glabrata* (non-*albicans*) and also, that this activity is related to the presence of vismione D, due to its high affinity with the enzyme *CaCYP51*, points out the importance of the joint action of the constituents present in the EHVG is generated, generating a phytocomplex.

Keywords: *Vismia guianensis*; Lacre; *Candida albicans*; Vismione; Biofilm.

1. INTRODUÇÃO

A incidência global de candidíase está estimada em 750.000 casos/ano, possivelmente em decorrência do aumento na resistência e do número de hospedeiros susceptíveis, como: pacientes submetidos a tratamentos com imunossupressores; ao uso prolongado de antibióticos de amplo espectro e ao uso de cateteres e sondas (ABRÃO et al., 2010; BEN-AMI, 2018).

A candidíase é a quarta causa de infecção nosocomial no mundo, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente e a de maior relevância médica, em função da sua prevalência tanto em hospedeiros hígidos, como naqueles com alguma alteração de base, ou comprometimento imunitário. *Candida albicans* está entre as espécies fúngicas mais prevalentes da microbiota humana, pois coloniza de modo assintomático indivíduos saudáveis. Por isso, pode ser facilmente encontrada na mucosa oral, trato digestório, trato urogenital e pele de seres humanos, desde o nascimento (SANTANA et al., 2013).

A infecção por *Candida* spp, está relacionada a sua capacidade de formar biofilmes (LOHSE et al., 2018), seguida da adesão, que corresponde a primeira etapa do processo patogênico de colonização (SARDI et al, 2012). Assim, a adesão com posterior formação de biofilme estão entre os fatores de virulência, pois enquanto a adesão permite a infecção, o biofilme contribuiu para crescimento fúngico e proteção da colônia, aumentando a persistência da infecção (ROSCETTO et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

Tratamentos variados são utilizados para infecção por *Candida* spp, no entanto, tem sido crescente o número de casos com resistência aos medicamentos disponíveis, tanto para as *Candida albicans* como para *Candida glabrata*, fungo patogênico emergente com resistência ao Fluconazol (COLOMBRO et al., 2013). Assim, a busca de novas drogas é sempre desejada e as plantas, surgem como importante alvo na bioprospecção de novos compostos, a serem utilizados em conjunto, ou isoladamente, com os antifúngicos já disponíveis no mercado (BALUNAS; KINGHORN, 2005; BRANDÃO et al, 2010).

Vismia guianensis, família Clusiaceae, é uma planta popularmente utilizada para tratar feridas, ulcerações, afecções de pele, dermatomicoses e herpes, principalmente na região amazônica, onde a atividade antimicrobiana é popularmente associada ao látex alaranjado que exsuda da quebra dos galhos (CAMELO et al., 2011). Essa planta de uso medicinal apresenta em suas folhas compostos fenólicos como as antraquinonas, flavonóides, xantonas e benzofenonas, sendo as antraquinonas os compostos mais frequentes (GUERRA, 1997; POLITI et al., 2004; BARBOSA et al., 2011; TALA et al.,

2013). Apresenta, também, alguns outros constituintes farmacologicamente ativos, tais como vismiona D e a ferruginina, que possuem atividade imunossupressora (GUERRA, 1997), antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas (ÁLVAREZ et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; SOUZA, 2014).

E assim, algumas estratégias são utilizadas para demonstrar a atividade farmacológica, bem como o possível mecanismo que possa apresentar interesse farmacológico e clínico, quer seja *in vitro*, *in vivo* ou *in silico* dos constituintes químicos identificados na composição dos extratos obtidos.

O estudo *in silico* é uma das técnicas utilizadas para caracterizar um provável mecanismo de atividade que não seja com animais, por meio da bioinformática, como, por exemplo, a docagem molecular ou *docking* molecular. O *docking* ou ancoramento molecular está entre as técnicas computacionais disponíveis para o planejamento de fármacos. Esta técnica permite estabelecer as características de interação entre um ligante (micromolécula) e um alvo biológico (biomacromolécula). Deste modo, a técnica pode ser usada no entendimento do metabolismo de fármacos, incluindo as interações do tipo ligante-proteína. Permite, também, investigar as estruturas químicas e as possíveis orientações que determinada molécula pode assumir, no interior do sítio ligante de um biorreceptor, ou na ligação entre duas macromoléculas, por exemplo, proteína-proteína ou proteína-DNA (DE OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; SILVA, 2017).

Considerando a utilização popular de *V. guianensis* para tratar infecções fúngicas, bem como seus efeitos biológicos descritos, avaliou-se a atividade *anti-Candida* e a natureza da atividade antifúngica, se fungicida ou fungistática, bem como os efeitos sobre a adesão e sobre os biofilmes jovens e maduros, na perspectiva de contribuir com dados que possam direcionar a busca de compostos por meio da caracterização química e identificação desses constituintes para posterior estudo da docagem molecular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação de *Vismia guianensis*

A coleta das folhas ocorreu no mês outubro de 2018, pela manhã, em São Luís, MA – Brasil (2°28'47.1"S 44°13'17.4"W). Em seguida, as folhas foram limpas e secas, ao abrigo da luz solar, sob ventilação natural, a temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$), durante 7 dias. O material vegetal encontra-se devidamente identificado e depositado sob n° 11.078 no Herbário do Maranhão (MAR) na Universidade Federal do Maranhão e sob o registro

Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), conforme previsto em Lei n. 13.123/15, sob o cadastro n. AFE7A08.

2.2 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal

2.2.1 Granulometria do pó das folhas

As folhas secas foram trituradas em moinho elétrico (Tenal TE 340) e o pó obtido foi utilizado para determinar a granulometria, o teor de cinzas do material e preparação do extrato. Para a caracterização do material vegetal, a granulometria, foram colocadas duas amostras de 100g da droga vegetal em um tamisador (PRODUTEST, 4228) com tamises nº 16, 20, 40, 60, 80 e 120 e aberturas de 1190, 850, 425, 250, 180 e 125µm, respectivamente, conforme determinação da ABNT, por 20 minutos, com reostato ajustado para intensidade 7. As amostras foram retiradas e pesadas para verificação em quais malhas ficou retido maior percentual do pó (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

2.2.2 Teor de cinzas e rendimento do pó das folhas

A quantificação das cinzas totais foi avaliada conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Amostras pó de folhas de *Vismia guianensis* (3g), em duplicata, foram dispostas em cadinhos, estabilizadas por 30 minutos, em dessecador e levadas separadamente para forno mufla (Magnus LTDA®), à temperatura inicial de 200°C, sendo acrescida a cada duas horas, em 200°C, até atingir a temperatura de 600°C. Em seguida, as amostras foram retiradas e transferidas para o dessecador, até atingir a temperatura ambiente, quando foram pesadas para cálculo do volume de cinzas.

2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico e rendimento de *V. guianensis* (EHVG)

O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração por sete dias, sob o abrigo da luz. Preparou-se o extrato hidroalcoólico com diferentes hidromódulos para verificar melhor perfil de obtenção dos metabólitos. Foram utilizados os seguintes hidromódulos, 1:5; 1:10; 1:15 e 1:20. Após uma semana de maceração, o material rotaevaporado e liofilizado mantido sobre refrigeração para posterior avaliação.

Para calcular o resíduo seco e o percentual de rendimento de cada hidromódulo amostras de 1 mL do extrato foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 37°C, até secagem completa. Amostras individuais foram testadas em triplicata (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

2.4 Caracterização química do EHVG

2.4.1 Análise do EHVG por HPLC-UV-Visível

Para essa análise foi utilizado o sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Shimadzu Corp., Japão), com detector UV-VIS (Ultravioleta-Vísivel) (SPA-10A) e coluna 150 $\mu\text{m} \times 4,6 \mu\text{m}$ (Luna 5 μm C18 100 A), conforme descrito por Santos et al., (2018).

Foram utilizados como solventes de eluição o ácido acético (2% em água) e metanol. As amostras (20 μL) foram eluídas de acordo em gradientes que variaram de 5% a 60 % em metanol, durante 60 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura ambiente. Os dados foram coletados e processados usando o *software* LC Solution (Shimadzu Corp., Japão) (MEDEIROS et al.2019).

2.4.2 Análise do EHVG por FIA-ESI-IT-MSⁿ

Para a análise de infusão direta em fluxo de (FIA-ESI-IT-MSⁿ) 10 mg do EHVG foram dissolvidos em 1mL de MeOH: H₂O (1:1, v/v). Após imersão em banho ultrassônico, por 5 minutos, o extrato foi filtrado (0,22 μm) e alíquotas de 20 μL , na concentração de 5ppm, foram diretamente injetadas no sistema FIA-ESI-IT-MSⁿ.

A análise de varredura completa foi registrada na faixa de 100-1000 m/z. Fragmentações de múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram obtidos usando o método de dissociação induzida por colisão contra o hélio (CID), para ativação de íons. A identificação dos diferentes compostos do EHVG foi feita a partir da comparação entre os espectros no ultravioleta (UV), as fragmentações características e os dados da literatura (DE OLIVEIRA-SANTOS et al, 2018).

2.5 Avaliação da atividade anti-*Candida in vitro*

2.5.1 Isolamento dos microrganismos

Foram utilizadas três amostras padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028; ATCC 14053; ATCC SC5314), uma não-*albicans* (*Candida glabrata* - ATCC 2001). Foram também utilizadas oito amostras de *Candida albicans* obtidas a partir de isolados clínicos, identificados por PCR multiplex, provenientes da coleção do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade CEUMA, São Luís, MA, Brasil, conforme aprovação do comitê de ética (Parecer n°.813.402/2014). (Tabela 1)

Tabela 1. Detalhamento das linhagens e isolados testados.

| Identificação | Espécie | Tipo de amostra |
|------------------------|--------------------|-----------------|
| ATCC 2001 ^a | <i>C. glabrata</i> | Padrão |
| ATCC 90028 | <i>C. albicans</i> | Padrão |
| ATCC 14053 | <i>C. albicans</i> | Padrão |
| SC 5314 | <i>C. albicans</i> | Padrão |
| A1(vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A2 (vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A3 (vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A4 (vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A5 (vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A6 (vaginal) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A7 (oral) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |
| A8 (oral) | <i>C. albicans</i> | amostra clínica |

a: ATCC® (American Type Culture Collection)

2.5.2 Preparo do inóculo

As diferentes linhagens foram ativadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com Cloranfenicol, sendo semeadas e incubadas por 24h, a 35°C. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina estéril [(0,145 mol L⁻¹; 8,5 g L⁻¹ NaCl (0,85%)] e a suspensão resultante foi homogeneizada, em agitador do tipo Vortex®, durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada por meio da espectrofotometria, em comprimento de onda de 530nm, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente da solução-padrão, correspondente a 0,5 da escala de McFarland.

2.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A padronização dos testes de susceptibilidade antifúngica (TSA) seguiu normas previamente estabelecidas (CLSI, 2012/M27-S4). O teste foi realizado em placas de microtitulação estéreis de 96 poços. Foram adicionados aos poços: as suspensões de *Candida* citadas na tabela 1 (1×10⁶ CFU/mL), 100 µL do meio de cultura RPMI-1640 (com glutamina, vermelho de fenol e sem bicarbonato e com indicador), tamponado em MOPS [ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico. Em seguida, foram adicionados a primeira coluna 100 µL das diluições seriadas do EHVG (50 a 0,095mg/mL). Foram utilizados como controle positivo Anfotericina B em diluição seriada (16 a 0,0313-µg/mL - ANFO B) e Fluconazol (256 a 0,125-µg/mL - FLU) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Para controle de crescimento utilizou-se somente o meio RPMI. As placas foram incubadas à 37°C, por 24 horas. O resultado foi analisado visualmente e considerado

como CIM a menor concentração onde não foi detectado crescimento. O teste foi realizado em triplicata em dois experimentos diferentes.

2.5.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi determinada a partir dos resultados obtidos na determinação da CIM. Uma alíquota, de 10µL dos poços correspondentes até 4× o valor da CIM, foi semeado em placa contendo ASD com Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C, por 24h-48 horas e ao final considerou-se como CFM a menor concentração do EHVG e dos antifúngicos sem crescimento fúngico. Todos os testes foram realizados em triplicata. A razão CFM/CIM foi calculada para determinar a atividade fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM \leq 4$) (SIDICQUI et al, 2013).

2.5.6 Avaliação da Cinética de crescimento por determinação das unidades formadoras de colônia (UFC)

Foram selecionadas duas linhagens padrão para avaliação dos efeitos do EHVG na cinética de crescimento, sendo uma *Candida glabrata* (ATCC 2001) e outra *Candida albicans* (SC 5314). O ensaio foi realizado segundo Seleem et al., (2016), com adaptações. O inóculo fúngico foi diluído em meio RPMI-1640, para se obter a concentração final de 5×10^3 CFU/mL. Esses inóculos foram então adicionados aos poços de uma placa (96 poços) e tratados com diluições do EHVG correspondentes aos valores da 1×CIM e 2×CIM. A Anfotericina B e o Fluconazol foram utilizados como controle positivo e poços com inóculo e meio RPMI-1640, foram considerados como controle negativo. As placas foram incubadas a 37° por 24 horas, para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). A cinética de crescimento foi avaliada em diferentes períodos de incubação: 0; 3; 6; 12; 24; 36 e 48 horas. Foi realizada a diluição seriada para cada amostra (10^{-1} a 10^{-4}), e transferidos 10µL para placas de Petri contendo ASD com Cloranfenicol. Após contagem das colônias foi aplicada a seguinte fórmula:

$$UFC/mL = n^\circ \text{ de colônias contadas} \times 10^n / q,$$
 onde n corresponde ao valor absoluto da diluição escolhida e q ao volume semeado (mL) nas placas para cada diluição (ZAGO et al, 2015). Experimento realizado em triplicata em dois experimentos diferentes.

2.5.7 Avaliação do efeito do EHVG na adesão de *Candida* spp.

Inóculos de *Candida* das amostras foram ativadas (vide item 2.5.2) e em sequência lavados com PBS estéril (3mL) e centrifugados $2060 \times g$, durante 5 minutos, por duas vezes. Após a última lavagem os inóculos foram resuspendidos em PBS estéril (5mL) e as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro a 530nm, para ajustá-los a concentração de 1×10^7 CFU/mL (OLIVEIRA et al., 2017; GULATI et al., 2017).

Para a determinar a adesão foi adicionado aos inóculos 100 μ L de PBS estéril e 100 μ L de EHVG, nas concentrações correspondentes a $1 \times$ CIM e $\frac{1}{2}$ CIM, para cada linhagem de *Candida* testada (ATCC2001; ATCC90028 e SC5314). As amostras foram diluídas seriadamente e incubadas a 37°C, por 90 min. Em seguida, foram descartados os sobrenadantes e as placas foram lavadas duas vezes com PBS estéril. Na última lavagem todo o PBS foi descartado e as células foram resuspendidas em 100 μ L PBS estéril.

A técnica de microgotas foi utilizada para semear as diluições entre 10^{-2} a 10^{-4} em placas ASD com Cloranfenicol, as quais foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após contagem das colônias foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = n^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times 10^n / q$$

onde n = valor absoluto da diluição escolhida e q = volume (mL) semeado de cada diluição nas placas (ZAGO et al, 2015). O ensaio foi realizado em triplicata em dois experimentos diferentes.

2.5.8 Avaliação do efeito do EHVG sobre a formação de biofilme

Os experimentos foram realizados conforme Senevirante et al (2016) com adaptações. Para avaliação da interferência do extrato na formação do biofilme, foram utilizadas as concentrações sub-inibitórias do EHVG (200 μ L), correspondentes aos valores de $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{2}$ CIM (ATCC2001; ATCC90028 e SC5314). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi retirado e as placas foram lavadas $2 \times$ com PBS estéril. A determinação do efeito do EHVG foi realizada a partir da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), atividade metabólica por MTT (GULATI et al, 2017) e biomassa por cristal violeta (ZAGO et al., 2015).

Para quantificar o número de UFC utilizou-se a técnica de microgotas para semear as diluições entre 10^{-2} a 10^{-4} em placas ASD com Cloranfenicol, as quais foram incubadas a 37°C, por 24-48 horas. Após contagem das colônias foi aplicada a fórmula descrita por Zago et al., (2015) (vide item 2.5.6).

Para análise do efeito do extrato no biofilme formado maduro seguiu-se o mesmo procedimento adotado para o biofilme jovem, sendo que as microplacas foram incubadas por 48 horas, a 37°C, com uma troca do meio de cultura depois de 24 horas. O sobrenadante foi aspirado e o biofilme lavado 2× com PBS estéril. Utilizou-se concentrações EHVG (200µL), correspondentes aos valores de 2×CIM e 4×CIM. As placas foram incubadas a 37°C, por mais 24 horas, após a adição do extrato. Ao final as amostras foram lavadas 2× com PBS estéril, antes da contagem de unidades formadoras de colônias e determinação da atividade metabólica e avaliação do biofilme pela coloração com cristal violeta (SENEVIRATNE et al, 2016). Os efeitos do EHVG sobre o biofilme foram também avaliados após incubação com MTT.

Para quantificar o n° de UFC, utilizou-se também a técnica de microgotas para semear as diluições entre 10^{-2} a 10^{-4} em placas ASD com Cloranfenicol, as quais foram incubadas a 37°C, por 24-48 horas (ZAGO et al, 2015).

Em todos os experimentos, biofilmes sem extratos foram utilizados como controle negativo e biofilmes tratados com Anfotericina B (ANFO B) ou Fluconazol (FLU) foram utilizados como controle positivo.

2.6 Ensaio de viabilidade e citotoxicidade do EHVG

Foram realizados três testes distintos para avaliar a viabilidade e citotoxicidade: MTT, atividade hemolítica e o teste com vermelho neutro.

2.6.1 Citotoxicidade por MTT

Foi avaliada a citotoxicidade dos extratos sobre macrófagos murinos (RAW 264.7) (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram incubadas por 1 hora, a 37°C e presença de CO₂ (5%), em meio de RPMI, adicionado de soro fetal bovino [10% (Invitrogen, Nova York, EUA)] e de penicilina/estreptomicina [1% (Gibco, Grand Island, EUA)]. Após a sub-confluência, as células foram desprendidas com auxílio do *cell scraper* (TPP) e centrifugadas a 2000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em meio RPMI-1640 e distribuídas em placas de microtitulação (100 µL/1×10⁶/poço) e incubadas novamente por 4 horas, na presença de CO₂, para que aderissem. Em seguida foram adicionadas concentrações crescentes do EHVG (0,5 a 50mg/mL) e incubadas a 37°C, em presença de 5% CO₂, durante 24h. Para controle de crescimento as células foram incubadas na presença do meio RPMI-1640 sem o extrato.

Ao final do período de incubação o sobrenadante foi retirado e as células aderidas foram avaliadas adicionando-se aos poços 10µL da solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- brometo de difeniltetrazol (5 mg/mL; Sigma, USA)]. As placas foram incubadas a 37°C, por 4h, ao abrigo da luz. Para leitura retirou-se o sobrenadante e adicionou-se em cada 100 µL de Sódio Dodecil Sulfato (SDS), para a extração do formazan. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm, após 24h de incubação.

2.6.2 Determinação da atividade hemolítica do EHVG

O sangue de carneiro desfibrinado (EB FARMA, Rio de Janeiro, BR) foi utilizado no estudo. Os eritrócitos foram isolados por centrifugação a $290 \times g$, por 10 minutos, a 4°C. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) e ressuspensos a 2% (v/v). Para avaliar a atividade hemolítica 100 µL da solução eritrocitária foram adicionados a microplacas de 96 poços de fundo chato (Kasvi, Itália) e adicionados de diluição seriada do EHVG variando de 0,05 a 50 mg/mL. O Triton X-100 (Sigma-Aldrich) foi utilizado a 1% como controle da hemólise total e PBS estéril foi usado como controle negativo.

Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a $300 \times g$, por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância a 540 nm (SILVA, et al., 2016).

A atividade hemolítica relativa foi expressa em relação aos valores obtidos com Triton X-100, usando a seguinte fórmula:

Atividade hemolítica relativa (%) = $[(As-Ab).100] / (Ac-Ab)$, onde (Ab) é absorbância de controle negativo, (As) absorbância na presença do extrato e (Ac) absorbância na presença de Triton X-100. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em três experimentos diferentes.

2.6.3 Viabilidade celular por Vermelho Neutro

Para o teste por vermelho neutro analisou a incorporação do corante aos lisossomos de células viáveis. Para este fim, o Vermelho Neutro (Vetec/Sigma Aldrich, SP, Brasil) foi preparado em PBS estéril (20 µg/mL) e 100 µL/poço desta solução foi colocada nos poços onde já tinham sido adicionados células RAW 264.7, ($100 \mu\text{L}/1 \times 10^6$), tratadas com diferentes concentrações de EHVG a partir de 50mg/mL a 0,5mg/mL. Após 2 h de incubação, sob o abrigo da luz, as placas foram centrifugadas e o

sobrenadante foi removido. Em seguida foi adicionado aos poços álcool etílico P.A. (100 μ L). A placa foi agitada em mesa orbital (Solab), por 15 min. Em seguida, a absorbância foi determinada a 570nm. Os valores obtidos foram convertidos em percentual de viabilidade celular (OLIVEIRA et al., 2017).

2.7 Análise *in silico*

2.7.1 Ligantes e preparações de alvo

Os compostos, Vismiona D, Antraquinona F, Kaempferol e Catequina, identificados por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MS no extrato bruto das folhas de *V. guianensis*, foram estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o GaussView 5.0.8 (DENNINGTON et al., 2009). As propriedades geométricas e vibracionais foram calculadas, no vácuo, considerando o método relativo a Teoria Funcional da Densidade (DFT), usando a função híbrida B3LYP, combinada com o conjunto de bases 6-31 ++ G (d, p) com o Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). A estrutura tridimensional da 14-alfa-demetilase da levedura *Candida albicans* (CaCYP51) foi obtida do Protein Data Bank (PDB) (# 5FSA), resolvido por cristalografia de raios X, com resolução de 2,86 Å.

2.7.2 Ancoragem molecular (*Docking molecular*)

As estruturas de CaCYP51 e dos ligantes foram preparadas para os cálculos de docking molecular (DM) usando o módulo AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6. A estrutura do CaCYP51 foi considerada rígida, enquanto cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais de Gasteiger foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Em seguida, os hidrogênios apolares da CYP e dos ligantes foram subsequentemente fundidos. Uma caixa cúbica com 120×120×120 pontos espaçamentos de 0,35Å foi gerada em toda porção que compreende o sítio ativo da macromolécula.

A caixa de grade foi centrada no grupo HEME da enzima CaCYP51. Para o DM foi feita a busca global usando Algoritmos Genéticos Lamarckianos (AGL) e busca local (LS) usando pseudo-Solis e Wets. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de acoplamento e o restante dos parâmetros de encaixe foram definidos como valores padrão. As coordenadas iniciais das interações da enzima CaCYP51 e dos compostos presentes no EHVG foram escolhidas, utilizando o critério de menor conformação de encaixe do cluster e menor energia combinada com a inspeção

visual (RAMOS et al., 2012; SILVA et al., 2016). A ancoragem molecular foi realizada usando o AutoDock 4.2 (MORRIS et al., 2009).

2.8 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). O tratamento estatístico foi por análise de variância (One-way ANOVA), seguido de pós-teste Teste Dunn's para Múltiplas comparações e teste T de Student para comparações entre dois grupos. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prisma, versão 7.0. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Granulometria e teor de cinzas do material vegetal

A Figura 1 mostra que de acordo com a granulometria o pó das folhas de *V. guianensis* pode ser classificado como pó semi-fino, pois grande parte do material ficou retido na malha M60 (34,09%), seguida da malha M80 (20,73%).

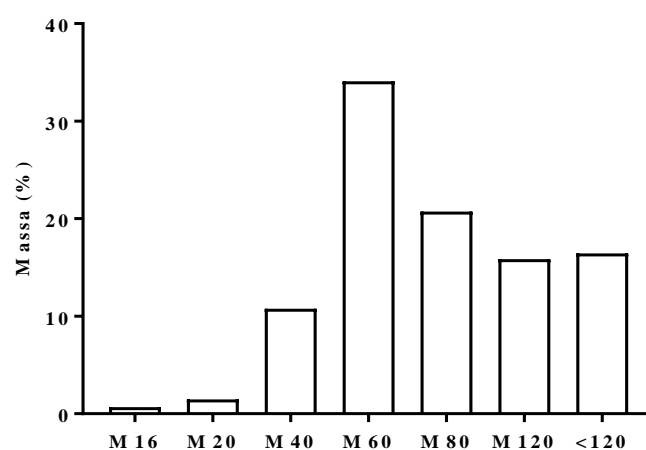


Figura 1. Percentual do pó das folhas secas de *Vismia guianensis*, após a moagem e tamisação, utilizando diferentes tipos de malhas.

Em relação ao teor de cinzas o percentual de matéria orgânica obtido do pó das folhas de *V. guianensis* foi de 97% e o rendimento dos hidromódulos foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de rendimento dos diferentes hidromódulos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis*.

| Hidromódulo | Resíduo seco ($\bar{X} \pm SD$) | Resíduo total | Rendimento extrativo (%) |
|-------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|
| 1:5 | 21 \pm 0.0018 | 210 | 0,5 |
| 1:10 | 13 \pm 0.0004 | 258 | 13 |
| 1:15 | 8 \pm 0.0006 | 119 | 6 |
| 1:20 | 7 \pm 0.0017 | 15 | 8 |

\bar{X} - média; SD – desvio padrão; valores do resíduo seco e total (mg).

3.2 Análise química dos extratos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSⁿ do EHVG

A figura 2 apresenta o resultado do perfil cromatográfico dos hidromódulos, sendo o 1:10, selecionado para o estudo, por apresentar quantificação relativa, em área de pico, o melhor perfil de extração com os percentuais de rendimento dos compostos sinalizados na figura.

