



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**MARIA JANIELLY CASTELO BRANCO SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E MECANISMOS DE AÇÃO DE EXTRATOS DE *Caryocar*  
*coriaceum* Wittm. FRENTE A *Candida* spp.**

**FORTALEZA  
2025**

**MARIA JANIELLY CASTELO BRANCO SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E MECANISMOS DE AÇÃO DE EXTRATOS DE *Caryocar*  
*coriaceum* Wittm. FRENTE A *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

**FORTALEZA**

**2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S589c Silveira, Maria Janielly Castelo Branco.

Caracterização química e avaliação in vitro da atividade antifúngica e mecanismos de ação de extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. frente a *Candida* spp. / Maria Janielly Castelo Branco Silveira. – 2025.  
94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.  
Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

1. Caryocar. 2. Candida. 3. Espécies Reativas de Oxigênio. I. Título.

CDD 616.9

---

**MARIA JANIELLY CASTELO BRANCO SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *Caryocar coriaceum* Wittm. FRENTE A *Candida*  
spp. E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 14/02/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

---

Prof. Dr. Iri Sandro Pampolha Lima  
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

A Deus.

Aos meus pais, Luisa e Paulo.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, por seu amor incondicional e pelos recursos concedidos. Por ser minha base, por me dar saúde, coragem e por permitir que eu sonhasse e realizasse além do que imaginei.

Aos meus pais, Luisa Castelo Branco e Paulo Silveira, que trabalharam incansavelmente e se dedicaram para me oferecer as melhores condições possíveis.

Aos meus irmãos, Heloísa Hellen e Paulo Castelo Branco, por estarem ao meu lado em todos os momentos da vida.

Às minhas avós, Imaculada Lima e Raimunda Silveira, por me mostrarem o lado doce da vida.

Aos meus tios, Josué e Mirian, que sempre sonharam comigo e acreditaram que tudo era possível.

À Levy e Samuel, por trazerem alegria para nossas vidas.

À Nina, que se manteve ao meu lado em todas as madrugadas de estudo.

Ao professor Hélio Vitoriano, pela confiança, orientação e a oportunidade honrosa de fazer parte desse grupo de pesquisa.

Às professoras Cecília Rocha e Lívia Gurgel, pelas longas conversas e disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. João Batista, que primeiro confiou e acreditou em mim.

À Ma. Vitória Farias e Me. Daniel Sampaio, a quem devo toda minha gratidão por tudo que me ensinaram, aconselharam e por me mostrarem o caminho.

Às Ma. Érica Rayanne, Lara Moreira e Tatiana Paiva, pelo companheirismo durante essa longa caminhada na vida acadêmica.

Aos membros do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, que tanto contribuíram nessa jornada, especialmente Ma. Thais Lima e Leilson Carvalho.

À Sarah Sousa e Lavínia Cavalcante, por permanecerem ao meu lado.

À Karla, cujo apoio constante trouxe força e conforto nos momentos mais desafiadores.

Aos membros do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial Dr. Max Barbosa, Dra. Daniela Alves e Dra. Selene Maia, por tornarem possível a realização desse projeto e fornecerem apoio metodológico.

Ao Prof. Dr. Bruno Coêlho, pelas contribuições metodológicas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de tempo e contribuições apresentadas.

À CAPES, pelo apoio financeiro e pela manutenção da bolsa de auxílio.

“Se eu vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.” (Sir Isaac Newton).