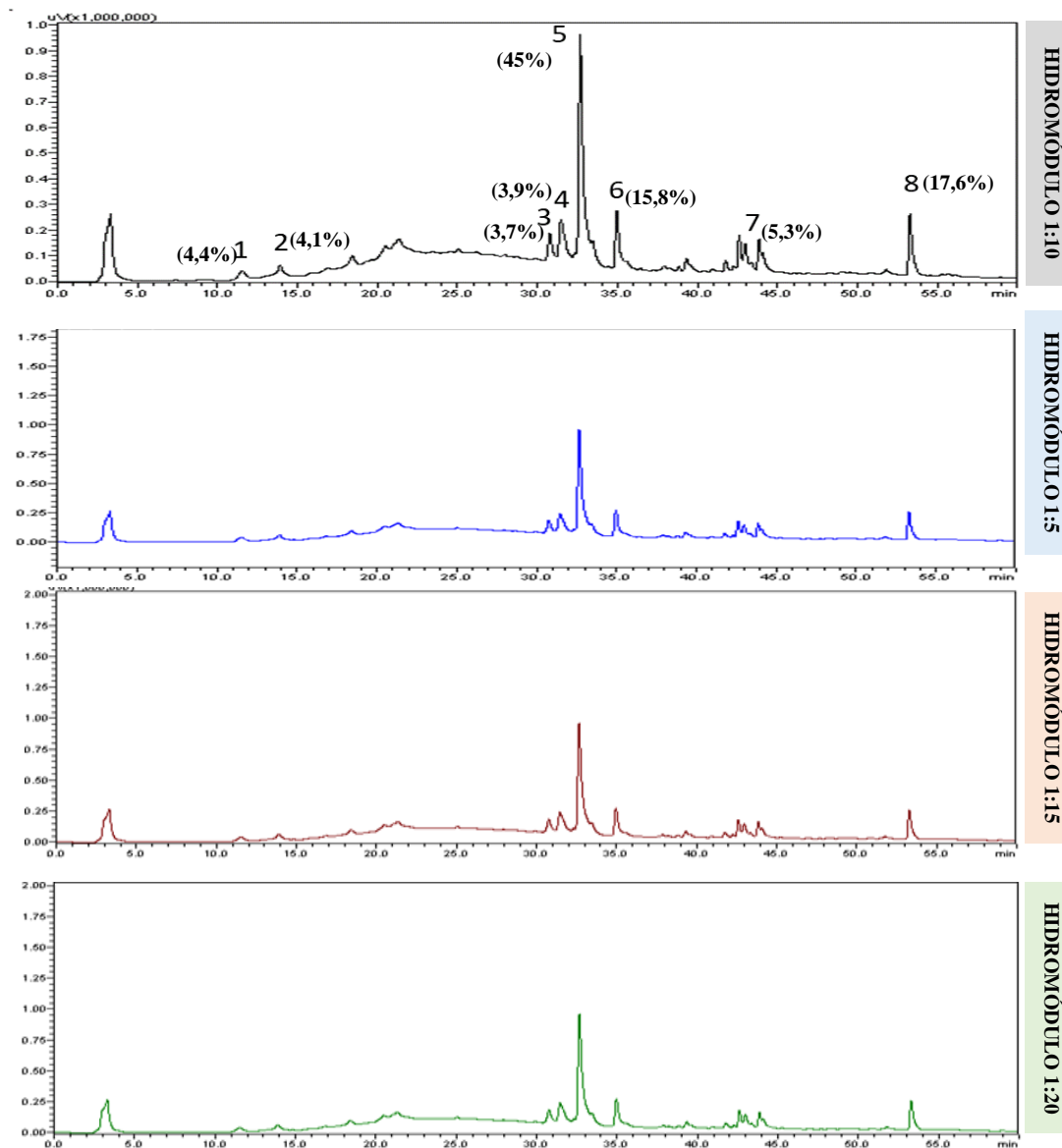


Figura 2. Cromatogramas dos hidromódulos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* por HPLC com detecção no ultravioleta (HPLC–UV/Vis), com picos e áreas definidos.

A Figura 3 mostra o espectro do *full scan*, do extrato hidroalcoólico de *V. guianensis*, do hidromódulo 1:10 para a identificação dos compostos químicos. Foi possível identificar 14 compostos, apresentados na Tabela 3, tendo a presença dos marcadores majoritários desses metabólitos, antraquinonas, flavonoides e a vismiona D.

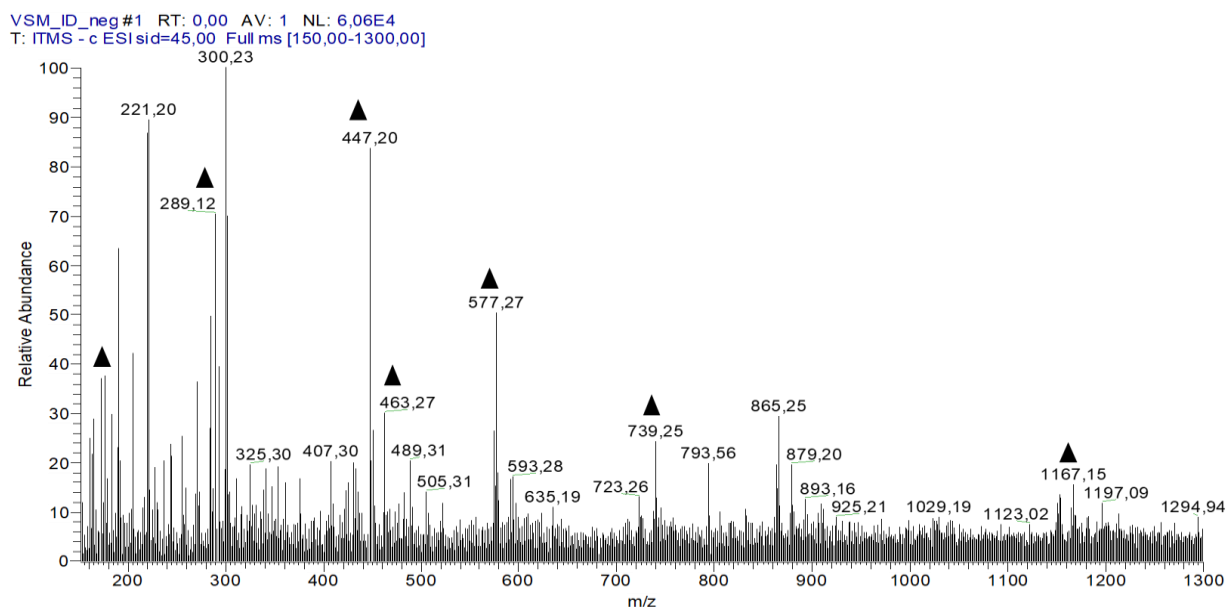
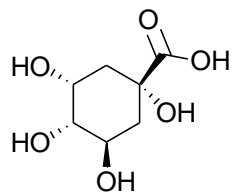


Figura 3. Espectro de primeira ordem para a análise por injeção direta em fluxo (FIA-ESI-IT-MSⁿ) obtidos em modo negativo para o EHVG. (▲) fragmentos dos constituintes químicos identificados.

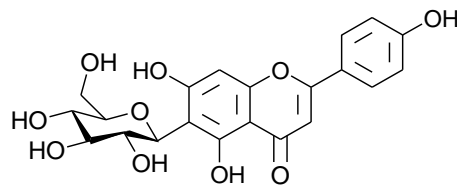
Tabela 3. Identificação dos compostos de *Vismia guianensis* por MSⁿ.

| Número | [M-H] ⁻ | MS ⁿ íons | Composto proposto |
|--------|--------------------|------------------------------|--|
| 1 | 191 | 173, 111, 85 | Ácido quinico |
| 2 | 431 | 269 | Isovitexina |
| 3 | 447 | 429, 357 | Isoorientina |
| 4 | 289 | | Catequina |
| 5 | 447 | 429, 301, 269, 229 | Orientina |
| 6 | 431 | 285, 163 | Kaempferol-o-ramnosídeo |
| 7 | 731 | 285, 255 | Kaempferol galactodídeo-ramnosídeo |
| 8 | 1153 | 1001, 983, 789 | Tetrâmero de Catequina |
| 9 | 463 | 301, 283, 273, 229, 179, 121 | Quercitina glicosídeo |
| 10 | 577 | 425, 407, 285, 257, 213 | Dímero de Catequina |
| 11 | 1167 | 1015, 863, 711 | Trímero de procianidina digalatoe tipo A |
| 12 | 409 | 273, 255 | Vismiona D |
| 13 | 283 | 269, 239 | Antraquinona F |
| 14 | 285 | | Kaempferol |

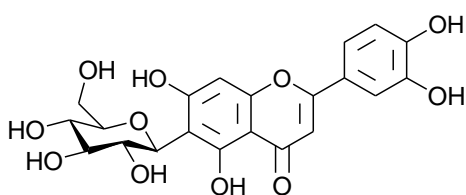
A Figura 4 demonstra as estruturas das substâncias identificadas no extrato das folhas de *V. guianensis*, conforme espectro da Figura 3 e tabela 2. Importante notar as estruturas da Vismiona D, da Antraquinona F e do Kaempferol, marcadores do gênero *Vismia*.



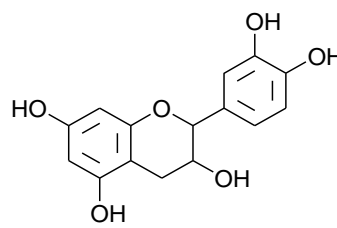
ácido quínico
(1)



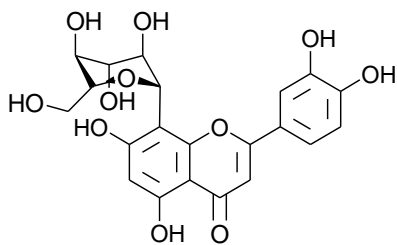
isovitexina
(2)



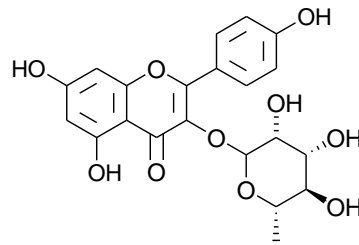
isoorientina
(3)



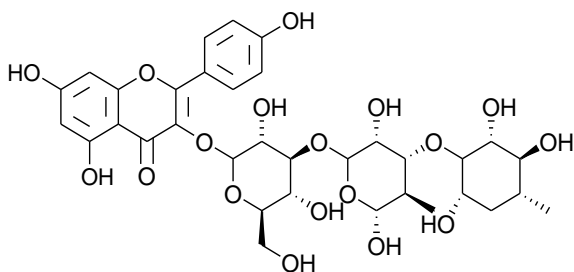
catequina
(4)



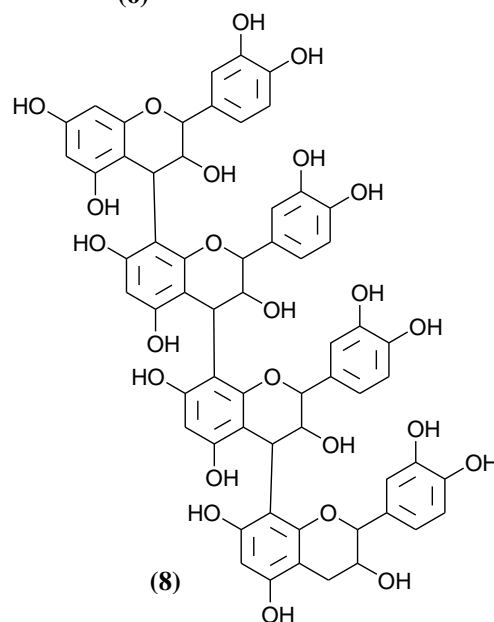
orientina
(5)



kaempferol-o-ramnosideo
(6)



kaempferol-galactoside-ramnosideo-3'''-ramnosideo
(7)



(8)
tetrâmero de catequina

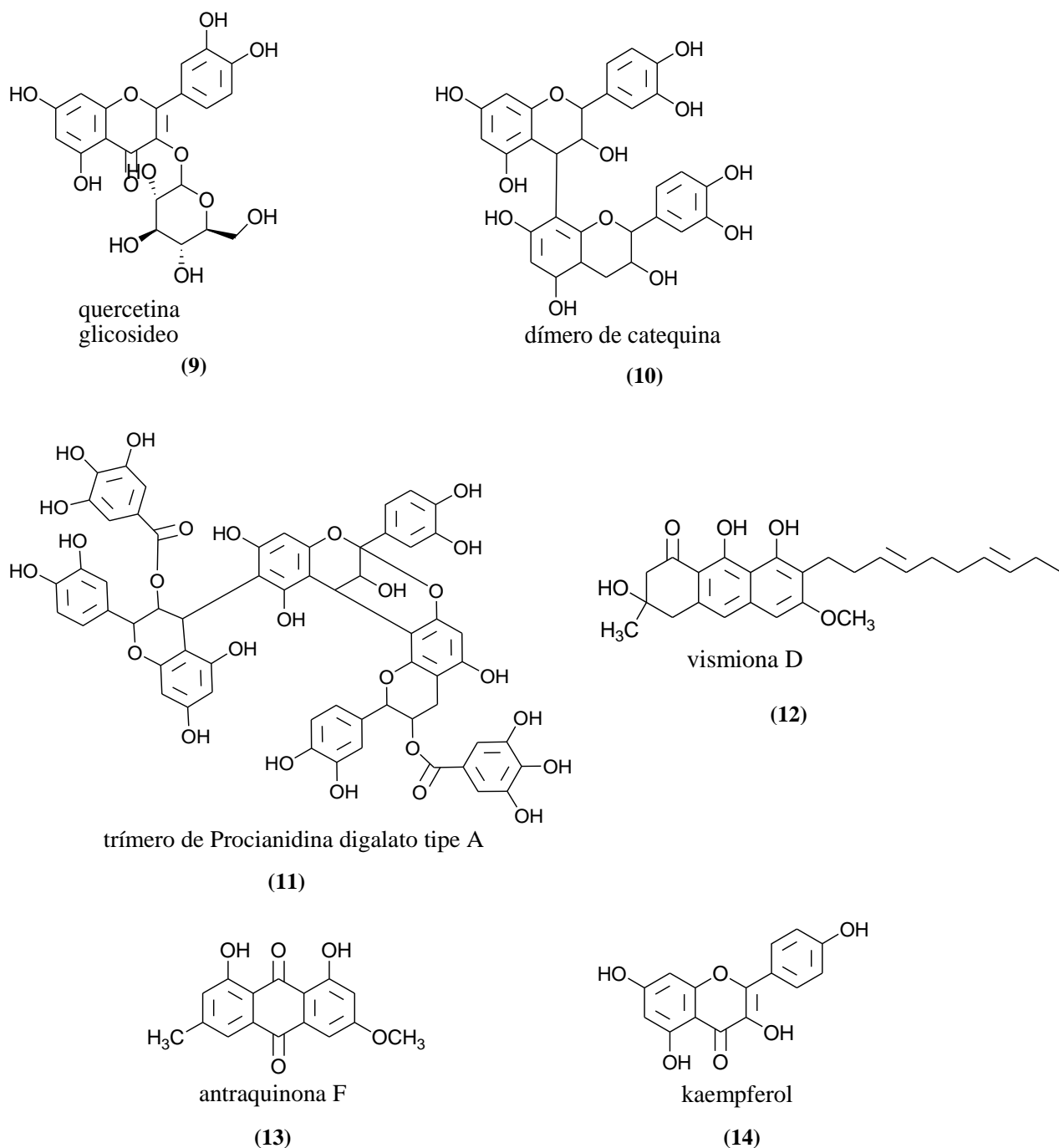


Figura 4. Estruturas químicas de compostos identificados de *Vismia guianensis*.

3.3 O EHVG apresentou baixa toxicidade para macrófagos e eritrócitos

O EHVG apresentou baixa toxicidade tanto para eritrócitos (Figura 5A) como para leucócitos (Figura 5B), sobretudo nas concentrações entre 10 e 0,5 mg/mL, as quais apresentaram valores de citotoxicidade menores do 10%. O EHVG não afetou a viabilidade celular que foi superior a 80% nas concentrações menores do que 10mg/mL (Figura 5C).

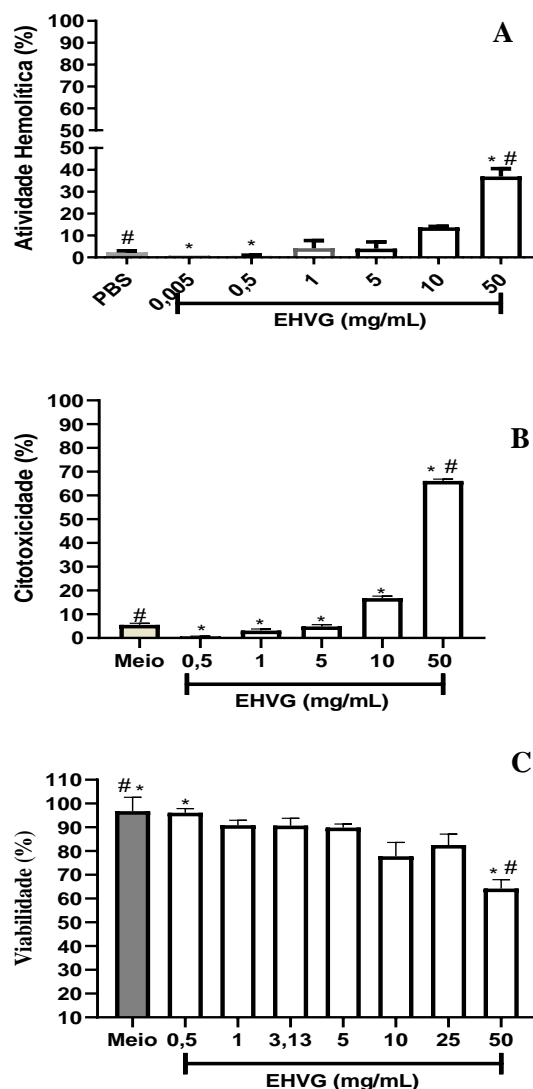


Figura 5. Atividade citotóxica das diferentes concentrações do extrato das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG) avaliado por hemólise de eritrócitos (A), sobre células RAW264.7, por MTT (B) e com vermelho neutro (C). Meio e DMSO foram utilizados como controle negativo e Triton X como controle positivo. Os dados representam $X \pm SD$ de amostras individuais testadas e quadruplicata. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle positivo e (#) $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

3.4 Ação anti-*Candida* do EHVG considerando diferentes linhagens

Todas as linhagens de *Candida* testadas foram sensíveis a ação do EHVG, como mostram os valores de CIM e CFM na tabela 4, inclusive as linhagens *Candida albicans* SC5314 e *Candida glabrata* (ATCC 2001), além dos isolados clínicos. Importante também mencionar que o EHVG apresentou atividade fungicida para todas as amostras, sendo o menor valor de CIM para as amostras ATCC 2001 – *C. glabrata*.

ATCC 90028 – *C. albicans* entre as amostras padrão e para 4 entre dos sete isolados clínicos (A2; A4; A5 e A6).

Tabela 4. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração fungicida mínima (CFM) e a atividade fungicida ou fungistática do extrato das folhas de *Vismia guianensis* sobre linhagens de *Candida* spp.

| Linhagens | <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Chosy | | | Antifúngicos | |
|---|--|-------------|-------------------|---------------------|------------------|
| | CIM (mg/mL) | CFM (mg/mL) | Atividade CFM/CIM | ANFO B ^b | FLU ^c |
| ATCC 2001 ^a – <i>C. glabrata</i> | 3,125 | 6,25 | 2 | 0,25 | 16 |
| ATCC 90028 – <i>C. albicans</i> | 3,125 | 3,125 | 1 | 1 | 8 |
| ATCC 14053 – <i>C. albicans</i> | 6,25 | 6,25 | 1 | 0,5 | 8 |
| SC 5314 – <i>C. albicans</i> | 6,25 | 6,25 | 1 | 0,5 | 16 |
| A1 <i>C. albicans</i> (vaginal) | 6,25 | 12,5 | 2 | 1 | 8 |
| A2 <i>C. albicans</i> (vaginal) | 3,125 | 3,125 | 1 | 0,5 | 8 |
| A3 <i>C. albicans</i> (vaginal) | 6,25 | 6,25 | 1 | 0,25 | 4 |
| A4 <i>C. albicans</i> (vaginal) | 3,125 | 6,25 | 2 | 0,5 | 16 |
| A5 <i>C. albicans</i> (vaginal) | 3,125 | 3,125 | 1 | 0,5 | 16 |
| A6 <i>C. albicans</i> (oral) | 3,125 | 3,125 | 1 | 0,5 | 16 |
| A7 <i>C. albicans</i> (oral) | 6,25 | 6,25 | 1 | 1 | 16 |

(a) Valores expressos em mg/mL; (b) Concentração da Anfotericina B – 0,03 a 16µg/mL; (c) Concentração de Fluconazol – 0,125-256µg/mL.

A CIM, além de mostrar as concentrações efetivas do EHVG diante de diferentes linhagens, serviu, também como parâmetro para a seleção dessas linhagens nos ensaios a seguir, quando foram selecionadas, inicialmente, apenas duas linhagens, uma *C. albicans* (SC 5314) e não-albicans (*Candida glabrata* ATCC 2001), ambas de interesse clínico.

3.4.1 O tratamento com EHVG inibe o crescimento de *Candida* spp.

A Figura 6 mostra que o EHVG apresentou atividade fungicida tanto na concentração correspondente a 2× os valores de CIM (12,5mg/mL) como na 1×CIM (6,25mg/mL), para linhagem SC 5314, após 36 e 48 horas, respectivamente (Figura 6A). O mesmo ocorreu para a linhagem ATCC 2001, nas concentrações 2×CIM (6,25mg/mL) e 1×CIM (3,125mg/mL) após 24 e 36 horas, respectivamente (Figura 6B). Observou-se

que o EHVG apresentou melhor atividade em menor tempo, diante de *Candida glabrata* (ATCC 2001).

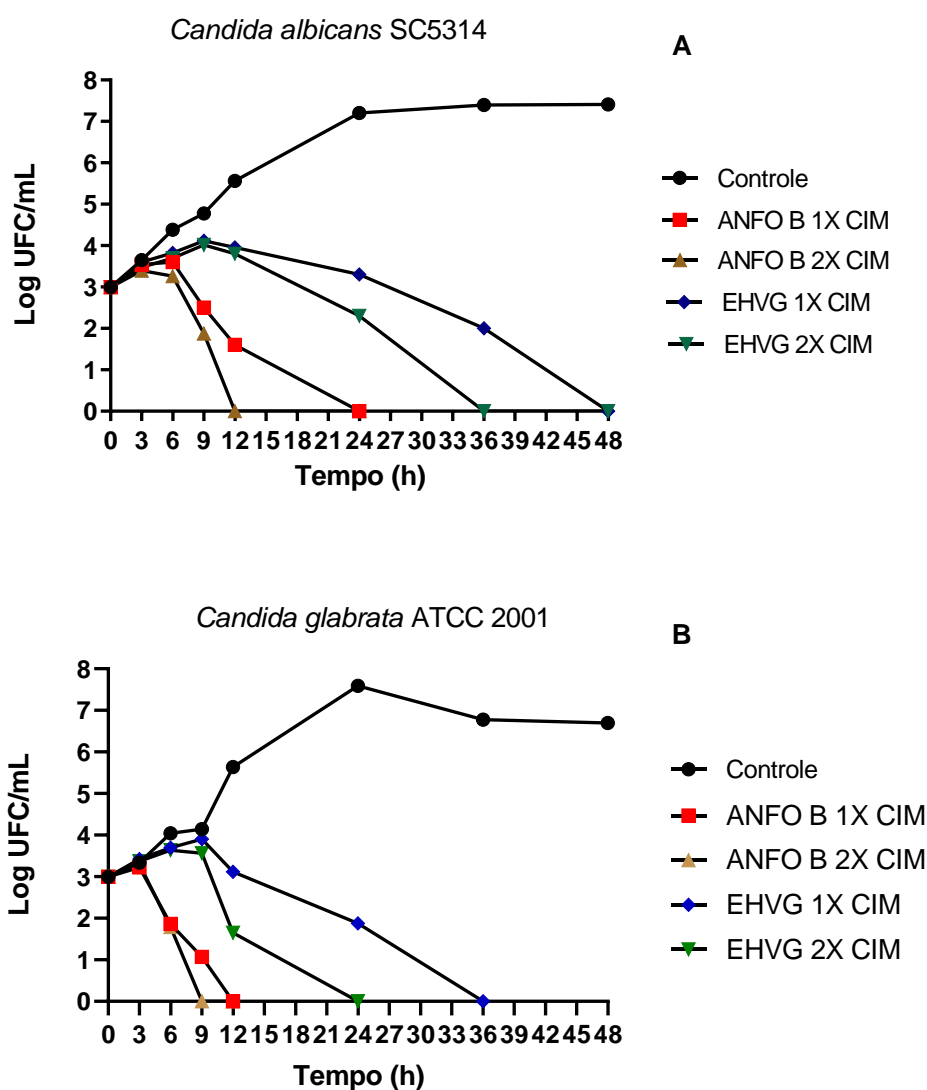


Figura 6. Efeito do EHVG sobre a curva de morte de *Candida albicans* SC5314(A) e *Candida glabrata* ATCC 2001 (B), em concentrações 1×CIM ou 2×CIM, comparado ao tratamento com Anfotericina B CIM (0,5µg/mL) e 2× CIM (1µg/mL) (ANFO B)

3.4.2 O tratamento com EHVG inibiu a adesão de *Candida* spp

A partir desse ensaio, acrescentou-se outra espécie de *Candida albicans* (ATCC 90028), além *Candida albicans* SC5314 e de *Candida glabrata* (ATCC 2001), como mostra a Figura 7.

Na Figura 7A é possível observar que o EHVG foi mais efetivo do que a Anfotericina B em inibir adesão de *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. albicans* (SC5314), quando na menor concentração (1/2×CIM). Na maior concentração de EHVG (1×CIM)

inibiu a adesão das três linhagens testadas, com efeito similar aos controles positivos, independente da concentração utilizada (Figuras 7B e 7C).