## RESUMO

Espécies de *Candida* spp. são classificadas como patógenos fúngicos prioritários devido a resistência fúngica, número de óbitos, tratamento, acesso ao diagnóstico, incidência anual, complicações e sequelas da infecção. O potencial antimicrobiano de *Caryocar coriaceum*, conhecido como pequi, vêm sendo avaliado, contudo, muitos trabalhos se limitam a verificar apenas a atividade antimicrobiana, sem compreender as interações envolvidas no processo, resultando em mecanismos de ação inexplorados. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a composição química e avaliar a atividade de três extratos de *C. coriaceum* Wittm. frente a *Candida* spp. tanto em sua forma planctônica como em biofilme, bem como analisar os possíveis mecanismos de ação envolvidos. As folhas do pequizeiro foram coletadas no Campus da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil. Foram produzidos três extratos, sendo eles: o extrato acetato das folhas de pequi (EAFP), extrato metanólico das folhas de pequi (EMFP) e extrato etanólico das folhas de pequi (EEFP). A composição foi analisada por *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Para análise microbiológica foram utilizadas sete cepas de *Candida* spp. O teste de sensibilidade antifúngico foi realizado conforme a norma M27-A3 do *Clinical And Laboratory Standards Institute*. Os extratos foram associados aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B (AMB) pelo método de *checkerboard*. A avaliação do mecanismo de ação foi realizada por citometria de fluxo e eletroforese. A atividade dos extratos sobre biofilmes maduros de *C. albicans* foi analisada em placas de 96 poços. Linfócitos humanos foram utilizados para avaliar da citotoxicidade dos extratos. Os extratos foliares revelaram atividade antifúngica frente a *Candida* spp., com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 0,5 e 512 µg/mL, mas efeito limitado sobre biofilmes. A caracterização por HPLC revelou a presença de ácido gálico, ácido elágico, rutina e queracetina, apontados como responsáveis pela atividade antifúngica. A análise do mecanismo de ação indicou a produção de espécies reativas de oxigênio, despolarização mitocondrial, dano ao DNA e redução da densidade celular provocada pelo processo apoptótico desencadeado. Os extratos demonstraram baixa citotoxicidade em relação à viabilidade de linfócitos humanos. Além disso, houve sinergismo quando os extratos foram combinados com anfotericina B, revelando uma associação em potencial contra infecções por *Candida*. Nos casos onde houve sinergismo, em comparação ao tratamento com os ativos sozinhos, a interação entre EAFP e AMB resultou em uma diminuição de quatro a 16 vezes na CIM, enquanto as combinações de EMFP e EEFP com AMB reduziram a CIM em aproximadamente quatro vezes.

**Palavras-chave:** *Caryocar*. *Candida*. Espécies Reativas de Oxigênio.

## ABSTRACT

Species of *Candida* spp. are classified as priority fungal pathogens due to fungal resistance, mortality rates, treatment challenges, access to diagnosis, annual incidence, complications, and sequelae from infections. The antimicrobial potential of *Caryocar coriaceum*, known as pequi, has been evaluated. However, many studies are limited to verifying only antimicrobial activity, without understanding the interactions involved in the process, resulting in unexplored mechanisms of action. Thus, the aim of this study was to analyze the chemical composition and evaluate the activity of three extracts of *C. coriaceum* Wittm. against *Candida* spp. in both its planktonic and biofilm forms, as well as to analyze the possible mechanisms of action involved. The leaves of the pequi tree were collected on the campus of Ceará State University, Fortaleza, Brazil. Three extracts were produced: the pequi leaf acetate extract (EAFP), pequi leaf methanol extract (EMFP), and pequi leaf ethanol extract (EEFP). The composition was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Seven strains of *Candida* spp. were used for microbiological analysis. The antifungal sensitivity test was performed according to the M27-A3 standard of the Clinical and Laboratory Standards Institute. The extracts were combined with the antifungals fluconazole, itraconazole, and amphotericin B (AMB) using the checkerboard method. The mechanism of action evaluation was performed by flow cytometry and electrophoresis. The activity of the extracts on mature *C. albicans* biofilms was analyzed in 96-well plates. Human lymphocytes were used to assess the cytotoxicity of the extracts. The leaf extracts revealed antifungal activity against *Candida* spp., with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.5 to 512 µg/mL, although with limited effect on biofilms. High-performance liquid chromatography characterization revealed the presence of gallic acid, ellagic acid, rutin, and quercetin, which were identified as responsible for the antifungal activity. Analysis of the mechanism of action indicated the production of reactive oxygen species, mitochondrial depolarization, DNA damage, and reduced cell density caused by the apoptotic process triggered. The extracts had low cytotoxicity with respect to human lymphocyte viability. Furthermore, synergism was observed when the extracts were combined with amphotericin B, revealing a potentially synergistic association against *Candida* infections. In cases where synergism occurred, compared to treatment with the actives alone, the interaction between EAFP and AMB resulted in a four to sixteen-fold decrease in the MIC, while the combinations of EMFP and EEFP with AMB reduced the MIC by approximately four-fold.