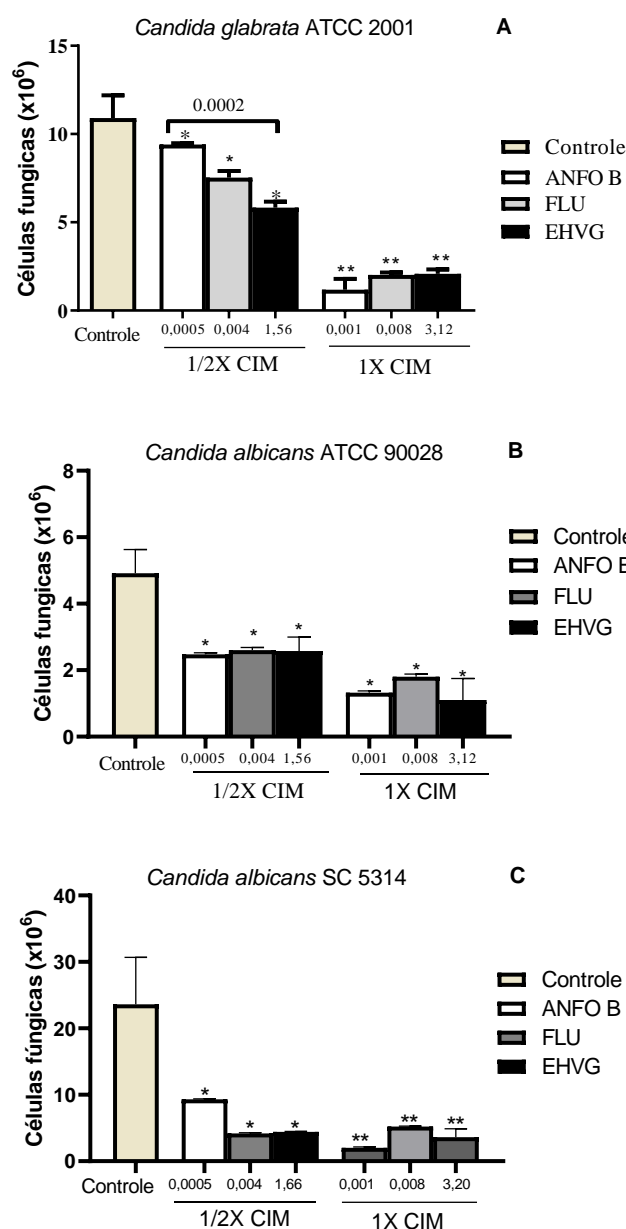


Figura 7. Tratamento com EHVG na adesão de *C. glabrata* ATCC2001 (A) e a *C. albicans* ATCC 90028 (B) e *C. albicans* SC5314 comparados com a Anfotericina B (ANFO B) e ao Fluconazol (FLU). (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0,01$ em relação ao Controle não tratados (#) $p < 0.05$ em relação a Anfotericina B.

3.4.3 O EHVG interferiu tanto no biofilme jovem como o maduro

A Figura 8 mostra que o tratamento com EHVG inibiu tanto os biofilmes jovens, formados em até 48h (Figuras 8A; 8C; 8E), como os maduros com até 72h (Figuras 8B; 8D; 8F), com efeito semelhante a Anfotericina B e o Fluconazol, em comparação aos controles não tratados. Para ATCC 90028, no biofilme jovem não houve

diferença, o que não aconteceu no biofilme maduro, onde o EHVG apresentou efeito melhor que o Fluconazol.

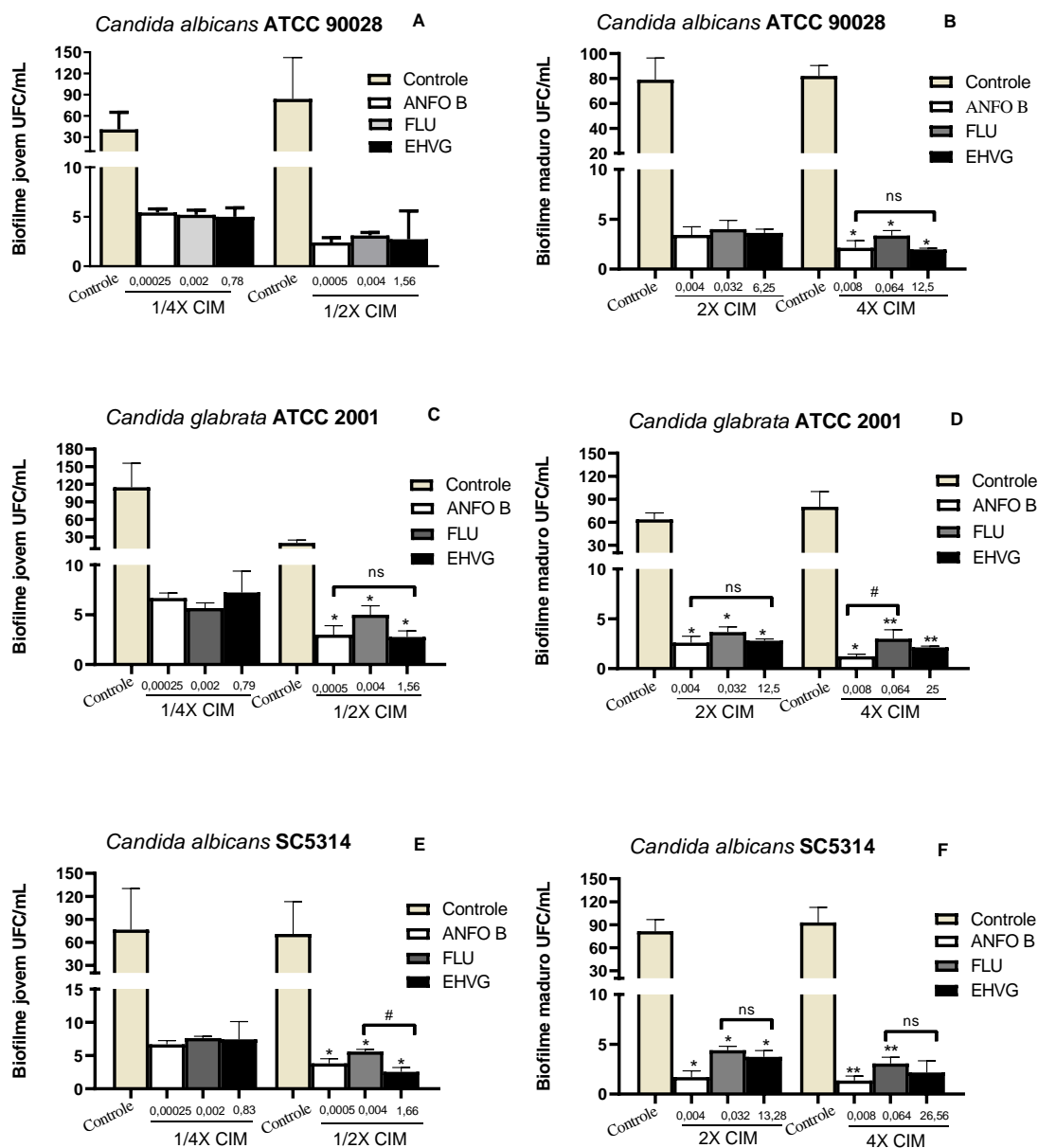


Figura 8. Efeito inibitório do EHVG na formação de biofilmes jovens (A; C; E) e maduros (B; D; F). Os valores de UFC/mL foram estabelecidos em culturas de *C. albicans*. (ATCC90028 – A e B); *Candida glabrata* (ATCC2001 – C e D), e *C. albicans* (SC5314 – E e F) após 48h e 72h (UFC/mL). Os efeitos do EHVG foram comparados aos da Anfotericina B (ANFO B), do Fluconazol (FLU) e aos biofilmes não tratados (Controle). (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,001$ em relação ao controle e (#) $p < 0,05$ em relação ao Fluconazol ou Anfotericina B. (ns) resultados similares.

Por meio da utilização do teste colorimétrico, MTT, a figura 9 mostra que o tratamento com o EHVG, mesmo nas concentrações sub-inibitórias ($1/4 \times \text{CIM}$ e $1/2 \times \text{CIM}$) inibiu a formação de biofilme jovem e maduro, com eficácia semelhante ao Fluconazol,

para a linhagem de *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida albicans* (ATCC 90028). E se apresentou mais efetiva para *Candida albicans* (SC5314) com maior CIM.

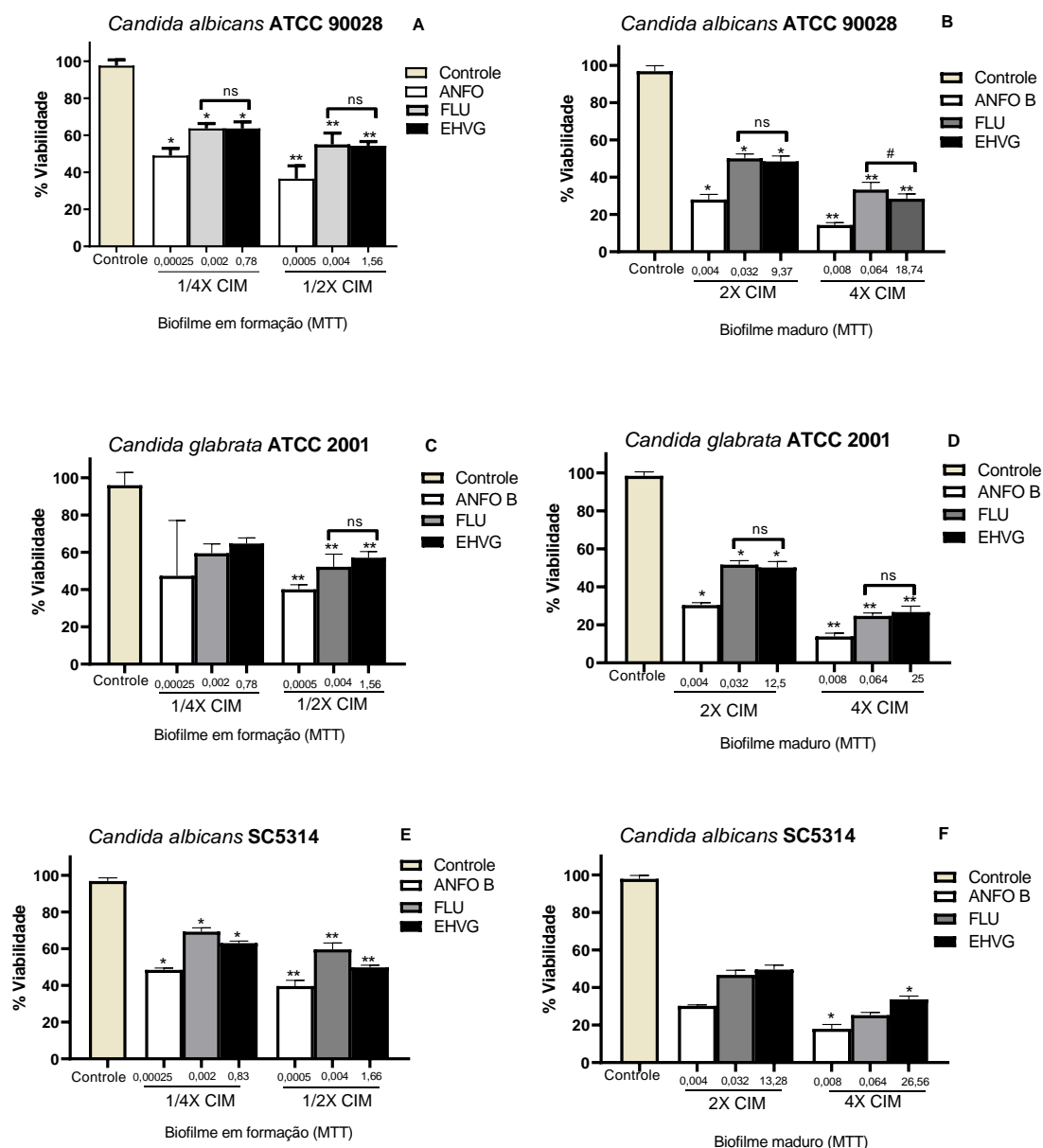


Figura 9. Percentual de inibição da formação de biofilme por MTT de *Candida* spp. (ATCC 90028 – A e B), (ATCC2001 – C e D) e (SC5314– E e F) após 48h e 72h em amostras tratadas com EHVG e comparadas as tratadas com Anfotericina B (ANFO), com Fluconazol (FLU) e com as não tratadas (Controle) em mg/mL. (*) $p < 0.05$ em relação ao Fluconazol e a Anfotericina B.

A Figura 10 mostra redução da biomassa, realizada pela técnica colorimétrica Cristal Violeta (CV) nos grupos tratados com EHVG, por 48 horas e 72 horas. A inibição observada foi semelhante à das amostras tratadas no ensaio por MTT servindo como confirmatório para os achados anteriores. Destaca-se que o EHVG apresentou percentual

de redução da biomassa com eficácia semelhante ao Fluconazol, para a linhagem de *Candida albicans* (ATCC90028) e *Candida glabrata* (ATCC2001) tanto para o biofilme jovem como o maduro. E demonstra sua efetividade, também, frente a *C. albicans* SC5314.

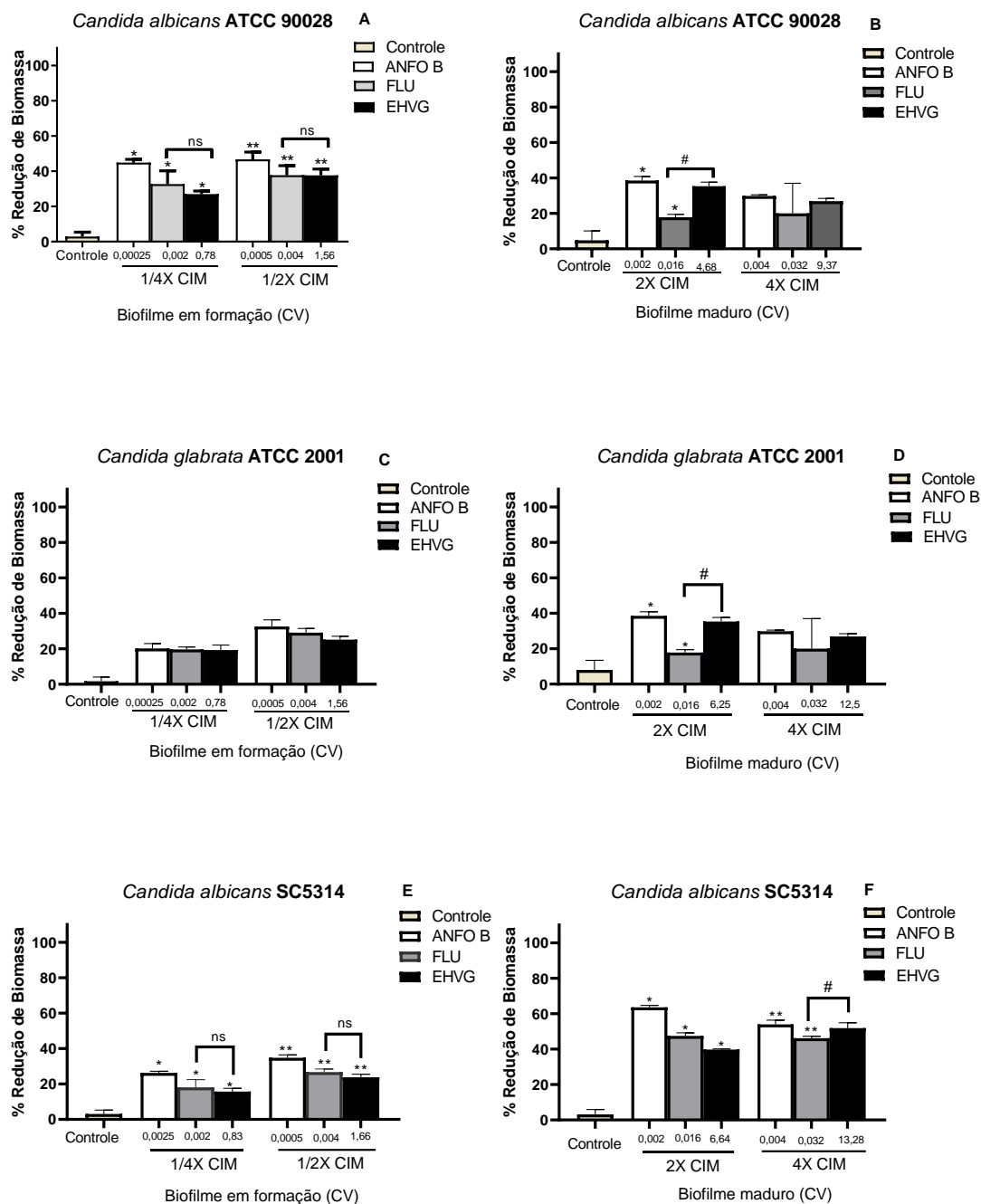


Figura 10. Percentual de redução da formação de biomassa por Cristal Violeta (CV) de *Candida* spp. (ATCC90028 – A e B), (ATCC2001 – C e D) (SC5314– E e F) após 48h e 72h em amostras tratadas com EHVG e comparadas as tratadas com Anfotericina B (ANFO), com Fluconazol (FLU) e com as não tratadas (Controle) em mg/mL. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ em relação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação ao Fluconazol e a Anfotericina B.

3.5 Os compostos presentes do EHVG, especialmente Vismiona D, apresentam interação com CaCYP51 de *Candida albicans*.

Para a docagem molecular foram utilizados quatro dos compostos identificados no extrato hidroalcolico das folhas de *V. guianensis*: Antraquinona F, Catequina, Kaempferol e Vismiona D.

Vismiona D foi o composto que apresentou os melhores parâmetros de afinidade no *docking* molecular com a enzima CaCYP51, com 10,96 kcal/mol para energia de ligação livre (ΔG_{bind}) e 0,009 μM como constante de inibição (K_i), em comparação ao Posoconazol e ao Fluconazol. A Antraquinona F apresentou resultados semelhantes ao Posoconazol e a catequina e o Kaempferol apresentaram resultados semelhantes ao Fluconazol (Tabela 5).

Tabela 5. Energias de ligação livre e constante de inibição dos compostos do extrato bruto de *Vismia guianensis* usando a estrutura de CaCYP51 de *Candida albicans* (PDBID 5FSA) como ligante no *docking* molecular.

| Ligante | ΔG_{bind} (kcal/mol)* | K_i (μM)** |
|----------------|-------------------------------|---------------------------|
| Vismiona D | -10.96 | 0.009 |
| Antraquinona F | -7.92 | 1.56 |
| Catequina | -6.97 | 7.79 |
| Kaempferol | -6.70 | 12.35 |
| Posaconazol | -8.43 | 0.57 |
| Fluconazol | -6.89 | 11.61 |

Dessa forma, a figura 11 mostra a interação molecular entre a vismiona D, presente no EHVG e que apresentou melhor interação, e a molécula CaCYP51 de *Candida albicans*. A avaliação desse complexo (Vismiona D + CaCYP51), mostra que o ligante produziu ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Tyr118, Ser378 e Met508 e contatos hidrofóbicos com os resíduos de aminoácidos Leu121, Phe228, Pro230, Phe233, Gly303, Ile304, Gly307, Gly308, Thr311, Leu376, Phe380, Ser507, incluindo também interações com o grupo HEME.

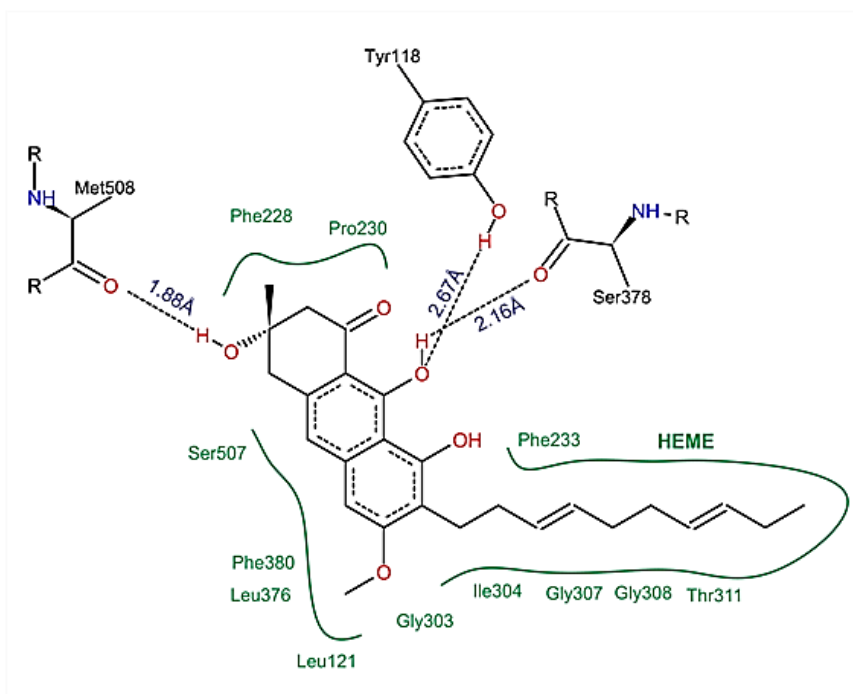


Figura 11. Representação esquemática das interações identificadas no *docking* molecular na interação entre Vismiona D e a estrutura do *CaCYP51*. Figura obtida com o PoseView.

A figura 12 mostra a conformação espacial do acoplamento molecular que a molécula de vismiona D apresentou quando inserida no sítio de *CaCYP51* apresentando vários pontos de ligação favorecendo assim sua possível ação sobre a enzima.

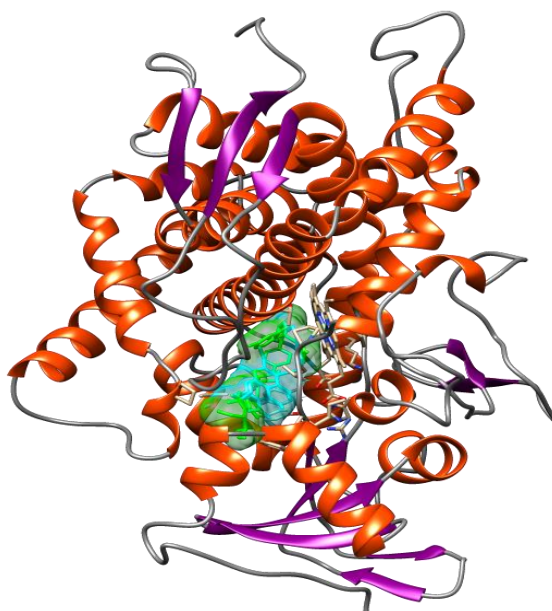


Figura 12. Conformação espacial obtida após o acoplamento molecular de Vismiona D (azul) e Posaconazol (verde) com *CaCYP51* (PDB: 5FSA), mostrando os vários sítios de ligação em comum entre o composto e o antifúngico. Imagem obtida com a quimera USCF.

4. DISCUSSÃO

A busca por compostos naturais que possam servir de fonte a novas moléculas capazes de debelar e controlar a resistência de microrganismos aos medicamentos tradicionais, tem resultado na busca constante por essas novas moléculas bioativas que não sejam tão tóxicas. Nesse contexto, as plantas surgem, como a principal fonte desses bioativos, e entre elas encontra-se *V. guianensis*, planta nativa do Brasil, encontrada em diferentes regiões, principalmente na região norte e nordeste do país.

No intuito de trabalhar de uma forma padronizada com a planta, obteve-se a granulometria das folhas de *V. guianensis* considerado um material de pó semi-fino e o teor de cinzas apresentou um percentual elevado de matéria orgânica. Esses dados, são relevantes na preparação dos extratos padronizados, pois permitem determinar as dimensões das partículas do agregado e de suas respectivas porcentagens de ocorrência, o que pode influenciar nas propriedades extrativas desse material.

Utilizou-se na preparação do extrato, diferentes hidromódulos, os quais resultaram também em diferentes rendimentos e diferentes perfis cromatográficos, sendo que o hidromódulo 1:10, apresentou melhor perfil cromatográfico, pois apresentou picos mais intensos, com maiores amplitudes e melhor definidos. Assim, avaliar diferentes hidromódulos, torna-se, importante, para determinar o que terá melhor resolutividade na elucidação dos principais compostos presentes no extrato, pois a concentração desses compostos pode influenciar nas atividades avaliadas (TRABULSI-FILHO et al., 2013).

A análise por injeção direta em fluxo do extrato hidroalcóolico de *Vismia guianensis* (EHVG), utilizando o hidromódulo 1:10, permitiu identificar a presença de compostos fenólicos, como antraquinonas, catequinas, epicatequinas, kaempferol, vismiona e flavonoides. Os compostos encontrados são os mesmos já descritos anteriormente em outros estudos utilizando as folhas de *Vismia guianensis*. (POLITI et al., 2014; HUSSAIN et al., 2012; OLIVEIRA 2009; SEO et al., 2000).

Por conseguinte, na avaliação *in vitro*, encontrou-se como resultado para a determinação da CIM e CFM do EHVG o efeito fungicida caracterizando o poder de inibição de crescimento do fungo tanto para as linhagens padrão como para os isolados clínicos de *Candida albicans*. Dados esses, que podem ser corroborados com estudo, anteriormente, descrito por Rodrigues (2013) que apresentou resultados semelhantes atividade antifúngica frente à *Candida albicans* obtidos dos extratos secos das folhas de *Vismia guianensis*.

Diferentemente, no estudo realizado por Da Silva et al (2020), foi necessário CIM e CFM com concentrações superiores para inibir o crescimento das mesmas linhagens padrão ATCC2001 e ATCC90028, quando comparados aos achados para o EHVG.

A utilização do EHVG foi importante tanto para linhagens padrão como para isolados clínicos. E por se tratar, também, de uma planta encontrada no cerrado, pode ser uma alternativa para atividade anti-*Candida*, pois Correia (2016) ao avaliar atividade antifúngica de cinco plantas do cerrado brasileiro contra linhagens padrão de ATCC de *Candida* spp., dos oito extratos utilizados (4 aquoso e 4 etanoicos) nenhum apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e em relação aos isolados clínicos apenas três tipos de extratos apresentaram atividade antifúngica o que torna *Vismia guianensis* uma opção efetiva como planta característica, também, dessa região.