**Keywords:** *Caryocar*. *Candida*. Reactive Oxygen Species.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Principais doenças de animais e humanos causadas por <i>Candida</i> spp. ....   | 19 |
| Figura 2: Representação da estrutura da parede celular da <i>Candida albicans</i> . ....  | 20 |
| Figura 3: Sítios de comensalismo e patogenicidade de <i>Candida albicans</i> . ....   | 22 |
| Figura 4: Invasão tecidual por <i>Candida albicans</i> . ....   | 23 |
| Figura 5: Distribuição global das espécies de <i>Candida</i> spp. ....  | 25 |
| Figura 6: Estágios de formação do biofilme em <i>Candida albicans</i> . ....  | 30 |
| Figura 7: Representação das estruturas químicas dos antifúngicos.....   | 32 |
| Figura 8: Mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos.....   | 35 |
| Figura 9: Representação esquemática metodológica.....   | 43 |
| Figura 10: Padrões de referência para caracterização de compostos químicos.....   | 52 |
| Figura 11: Representação gráfica dos perfis de HPLC dos extratos EAFP, EMFP e EEFP. ....  | 53 |
| Figura 12: Representação gráfica da estrutura química dos elementos encontrados nos<br>extratos. ....   | 54 |
| Figura 13: Análise do estímulo do pequi na produção de espécies reativas de oxigênio por <i>C.</i><br><i>albicans</i> .....                       | 61 |
| Figura 14: Avaliação dos efeitos dos extratos de pequi na viabilidade e indução de apoptose<br>em <i>C. albicans</i> . ....                       | 63 |
| Figura 15: Alterações na membrana mitocondrial de <i>C. albicans</i> induzida por extratos de <i>C.</i><br><i>coriaceum</i> . ....                | 64 |
| Figura 16: Extratos de <i>C. coriaceum</i> associados a AMB causam danos ao DNA de <i>C.</i><br><i>albicans</i> .....                             | 65 |
| Figura 17: Avaliação do efeito dos extratos do pequi sobre viabilidade de biofilme maduro de<br><i>C. albicans</i> . ....                         | 67 |
| Figura 18: Atividade dos extratos do pequi sobre a biomassa de biofilme maduro de <i>C.</i><br><i>albicans</i> .....                              | 68 |
| Figura 19: Possíveis mecanismos associados a atividade antifúngica de extratos de <i>C.</i><br><i>coriaceum</i> frente a <i>C. albicans</i> ..... | 74 |

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Principais fatores de virulência de <i>Candida</i> spp. ....  | 27 |
| Tabela 2: Análise química dos extratos da folha de <i>C. coriaceum</i> Wittm. por HPLC.....                       | 54 |
| Tabela 3: Atividade antifúngica dos extratos de <i>C. coriaceum</i> Wittm. e antifúngicos FLC, ITR<br>e AMB. .... | 56 |
| Tabela 4: Atividade antifúngica do extrato EAfp associado aos antifúngicos FLC, ITR e<br>AMB. ....                | 58 |
| Tabela 5: Atividade antifúngica do extrato EMFP associado aos antifúngicos FLC, ITR e<br>AMB. ....                | 59 |
| Tabela 6: Atividade antifúngica do extrato EEFP associado aos antifúngicos FLC, ITR e<br>AMB. ....                | 60 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |   |
|---------|---|
| 5-FC    | 5-flucitosina   |
| ALS     | <i>Agglutinin-like sequence</i>                           |
| AMB     | Anfotericina B  |
| AMB 0,5 | Anfotericina B 0,5 µg/mL                                  |
| ATCC    | <i>American Type Culture Collection</i>                   |
| ATP     | Adenosina trifosfato                                      |
| CIM     | Concentração Inibitória Mínima                            |
| CLSI    | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>        |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| DMSO    | Dimetilsulfóxido  |
| EAFP    | Extrato acetato das folhas de pequi                       |
| EAP1    | Proteínas de poliestireno                                 |
| MEC     | Matriz extracelular                                       |
| EEFP    | Extrato etanólico das folhas de pequi                     |
| EMFP    | Extrato metanólico das folhas de pequi                    |
| EROS    | Espécies Reativas de Oxigênio                             |
| EPA     | Adesinas epiteliais                                       |
| FLC     | Fluconazol  |
| ICIF    | Índice de Concentração Inibitória Fracionária             |
| HIV     | Vírus da imunodeficiência humana                          |
| HPLC    | <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>             |
| HSPS    | <i>Heat shock proteins</i>                                |
| HWP     | <i>Hyphal wall protein</i>                                |
| IP      | Iodeto de propídeo  |
| ITR     | Itraconazol   |
| LABIMAN | Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas |
| MFS     | Superfamília do facilitador principal                     |
| MTT     | Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio  |
| MOPS    | Ácido morfolinopropanosulfônico                           |
| OMS     | Organização Mundial da Saúde                              |
| PBS     | Solução salina tamponada com fosfato                      |