Diante da atividade antifúngica apresentada, os efeitos citotóxicos do EHVG sobre leucócitos e eritrócitos, bem como a viabilidade celular de leucócitos expostos a várias concentrações do extrato resultou que o EHVG apresentou baixa toxicidade com resultados muito semelhantes para todas as técnicas utilizadas, considerando que doses menores ou iguais a 10mg/mL podem ser classificadas como de baixa toxicidade e a dose de 50mg/mL, como sendo de toxicidade moderada. A citotoxicidade foi avaliada por mais de uma técnica, pois segundo Oliveira et al., (2017) a coloração do extrato pode interferir na avaliação da viabilidade celular por MTT. Além disso, a avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos visou avaliar se os efeitos antifúngicos não estavam relacionados a morte dessas células, considerando que são fontes do ferro necessário a replicação e amadurecimento de *C. albicans*.

A captação de ferro, a partir das hemácias dos hospedeiros, é um dos mecanismos de escape e de virulência, de muitas espécies do gênero *Candida*. Essa captação ocorre a partir da produção de hemolisina, enzima produzida, o que resulta na destruição de hemácias do hospedeiro. Assim, a produção da hemolisina, seguida da aquisição de ferro, facilita a invasão e o desenvolvimento da candidíase disseminada (MANNIS et al, 1994; SARDI et al., 2013; SENEVIRATNE et al., 2016).

Na etapa seguinte do estudo *n vitro* foram selecionadas duas linhagens padrão sendo uma de *C. albicans* (SC5314) e uma de *C.glabrata* (ATCC 2001), para avaliação dos efeitos do EHVG na cinética de crescimento. Essas linhagens foram escolhidas com base na sensibilidade ao EHVG e por se tratar de uma linhagem de *Candida albicans* e uma *Candida* não *albicans* (*Candida glabrata*), ambas de interesse clínico, além de serem

linhagens comumente utilizadas para avaliar a ação anti-*Candida* de extratos vegetais e outros produtos (REIS et al., 2016; BONI et al., 2016; SELEEM et al., 2016; COSTA et al., 2017; BARBOSA et al., 2017).

O EHVG eliminou, em até 48 horas, a linhagem SC5314 e, em até 36 horas, a linhagem ATCC 2001, com importante efeito de eliminação assim como realizado pela Anfotericina B. O EHVG foi mais efetivo para *C. glabrata*, pois ocasionou redução significativa logo nas primeiras 12 horas, apresentando ação de forma mais efetiva considerando que se trata de um extrato bruto e não de um isolado como Anfotericina B.

Para se ter um parâmetro da importância desse processo, no estudo realizado por Ahmad et al., (2010) foi preciso utilizar um valor 4× CIM dos compostos estudados enquanto para o EHVG, além de apresentar melhor efetividade em relação ao menor tempo de ação, foram utilizados valores menores de CIM.

Por conseguinte, verificou-se que o EHVG, também, interferiu na adesão das três linhagens ATCC utilizadas, sendo uma de *Candida glabrata* ATCC 2001 e duas de *Candida albicans* (ATCC 90028 e SC5314). A adesão, evento inicial da infecção, seguida da formação de biofilme está entre os fatores de virulência, pois enquanto a adesão permite a infecção, o biofilme contribui para o crescimento fúngico e proteção da colônia, aumentando a persistência da infecção (ROSCETTO et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

Nesse contexto, a formação de biofilme e sua evolução pode ser avaliada por várias metodologias, sendo as mais frequentes a reação colorimétrica baseada na redução do sal MTT, ou pela coloração com cristal violeta (SILVA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Optou-se aqui por avaliar de três formas, pela incorporação de MTT, pela coloração com cristal violeta e por Unidades Formadoras de Colônias. O EHVG apresentou atividade semelhante nas três metodologias, com importante ação na inibição sobre os biofilmes em formação (jovem) ou os já formados (maduros), com efeito semelhante, principalmente ao Fluconazol.

Grande parte das infecções por *Candida* spp. estão associadas com a formação de biofilme na superfície de materiais médicos ou epitélio do hospedeiro. As células sésseis que constituem o biofilme apresentam fenótipos drasticamente diferentes das células planctônicas, tais como resistência aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro que são de importância do ponto de vista clínico. Dessa forma, o tratamento EHVG reduziu a formação do biofilme jovem, de forma semelhante a Anfotericina B, para ATCC 90028 e ATCC 2001. E quando comparado ao

Fluconazol, o EHVG apresentou melhor efeito nas doses sub-inibitórias do CIM, inclusive para ATCC SC5314.

Em relação ao biofilme maduro, observou-se, ao utilizar o EHVG em concentração correspondente a 2×CIM, o extrato apresentou ação semelhante a Anfotericina B e Fluconazol para ATCC 2001 e ATCC 90028. Para *C.albicans* (SC5314) o EHVG não apresentou diferença em relação ao Fluconazol, apesar de também ter reduzido a formação do biofilme maduro.

Os biofilmes, de um modo geral, atuam como barreiras protetoras, fazendo com que as células fúngicas fiquem mais resistentes aos tratamentos. Como os biofilmes provenientes das infecções por *Candida* são difíceis de tratar dependendo da fase do biofilme, exigem concentrações inibitórias maiores do que as usadas em células planctônicas. Além disso, há uma variação de formação do biofilme entre as linhagens de *Candida* frente aos diferentes antifúngicos, o que podem aumentar a virulência (ROSCETTO et al., 2018). Contudo, o EHVG, conseguiu interferir na evolução do biofilme em formação, bem como no biofilme pré-formado, com eficácia semelhante e, algumas vez melhor, que os dois agentes antifúngicos utilizados, achados relevantes e de interesse clínico, sobretudo se considerarmos a efetividade de baixas concentrações do extrato, pois os tratamentos convencionais usam com doses cada vez maiores, provocando efeitos tóxicos e aumento da resistência aos antifúngicos.

Na busca de entender um possível mecanismo de ação do EHVG em relação a atividade anti-*Candida* spp. apresentada até aqui e com a identificação dos compostos presentes no extrato, ao se realizar o *docking* molecular, possibilitou que os quatro compostos identificados e selecionados do EHVG foram capazes de se ligarem ao alvo, a enzima *CaCYP51* de *C. albicans*. Foram testados Vismiona D, Antraquinona F; Catequina e Kaempferol. Curiosamente, todas as substâncias apresentaram interação favorável com *CaCYP51*, embora o composto mais efetivo tenha sido Vismiona D, sugerindo que mais de um composto pode estar associado a atividade anti-*Candida* do EHVG o que pode originar um possível fitocomplexo.

O *docking* molecular mostrou que a inibição da *CaCYP51* pelo constituinte do EHVG foi bastante relevante, e de intensidade semelhante ao Posoconazol, droga da classe dos azóis que está entre os fármacos fungicidas mais amplamente utilizados. A enzima *CaCYP51* (citocromo P450 lanosterol 14a-demetilase) foi selecionada como alvo, pois é importante para a síntese do ergosterol, a partir de lanosterol, o seu precursor, sendo, portanto, vital para sobrevivência de *Candida albicans* (OLIVEIRA-SANTOS et

al., 2018). Assim, sua inibição inviabiliza o crescimento fúngico e resulta em controle da infecção, efeito que pode indicar se este é o mecanismo de ação do EHVG.

Assim, esses dados do *docking* molecular mostraram que a Vismiona D foi o composto que apresentou maior afinidade, sendo inclusive maior do que os dois antifúngicos utilizados como controle, o Posaconazol e o Fluconazol. E a energia livre de ligação é um parâmetro utilizado o quanto espontâneo a interação da molécula e o alvo pode ocorrer, sendo que a vismiona D foi o que apresentou valor mais negativo e constante de inibição com menor valor resultando em melhor atividade. Energias livre de ligação negativas indicam que essas interações são favoráveis para formação do complexo ligante-receptor (GUIMARÃES et al., 2014).

As interações intermoleculares, tais como, pontes de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Tyr-118, Ser-378 e Met-508 e interações hidrofóbicas, além da interação do grupo HEME, certificaram a capacidade de estabilizar o ligante na cavidade de ligação para formar o complexo ligante-receptor, ou seja, comparado ao posaconazol, que é fungicida, a vismiona D fez interação com praticamente todos os aminoácidos que o posaconazol também faz, mas de forma mais espontânea e com maior potencial de interação, além de apresentar estrutura mais linear conforme apresentado na conformação espacial obtida. Valores abaixo de 2Å indicaram que o protocolo de acoplamento utilizado foi válido, ou seja, apresenta similaridade com a estrutura experimental (GUIMARÃES et al., 2014).

Quanto ao Fluconazol que apresentou parâmetros de afinidade semelhantes a catequina e kaempferol e menor que antraquinona F e vismiona D e ao próprio Posaconazol, apesar de ser uma molécula de estrutura pequena, não apresentou dados satisfatórios no presente estudo em relação a docagem molecular. Dados esses também relatados por Gómez-Garcia et al, (2018), Oliveira (2018) e Hargrove et al, (2017). Não há estudos dessa atividade *in silico* envolvendo o EHVG ou mesmo qualquer outra espécie do gênero *Vismia*, destacando a importância dessa avaliação como possível mecanismo de ação para atividade antifúngica.

Importa ressaltar que os fitocomplexos presentes no EHVG apresentam efeito anti-*Candida* e, por isso, tem um grande potencial para serem utilizados no desenvolvimento de novos antifúngicos, com largo espectro de ação, possivelmente até mais amplo do que os medicamentos tradicionais. Esses fitocomplexos originários do metabolismo primário e/ou secundário das plantas, são responsáveis pelos efeitos

biológicos das plantas utilizadas como medicinais e dos produtos dela derivados (CORREIA, 2016).

Assim, os resultados do presente estudo sugerem que a atividade biológica de *V. guianensis* contra *C. albicans* podem estar associadas a uma atividade que pode ser utilizada na inibição da biossíntese de ergosterol, mediada pela *CaCYP51*.

5. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcolólico (1:10) das folhas de *Vismia guianensis* apresentou atividade *anti-Candida* inibindo o crescimento fúngico, a adesão e a evolução dos biofilmes em formação ou pré-formado tanto para linhagens de *Candida albicans* como para *Candida glabrata*. Esses efeitos ocorrem, possivelmente, devido a presença de compostos complexados, com especial participação de Vismiona D, os quais atuam na inibição da *CaCYP51*, inviabilizando a evolução da infecção. Desta forma, conclui-se que *Vismia guianensis* é uma espécie vegetal promissora na bioprospecção de novos antifúngicos com ação na enzima responsável pela síntese do ergosterol.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico), ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade CEUMA ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFMA, Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF) e Produtos Naturais e Universidade Federal do Piauí (UFPI) – Departamento de Farmácia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRÃO, F.Y, PONTES, N.P, SILVA, M.R.R., LINO, J.R.R.S, SOUZA, P.H.H, SOUZA, L.K.H. 2010. Atividade in vitro de Fluconazol e itraconazol em biofilme de *Candida albicans*. Trabalho de conclusão de curso do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP). 15p.
2. AHMAD, A., KHAN, A., MANZOOR, N., KHAN, L.A. 2010. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48: 35-41.
3. ÁLVAREZ, E.R., GIL, J.H.G., JÍMENEZ, O.J.G., POSADA, C.M.A., ROJANO, B.A., GARCÍA, C.M.P., DURANGO, D.L.R. 2008. Actividad antioxidante y contenido

fenólico de los extractos provenientes de las bayas de especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae Revista De La Facultad de Química Farmacéutica*, 15 (1): 165-172. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

4. BALUNAS, M.J., KINGHORN, A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*, 78: 431.
5. BARBOSA, J.P. 2018. Atividade anti-*Candida* de óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas: São Paulo, 73p.
6. BARBOSA, W.L.R., VASCONCELOS, F., VIEIRA, J.M.S., SILVA JUNIOR, J.O.C. 2011. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*, 2 (12): 3224-3229.
7. BEN-AMI R. 2018. Treatment of invasive candidiasis: a narrative review. *Journal of Fungi*, 4:97.
8. BONI, G.C. 2016. Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados isolados de diferentes espécies de *Mentha*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas: São Paulo, 66p.
9. BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J.A.P., DAVID, J.M. 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33 (6):1359-1369
10. CAMELO, S.R.P., COSTA, R.S., RIBEIRO-COSTA, R.M., BARBOSA, W.L.R., VASCONCELOS, F., VIEIRA, J.M. DOS S., SILVA JUNIOR, J.O.C. 2011. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *UPSAR*, 2 (12): 224-3229.
11. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA.
12. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2010. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2. CLSI, Wayne, PA, USA.
13. COLOMBO, A.L., GARNICA, M., CAMARGO, L.F.A., CUNHA, C.A., BANDEIRA, A.C., BORGHI, D., CAMPOS, T., SENNA, A.L., DIDIER, M.E.V. ; DIAS, V.C. ; NUCCI, M. 2013. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* January, 51, 38–44. doi: 10.3109/13693786.2012.698024.
14. CORREIA, A.F., Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* spp. Tese de Doutorado em Ciências da Saúde - Brasília, 2016. 95 p.
15. COSTA, M.D.C.M.F.D., SILVA, A.G.D., SILVA, A.P.S.D., LIMA, V.L.M., BEZERRA SILVA, P.C., ROCHA, S.K.L.D., NAVARRO, D.M.D.A.F., CORREIA, M.T.D.S., NAPOLEÃO, T.H., SILVA, M.V.D., PAIVA, P.M.G. 2017. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. *Medicines (Basel)*, 3 (4).

16. DA SILVA, A.F., DA ROCHA, C.Q., DA SILVA, L.C.N., CARVALHO JÚNIOR, A.R., MENDES, I.N.F.V., DE ARARUNA, A.B., MOTTA, E.P., SILVA, R.S., CAMPOS, C.D.L., FARIAS, J.R., OLIVEIRA, A.D.S., SILVA, D.H.D.S., NASCIMENTO, F.R.F., GUERRA, R.N.M., MONTEIRO, C.A., Antifungal and Antivirulence Activities of Hydroalcoholic Extract and Fractions of *Platonia insignis* Leaves against Vaginal Isolates of *Candida* Species. *Pathogens* 2020, 9, 84; doi:10.3390/pathogens9020084
17. DENNINGTON, R., KEITH, T., AND MILLAM, J. (2009). GaussView. Version 5. Shawnee Mission, KS: Semichem Inc.
18. DE OLIVEIRA-SANTOS, G.C. Efeito de *Terminalia catappa* L. em leveduras de *Candida*: avaliação *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Tese de doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), São Luis, Maranhão, 2018.95p.
19. FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 1. Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas. 2. Medicamentos e correlatos. 3. Especificações e métodos de análise. I Título. 546p., 1v/il.
20. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R. ET AL. (2009). Gaussian 09, Revision, D.01. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.
21. GÓMEZ-GARCÍA O., ANDRADE-PAVÓN D., CAMPOS-ALDRETE E., BALLINAS-INDILÍ R., MÉNDEZ-TENORIO A., VILLA-TANACA L., ÁLVAREZ-TOLEDANO C. Synthesis, molecular docking, and antimycotic evaluation of some 3-acyl imidazo[1,2-a]pyrimidines. *Molecules*. 2018, 23 (3): 1–17.
22. GUERRA, R.N.M. 1997. Atividade imunossupressora dos frutos de *Vismia reichardtiana* (tese de Doutorado em Ciências – Imunologia). Universidade de São Paulo. 120p.
23. GUIMARÃES, A.G., SCOTTI, L., SCOTTI, M.T., MENDONÇA, F.J.B., MELO, N.S.R., ALVES, R.S., DE LUCCA, W., BEZERRA, D.P., GELAIN, D.P., QUINTANS, L.J. Evidence for the Involvement of Descending Pain-81 Inhibitory Mechanisms in the Attenuation of Cancer Pain by Carvacrol Aided through a Docking Study. *Life Sciences*. 2014, 116 (1): 8–15.
24. GULATI, M., ENNIS, C. L., RODRIGUEZ, D. L., AND NOBILE, C. J. (2017). Visualization of biofilm formation in *Candida albicans* using an automated microfluidic device. *J. Vis. Exp.* 130:e56743. doi: 10.3791/56743.
25. GULATI, M., LOHSE, M.B., ENNIS, C.L., GONZALEZ, R.E., PERRY, A.M., BAPAT, P., VALLE AREVALO, A., RODRIGUEZ, D.L., NOBILE, C.J. 2018. In vitro culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. *Current Protocols in microbiology*, e60. doi: 10.1002/cpmc.60
26. HARGROVE, T.Y., FRIGGERI, L., WAWRZAK, Z., QI, A., HOEKSTRA, W.J., SCHOTZINGER, R.J., YORK, J.D., PETER, GUENGERICH F., LEPESHEVA, G.I. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2017, 292 (16): 6728–6743.

27. HUSSAIN H, HUSSAIN J, AL-HARRASI A, SALEEM M, GREEN IR, VAN REE T, GHULAM A. Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, 2012; 50 (11):1448–1462.
28. LOHSE, M.B., GULATI, M., JOHNSON, A.D., NOBILE, C.J. 2018. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms,16:19–31.
29. MANNS, J. M., MOSSER, D. M., & BUCKLEY, H. R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 62 (11): 5154 –5156.
30. MEDEIROS, A.C., ALMEIDA, E., QUINTINO-DA-ROCHA, C., TANGERINA, M., LIMA NETO, J.S., SILVA, A., ROCHA, C., MARTINS, L. 2019. Antiparasitic activities of hydroethanolic extracts of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb. (Convolvulaceae). *PLoS One*, 14: e0211372.
31. MORRIS GM, RUTH H, LINDSTROM W, SANNER MF, BELEW RK, GOODSELL DS, OLSON AJ. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 2009; 30 (16):2785–2791.
32. MUTHAMIL, S., BALASUBRAMANIAM, B., BALAMURUGAN, K. AND PANDIAN, S.K. 2018. Synergistic Effect of Quinic Acid Derived from *Syzygium cumini* and Undecanoic Acid Against *Candida* spp. *Biofilm and Virulence*. *Front. Microbiol.* 9:2835. doi: 10.3389/fmicb.2018.02835
33. OLIVEIRA, A.H. 2009. Atividade antimicrobiana e imunológica in vitro dos extratos de *Senna reticulata* (Willd). Irwin; Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara.
34. OLIVEIRA, A.H.G.G.F., CARNEVALE NETO, D.F., PORTUONDO, A., BATISTA-DUHARTE, I.Z, CARLOSA. 2017. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *Journal of Ethnopharmacology*,195:266-274.
35. OLIVEIRA, J.R., DE JESUS, D., FIGUEIRA L.W., OLIVEIRA, F.E., SOARES, C.P., CAMARGO, S.E.A., JORGE, A.O.C., OLIVEIRA, L.D. 2017. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*, 242: 625-634.
36. OLIVEIRA-SANTOS G.C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; CARTÁGENES, M. S. S.; BARROS-FILHO, A. K. D.; NASCIMENTO F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; ANDRADE M. S.; ROCHA, F. M. G.; ANDRADE-MONTEIRO, C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in Microbiology*, 2018; 9.
37. POLITI, M., SANOGO, R., NDJOKO, K., GUILLET, D., WOLFENDER, J-L., HOSTETTMANN, K., MORELLI, I. 2004. HPLC-UV/PAD; HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical Analysis*,15:355-364.
38. RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. N. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-

Acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: A computational study on a new possible mechanism of resistance. *Journal of Molecular Modeling*, v. 18, n. 9, p. 4013–4024, 2012.

39. RAMOS, L.P. 2016. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* L. / Lucas de Paula Ramos. - São José dos Campos: [s.n.].

40. REIS, A.J., MATA-SANTOS, T., CARRION, L.L., RODRIGUES, K., FENALTI, J.M., MESQUITA D.W.O., SCAINI, C.J., MARTINS, D., MESQUITA, A.S.S., SILVA, P.E.A., NUNEZ, C.V., RAMOS, D.F. 2016. Avaliação das atividades antifúngica, antimicrobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 6: SUPLEMENTO - II Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Promoção da Saúde. <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v1i1.8188>.

41. RODRIGUES, I.C. 2013. Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. com atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

42. ROSCETTO, E., CONTURSI, P., VOLLARO, A., FUSCO, S., NOTOMISTA, E., CATANIA, M.R. 2018. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. Clinical isolates. *Scientific Reports*, 8:1-11.

43. SANTANA, D.P., RIBEIRO, E.L., MENEZES, A.C.S., NAVES, P.L.F. 2013. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12 (2): 229-233.

44. SANTOS, G.C.O., VASCONCELOS, C.C, LOPES, A.J.O, CARTAGENES, M.S.S., FILHO, A.K.D., NASCIMENTO, F.R.F., RAMOS, R.M., PIRES, E.R.R.B., ANDRADE, M.S., ROCHA, F.M.G., MONTEIRO, C.A. 2018. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agentes. *Frontiers in microbiology* July 9.

45. SARDI, B.B. J.C., SCORZONI, L., BERNARDI, T., ALMEIDA, AM.F., MENDES, M.J.S, GIANNINI, M. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical microbiology*, 62:10–24.

46. SELEEM, D., BENSO, B., NOGUTI, J., PARDI, V., MURATA, R.M. 2016. In vitro and in vivo antifungal activity of Lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *Plos One* June, 10.

47. SENEVIRATNE, C.J., RAJAN, S., WONG, S.W., TSANG, D.N.C, LAI, C.K.C, SAMARANAYAKE, L.P., Jin, L. 2016. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. *Frontiers in microbiology* February 7.

48. SEO, E.K., MUKHERJEE, R., WANI, M.C., WALL, M.E., NAVARRO, H., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D. 2000. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry*, 55:35-42.

49. SIDDIQUI, Z.N., FAROOQ, F., MUSTHAFI, T.N.M., AHMAD, A., KHAN, A.U. 2013. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17:237-243.
50. SILVA, A.P.S., SILVA, L.C.N., FONSECA, C.S.M., ARAÚJO, J.M., CORREIA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S., LIMA, V.L.M. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* Jacq. *Frontiers in microbiology*, June, 7.
51. SILVA, A.R. DE, ANDRADE NETO, J.B., SILVA, C.R. DA, CAMPOS, R.D.S., COSTA SILVA, R.A., FREITAS, D.D., NASCIMENTO, F.B.S.A. DE, ANDRADE, L.N.D., SAMPAIO, L.S., GRANGEIRO, T.B., MAGALHÃES, H.I.F., CAVALCANTI, B.C., MORAES, M.O., NOBRE JUNIOR, H.V. 2016. Berberine antifungal activity in Fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*, 60:3551-3557.
52. SOUZA, M.S.R. 2014. Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Dissertação de Mestrado (UFPB/CCS), João Pessoa, 94p.
53. SPRINGFIELD, E.P., AMABEOKU, G., WEITZ, F., MABUSELA, W., JOHNSON, Q. 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, 10:434-439.
54. TALA, M.F., JEANNE, E., LANTOVOLOLONA, R., TALONTSI, F.M., WABO, H.K., TANE, P., LAATSCH, H. 2013. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guianensis*. / *Biochemical Systematics and Ecology*, 50:310–312.
55. TRABULSI-FILHO F.A., ANDRADE K.C.S., DA SILVA E.C., CASTRO A.T.O., BATISTA M.C., ARANHA M.N.S., DO AMARAL F.M.M. Study of standardization of *Anacardium occidentale* L. Extracts in research and development of giardicidal herbal. *Cad. Pesq.*, São Luís, julho 2013; 20:7-15.
56. ZAGO, C.E., SILVA, S., SANITÁ, P.V., BARBUGLI, P.A., DIAS, C.M.I, LORDELLO, V.B., VERGANI, C.E. 2015. Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Plos One*, April, 13:1-15.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não existe conflitos de interesse entre os autores.

4.3 Capítulo 3

**ATIVIDADE ANTI-VIRULÊNCIA DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy
CONTRA *Candida albicans***

MOTTA, Elizangela Araujo Pestana¹; ROCHA, Claudia Quintino², GUERRA, Rosane Nassar
Meireles³.

A ser submetido:

Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Qualis Medicina I – A1 e Fator de impacto 5.113

RESUMO

Vismia guianensis, planta da região amazônica, tem apresentado constituintes químicos de interesse farmacológico e que possuem uma variedade de atividades, tais como, antiinflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. É utilizada, popularmente, para tratar infecções fúngicas na pele. Dentre a diversidade de fungos, o gênero *Candida*, tem despertado interesse devido ao aumento da resistência aos medicamentos tradicionais, inclusive para *Candida albicans*. Esse fungo apresenta patogenicidade atribuída a vários fatores de virulência, dentre eles a capacidade de formar biofilme, a diversidade morfológica e a produção de enzimas. Dessa forma, investigou-se a ação do extrato hidroalcoólico das folhas *Vismia guianensis* (EHVG) contra *Candida albicans*, considerando os efeitos *in vitro* sobre os fatores de virulência e *in vivo* na sepse letal induzida em camundongos *Swiss*. Foram utilizadas três linhagens de *Candida albicans*: um padrão (ATCC 10231) e duas clínicas, sendo uma delas sensível ao Fluconazol *Ca(S)Flu* e outra resistente *Ca(R)Flu* ao Fluconazol. Foi determinado os efeitos anti-*Candida* do EHVG sobre a concentração inibitória mínima (CIM), a Concentração Fungicida Mínima (CFM) e curva de crescimento. Também foi avaliado o efeito do EHVG sobre a produção de exoenzimas, sobre o biofilme em formação e a transição morfológica de leveduras para hifas. A Anfotericina B (ANFO B) e o Fluconazol (FLU) foram utilizados como controles positivos. Avaliou-se também o efeito *checkerboard* do EHVG com os antifúngicos. Para avaliação *in vivo* de sobrevida de camundongos foi induzida sepse experimental letal por *C. albicans* (ATCC10231). Como resultados, o EHVG inibiu o crescimento do biofilme em formação, a transformação em hifas e interferiu na liberação das enzimas proteolíticas nas três linhagens *C. albicans*, mas não interferiu na produção de hemolisina. Adicionalmente, o EHVG apresentou sinergismo com os antifúngicos para a linhagem ATCC 10231 e *Ca(R)Flu*, e foi indiferente sobre o isolado clínico *Ca(S)Flu*. O tratamento *in vivo* com EHVG aumentou a sobrevida dos animais com sepse fúngica ao ser administrado concomitantemente e seis horas após a infecção. Conclui-se que o tratamento com EHVG é efetivo em inibir o crescimento de três linhagens de *C. albicans*, além de interferir na formação de biofilme, na produção das exoenzimas e na transformação em hifas, sugerindo que o prolongamento da sobrevida na sepse fúngica, possivelmente está relacionada aos efeitos do extrato sobre os principais fatores de virulência de *C. albicans*. Em conjunto, os dados indicam que o EHVG parece ter em sua composição compostos com potente ação anti-fúngica.