|      |  |
|------|--|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SAP  | <i>Secreted aspartic proteases</i>     |
| UTI  | Unidade de Terapia Intensiva           |
| YWP  | <i>Yeast wall protein</i>              |

## LISTA DE SÍMBOLOS

- \$ Dólar
- % Porcentagem
- © Copyright
- ® Marca Registrada

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1. Gênero <i>Candida</i> .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.1.1. <i>Candida spp.</i>.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1.2. Infecções causadas por <i>Candida spp.</i>.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.1.3. Epidemiologia das infecções por <i>Candida spp.</i>.....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>2.1.4. Fatores de virulência expressos por <i>Candida spp.</i>.....</b>                            | <b>27</b> |
| <b>2.1.4.1. Biofilmes</b>   | <b>29</b> |
| <b>2.1.5. Antifúngicos disponíveis e mecanismos de resistência .....</b>                              | <b>31</b> |
| <b>2.1.6. Estratégias para o desenvolvimento de novos antifúngicos.....</b>                           | <b>35</b> |
| <b>2.2. Gênero <i>Caryocar</i> .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.2.1. Importância do gênero na comunidade .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.2.2. Atividades biológicas do gênero .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.2.3. Atividade antimicrobiana de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.....</b>                        | <b>39</b> |
| <b>4. OBJETIVOS .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.1 Objetivo geral.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.2 Objetivos específicos.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>5. METODOLOGIA.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>5.1 Microrganismos .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.2 Ativos utilizados.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.2.1 Obtenção dos extratos.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.2.2 Antifúngicos .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.3 Padrões utilizados na caracterização química .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.4 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) com detecção de arranjo de diodos (DAD).....</b> | <b>44</b> |
| <b>5.5 Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia antifúngica dos extratos .....</b>                       | <b>45</b> |
| <b>5.6 Interação farmacológica entre os extratos e agentes antifúngicos .....</b>                     | <b>46</b> |
| <b>5.7 Avaliação do mecanismo de ação .....</b>   | <b>46</b> |
| <b>5.7.1 Detecção de EROS.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>5.7.2 Determinação da viabilidade celular .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>5.7.3 Marcação celular com Anexina V .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>5.7.4 Avaliação do potencial de despolarização da membrana (<math>\Delta\psi_m</math>) .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>5.7.5 Detecção de danos ao DNA .....</b>   | <b>48</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.8 Cultivo e maturação do biofilme de <i>C. albicans</i> para avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos dos extratos de <i>C. coriaceum</i> Wittm.</b> .....          | <b>48</b> |
| <b>5.8.1 Avaliação da viabilidade celular do biofilme.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>5.8.2 Determinação da biomassa do biofilme .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>5.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos sobre linfócitos humanos .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.10 Análise estatística.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>6.1. Caracterização química dos extratos foliares de <i>C. coriaceum</i> Wittm. ....</b>   | <b>51</b> |
| <b>6.2 Extratos do pequi possuem atividade antifúngica contra <i>Candida</i> spp.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>6.3 Interações entre extratos de pequi com antifúngicos frente a <i>Candida</i> spp.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>6.4 Avaliação do mecanismo de ação por citometria de fluxo .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>6.4.1 O tratamento com extratos do pequi estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em <i>C. albicans</i> .....</b>                               | <b>61</b> |
| <b>6.4.2 A exposição a extratos do pequi reduz a viabilidade celular e induz <i>C. albicans</i> à apoptose.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>6.4.3 Modificação do potencial transmembrana mitocondrial (<math>\delta\psi_m</math>) em <i>C. albicans</i> induzida por extratos de <i>C. coriaceum</i> .....</b> | <b>64</b> |
| <b>6.4.4 Extratos de pequi associados à AMB danificam o DNA de <i>C. albicans</i> .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>6.5 Ensaios com biofilmes maduros de <i>C. albicans</i>.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>6.6 Atividade de extratos de <i>C. coriaceum</i> Wittm sobre a viabilidade de linfócitos humanos.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>8. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>75</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>76</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