Palavras-chave: *Vismia guianensis*; Virulência; Antifúngicos; *Candida albicans*.

ABSTRACT

Vismia guianensis, a plant from the Amazon region, has shown chemical constituents of pharmacological interest and that have a variety of activities, such as anti-inflammatory, antioxidants and antimicrobials. It is popularly used to treat fungal infections of the skin. Among the diversity of fungi, the genus *Candida*, has aroused interest due to the increased resistance to traditional medicines, including *Candida albicans*. This fungus has pathogenicity attributed to several virulence factors, including the ability to form biofilm, morphological diversity and the production of enzymes. Thus, the action of the hydroalcoholic extract of the leaves *Vismia guianensis* (EHVG) against *Candida albicans* was investigated, considering the *in vitro* effects on virulence factors and *in vivo* in the lethal sepsis induced in Swiss mice. Three strains of *Candida albicans* were used: one standard (ATCC 10231) and two clinics, one of which is sensitive to Fluconazole *Ca*(S)Flu and the other resistant *Ca*(R)Flu to Fluconazole. The anti-*Candida* effects of EHVG on minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungal concentration (MFC) and growth curve were determined. The effect of EHVG on the production of exoenzymes, on the biofilm in formation and on the morphological change to hyphae was also evaluated. Amphotericin B (ANFO B) and Fluconazole (FLU) were used as positive controls. The EHVG checkerboard effect with antifungals was also evaluated. For *in vivo* assessment of mouse survival, lethal experimental sepsis was induced by *C. albicans* (ATCC10231). As a result, EHVG inhibited the growth of the biofilm in formation, the transformation into hyphae and interfered with the release of proteolytic enzymes in the three *C. albicans* strains but did not interfere with the production of hemolysin. Additionally, the EHVG showed synergism with the antifungals for the ATCC 10231 and *Ca*(R)Flu strain and was indifferent about the clinical isolate *Ca*(S)Flu. *In vivo* treatment with EHVG increased the survival of animals with fungal sepsis when administered concomitantly and six hours after infection. It is concluded that treatment with EHVG is effective in inhibiting the growth of three strains of *C. albicans*, in addition to interfering in the formation of biofilm, in the production of exoenzymes and in the transformation into hyphae, suggesting that the prolongation of survival in fungal sepsis, possibly it is related to the effects of the extract on the main virulence factors of *C. albicans*. Taken together, the data indicate that EHVG appears to have compounds with a potent anti-fungal action.

Keywords: *Vismia guianensis*; Virulence; Antifungals; *Candida albicans*.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal de mucosas e pele de mamíferos, pois colonizam, de modo assintomático, indivíduos saudáveis e, assim, vivem em equilíbrio com o seu hospedeiro (MULTHAMIL et al., 2018). São frequentemente encontrados em várias partes do corpo, sendo mais frequentes na mucosa vaginal, cavidade oral, trato gastrointestinal e urinário (DELALOYE E CALANDRA, 2014; LOHSE et al., 2018). Entretanto, o desequilíbrio desses microambientes ou do sistema imunológico, pode resultar em infecções também denominadas de candidíase, especialmente em pacientes imunocomprometidos e por isso são consideradas um grave problema de saúde pública (SANTOS et al., 2018).

Na maioria dos casos de candidíase, em mamíferos, o agente etiológico é *Candida albicans*. Está associada entre 70 e 90% de todas as infecções fúngicas invasivas, as quais frequentemente evoluem para casos fatais, como ocorre na sepse e no choque séptico, principalmente em pacientes críticos, como aqueles internados em unidades de terapia intensiva ou em pacientes imunosuprimidos. A proporção de pacientes com infecções graves ocasionadas por *C. albicans*, que evoluem para sepse, está entre 30 e 35% no mundo (GUZMANA et al., 2011; QUENOT et al., 2013). No Brasil, de acordo com a Rede Brasileira de Estudo de Infecções Fúngicas, *C. albicans* é responsável por 41% dos casos de infecção (NUCCI et al., 2010; SARDI et al., 2012). Vale ressaltar que *C. albicans* é, também, agente etiológico de micoses oportunistas, em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (LACAZ et al., 2002).

A patogenicidade de *Candida albicans* é atribuída a vários fatores de virulência, desenvolvidos para facilitar a infecção dos tecidos dos hospedeiros, pois permitem que o fungo se dissemine para diferentes partes do corpo, muitas vezes inativando mecanismos imunológicos de controle da infecção. Entre os principais fatores de virulência pode-se listar a mudança fenotípica e transição morfológica de leveduras (disseminação) para hifas (invasão tecidual); a expressão de invasinas, adesinas e candidalinas; secreção de enzimas hidrolíticas e a formação de biofilmes que tornam esses microrganismos resistentes a drogas. Incluem-se ainda entre os fatores de virulência os produtos dos genes da aspartil-proteinase e da fosfolipase (SARDI et al., 2012; SHARMA et al., 2019). E de alguma forma, todos esses fatores têm favorecido o aumento de resistência ao tratamento convencional, incluindo, o grupo dos azóis (Fluconazol) e polienos (Anfotericina B).

O desenvolvimento de novas moléculas alternativas aos agentes antifúngicos convencionais constitui uma possibilidade de reduzir a resistência desses fungos, o que chama atenção no setor de saúde pública (DARTEVELLE et al., 2018). Assim, espécies vegetais, por serem fontes de substâncias ativas, tem sido utilizadas na busca de novos compostos.

O uso popular de plantas é, em grande parte das vezes, um fator decisivo na pesquisa de novas substâncias bioativas, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Importante ressaltar que as plantas são também a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (DORNAS, 2009; CAMELO, 2011; DAS et al., 2016).

Vismia guianensis (Clusiaceae) (Aubl.) Choisy, planta de uso medicinal popularmente conhecida como lacre, espécie nativa da América do Sul é encontrada nas matas de vegetação secundária dos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia e Minas Gerais. É uma planta com ação antimicrobiana e o látex, as folhas e as cascas são utilizadas popularmente para tratar infecções fúngicas. Tem sido avaliada, também, em estudos de atividade antibacteriana (SEO et al., 2000; CAMELO et al, 2011; SOUZA, 2014; REIS, 2017).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os mecanismos de ação associados ao efeito anti-*Candida* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis*, considerando os efeitos do extrato sobre os principais fatores de virulência de três linhagens de *Candida albicans*, sendo uma linhagem padrão ATCC, um resistente e outra sensível ao Fluconazol, antifúngico comercial amplamente utilizado no tratamento de candidíases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação de *Vismia guianensis*

A coleta das folhas ocorreu no mês de outubro, pela manhã, em São Luís, MA – Brasil (Latitude: -2.479740 e Longitude: -44.22136). Em seguida as folhas foram limpas e secas, ao abrigo da luz solar, sob ventilação natural, a temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$), durante 7 dias. O material vegetal foi identificado e depositado sob n° 11.078 no Herbário do Maranhão (MAR) na Universidade Federal do Maranhão (ANEXO A) e sob o registro Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento

Tradicional Associado (SisGen) (ANEXO B), conforme previsto em Lei n. 13.123/15, sob o cadastro n. AFE7A08

2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Vismia guianensis* (EHVG)

As folhas secas foram trituradas em moinho elétrico (TENAL TE 340) e o pó obtido foi utilizado para preparação do extrato. O extrato foi obtido por maceração, por sete dias, sob o abrigo da luz. Preparou-se o extrato hidroalcoólico com hidromódulo 1:10. Após uma semana de maceração, o material foi rotaevaporado e liofilizado, mantido sobre refrigeração para posterior utilização, resultando em rendimento de 13%.

2.3 Atividade anti-*Candida albicans* do EHVG *in vitro*

2.3.1 Isolamento dos microrganismos e preparo do inóculo:

Utilizou-se a linhagem padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) e dois isolados clínicos sendo um deles sensível ao Fluconazol (*Ca(S)Flu*) e o outro resistente (*Ca(R)Flu*) provenientes do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Os isolados clínicos foram identificados pela técnica de ionização por desorção a laser assistida por espectrometria de massa (MALDI-TOF Microflex, Bruker) e o perfil aos antifúngicos, foi determinado por método automatizado de avaliação da sensibilidade fúngica (VITEK®2 Compact, bioMérieux Brasil) e confirmado pelo método de Kirby-Bauer, tendo o parecer do comitê de ética CAAE n. 29660920.7.0000.5087 (ANEXO G).

As amostras de *C. albicans* foram ativadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com Cloranfenicol, sendo semeadas e incubadas por 24h a 37°C. As colônias foram ressuspensas em 5mL de solução salina estéril (0,85% - NaCl). A suspensão resultante foi homogeneizada, em agitador do tipo Vórtex®, durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada, visualmente, à uma turbidez equivalente à 0,5 na escala de MacFarland. A densidade também foi aferida por espectrofotometria (Global Trade Technology), em comprimento de onda de 530nm, usando como controle uma solução-padrão correspondente a 0,5 da escala de MacFarland (CSLI, 2012/M27-A3).

2.3.2 Teste de difusão em meio sólido

A atividade antifúngica do EHVG foi avaliada contra a linhagem padrão (ATCC 10231) e os isolados clínicos de *Candida albicans* em estudo pelo método de difusão em poços. Foram padronizadas individualmente em um inóculo 1×10^6 UFC/mL (0,5 da escala de MacFarland) diluídas em PBS estéril, sendo posteriormente espalhadas

em placas de Petri contendo ASD com Cloranfenicol com o auxílio de um swab estéril. Posteriormente foi utilizado um utensílio cilíndrico estéril com diâmetro de 6mm sendo feito poços nas placas e adicionado 40 μ L das concentrações teste do EHVG (25mg/mL, 50mg/mL e 100mg/mL), controle positivo Fluconazol (25 μ g/mL) e Anfotericina B (100 μ g/mL) e controle negativo PBS estéril. As placas foram submetidas a incubação a 37°C e feitas as leituras após 24h. As zonas inibitórias foram medidas e registradas em triplicatas para obter valores médios (CLSI, 2010/M44-A2).

2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em caldo (CLSI, 2012 M27-S4 com adaptações). O CIM foi definido como a concentração capaz de reduzir em 90% a absorção, quando comparado ao controle (CLSI, 2012 M27-S4; SHAMA, 2019). Foi testado o efeito de diluições crescentes do EHVG em comparação ao Fluconazol e a Anfotericina B, utilizados como controle positivo.

2.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi determinada a partir dos resultados obtidos no CIM. Uma alíquota, de 10 μ L dos poços correspondentes até 4 \times o valor do CIM, foi semeado em placa contendo ASD com Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C, por 24h-48 horas e ao final considerou-se como CFM a menor concentração do EHVG e dos antifúngicos sem crescimento fúngico (CLSI, 2012 M27-S4 com adaptações). Todos os testes foram realizados em triplicata. A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se o extrato tinha atividade fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM \leq 4$) (SIDICQUI et al, 2013).

2.3.4 Cinética de crescimento ou curva de morte

As linhagens de *Candida* foram sub-cultivadas, pelo menos duas vezes, e cultivadas por 24 h, a 35°C, em placas contendo ASD com Cloranfenicol. Em seguida, células [(1 $\times 10^6$) (A595 = 0,1)] foram inoculadas em meio fresco. O EHVG foi adicionado à cultura e as placas foram incubadas a 37°C, sob agitação (200 rpm). Após diferentes intervalos (0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 h), as alíquotas foram removidas e o crescimento observado e quantificado por densidade óptica, com filtro de 595nm (SHARMA, 2016).

2.3.5 Determinação da formação do biofilme por densidade ótica (OD600nm)

Seguiu-se o protocolo descrito por Gulati et al., (2018), que corresponde a avaliação do biofilme por densidade ótica (OD). Para o ensaio utilizou-se 1×10^7 da linhagem padrão *Candida albicans* (ATCC 10231) e isolados clínicos de *Candida albicans* - Ca(S)Flu e Ca(R)Flu. Foi adicionado 200 μ L de RPMI-1640 + extratos com diferentes CIMs e incubados a 37 °C. Após a incubação foi aspirado o meio com cuidado e realizado a leitura a 600nm. Realizou-se a lavagem com PBS estéril 2 \times , e acrescentou 110 μ L da solução aquosa de cristal violeta (0,4%). Deixou-se por 45 minutos em repouso, e após esse período foi lavado com 200 μ L de água destilada estéril. Seguiu-se adicionando 200 μ L de etanol (95%) e deixado em repouso por 45 minutos, após este período foi transferido 100 μ L de cada poço para uma nova placa, realizando-se leitura em OD₅₉₅ nm.

2.3.6 Teste de efeito de combinação no biofilme em formação (Ensaio *Checkerboard*)

O efeito combinatório do EHVG com a Anfotericina B e com o Fluconazol em culturas de *Candida albicans* (ATCC 10231), Ca(R)Flu e Ca(S)Flu foi avaliado pelo método do tabuleiro de xadrez (*Checkerboard*) segundo Dong et al. (2015) com pequenas modificações. Foram preparadas soluções-mãe para cada amostra a ser combinada (EHVG, Fluconazol, Anfotericina B). Posteriormente, em uma placa de 96 poços, foram realizadas combinações das diluições seriada de EHVG (25-0,78 mg/mL) e Anfotericina B (16 – 0,25 μ g/mL), Fluconazol (156 -1 μ g/mL), em meio RPMI-1640. Em seguida, 100 μ L de inóculo (1×10^7 células), de cada uma das três amostras de *C. albicans*, foram adicionados e as placas foram então incubadas a 37°C, por 24 h. Ao final do período de incubação foi realizada a leitura e os valores utilizados para calcular se houve sinergismo entre os tratamentos, conforme descrito anteriormente (ALVES et al., 2016, ODDS, 2003; MATSUMOTO et al., 2014).

Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI):

$$FICI = (MIC_{A \text{ COMB}} / MIC_{A \text{ SOZINHO}}) + (MIC_{B \text{ COMB}} / MIC_{B \text{ SOZINHO}})$$

Para interpretação dos resultados considerou-se os seguintes valores de FICI: Sinergismo: FICI $\leq 0,5$; Indiferente: FICI $> 0,5$ e ≤ 4 ; Antagonismo: FICI > 4 .

2.3.7 Teste de inibição de formação de hifas no meio líquido e meio sólido

Para o teste em meio líquido foram avaliados os efeitos do EHVG em comparação as drogas padrão (Anfotericina B e Fluconazol) (TSANG et al., 2012; BONI,

2016). Os compostos foram diluídos em meio RPMI-1640 suplementado (SFB 10%) e distribuídos em placas de microtitulação. Em seguida, foi adicionado um inóculo de cada linhagem, padronizado em $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C , em atmosfera de 10% de CO_2 , por 16 horas. Após a incubação, $5\mu\text{L}$ de cada poço foi transferido para lâminas e as amostras foram coradas pela técnica de GRAM. A avaliação foi realizada com auxílio do microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) nas objetivas panorâmicas, $10\times$ e $40\times$, e do programa NIS- *Elements advanced research* (Nikon Corporation®, Japão).

Para avaliação em meio sólido foi realizado de forma qualitativa conforme o método descrito por Tsang et al., (2012). Foram preparados em placas de Petri meio de cultura sólido (ASD) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) para a indução de formação de hifas. Os compostos diluídos na concentração $1\times\text{CIM}$ e $2\times\text{CIM}$ do EHVG e dos controles positivos Anfotericina B e Fluconazol para a linhagem *Candida albicans* ATCC 10231 e para *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu* foram adicionados. Posteriormente, foi transferido para a placa ASD, $25\mu\text{L}$ do inóculo padronizado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Os resultados foram avaliados através da morfologia das colônias. As colônias de aspecto rugoso indicam a presença de filamentos e as colônias de aspecto liso ausência de filamentos. Foram ainda, testados grupos controles sendo: Grupo de controle: ASD + 10% de SFB acrescido de inóculo, para observar o aspecto das colônias sem o tratamento e ASD + inóculo para observar o aspecto das colônias sem a presença de SFB. As placas foram incubadas em estufa de aerobiose por 4 dias a 37°C e fotografadas utilizando câmera digital. Foram realizados 3 experimentos independentes.

2.3.8 Avaliação da inibição das exoenzimas de *Candida albicans*

2.3.8.1 Efeito sobre a produção de hemolisina

A avaliação para a enzima hemolisina foi realizada para todos os isolados de *C. albicans*, usando placas com Ágar sangue. Essas foram preparadas adicionando 7 ml de sangue de carneiro desfibrinado (EBE-FARMA®) a 100 ml ASD (Merck) suplementado com glicose a uma concentração final de 3% (w/v). O pH final do meio foi de aproximadamente 5,6. Inicialmente, as linhagens foram cultivadas em ASD com Cloranfenicol por 24h, e resuspendidas em solução salina e verificada a absorbância pela escala de McFarland 0,5 e confirmada por meio da contagem em câmara de Neubauer 10^7 CFU/mL. Após esse procedimento, em microplaca de 96 poços foram adicionados $100\mu\text{L}$ de meio RPMI-1640 junto ao inóculo e as substâncias teste (EHVG, Fluconazol e

Anfotericina B). Foram, então, incubadas a 37°C. Após o tempo na estufa, foram aliquoteados 5µL de cada poço e transferidos para as placas contendo ágar sangue com a observação da leitura do halo em 72h.

A hemólise foi classificada do tipo beta (β) quando houver halo translúcido total ao redor do inóculo, atividade do tipo alfa (α) quando formar halo preto esverdeado e atividade do tipo Gama (γ) quando não produzir hemólise. Já a intensidade da hemólise foi obtida pela razão: halo + colônia/colônia. Os experimentos foram feitos em triplicatas e a classificação foi feita de acordo com o Índice Hemolítico (IH): positiva ($1,00 < IH < 1,5$) e fortemente positiva ($IH > 1,5$) (BRANCO et al., 2012; SARDI et al., 2016; FERREIRA et al., 2019).

2.3.8.2 Efeito sobre a produção de Proteinase

O meio de teste para proteinase foi meio de ágar BSA (*Bovine Serum Albumin*) contendo 2g BSA, 145 g YNB (*Yeast Nitrogen Base*), 20 g de glicose e 20 g de ágar por litro de água destilada. As amostras de *Candida* foram cultivadas em meio ASD com Cloranfenicol por 24h, e ressuspendidas em solução salina e verificadas a absorvância pela escala de McFarland 0,5 e confirmada por meio da contagem em câmara de Neubauer 10^7 UFC/ ml. Após esse procedimento, em microplaca de 96 poços foram adicionados 100µL de meio RPMI-1640 junto ao inóculo e as substâncias teste EHVG, Fluconazol e Anfotericina B). Foram então incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, foram aliquoteados 5µL de cada poço e transferidos para as placas de Petri com meio BSA e a observação da leitura do halo de 48 e 72h, respectivamente. Todos os isolados utilizados nesse experimento de *C. albicans* foram testados em triplicata, durante dois experimentos independentes, para verificar a atividade de proteinases (SAPs).

A atividade enzimática foi determinada pela formação do halo ao redor da colônia e medida em termos da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação (Pz). De acordo com este sistema,

Pz=1,0 indica que a linhagem teste era negativa para proteinase;

Pz entre 0,64 e 0,99 significa que a linhagem teste estava liberando pequenas quantidades de proteinases (positivas) ou média ++ ou fraca + ;

Pz \leq 0,63 significa que a linhagem teste estava liberando grandes quantidades de proteinases (fortemente positivas) ou forte +++ (SARDI et al, 2012; BRANCO et al., 2012).

2.3.8.3 Efeito sobre a produção de Fosfolipase

Para o teste para fosfolipase foi utilizado para a produção do meio, 10g de peptona, 57,3g (NaCl) de cloreto de sódio, 0,55g (CaCl₂) de cloreto de cálcio, 30g de glicose e 20g de ágar e a adicionado 100ml de água destilada com 50% de gema de ovo (enriquecimento de gema de ovo). As amostras de *Candida* foram cultivadas em meio ASD com Cloranfenicol por 24h, e ressuspensas em solução salina e verificadas a absorvância pela escala de McFarland 0,5 e confirmada por meio da contagem em câmara de Neubauer 10⁷ UFC/ ml. Após esse procedimento, em microplaca de 96 poços foram adicionados 100µL de meio RPMI-1640 junto ao inóculo e as substâncias teste (EHVG, Fluconazol e Anfotericina B). Foram então incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, foram aliqüotados 5µL de cada poço e transferidos para as placas de Petri com meio preparado anteriormente com gema de ovo e a observação da leitura do halo de 48 e 72h, respectivamente. A atividade enzimática foi determinada pela formação do halo ao redor da colônia e medida em termos da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação (Pz). De acordo com este sistema,

Pz=1,0 indica que a linhagem teste era negativa para fosfolipase;

Pz entre 0,64 e 0,99 significa que a linhagem teste estava liberando pequenas quantidades de fosfolipase (positivas) ou média ++ ou fraca +

Pz≤0,63 significa que a linhagem teste estava liberando grandes quantidades de fosfolipase (fortemente positivas) ou forte +++ (SARDI et al, 2012; BRANCO et al., 2012). Todas as amostras de *C. albicans*, padrão, resistente e sensível, foram testados em triplicata, durante dois experimentos independentes, para verificar a atividade de fosfolipase.

2.4 Avaliação da atividade do EHVG *in vivo*

2.4.1 Animais

Todos os experimentos foram conduzidos conforme determinação COBEA, e do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMA (CEUA) - (parecer de aprovação do projeto com Protocolo nº 23115.009717/2015-10). Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (n=30), divididos em 6 grupos com 5 animais cada.

2.4.2 Ensaio *in vivo* Sobrevida sepse letal por *Candida albicans*.

O protocolo *in vivo* procedeu-se conforme conhecimento do Comitê de Ética e Pesquisa com Animais e foi realizado de acordo com o descrito por Alves (2018) com adaptações para a investigação da sepse fúngica. Realizou-se da seguinte forma:

- a. Animais utilizados: Camundongos - Linhagem Swiss/ fêmeas com 8 a 14 semanas de idade;
- b. Imunossupressão: utilizou-se Ciclofosfamida 50mg/Kg – administração de dose única via intraperitoneal 48h antes da infecção;
- c. Infecção pelo microrganismo: *Candida albicans* (ATCC 10231): 3×10^8 /animal-administrado pela via intraperitoneal;
- d. Tratamento controle positivo: Anfotericina B solução 0,06mg/Kg – administração em dose única por via subcutânea concomitante a infecção;
- e. Tratamento com EHVG solução 5mg/Kg – administração em dose única por via subcutânea concomitante e 6 horas após a infecção. Na tabela 1 mostra a distribuição dos grupos para a avaliação dos efeitos do EHVG na sepse experimental.

Tabela 1. Organização dos grupos a serem utilizados para o experimento *in vivo* de sepse fúngica.

| | Grupos (Experimento Sobrevida) | N |
|---------------------------------|--|----------|
| SHAM | Sem imunossupressão, sem infecção e não tratado | 5 |
| Imunossuprimido (IMUNOS) | Imunossuprimido, sem infecção e não tratado | 5 |
| PBS | Imunossuprimido, infectado e administrado PBS (100µL) | 5 |
| ANFO B | Imunossuprimido, infectado e tratado com Anfotericina B (0,6mg/Kg) | 5 |
| EHVGc | Imunossuprimido, infectado e tratado com EHVG (5mg/Kg) concomitante com a infecção | 5 |
| EHVGa | Imunossuprimido, infectado e tratado com EHVG (5mg/Kg) após a infecção | 5 |

Para a análise da sobrevida, os animais foram observados por no mínimo 5 dias após a infecção, e a mortalidade foi calculada considerando o tempo médio de sobrevivência (MST) e o aumento percentual no tempo de vida (ILS), de acordo com a seguinte fórmula: $ILS (\%) = (MST \text{ do grupo tratado} - MST \text{ do grupo controle}) \times 100 / MST \text{ do grupo controle}$ (GUPTA et al., 2000).

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas após a realização do teste de normalidade. Os dados foram expressos em gráficos a partir da determinação da média \pm desvio padrão, com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 8.0. As diferenças serão consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 O EHVG inibe o crescimento fúngico ocasionando a formação de halos.

A Figura 1 mostra que o EHVG inibiu o crescimento das três amostras de *Candida albicans*, sendo que a zona máxima de inibição foi observada na maior concentração do EHVG, correspondente a 100mg/mL do extrato. Observa-se que para *Ca(R)Flu*, o EHVG demonstrou atividade com a presença do halo em todas as concentrações testadas. O que não ocorreu para o Fluconazol (D).