No mundo todo, aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas são afetadas por infecções fúngicas, sendo *Candida* um dos principais responsáveis por esse cenário (Du *et al.*, 2020a). Espécies de *Candida* spp. residem na microbiota normal do trato gastrointestinal, genital e cavidade oral dos seres humanos como comensais, mas, como microrganismos oportunistas, podem causar infecções durante a depleção do sistema imune do hospedeiro (Murray; Rosenthal; Pfaffer, 2022). A exposição a fatores de risco como antibioticoterapia prévia, procedimentos médicos invasivos, nutrição parenteral, terapias imunossupressoras e imunomoduladoras favorecem a colonização oportunista por esse agente e o desenvolvimento de processos infecciosos (Araujo; Lopes; Cruz, 2020; Medrano *et al.*, 2006; Valdoleiros *et al.*, 2021).

*Candida* pode causar infecções cutâneas, mucosas e sistêmicas. Doenças invasivas por *Candida* spp. correspondem a cerca de 400.000 casos de infecções hematogênicas no mundo todo, sendo a taxa de mortalidade de aproximadamente 40% (Du *et al.*, 2020a). Em mulheres em idade fértil, a incidência de candidíase vulvovaginal é de 75%, com pelo menos um episódio ao longo da vida, 50% com mais de um episódio e 9% com mais de três ocorrências em um ano, nesses casos sendo classificado como infecção recorrente (Brand *et al.*, 2021).

Infecções de repetição, além do elevado custo econômico do tratamento, afetam a qualidade de vida do paciente. Nos Estados Unidos, infecções vulvovaginais atingem cerca de 6,8 milhões de mulheres, gerando um custo oneroso de quase 1,4 milhão em consultas e US \$374 milhões em despesas médicas a cada ano (Benedict *et al.*, 2022).

Para se adaptar e infectar diferentes hospedeiros, essas leveduras apresentam diversos fatores de virulência, como: bomba de efluxo, produção de enzimas, formação de biofilme, expressão de adesinas e invasinas, além da própria morfologia celular (Angioletta *et al.*, 2024; Rocha *et al.*, 2021).

As infecções por patógenos resistentes aos fármacos disponíveis no mercado contribuem para o aumento da morbimortalidade, estendem a duração da permanência hospitalar, limitam as opções terapêuticas, elevam o custo dos cuidados de saúde e aumentam os riscos de toxicidade e desenvolvimento de resistência cruzada (Araujo; Lopes; Cruz, 2020; Rajendran *et al.*, 2016). Projeções indicam que cerca de 10 milhões de mortes anuais poderão ocorrer devido a infecções por organismos multirresistentes. Além disso, estima-se que aproximadamente 24 milhões de pessoas possam ser levadas à extrema pobreza até 2030, com

as espécies emergentes de *Candida* representando um risco potencial (Angioletta *et al.*, 2024; WHO, 2019).

Dessa forma, à medida que a resistência antimicrobiana ameaça cada vez mais a eficácia dos tratamentos, a busca por novas opções terapêuticas ganha importância significativa. Entre essas alternativas, existem os produtos de origem natural. Esses produtos podem ser utilizados em sua forma natural ou sintética (Al-Aboody; Mickymaray, 2020). O reduzido valor econômico, alta disponibilidade e a possibilidade de associá-los a antifúngicos, por exemplo, estão entre as vantagens de seu uso (Al-Aboody; Mickymaray, 2020; Soliman *et al.*, 2017). Inúmeros compostos bioativos encontrados em certas plantas medicinais demonstram várias atividades biológicas, como é o caso das plantas do gênero *Caryocar* spp., popularmente conhecida como pequi (Barroso *et al.*, 2020; Jorge-Junior *et al.*, 2020).

O *Caryocar* spp. é integrante da família *Caryocaraceae*, sendo encontrado em países da América do Sul e Central (Barroso *et al.*, 2020; Jorge-Junior *et al.*, 2020). No Brasil, possui forte importância cultural e econômica, sendo encontrado em diversos biomas, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Barroso *et al.*, 2020). No norte da região Nordeste do país, mais precisamente na Chapada do Araripe, região que compreende parte do território dos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, os frutos de *C. coriaceum* Wittm. são encontrados em abundância, sendo utilizados popularmente para produção de chás, óleos e extratos para tratamento de doenças respiratórias, gripe, febre, queimaduras e indigestão (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022; Arruda; Cruz; Almeida, 2012; Castellucci *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2016).

Seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, cicatrizante e gastroprotetor o torna promissor como opção farmacêutica (Alves *et al.*, 2017; Jorge-Junior *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2009). Estudos estão voltados para a investigação da atividade antimicrobiana do gênero *Caryocar* spp. frente a uma diversidade de microrganismos, como parasitas (Alves *et al.*, 2017; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018), fungos e bactérias (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022; Alves *et al.*, 2017), mas não focam precisamente na elucidação do mecanismo de atividade.

Portanto, este estudo teve como objetivo analisar a composição química e avaliar a atividade de extratos de *C. coriaceum* Wittm. sozinhos e em associação a antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp. tanto em sua forma planctônica como em biofilme, bem como analisar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Candida*

#### 2.1.1. *Candida spp.*

As leveduras do gênero *Candida* foram descritas pela primeira vez por Langenbeck em 1939 (Knoke; Bernhardt, 2006; Zaitz, 2010). *Candida spp.* faz parte do reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* (Giolo; Svidzinski, 2010). *Candida* é um gênero de fungos saprófitas que, com frequência, se reproduzem por brotamento, podendo estar presentes no solo, na água e em alimentos (Giolo; Svidzinski, 2010; Samanta, 2015). Podem se apresentar na forma de levedura e produzir hifas ou pseudo-hifas, dependendo da espécie (Samanta, 2015).

*Candida spp.* tem a capacidade de utilizar carbono e nitrogênio obtidos pela degradação de proteínas e carboidratos (Giolo; Svidzinski, 2010). Esses microrganismos são cultiváveis em meios ágar Sabouraud dextrose, ágar batata dextrose, ágar sangue, ágar infusão cérebro-coração e meios cromogênicos, que auxiliam na identificação das espécies. São microrganismos aeróbios e crescem em ampla faixa de temperatura, suas colônias têm características lisas, brancas, cremosas e de aparência circular (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2022; Samanta, 2015).

Dentre as mais de 200 espécies de *Candida* já identificadas, as seguintes espécies foram relatadas como colonizadoras da microbiota normal dos seres humanos: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krissi*, *C. rugosa*, *C. austromarina*, *C. lusitaniae*, *C. pararugosa*, *C. deformans*, *C. fermentati*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides*, *C. saquê*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lambica*, *C. humilis*, *C. orthopsilosis*, *C. khmerensis*, e *C. humicolus* (Belvoncikova *et al.*, 2022).

Esses fungos fazem parte da microbiota de animais e seres humanos, principalmente em regiões de mucosa, sistema respiratório, trato gastrointestinal e genital (Giolo; Svidzinski, 2010; Lamego, 2022). Espécies de *Candida* estão entre os principais patógenos fúngicos responsáveis por infecções em humanos e animais (Lamego, 2022; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2022). Aves e mamíferos são os principais animais afetados por infecções por *Candida*, onde as manifestações ocorrem no trato digestório, canal auditivo, sistema urinário e epitelial (Lamego, 2022). Em humanos, *Candida* é responsável por infecções orais, esofágicas, vaginais, ungueais, urinárias e sistêmicas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2022; Ritter, 2021). A Figura 1 demonstra algumas doenças causadas por *Candida* em seres humanos e animais.