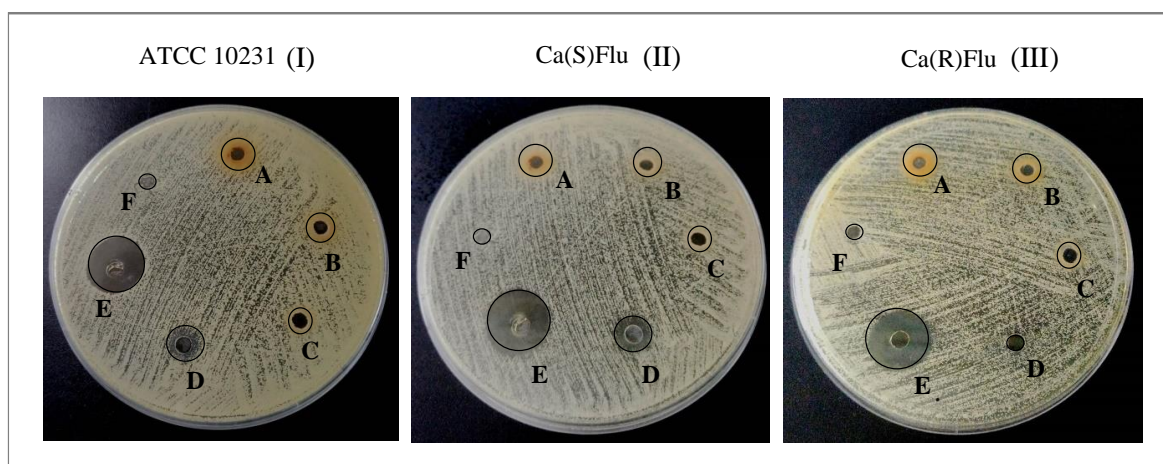


Figura 1. Atividade antifúngica do EHVG contra as linhagens de *Candida albicans* ATCC 10231 (I); *Ca(S)Flu* (II) e *Ca(R)Flu* (III), mostrando a formação de halos correspondentes às zonas de inibição do extrato utilizado nas concentrações de: 100mg/mL (A), 50mg/mL (B) e 25mg/mL (C), em comparação ao Fluconazol (25 μ g/mL) (D) e à Anfotericina B (100 μ g/mL) (E) e ao controle negativo PBS estéril (F).

Os valores do tamanho dos halos, conforme a leitura realizada após 24 horas, confirmaram que a inibição ocasionada pelo EHVG foi dose dependente, com os maiores tamanhos dos halos observados na maior concentração do extrato como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Medidas dos halos referente a cada dose e o efeito inibitório do EHVG sobre *Candida albicans* (ATCC 10231, *Ca*(S)Flu e *Ca*(R)Flu), após 24 horas.

| TRATAMENTO | ATCC 10231 (mm) | <i>Ca</i> (S)Flu (mm) | <i>Ca</i> (R)Flu (mm) |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| EHVG (100 mg/mL) | 17±0,01 | 17±0,71 | 14±0,70 |
| EHVG (50 mg/mL) | 15±0,71 | 16±0,01 | 11±0,0 |
| EHVG (25 mg/mL) | 8±0,70 | 8±0,01 | 6±0,71 |
| FLUCONAZOL (25 µg/mL) | 11±0,01 | 13±1,41 | (R) |
| ANFOTERICINA B (100 µg/mL) | 24±0,71 | 21±0,01 | 19±0,01 |
| Controle Negativo - PBS estéril | + | + | + |

3.2 O EHVG demonstrou a concentração inibitória mínima (CIM) em todas as amostras de *Candida albicans*

Conforme a tabela 3, os valores de CIM nas amostras tratadas com EHVG foram semelhantes para ATCC 10231 e sensível *Ca*(S)Flu, e pelo menos duas vezes maiores para a linhagem resistente *Ca*(R)Flu. A Anfotericina B demonstrou ser mais eficiente do que o Fluconazol em relação ao CIM e a CFM, inclusive para *Ca*(R)Flu.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EHVG frente as linhagens ATCC 10231, *Ca*(R)Flu e *Ca*(S)Flu de *Candida albicans* em relação ao Fluconazol.

| <i>C. albicans</i> | <i>V. guianensis</i> (mg/mL) | | Anfotericina B (µg/mL) | | Fluconazol (µg/mL) | |
|--------------------|------------------------------|------|------------------------|-----|--------------------|------|
| | CIM | CFM | CIM | CFM | CIM | CFM |
| ATCC 10231 | 0,78 | 3,12 | 1 | 2 | 0,5 | 8 |
| <i>Ca</i> (S)Flu | 0,78 | 1,56 | 0,5 | 1 | 2 | 32 |
| <i>Ca</i> (R)Flu | 1,56 | 6,25 | 1 | 2 | 128 | >128 |

3.3 O EHVG apresenta sinergismo com os antifúngicos no controle do biofilme

A Tabela 3 mostra que houve redução do CIM quando se realizou a combinação do EHVG, Anfotericina B e Fluconazol na ordem de 75%, 75% e 88%, respectivamente. Os resultados indicam que não houve antagonismo entre o EHVG e os antifúngicos para nenhuma das linhagens testadas. Já o efeito sinérgico entre o EHVG e os dois antifúngicos foi observado para as linhagens (ATCC 10231 e *Ca*(R)Flu). Para a linhagem *Ca*(S)Flu o EHVG apresentou efeito indiferente ao Fluconazol e Anfotericina

B, apesar de ter reduzido o valor do CIM. Por outro lado, a combinação entre o EHVG e os antifúngicos não alterou o perfil da resposta, considerada como indiferente.

Tabela 3. Combinação (*Checkerboard*) do extrato (EHVG) com controle positivo (ANFO B e FLU).

| <i>C. albicans</i> | Antifúngico | Antifúngico ($\mu\text{g/mL}$) | | <i>V. guianensis</i> (mg/mL) | | FICI | Resultado | Redução (%) |
|--------------------|-------------|----------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|-------------|------------------|-------------|
| | | CIM | CIM combinado | CIM | CIM combinado | | | |
| ATCC 10231 | ANFO B | 1,0 | 0,25* | 0,78 | 0,19* | 0,50 | Sinérgico | 75 |
| | FLU | 0,5 | 0,25* | 0,78 | 0,39* | 1,00 | Indiferente | 50 |
| <i>Ca(S)Flu</i> | ANFO B | 0,5 | 0,13* | 0,78 | 0,39* | 0,75 | Indiferente | 30 |
| | FLU | 2,0 | 0,50* | 0,78 | 0,39* | 0,75 | Indiferente | 30 |
| <i>Ca(R)Flu</i> | ANFO B | 1,0 | 0,13* | 1,56 | 0,39* | 0,37 | Sinérgico | 75 |
| | FLU | 128,0 | 32,0* | 1,56 | 0,19* | 0,37 | Sinérgico | 88 |

CIM – Concentração Inibitória Mínima;

FICI – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

(*) $p < 005$ em relação ao MIC do EHVG ou da Anfotericina testado sem associação

3.4 O tratamento *in vitro* com EHVG promove a morte de *Candida albicans*

A Figura 2 mostra que o tratamento com EHVG ($1 \times \text{CIM} = 0,78 \text{mg/mL}$ e $2 \times \text{CIM} = 1,56 \text{mg/mL}$) inibiu a curva de crescimento das três amostras de *Candida albicans* avaliadas, promovendo a morte dessas linhagens. Após 24 horas, não houve diferença entre as amostras tratadas com o extrato e com Anfotericina B (Figura 2A; 2B e 2C). No entanto para o Fluconazol (Figura 2D; 2E; 2F), o EHVG mostrou-se mais eficiente quanto aos efeitos no isolado resistente (*Ca(R)Flu*).

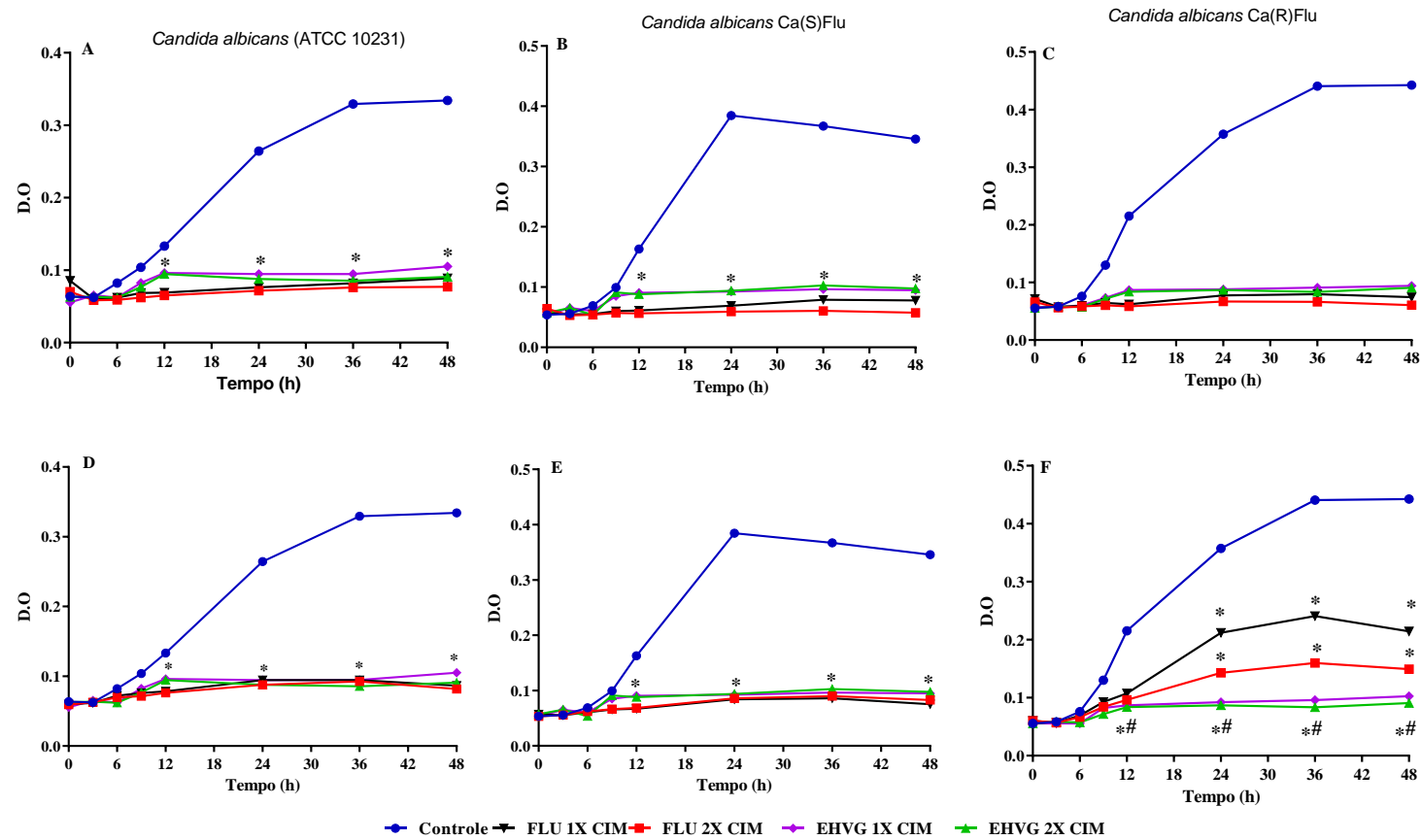


Figura 2. Efeito do EHVG sobre a curva de crescimento de cepas de *Candida albicans* ATCC 10231; *Ca(S)Flu* ou *Ca(R)Flu*. O tratamento com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG) foi comparado a Anfotericina B (A; B e C) ou ao Fluconazol (D; E e F). Os resultados correspondem a média de amostras testadas em quintuplicata (*) p < 0,05 em relação ao controle não tratado e (#) p < 0,05 em relação controle positivo.

3.5 O tratamento com EHVG inibe o biofilme em formação

A Figura 3 mostra ação inibitória do EHVG sobre o biofilme em formação, de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Ca*(S)Flu e *Ca*(R)Flu. Para a linhagem padrão ATCC 10231, o EHVG apresentou resultados semelhantes ao Fluconazol e demonstrou diferença significativa para a Anfotericina B (Figura 3A). O EHVG demonstrou ser mais efetivo que os dois antifúngicos quando testado sobre os isolados clínicos *Ca*(R)Flu (Figura 3B) ou *Ca*(S)Flu (Figura 3C).

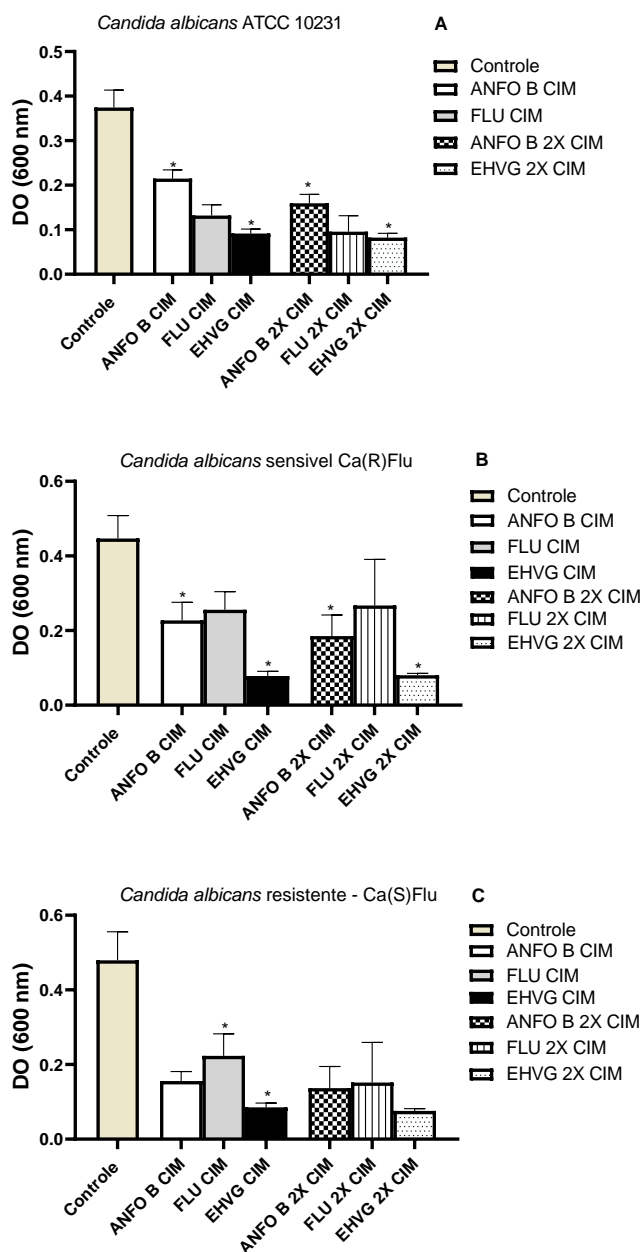


Figura 3. Efeito inibitório do EHVG sobre o biofilme em formação. As culturas tratadas com EHVG foram comparadas àquelas tratadas com Anfotericina B (ANFO B) ou Fluconazol (FLU). Os dados expressos em densidade ótica a 600nm (DO) representam média \pm SD de amostras individuais testadas em quintuplicata (*) $p < 0,05$ com Teste Kruskal-Wallis com Teste Dunn's para múltiplas comparações.

3.6 O tratamento com EHVG inibe a formação de hifas

A Figura 4 mostra o efeito do EHVG nas concentrações 1×CIM e 2×MIC, respectivamente, sobre a formação de hifas na linhagem de *Candida albicans* ATCC 10231 e em culturas não tratadas. Nas amostras tratadas com EHVG tanto em relação a concentração ocorreu importante inibição tanto na formação de hifas como nos blastoconídeos em brotamento, demonstrando também o desarranjo ocasionado pela presença do extrato.

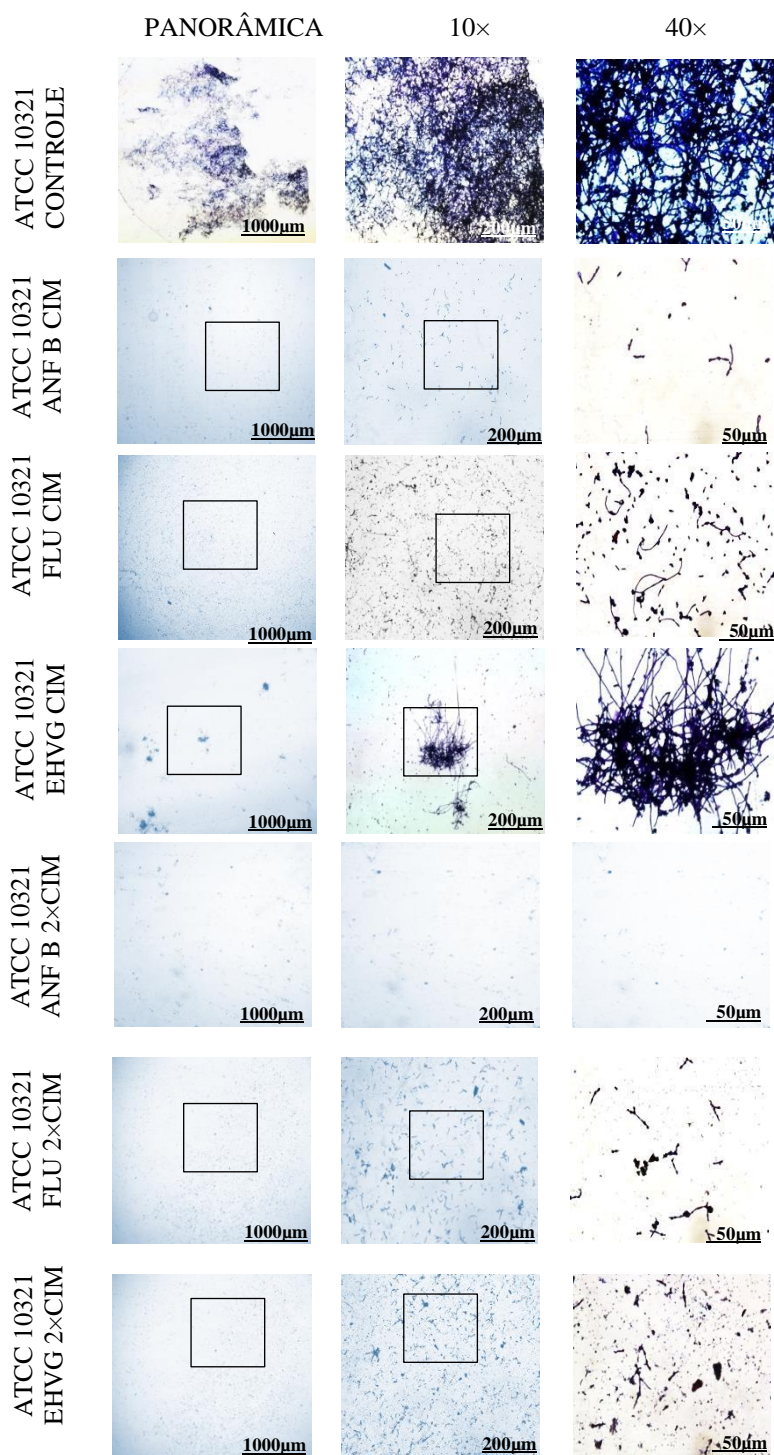


Figura 4. Fotomicrografias comparativas de *Candida albicans* ATCC 10231 tratados com 1×CIM e 2×CIM e obtidas de forma panorâmica e com aumento de 10 e 40X em amostras coradas com coloração de GRAM.

A Figura 5 mostra a presença de hifas e blastoconídeos em brotamento no controle tratado com Fluconazol, 1×CIM e 2×CIM diante de do isolado *Ca(S)Flu*. Nas amostras tratadas com Fluconazol observa-se uma desorganização da construção das hifas, além de redução no número de hifas e blastoconídeos em brotamento. Nessa condição o EHVG foi mais efetivo quando comparado com a linhagem padrão de *Candida albicans*.

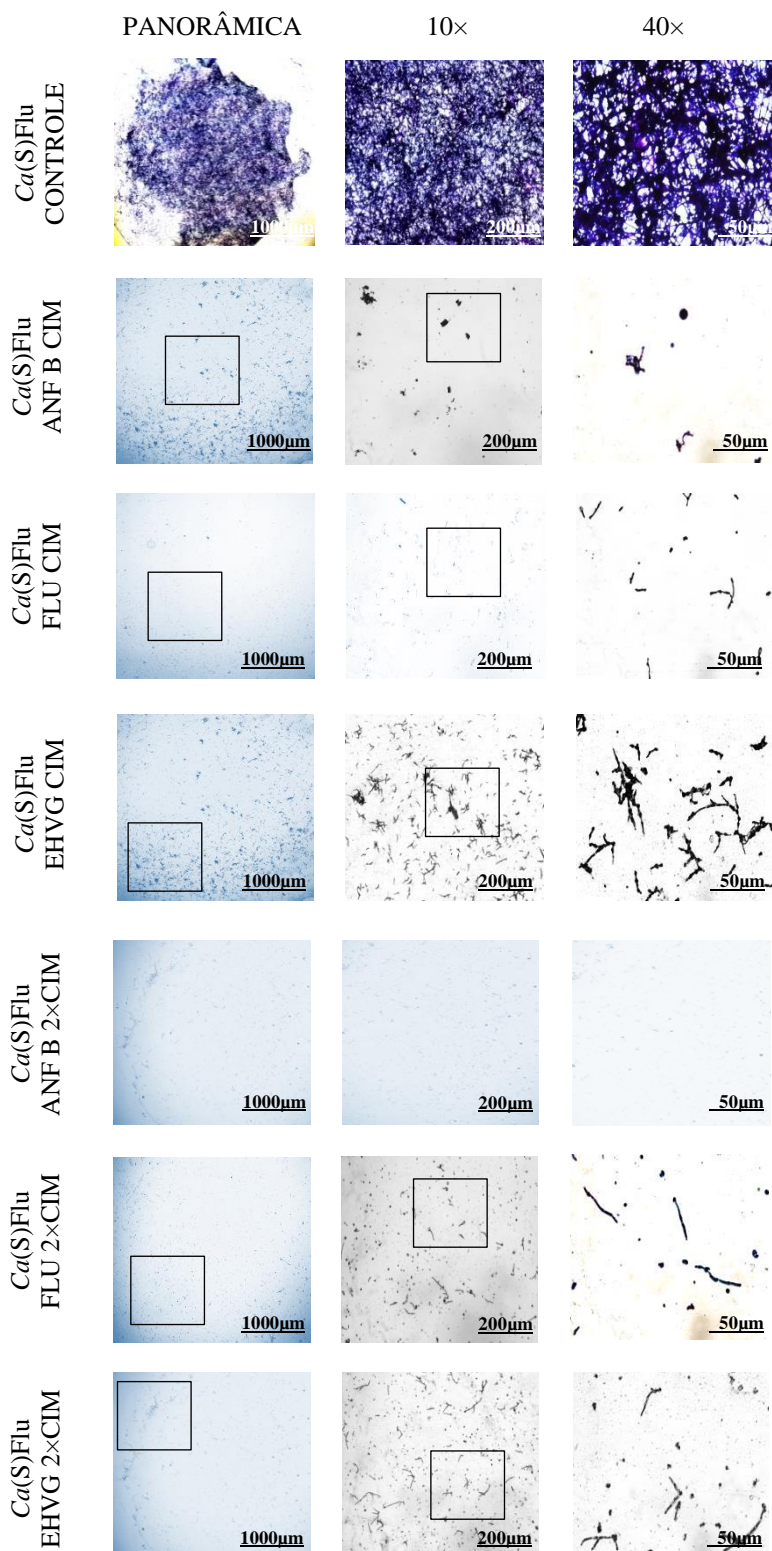


Figura 5. Fotomicrografias comparativas de *Ca(S)Flu* tratados com 1×CIM e 2×CIM e obtidas de forma panorâmica, com aumento de 10 e 40× em amostras coradas com coloração de GRAM.

A Figura 6 mostra a presença de hifas em grandes quantidades e semelhantes ao controle, tanto duas concentrações, 1×CIM e 2×CIM, diante de *Ca*(R)Flu. tratado com Fluconazol o que não acontece para Anfotericina e o EHVG. Nas amostras tratadas na concentração 2×CIM raras são as hifas presentes.

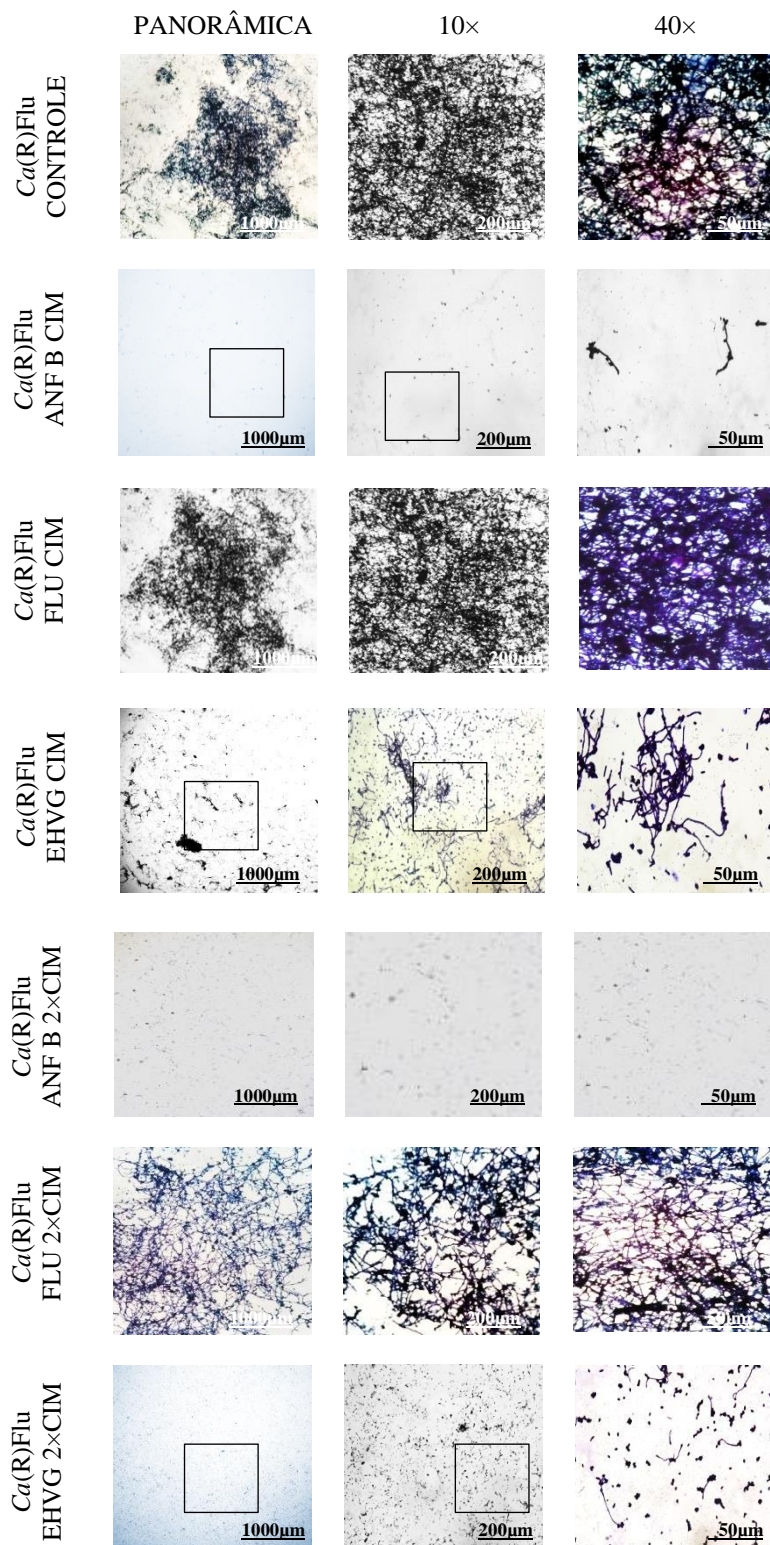


Figura 6. Fotomicrografias comparativas de *Ca*(R)Flu tratados com 1×CIM e 2×CIM e obtidas de forma panorâmica e com aumento de 10 e 40× em amostras coradas com coloração de Gram.