**Figura 1:** Principais doenças de animais e humanos causadas por *Candida* spp.

| Fungos   | Hospedeiro       | Doença  |
|--|------------------|---|
| <i>Candida albicans</i>  | Aves             | <i>Sapinho (micose do papo)</i> : É observado em galinhas, perus, pintadas. Em casos agudos, as aves podem morrer sem qualquer síndrome. O papo, a boca, o esôfago, o proventrículo e as moelas são comumente afetados. As lesões são placas brancas, úlceras e/ou pseudomembranas aderentes à superfície da mucosa. A mucosa do papo produz a aparência característica de "toalha turca". A doença está associada à coccidiose, superlotação   |
| <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i>     | Gado             | <i>Mastite micótica</i> : Normalmente a prevalência é baixa em rebanhos bovinos (10%) e a infecção é leve e autolimitada por natureza. Ela tem sido associada ao uso de seringas, cânulas e preparações antibióticas contaminadas. Lesões no teto podem atuar como causa predisponente. Ela é transmitida pela pele contaminada do úbere através da mão do ordenhador, máquina de ordenha ou de pisos contaminados, palha, ração, agentes sanitários e outros equipamentos.   |
| <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i>   | Potros, bezerros | Candidíase gastroesofágica e ulceração gástrica   |
| <i>Candida albicans</i>  | Porcos           | Alopecia, lesão cutânea circular coberta de exsudatos, formação de pseudomembrana   |
| <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i>                  | Cães             | Dermatite esfoliativa no focinho, escroto e pés, juntamente com prurido e alopecia, otite externa, infecção do trato genital  |
| <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>  | Cães             | Peritonite canina com inflamação piogranulomatosa acentuada   |
| <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>   | Gatos            | Infecção localizada e disseminada associada à panleucopenia felina e ao vírus da imunodeficiência felina, rinite granulomatosa associada ao uso crônico de medicamentos imunossupressores, enterite   |
| <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> | Humano           | (a) <i>Candidíase invasiva</i> : Está associada à imunossupressão, neutropenia devido a células-tronco ou órgãos sólidos, como transplante de fígado. <i>Candida</i> está entre os patógenos importantes em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva. Causa alta taxa de morbidade e mortalidade sem síndrome específica<br><br>(b) <i>Candidíase oral</i> : Os pacientes que recebem antibióticos de amplo espectro, terapia esteroide ou citotóxica e têm diabetes mellitus, xerostomia, deficiência nutricional e AIDS são suscetíveis à candidíase oral. É caracterizada por manchas brancas na superfície da mucosa oral (sapinho); lesão eritematosa no dorso da língua, palato ou mucosa (ferida bucal antibiótica); formação de leucoplasia (lesão crônica); estomatite induzida por dentadura; glossite; etc. |

**Fonte:** Adaptado de Samanta (2015).

Estudos indicam que há poucas variações genéticas entre espécies de *Candida* que infectam seres humanos e animais. Foi demonstrado que algumas aves atuam como reservatórios intermediários de *C. glabrata* para humanos, e essa relação pode ocorrer com outras espécies de *Candida* (Al-Yasiri *et al.*, 2016; Lamego, 2022; McManus *et al.*, 2009). Além disso, espécies de *Candida* resistentes a antifúngicos já fazem parte da micobiota desses animais. Portanto, é provável que haja uma contribuição de reservatórios animais na disseminação desses patógenos resistentes (Al-Yasiri *et al.*, 2016).

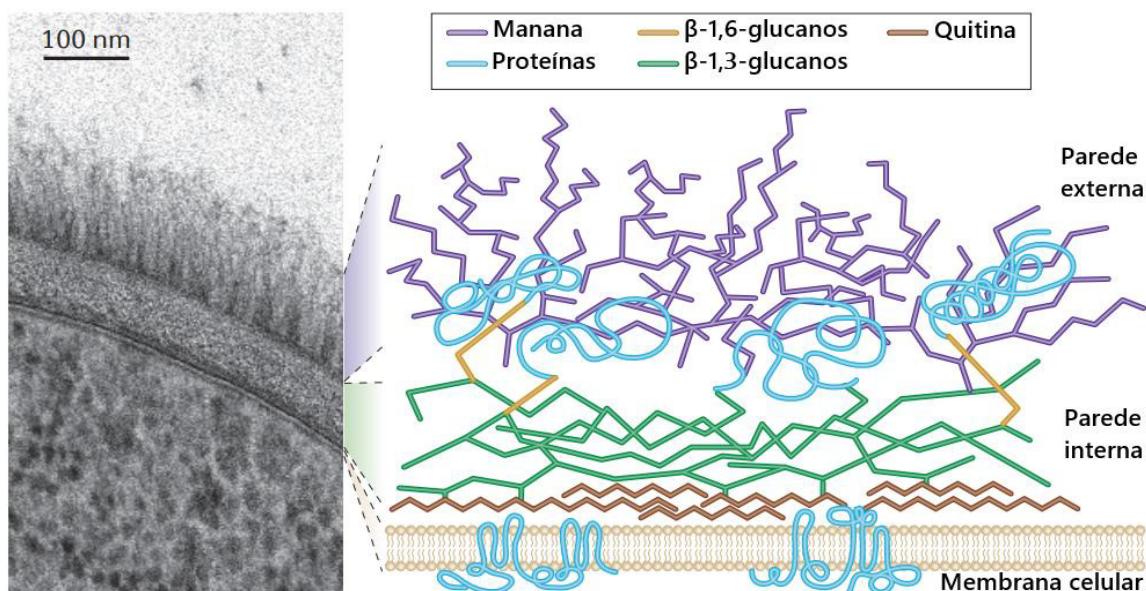
Leveduras também estão presentes no solo, onde os gêneros *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Lipomyces* e *Candida* são os mais frequentes, participando de processos de conversão de matéria orgânica (Frac *et al.*, 2018; Yurkov, 2018). Entretanto, em solos agrícolas, esses fungos estão suscetíveis à pressão seletiva pelo uso de fungicidas azólicos. O resultado disso é o desenvolvimento de resistência a antifúngicos, o que pode levar esses microrganismos a se tornarem um risco para a saúde humana (Dalhoff, 2018; Wachowska; Irzykowski; Jędryczka, 2018).