Na figura 7 é possível analisar macroscopicamente e de forma qualitativa as mudanças no aspecto das colônias após exposição ao EHVG 1×CIM e 2×CIM para *Ca(R)Flu* que apresentou uma característica lisa com menos segmentação e para o isolado *Ca(S)Flu* o aspecto misto (liso e rugoso) na presença de 1×CIM e 2×CIM. O controle sem exposição ao soro fetal bovino apresentou colônias de aspecto liso e o controle com exposição ao SFB apresentou colônias de aspecto rugoso para as três amostras de *Candida albicans*.

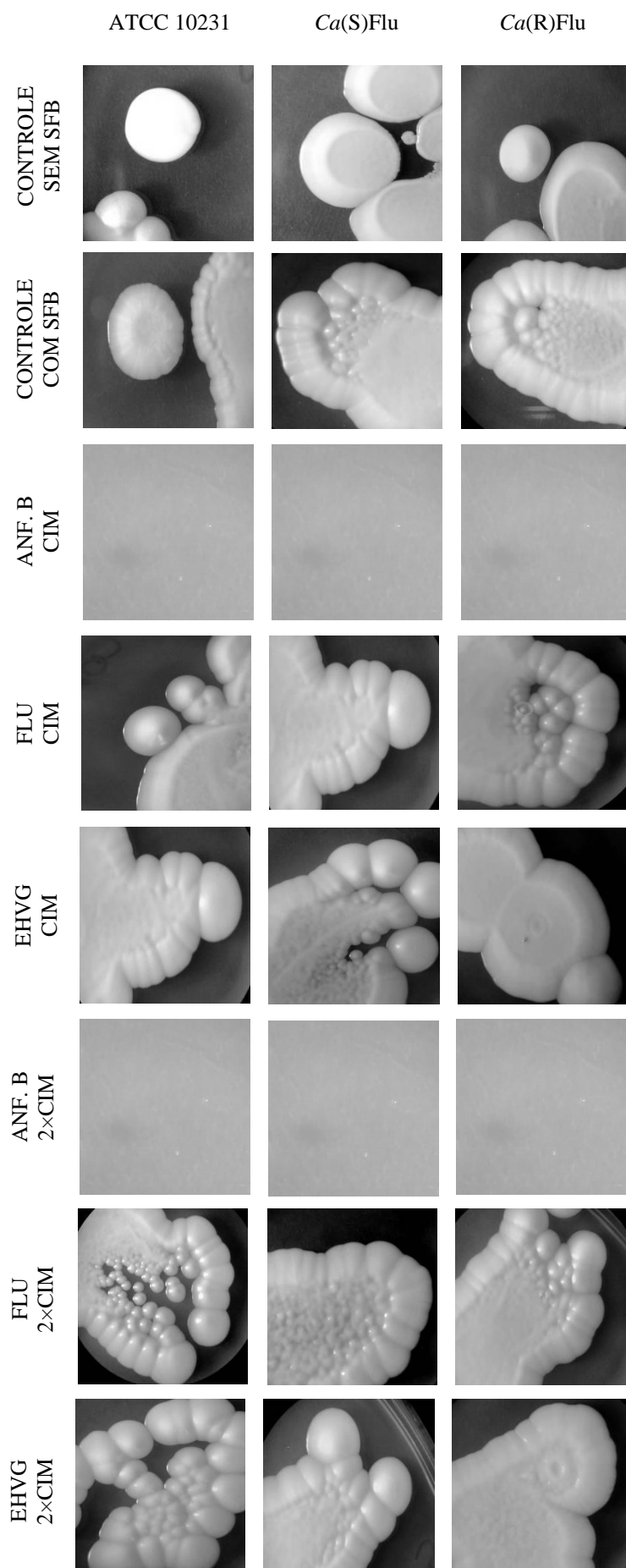


Figura 7. Comparação das amostras de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu* em meio sólido para observação morfológica tratadas com EHVG, Anfotericina B e Fluconazol, 1×CIM e 2×CIM.

3.7 O tratamento com EHVG interfere nas enzimas de virulência de *Candida albicans*

3.7.1 Efeito sobre as enzimas proteolíticas: proteinase e fosfolipase

Com relação a secreção da enzima proteinase foi observado que tanto a linhagem padrão *Candida albicans* ATCC 10231, como *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu*, houve a formação do halo ao redor da colônia para proteinase, no entanto, percebeu-se a redução no tamanho do halo e conseqüentemente, a redução da produção dessa enzima quando comparado ao controle (Pz=0,6). O tratamento com EHVG possivelmente reduziu a secreção de proteinase para *Ca(R)Flu* e ATCC 10231 que apresentaram valores de zona de precipitação (Pz) entre 0,74 e 0,99. Por outro lado, na linhagem *Ca(S)Flu* ocorreu liberação de enzimas em grande quantidade (Pz<0,63), mesmo na presença do extrato.

Em relação a enzima fosfolipase o EHVG apresentou também halo, mas com o Pz entre 0,82-084 nas amostras avaliadas, o que pode possivelmente caracterizar redução da produção dessa enzima, para *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu*.

A Tabela 5 mostra o efeito do EHVG na atividade enzimática, conforme a força de ativação. Ocorreu maior redução na secreção de fosfolipase na linhagem *Ca(S)Flu* em comparação as outras linhagens. Já para enzima proteinase o EHVG reduziu a produção tanto na linhagem ATCC 10231 como na *Ca(R)Flu*.

Tabela 5. Ação do EHVG sobre as enzimas fosfolipase e proteinase considerando a intensidade de secreção das enzimas por três linhagens de *Candida albicans* (ATCC 10231), (*Ca(S)Flu*) e (*Ca(R)Flu*).

| <i>Candida albicans</i> | Fosfolipase | | Proteinase | |
|----------------------------|-------------|------|------------|------|
| | Controle | EHVG | Controle | EHVG |
| ATCC 10231 | +++ | +++ | +++ | + |
| sensível <i>Ca(S)Flu</i> | +++ | + | +++ | +++ |
| resistente <i>Ca(R)Flu</i> | ++ | + | ++ | + |

(+++) atividade forte;

(++) atividade moderada;

(+) baixa atividade e

(-) sem atividade

3.7.2 O tratamento com EHVG não afeta a secreção de hemolisina

A Figura 8 mostra atuação do EHVG sobre a produção de hemolisina. Todas as 3 linhagens apresentaram hemólise em meio sólido. Na presença do EHVG teve efeito tipo α -hemólise para linhagem ATCC 10231 e β -hemólise para as linhagens dos isolados clínicos *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu* de acordo com o halo formado. Em relação ao índice hemolítico (IH) apresentaram $IH > 1,5$, considerado fortemente positivo a produção da enzima para ATCC10231.

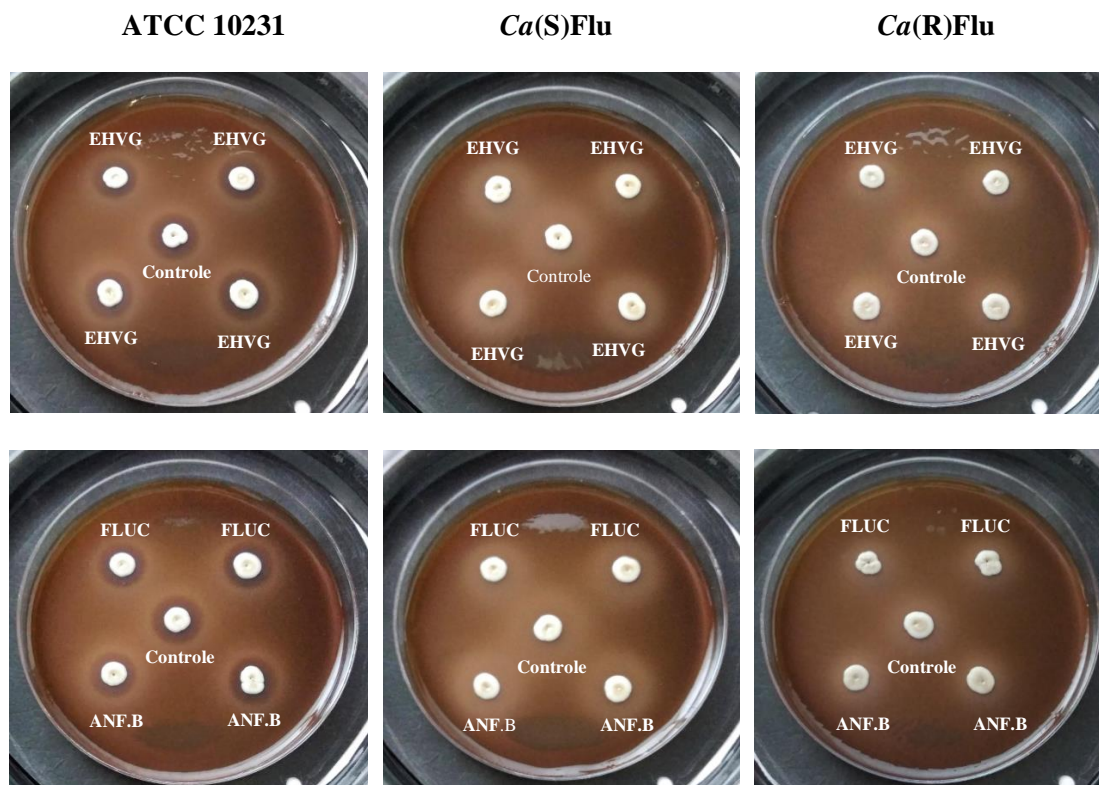


Figura 8. Comparação da atividade da enzima hemolisina de *Candida albicans* ATCC 10231, *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu*.

3.8 O EHVG assegura a sobrevivência e aumenta a expectativa de vida na sepse letal

Considerando o efeito anti-*Candida* do EHVG *in vitro*, avaliou-se o efeito do extrato *in vivo* usando o modelo de infecção letal apenas com *Candida albicans* (ATCC 10231), concomitante e após a indução da sepse assegurando a sobrevivência dos animais (Figura 9). Efeito semelhante pode ser observado no grupo tratado com Anfotericina B ao se comparar o tratamento concomitante do EHVG (Tabela 5). Todos os animais que receberam PBS morreram até o terceiro dia e tanto os animais limpos (SHAM) como aqueles apenas imunossuprimido (IMUNOS) permaneceram vivos até o final do experimento.

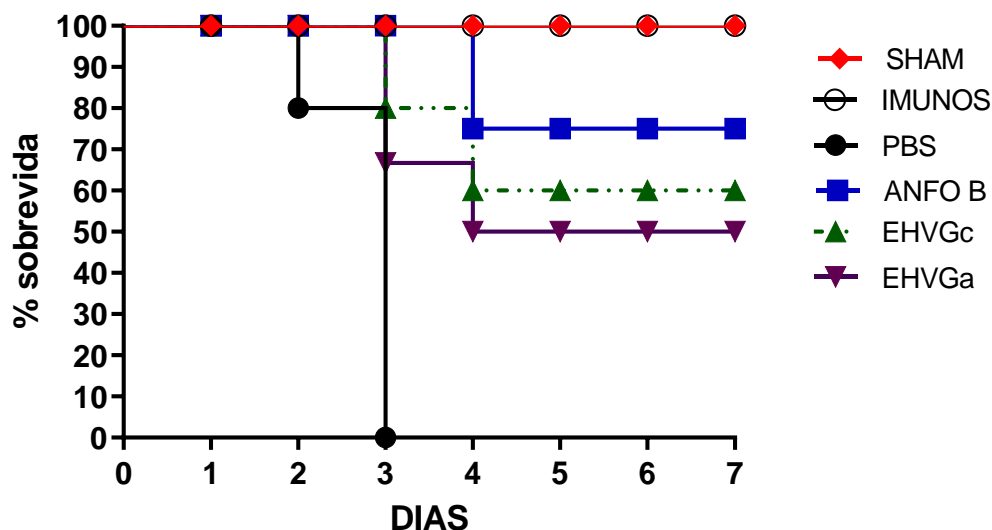


Figura 9. Percentual de sobrevivência dos animais hígidos (SHAM) comparados aos imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com de *Candida albicans* (ATCC 10231) tratados com EHVG concomitante a indução da sepse (EHVGc) ou 6 horas após (EHVGa) e não tratados (PBS). A Anfotericina B (ANFO B) foi utilizada como controle positivo aplicada no momento da infecção. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 6 animais/grupo.

Em decorrência do aumento na sobrevivência ocorreu também aumento da expectativa de vida dos animais infectados com *C. albicans* (ATCC 10231) e tratados com EHVG (Tabela 6)

Tabela 6. Expectativa de vida de animais com sepse induzida por *Candida albicans* e tratados com extrato de *Vismia guianensis* (EHVG).

| Tratamento | Expectativa de vida (dias) | Taxa Sobrevivência (%) |
|----------------|----------------------------|------------------------|
| PBS | 1,2 | 10 |
| EHVGc | 4,6* | 100* |
| EHVGa | 4* | 83* |
| Anfotericina B | 4,8* | 100* |

p<0,05 em comparação ao grupo PBS (*)

4. DISCUSSÃO

Variadas são as formas e mecanismos que os fungos do gênero *Candida*, especialmente, *Candida albicans*, se utilizam para aderir, invadir e se disseminar no organismo dos seres vivos. As infecções por *C.albicans* são um importante problema de saúde pública, pois além de serem relativamente frequentes, são resistentes a muitos antifúngicos. Participam da resistência os vários fatores que desenvolvem, incluindo a formação de biofilmes.

Ao se observar no teste de halo de difusão, pode-se confirmar a atividade do extrato hidroalcolico de *Vismia guianensis* que de alguma forma demonstrou atividade antifúngica e importante ponto de partida para os demais testes.

Por isso, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do EHVG demonstrou um potencial antifúngico frente as linhagens ATCC10231 e *Ca(S)Flu*, inclusive diante da linhagem resistente Fluconazol, *Ca(R)Flu*. Esses resultados mostraram que mesmo o EHVG, sendo um extrato bruto apresentou capacidade em controlar o crescimento de *Candida albicans*. A determinação da CIM tem relevância médica, pois permite identificar a quantidade de agente antifúngico adequada para controlar a infecção.

Em 2013, Rodrigues verificou que os extratos das folhas de *Vismia guianensis* apresentaram atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum*, com concentração inibitória mínima (CIM) que variou entre 0,5 a 8 mg/mL, valores semelhantes aos aqui descritos.

Segundo Oliveira (2009), os extratos das cascas e das folhas de *V.guianensis* apresentaram atividade inibitória frente as linhagens padrão (ATCC) e clínicas dos mesmos fungos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, sugerindo que os compostos presentes nos extratos de *V. guianensis* podem ter efeito antifúngico de largo espectro, pois além da atividade anti-*Candida albicans* aqui descrita, podem também inibir o crescimento de outras linhagens.

Pesquisadores relatam que a investigação dos efeitos de compostos de origem vegetal sobre linhagens padrão, linhagens clínicas sensíveis e linhagens resistentes, é bastante útil nos estudos de prospecção para efeito de comparação. Os achados de Sharma et al., (2019) confirmaram que a comparação entre linhagens padrão (ATCC90028) e linhagens clínicas sensíveis e resistentes ao Fluconazol, podem contribuir com a descoberta de novas moléculas com ação antifúngica, mesmo quando os valores de CIM para a linhagem resistente corresponda ao dobro do encontrado para linhagem sensível. Para fins comparativos os valores

de CIM após o tratamento com EHVG na linhagem resistente, também correspondeu ao dobro dos valores para linhagem sensível e para linhagem padrão de *C. albicans*.

Em sequência verificou-se que a curva de crescimento ou a denominada curva de morte para cada linhagem enfatizou a efetividade do EHVG nas duas concentrações utilizadas. O controle negativo de *C. albicans* apresentou-se em crescimento exponencial a partir da sexta hora, o que não foi observado quando se utilizou tanto o EHVG como os antifúngicos, mantendo a curva de forma estacionária para ATCC e *Ca(S)Flu* apresentando efeito fungicida. Inibiu o crescimento das três linhagens de *Candida albicans*, promovendo a morte nas primeiras 12h. A avaliação após 24 horas, mostrou que o EHVG teve efeito similar a Anfotericina B. Com relação ao Fluconazol o EHVG foi mais eficiente ao inibir o crescimento fúngico, sobretudo na linhagem resistente *Ca(R)Flu*. É importante destacar que a capacidade de formar biofilmes, é um dos fatores de virulência de *Candida albicans*, pois uma vez formado, estes biofilmes podem ser resistentes a drogas antifúngicas e aumentam as chances de infecções disseminadas (LOHSE et al., 2017).

Os efeitos sobre o biofilme permitem uma triagem rápida e de alto rendimento quando se busca resultados satisfatórios para uma determinada substância de interesse. Dessa forma, esses ensaios *in vitro* foram e ainda são utilizados como o passo inicial para identificar compostos que inibem a formação de biofilme antes desses serem testados em cultura celular e modelos *in vivo* verificando, também, toxicidade (LOHSE et al., 2017; GULATI et al., 2018).

Nesse contexto, ao se observar a ação antifúngica, testou-se por meio da técnica *Checkerboard*, o efeito combinado do Fluconazol e a Anfotericina B com o EHVG. De forma positiva, obteve-se uma redução na concentração inibitória mínima, tanto para os controles positivos como para o EHVG diante das linhagens avaliadas, inclusive *Ca(R)Flu*. Ao se destacar as linhagens, ATCC10231 e *Ca(R)Flu* que apresentou CIM de combinação reduzido de forma significativa e sinérgico, especialmente na associação entre o EHVG e a Anfotericina B, pode-se perceber a vantagem dessa combinação na redução da concentração da Anfotericina B, fármaco de muitas reações adversas intensas e tóxicas para os seres humanos. Tanto a Anfotericina B como o Fluconazol são amplamente utilizados na clínica, no entanto, devido ao aumento da resistência das espécies de *Candida* ao Fluconazol e, ainda, devido aos efeitos danosos ao sistema renal ocasionados pela Anfotericina B (HAN et al., 2007; BASSETTI et al., 2018) tem-se buscado por alternativas como essa do “jogo de xadrez”.

Outro achado relevante foi referente ao isolado clínico *Ca(R)Flu* que antes apresentava uma necessidade maior de concentração do EHVG e ao se realizar a combinação do Fluconazol e o EHVG apresentou tanto a redução do CIM em relação ao Fluconazol como

do EHVG que era de 1,56mg/mL e passou para 0,19mg/mL, importante dado percebido nessa pesquisa.

Em uma pesquisa realizada por Multhamil et al., (2018) utilizaram, também, ensaio *Checkerboard*, demonstraram a importância de se testar a associação, pois ao realizarem esse procedimento, o composto que antes não inibiu o crescimento de todas as linhagens de *Candida*, apresentou efeito sinérgico e foi efetivo para todas linhagens testadas, dados esses que fortalecem a ideia de se trabalhar com a combinação do EHVG com Anfotericina B e com o Fluconazol, pois não só inibiu o crescimento de forma isolada, mas o efeito combinado reduziu o CIM.

Iwazaki et al., (2010) confirmam, também, que a associação de compostos com atividade antifúngica pode potencializar a ação desses medicamentos. Utilizaram um composto que não apresentava atividade antifúngica e quando associaram ao Fluconazol no ensaio de “*Checkboard*”, gerou uma potencialização do efeito do Fluconazol, ocasionando, também, a redução da CIM. No mesmo ano, Endo et al, (2010), também, mostraram que a associação da punicalagina ao Fluconazol resultou em interação sinérgica, potenciando a ação do Fluconazol, com uma redução da CIM, de até duas vezes, demonstrando que essa é importante estratégia para otimizar os efeitos de medicamentos convencionais, mesmo quando parecem não ser eficientes, sobretudo no caso de microrganismos resistentes. No caso do EHVG apresentou atividade tanto antes como após a combinação, com destaque para a linhagem resistente avaliada.

Com interesse em se verificar a questão da transição morfológica de *Candida*, outro importante fator de virulência, obteve-se no teste em meio sólido o controle da segmentação inicial de *Candida*, demonstrando a efetividade tanto do EHVG como dos antifúngicos em controlar o crescimento e disseminação do microrganismo, uma vez que a hifa está relacionada com a invasão tecidual e a célula leveduriforme está associada a disseminação do fungo. Boni (2016) também realizou esse tipo de avaliação onde conseguiu observar que os compostos utilizados também conseguiram controlar essa alteração morfológica de *Candida*.

Essa habilidade é importante para *Candida albicans*, pois está associada a capacidade da levedura se transformar em distintas morfologias, deixando de ser unicelular e podendo gerar brotos (blastoconídeos) e/ou formar de hifas verdadeiras. E assim, ao se utilizar EHVG, também, em meio líquido gerou uma desorganização e redução na transformação das leveduras em hifas, além de ter reduzido o número de blastoconídeos em brotamento das três linhagens de *C. albicans*.

Outros estudos, também buscaram verificar a redução das hifas como importante estratégia de controle do fungo, como Boni (2016) já citado acima, Barbosa, (2018) e Roscetto et al., (2018). Considera-se, ainda, que esses últimos trabalhos utilizaram compostos isolados e nessa pesquisa, utilizou-se extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Vismia guianensis*.

Assim como a presença das hifas, outros fatores de virulência podem estar associados a processos de adesão, invasão e disseminação de *Candida*. Dentre eles, as exoenzimas ajudam a degradar componentes que auxiliam nesse processo, tais como hemolisina, proteinase e fosfolipase, objetos da pesquisa.

Ao se avaliar as placas apresentadas para o teste de hemolisina, observou-se que não foi possível inibir a formação dos halos para as linhagens de *Candida albicans*, ou seja, continuaram a produzir a enzima hemolisina, mas a intensidade hemolítica foi menor para *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu*. Sardi et al., (2012) comentaram que a secreção dessa enzima, facilita a invasão das hifas e no desenvolvimento da disseminação da candidíase, situação essa que piora quando se trata, por exemplo, de pacientes diabéticos com níveis elevados de glicose ou pacientes imunossuprimidos.

Um outro fator de virulência associado a patogenicidade de *C. albicans* é a secreção de enzimas proteolíticas, tais como as proteases aspartato (SAP) e fosfolipases. Nesse contexto, os efeitos do EHVG sobre a proteinase e fosfolipase foi que o extrato reduziu a produção de proteinase nas linhagens ATCC10231 e *Ca(R)Flu*. No entanto, a ação do extrato, em relação a fosfolipase, foi mais efetiva para linhagens *Ca(S)Flu* e *Ca(R)Flu*. Esses dados mostram que EHVG, do ponto de vista clínico, pode ser um importante alvo na prospecção de produtos antifúngicos, sobretudo se considerarmos sua ação na linhagem resistente.

A produção de enzima é provavelmente um processo bem regulado que é ativado em um momento específico durante a colonização e infecção para obter benefícios máximos para *C. albicans*. A revisão realizada por Mardegan et al., (2006) mostra as múltiplas funções do Genes SAP e relacionam as proteinases como uma família de genes de virulência versátil e multifuncional de *C. albicans* o que pode justificar, possivelmente, o não controle total da secreção dessas enzimas pelo EHVG.

E após todos esses testes *in vitro*, partiu-se para o teste *in vivo* para observar o comportamento em um organismo vivo diante de uma situação de sepse. Dessa forma, o estudo *in vivo*, demonstrou que a sobrevivida gerou que o EHVG utilizado de forma concomitante e seis horas após a infecção, teve a capacidade de garantir uma sobrevivida de 60% e 50% respectivamente, enquanto a Anfotericina B (antifúngico padrão utilizado como controle)

apresentou 80% de sobrevida. Os dados obtidos podem ser relacionados a ação por diversos mecanismos como demonstrado nas avaliações *in vitro*.

No estudo realizado por Santos (2018) ao utilizar o extrato de *Terminalia catappa* L. (10mg/mL) apresentou um percentual de sobrevida de 40% e a expectativa de vida encontrada foi de 63,6% concomitante, seguido por 54,5% com administração seis horas após. Em outro trabalho, Alves (2019), foi utilizado *Punica granatum* L, apesar de assegurar a sobrevida dos animais até o final do experimento quando se utilizou seis horas após a administração, não obteve bons resultados ao administrar o extrato concomitante obtendo comportamento semelhantes aos animais não tratados. O que não ocorreu ao se utilizar o EHVG que apresentou resposta mais efetiva quando administrado concomitantemente a infecção.

Assim, percebe-se que o estudo *in vivo* necessita de mais investigação, inclusive utilizar a forma associada (*checkerboard*), como realizado na avaliação *in vitro*, a fim de que se possa obter outros parâmetros não somente do tempo administrado, mas da via utilizada.

5 CONCLUSÃO

V. guianensis apresentou ação antifúngica, pois inibiu o crescimento de três linhagens, inclusive isolado resistente de *Candida albicans*, além de controlar fatores de virulência como, a redução da formação de biofilme, inibição do dimorfismo nas diferentes concentrações, considerando esse último fator importante no processo de invasão desse microrganismo. Observou-se, também, a ação sinérgica e melhoramento da ação do fármaco sobre a linhagem resistente juntamente com o EHVG. Essas atividades associadas sugerem que possivelmente, a sobrevida observada na sepse experimental letal nos animais tratados com o extrato quer seja concomitante ou após infecção podem ter sido favorecida.

Agradecimentos

A FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico), ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFMA e ao Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos.

Financiamento

FAPEMA

REFERENCIAS

1. ALVES PCS. Ação anti-fúngica e imunomoduladora de *Punica granatum* L. Assegura a sobrevida na sepse por *Candida albicans*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão: São Luis, 2018. 80p.
2. ALVES PM, QUEIROZ LMG, PEREIRA JV, PEREIRA MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009; 42 (2): 222-224.
3. ASHMAN RB, FARAH CS, WANASAENGSAKUL S, HU Y, PANG G, CLANCY RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. Immunol Cell Biol. 2004 Apr; 82 (2):196-204. doi: 10.1046/j.0818-9641.2004.01217.x
4. BARBOSA JP. Atividade anti-Candida de óleos essenciais de espécies de Eucalyptus. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas: São Paulo, 2018. 73p.
5. BASSETTI M, RIGHI E, MONTRAVERS P AND CORNELLY OA. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. J Antimicrob Chemother 2018; 73 Suppl 1: i14–i25. doi:10.1093/jac/dkx445.
6. BONI GC. Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados isolados de diferentes espécies de *Mentha*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas: São Paulo, 2016. 66p.
7. BRANCO PVGC, ANJOS DCV, NASCIMENTO FB, VALE INF, AZEVEDO CMPS, MONTEIRO SG, FIGUEIREDO PMS, MONTEIRO CA. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com aids e indivíduos hígidos. Revista de Patologia Tropical, out.-dez, 2012; 41(4): 427-441.
8. CAMELO SRP, COSTA RS, RIBEIRO-COSTA RM, BARBOSA WLR, VASCONCELOS F, VIEIRA JM dos S, SILVA JUNIOR JOC. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. UPSR 2011; 2 (12): 224-3229.
9. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
10. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CSLI). 2010. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2. CLSI, Wayne, PA, USA.
11. DARTEVELLE P, EHLINGER C, ZAET A, BOEHLER C, RABINEAU M, WESTERMANN B, CIANFÉRANI JS, YOUSSEF SH, METZ-BOUTIGUE MH, MARBAN C. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. Scientific Reports 2018; 8, Article number: 9235. doi:10.1038/s41598-018-27417-x
12. DAS SK, SAMANTARAY D, PATRA JK, SAMANTA L, THATOI H. Antidiabetic potential of mangrove plants: a review. Frontiers in Life Science 2016; 9 (1):75–88.
13. DAVOOD A, IMAN M. Molecular docking and QSAR study on imidazole derivatives as 14-demethylase inhibitors. Turk J Chem. (2013) 37: 119 – 133. doi:10.3906/kim-1204-8.

14. DELALOYE J and CALANDRA T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* January 1, 2014; 51: 161–169.
15. DONG, J., RUAN, J., XU, N., YANG, Y., AND AI, X. (2015). In vitro synergistic effects of fisetin and norfloxacin against aquatic isolates of *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 363:fnv220. doi: 10.1093/femsle/fnv220
16. DORNAS WC, OLIVEIRA TT, RODRIGUES-DAS-DORES RG, SANTOS AF, NAGEM TJ. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009; 19 (2^a):488-500.
17. ENDO EH, CORTEZ DAG, UEDA-NAKAMURA T, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology.* 2010, 161(7): 534-540.FERREIRA EO, MENDES INV, MONTEIRO SG, CROSARA KTB, SIQUEIRA WL, DE MARIA PEDROSO SILVA DE AZEVEDO CONCEIÇÃO, MOFFA EB, DE ANDRADE MONTEIRO C, Virulence properties and sensitivity profile of *Candida parapsilosis* complex species and *Kodamaea ohmeri* isolates from onychomycosis of HIV/AIDS patients, *Microbial Pathogenesis* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.012>.
18. GULATI M, LOHSE MB, ENNIS CL, GONZALEZ RE, PERRY AM, BAPAT P, VALLE AREVALO A, RODRIGUEZ DL, ; NOBILE CJ. (2018). In vitro culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, e60. doi: 10.1002/cpmc.60.
19. GUPTA M. et al. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L . seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. v. 72, p. 151–156, 2000.
20. GUZMANA JA, TCHOKONTEB R, SOBELC JD. Septic Shock Due to Candidemia: Outcomes and Predictors of Shock Development. *J Clin Med Res*, 2011;3(2):65-71
21. HAN, B., CHEN, J., YU, Y. Q., CAO, Y. B., AND JIANG, Y. Y. (2016). Antifungal activity of *Rubus chingii* extract combined with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* 60, 82–92. doi: 10.1111/1348- 0421.12357.
22. IWAZAKI RS, ENDO EH, UEDA-NAKAMURA T, NAKAMURA CV, GARCIA LB, DIAS FILHO BP. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. *Antonie van Leeuwenhoek* (2010) 97:201–205 DOI 10.1007/s10482-009-9394-8.
23. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – Tratado de Micologia médica; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilus. ISBN 85-7378-123-8.
24. LOHSE MB, GULATI M, VALLE AREVALO A, FISHBURN A, JOHNSON AD, NOBILE CJ. 2017. Assessment and optimizations of *Candida albicans* in vitro biofilm assays. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e02749-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02749-16>.
25. LOHSE MB, GULATI M, JOHNSON AD, NOBILE CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms 2018; 16:19–31.
26. MARDEGAN RC, FOGLIO MA, GONÇALVES RB, HÖFLING JF. *Candida albicans* proteinases. *Braz J Oral Sci* 2006; 5(16):944-952.
27. MATSUMOTO E, BOYKEN L, TENDOLKAR S, MCDANEL J, CASTANHEIRA M, PFALLER M, DIEKEMA D. Candidemia surveillance in Iowa: emergence of echinocandin resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Jun;79(2):205-8. doi: 10.1016/.

28. MUTHAMIL S, BALASUBRAMANIAM B, BALAMURUGAN K AND PANDIAN SK (2018) Synergistic Effect of Quinic Acid Derived From *Syzygium cumini* and Undecanoic Acid Against *Candida* spp. Biofilm and Virulence. *Front. Microbiol.* 9:2835. doi: 10.3389/fmicb.2018.02835.
29. NUCCI M, QUEIROZ-TELLES F, TOBÓN AM, RESTREPO A, COLOMBO AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 1;51(5):561-70. doi: 10.1086/655683.
30. ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 1. DOI: 10.1093/jac/dkg301.
31. OLIVEIRA AH. Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd). Irwin; Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2009.
32. QUENOT JP, BINQUET C, KARA F, MARTINET O, GANSTER F, NAVELLOU JC, CASTELAIN V, BARRAUD D, COUSSON J, LOUIS G, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* 2013; 17: R65; PMID:23561510; <http://dx.doi.org/10.1186/cc12598>.
33. REIS CB, DAMASCENO AA. Potencial antimicrobiano *in vitro* dos metabólitos produzidos pela *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy, frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade do Estado do Amazonas (Amazonas), 2017.
34. RODRIGUES IC. Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. com atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM) 2013.
35. ROSCETTO E, CONTURSI P, VOLLARO A, FUSCO S, NOTOMISTA E, CATANIA MR. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from the archaeal protein against *Candida* spp. Clinical isolates. *Scientific Reports* 2018; 8:1-11.
36. SANTOS, GCO, VASCONCELOS, CC, LOPES, AJOL, CARTÁGENES, MSS, FILHO AKBD, NASCIMENTO, FRF, ROCHA, FMG, MONTEIRO, CA. *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers Microbiology.* 2018, July: 9 (1351). Doi:10.3389/fmicb.2018.01351.
37. SARDI JC, DUQUE C, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol.* 2012 Jul;50(5):467-75. doi: 10.3109/13693786.2011.633233.
38. SELEEM D, BENSO B, NOGUTI J, PARDI V, MURATA RM. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of Lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *Plos One*, June 2016;10.
39. SEO, E.K., MUKHERJEE, R., WANI, M.C., WALL, M.E., NAVARRO, H., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D. 2000. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry*,55:35-42.

40. SHARMA Y, KHAN LA, MANZOOR N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *Journal de Mycologie Médicale*, September 2016; 26 (3): 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.04.004>.
41. SHARMA Y, RASTOGI SK, PERWEZ A, RIZVI MA, MANZOOR N. β -citronellol alters cell surface properties of *Candida albicans* to influence pathogenicity related traits. *Medical Mycology*, 2019, 0, 1–14.
42. SIDDIQUI, Z.N., FAROOQ, F., MUSTHAFI, T.N.M., AHMAD, A., KHAN, A.U. 2013. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17:237-243.
43. SOUZA MSR. Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Dissertação de Mestrado (UFPB/CCS), João Pessoa, 94p. 2014.
44. TSANG PW-K, BANDARA HMHN, FONG W-P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PloS One*. 2012;7(11).

4.4 Capítulo 4

PATENTE



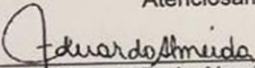
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do estudo realizado com o extrato hidroalcoólico das folhas *Vismia guianensis*, considera-se que o EHVG:

- ✓ Possui constituintes químicos importantes e presentes no extrato que atuam de forma conjunta como um fitocomplexo;
- ✓ Apresentou constituintes químicos capazes de inibir uma importante enzima para o desenvolvimento de *Candida albicans* por meio de uma simulação molecular;
- ✓ Foi capaz de apresentar atividade anti-*Candida* diante de linhagens padrão e isolados clínicos;
- ✓ Apresentou sinergismo positivo ao se realizar a combinação/associação com dois antifúngicos utilizados na terapêutica tradicional;
- ✓ Reduziu a concentração inibitória mínima quando combinada com os antifúngicos testados, podendo prever uma redução dos efeitos adversos desses fármacos;
- ✓ Foi capaz de melhorar a atividade anti-*Candida* em um isolado clínico resistente ao Fluconazol com o efeito de combinação;
- ✓ Interferiu na secreção das enzimas proteolíticas reduzindo a ação desses fatores de virulência;
- ✓ Interferiu no processo de dimorfismo de *Candida albicans*;
- ✓ Apresentou uma taxa de sobrevivência elevada, bem como a expectativa de vida dos animais induzidos com sepse letal de *Candida*;
- ✓ Apresenta-se como uma espécie vegetal promissora na bioprospecção de novos antifúngicos, em especial de interesse farmacológico com ação anti-*Candida*.

ANEXOS

ANEXO A – Certificação de depósito e registro da exciscata no Herbário do Maranhão da Universidade Federal do Maranhão.

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO <small>Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.</small> DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS</p> |  | |
| <p>HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR</p> | | | |
| <p>São Luís, 09 de janeiro de 2019</p> | | | |
| <p><u>CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO</u></p> | | | |
| <p>Segue abaixo a confirmação da identificação solicitada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.</p> | | | |
| <p>Nº tombo MAR 11.078</p> | <p>Coletor (número) MOTA, E.A.P. (01)</p> | <p>Família Hypericaceae</p> | <p>Espécie <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy</p> |
| <p>Atenciosamente,</p> | | | |
| <p> Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr. Curador do Herbário MAR</p> | | | |
| <p><small>Campus Universitário do Bacanga – Departamento de Biologia - Av. dos Portugueses, 1966 - São Luís-MA - CEP: 65080-805 - Fone (98) 3272-8000 Fax (98) 3272-8516 - Site: www.ufma.br</small></p> | | | |

ANEXO B – Comprovante de cadastro de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AFE7A08

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Número do cadastro: | AFE7A08 |
| Usuário: | UFMA |
| CPF/CNPJ: | 06.279.103/0001-19 |
| Objeto do Acesso: | Patrimônio Genético |
| Finalidade do Acesso: | Pesquisa |

Espécie

Vismia guianensis

Título da Atividade: **Estudo Químico e Biofarmacológico de Vismia guianensis**

Equipe

| | |
|--|---|
| Cláudia Quintino da Rocha | UFMA |
| Rosane Nassar Meireles Guerra | Universidade Federal do Maranhão |
| Elizângela Araujo Pestana Motta | Universidade Federal do Maranhão |

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Data do Cadastro: | 03/07/2019 09:05:28 |
| Situação do Cadastro: | Concluído |



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:07** de **03/07/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Bioprospecção de espécies vegetais com atividade anti-diabetes: ação sobre a inibição enzimática, a glicemia e a produção de insulina**” registrada com o nº **23115.009717/2015-10**, sob a responsabilidade de **Rosane Nassar Meireles Guerra**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 21/11/2016.

| FINALIDADE | ()Ensino (X)Pesquisa () Extensão |
|-------------------------|---|
| Vigência da autorização | 01/11/2015 à 30/10/2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Swiss, NOD, Balb/c, C57B1/6 |
| Nº de animais | 600 (150 Swiss, 150 NOD, 150 Balb/c, 150 C57B1/6) |
| Peso/Idade | 150-250g / 2-6 meses |
| Sexo | Machos e fêmeas |
| Origem | 150 Swiss -Biotério Central da UFMA e 450- CEMIB/UNICAMP - SP |

Lucilene Amorim Silva

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO D – Artigo publicado Revista Ceuma Perspectives, ano 2017.



Revista Ceuma Perspectives, vol. 30, 2017.
ISSN Eletrônico: 2525-5576

ESTUDO DO CONSUMO DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDAS EM FEIRAS LIVRES DE SÃO LUÍS, PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS.

STUDY OF THE CONSUMPTION OF MEDICINAL PLANTS OBTAINED IN FREE FAIRS OF SÃO LUÍS, FOR THE TREATMENT OF CHRONIC DISEASES.

Wellison Amorim Pereira¹; Nágila Layane Rabelo Cutrim²; Tatiane Santos Reis³;
Patrícia Heleny Pereira de Almeida⁴; Elizangela Araújo Pestana Motta⁵.

RESUMO: As doenças crônicas se estabelecem como um problema de saúde pública internacional, em especial no Brasil. Plantas medicinais têm sido largamente usadas para tratar tais doenças, porém, sem os devidos cuidados, seu uso pode causar intoxicação e até a morte. Trata-se de um estudo de campo, descritivo e quantitativo, que objetivou investigar, listar e realizar a identificação botânica das plantas medicinais mais utilizadas pelos moradores de São Luís, para o tratamento da Hipertensão, Diabetes, Asma e Obesidade. Os dados das indicações foram obtidos após visitas às principais feiras da cidade de São Luís. Após o levantamento das sete plantas mais indicadas para cada patologia, as mesmas foram compradas e armazenadas na forma de exsiccatas para sua póstuma identificação botânica, para saber se estas correspondiam ao que era comercializado pelos feirantes. Observou-se que apenas a parte que a qual era atribuída à ação farmacológica, era vendida, fator que impossibilitou a identificação botânica, levantando à discussão sobre os perigos da venda destes produtos. Foi feita ampla busca em periódicos científicos com os nomes populares das plantas informadas pelos feirantes, com o intuito de verificar sua eficácia no tratamento das doenças, sendo verificado que todas elas apresentavam eficácia comprovada. O presente estudo proveu maiores informações sobre os hábitos de consumo de plantas medicinais dos moradores de São Luís, assim como seus riscos e benefícios.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas Medicinais; Doenças Crônicas; Fitoterapia.

¹ Biomédico. Mestrando em Biologia Parasitária (Universidade CEUMA/FAPEMA).
E-mail: wellison.amorim@hotmail.com

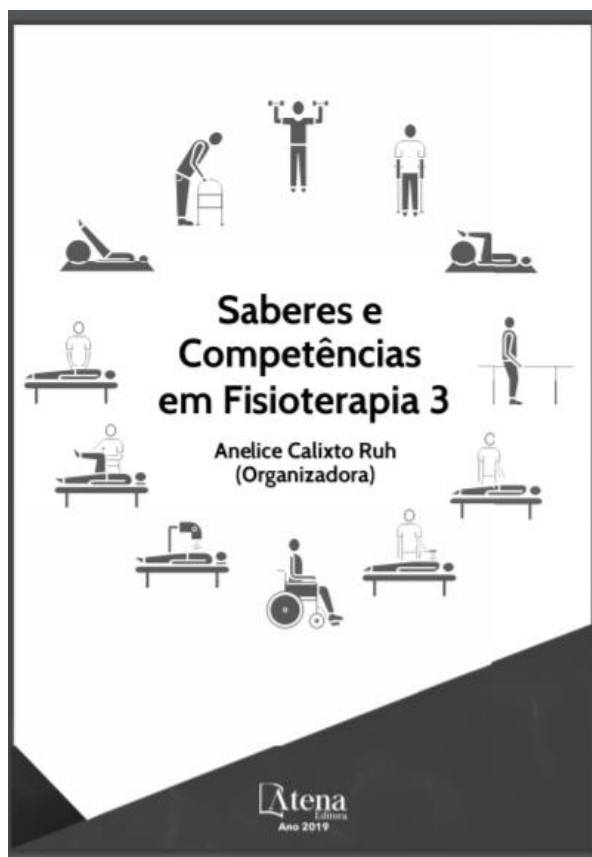
² Biomédica pela Faculdade Estácio de São Luís. E-mail: neutrim@live.com

³ Biomédica pela Faculdade Estácio de São Luís. E-mail: tatiangesantoreis@outlook.com

⁴ Biomédica pela Faculdade Estácio de São Luís. E-mail: patriciaheleny@hotmail.com

⁵ Farmacêutica, Doutoranda em Ciências da Saúde (UFMA); Mestre em Química (UFRN), Docente Faculdade Estácio de São Luís, Membro do CEP da Universidade CEUMA. E-mail: elifarmabr@gmail.com

ANEXO E - Publicação do artigo como capítulo 18 do livro Saberes e Competências pela Editora Atena (ano 2019).




| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 18 | 157 |
| LEVANTAMENTO ETNOFARMACOLÓGICO DAS PLANTAS MEDICINAIS VENDIDAS EM FEIRAS, ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS E MERCADOS, COM FINALIDADES PARA O SISTEMA DIGESTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO REALIZADO NA CIDADE DE SÃO LUÍS – MA | |
| Elizangela Araujo Pestana Motta Silvana Luiza Pires Furtado Rayanne Jordanne Ericeira Cardoso Rose da Costa Dias | |
| DOI 10.22533/at.ed.44019200818 | |
| CAPÍTULO 19 | 168 |
| OS EFEITOS DO HIBISCO (<i>HIBISCOS SABDARIFFA</i>) NO EMAGRECIMENTO | |
| Jersica Martins Bittencourt Eliene da Silva Martins Viana Jessica Tainara de Souza Samara da Silva Souza | |
| DOI 10.22533/at.ed.44019200819 | |
| CAPÍTULO 20 | 172 |
| PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES ATENDIDOS NO SERVIÇO DE FISIOTERAPIA ORTOPÉDICA E TRAUMATOLÓGICA DA CLÍNICA-ESCOLA DE UMA UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA | |
| Eduardo Linden Junior Ione Lourdes Uberti Taize Lorenzet | |
| DOI 10.22533/at.ed.44019200820 | |
| CAPÍTULO 21 | 184 |

ANEXO F – Parecer referentes as linhagens referentes do Artigo 2.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|--|---------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|
| | CENTRO UNIVERSITÁRIO DO MARANHÃO - UNICEUMA | | | | | | | | | | | |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | | | | | | | | | | | |
| DADOS DO PROJETO DE PESQUISA | | | | | | | | | | | | |
| Título da Pesquisa: EFEITO ANTAGONISTA ENTRE <i>Lactobacillus</i> E <i>Candida</i> E INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DE ADESÃO À CÉLULA E FORMAÇÃO DE BIOFILME | | | | | | | | | | | | |
| Pesquisador: Cristina de Andrade Monteiro | | | | | | | | | | | | |
| Área Temática: | | | | | | | | | | | | |
| Versão: 1 | | | | | | | | | | | | |
| CAAE: 36601714.3.0000.5084 | | | | | | | | | | | | |
| Instituição Proponente: Centro Universitário do Maranhão - UniCEUMA | | | | | | | | | | | | |
| Patrocinador Principal: Centro Universitário do Maranhão - UniCEUMA | | | | | | | | | | | | |
| DADOS DO PARECER | | | | | | | | | | | | |
| Número do Parecer: 813.402 | | | | | | | | | | | | |
| Data da Relatoria: 30/09/2014 | | | | | | | | | | | | |
| Apresentação do Projeto: | | | | | | | | | | | | |
| <p>A microbiota vaginal é dominada por bactérias chamadas <i>Lactobacillus</i>. Estas bactérias são adaptadas a este ambiente tendo em vista que são anaeróbicas facultativas ou obrigatórias e acidófilas. Também fazem parte da microbiota normal bactérias como <i>Gardnerella vaginalis</i> e fungos como <i>Candida albicans</i>. Ambos ocorrem frequentemente em indivíduos saudáveis, porém podem causar infecções caso ocorra aumento de suas populações. Sugere-se que estas infecções ocorram quando há um decréscimo na população de <i>Lactobacillus</i>, importante produtor de ácido láctico, ocasionando um aumento do pH vaginal. Aparentemente a manutenção da flora vaginal "normal" e saudável depende de condições que encorajem o crescimento de <i>Lactobacillus</i> e desencorajem a proliferação de <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Candida albicans</i>. Oferecendo suporte a essa observação, temos a terapia com probióticos, onde <i>Lactobacillus</i> são consumidos por via oral ou aplicados diretamente na vagina. O presente trabalho tem como objetivo principal verificar a atividade antifúngica de <i>Lactobacillus</i> contra <i>Candida albicans</i> e sua interferência durante o processo de adesão e formação de biofilme, e determinar a expressão gênica de <i>C. albicans</i> cultivada de forma isolada e co-incubada com <i>Lactobacillus</i> durante a formação de biofilme. As</p> | | | | | | | | | | | | |
| <table border="0"> <tr> <td>Endereço: DOS CASTANHEIROS</td> <td>CEP: 65.075-120</td> </tr> <tr> <td>Bairro: JARDIM RENASCENÇA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: MA</td> <td>Município: SAO LUIS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (98)3214-4265</td> <td>Fax: (98)3214-4212</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: cep@ceuma.br</td> </tr> </table> | | | Endereço: DOS CASTANHEIROS | CEP: 65.075-120 | Bairro: JARDIM RENASCENÇA | | UF: MA | Município: SAO LUIS | Telefone: (98)3214-4265 | Fax: (98)3214-4212 | | E-mail: cep@ceuma.br |
| Endereço: DOS CASTANHEIROS | CEP: 65.075-120 | | | | | | | | | | | |
| Bairro: JARDIM RENASCENÇA | | | | | | | | | | | | |
| UF: MA | Município: SAO LUIS | | | | | | | | | | | |
| Telefone: (98)3214-4265 | Fax: (98)3214-4212 | | | | | | | | | | | |
| | E-mail: cep@ceuma.br | | | | | | | | | | | |
| Página 01 de 04 | | | | | | | | | | | | |

ANEXO G – Parecer Plataforma Brasil sobre amostras clínicas de *Candida albicans* clínicas do artigo 3.

| | | |
|--|--|---|
| <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>UFMA - UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> | | |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | |
| DADOS DO PROJETO DE PESQUISA | | |
| Título da Pesquisa: ATIVIDADE DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Chosy L.CONTRA <i>Candida</i> spp. | | |
| Pesquisador: ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA | | |
| Área Temática: | | |
| Versão: 2 | | |
| CAAE: 29660920.7.0000.5087 | | |
| Instituição Proponente: Universidade Federal do Maranhão | | |
| Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHÃO - FAPEMA | | |
| DADOS DO PARECER | | |
| Número do Parecer: 3.956.307 | | |
| Apresentação do Projeto: | | |
| <p><i>Candida albicans</i> apresenta uma flexibilidade de patogenicidade que é atribuída a vários fatores de virulência, dentre eles a capacidade de formar biofilme e produzir enzimas proteolíticas. <i>Vismia guianensis</i>, planta da região amazônica, tem apresentado interesse contra microorganismos e que possui atividade anti-candida. O objetivo do presente estudo será para explorar o potencial anti-candida diante desses fatores de virulência utilizando linhagem de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) e linhagens clínicas cedidas por um laboratório denominadas de <i>Candida albicans</i> sensível (CAS) e <i>Candida albicans</i> resistente (CAR) ao fluconazol. O potencial anti-candida será avaliado pela realização dos testes de CIM, CFM, curva de crescimento, atuação sobre as exoenzimas secretadas biofilme e inibição de formação de hifas. Será avaliado, também, o efeito do extrato associado aos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol. Como resultados, espera-se ação fungicida do extrato para todas as cepas desse estudo, com o controle do crescimento semelhante aos controles positivos, Fluconazol e Anfotericina B, bem como a redução da formação do biofilme e que a espécie vegetal seja uma promissora alternativa para atividade antifúngica diante das espécies de <i>Candida</i>, quer seja de forma isolada ou associada ao tratamento convencional. Palavra-chave: <i>Candida</i>. <i>Vismia</i>. Tratamento.</p> | | |
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Bairro: Bloco C Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65 080 040</td> </tr> </table> | Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho | Bairro: Bloco C Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65 080 040 |
| Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho | | |
| Bairro: Bloco C Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65 080 040 | | |

ANEXO H – Declaração de aceite do artigo Potencial de inibição enzimática (alfa-amilase e alfa-glicosidase) de plantas com atividade anti-diabetes como capítulo de livro pela Editora Atena.



PONTA GROSSA, 04 de julho de 2020.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

Após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, tenho a honra de informar que o artigo intitulado "POTENCIAL DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA (A-AMILASE E A-GLICOSIDASE) DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-DIABETES" de autoria de "ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Adesão e Preservação do Tratamento de Diabetes Tipo II: A Relação das Pessoas com o Diabetes Tipo II e os Medicamentos" a ser divulgado em novembro de 2019.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editor Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

ANEXO I – Certificado do artigo aceito pela Pathogens (ano, 2020).