Como células eucarióticas, a estrutura celular de *Candida* é composta por membrana plasmática, citoplasma, núcleo e outras organelas. Além disso, diferenciando-as de outros organismos eucariontes, as células fúngicas possuem uma parede celular responsável pela rigidez da célula e que participa de eventos celulares de sinalização, adesão e reprodução, bem como na proteção física e osmótica (Nimrichter *et al.*, 2005; Trabulsi; Alterthum, 2015; Zaitz, 2010).

A parede celular de *Candida* é formada principalmente por carboidratos (80-90%) e proteínas (10-20%). Os polissacarídeos estão principalmente na forma de  $\beta$ -glucanas, mananas e quitina, enquanto as proteínas geralmente estão associadas a carboidratos por ligações O ou N, formando glicoproteínas (Garcia-Rubio *et al.*, 2020; Gow; Hube, 2012). A parede celular é um alvo imunológico importante durante as infecções, pois a maioria das proteínas presentes em sua composição são desconhecidas pelo sistema imunológico (Gow *et al.*, 2012).

Algumas espécies de *Candida* podem apresentar-se na forma de levedura ou alterar sua morfologia para a forma de hifa, que possui uma camada maior de quitina em sua parede (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Os glucanos são os polissacarídeos mais abundantes nas células fúngicas, sendo unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3 ou  $\beta$ -1,6. Na parede celular, o esqueleto  $\beta$ -glucano-quitina confere forma e resistência à célula, enquanto mananas encontram-se associadas a proteínas, formando manoproteínas na camada externa, sobrepondo  $\beta$ -glucanas e impedindo a identificação pelo sistema imune (Costa, 2008; Garcia-Rubio *et al.*, 2020) (Figura 2).

**Figura 2:** Representação da estrutura da parede celular da *Candida albicans*.



Fonte: Adaptado de Gow *et al.*, (2012).

A membrana celular é formada por duas camadas de fosfolipídios, contendo proteínas associadas que podem agir como receptores, no transporte ou transdução de sinal. O contato entre o meio intra e extracelular é facilitado por vacúolos e vesículas (Talapko *et al.*, 2021; Trabulsi; Alterthum, 2015; Zaitz, 2010). A superfície da membrana celular possui ergosterol, um esterol que está relacionado a manutenção da estrutura, resistência ao estresse e fluidez. O ergosterol comumente é alvo da ação de antifúngicos, tendo em vista sua importância na homeostase da célula (Loguerio-Leite *et al.*, 2006; Talapko *et al.*, 2021).

No citoplasma, são encontradas diversas organelas que atuam na manutenção do metabolismo energético e síntese de proteínas (Trabulsi; Alterthum, 2015). As mitocôndrias, por exemplo, são responsáveis pela produção de adenosina trifofato (ATP), a molécula energética da célula (Loguerio-Leite *et al.*, 2006). Já o núcleo, envolto por uma dupla membrana, é responsável principalmente por abrigar o material genético (Trabulsi; Alterthum, 2015).

### **2.1.2. Infecções causadas por *Candida* spp.**

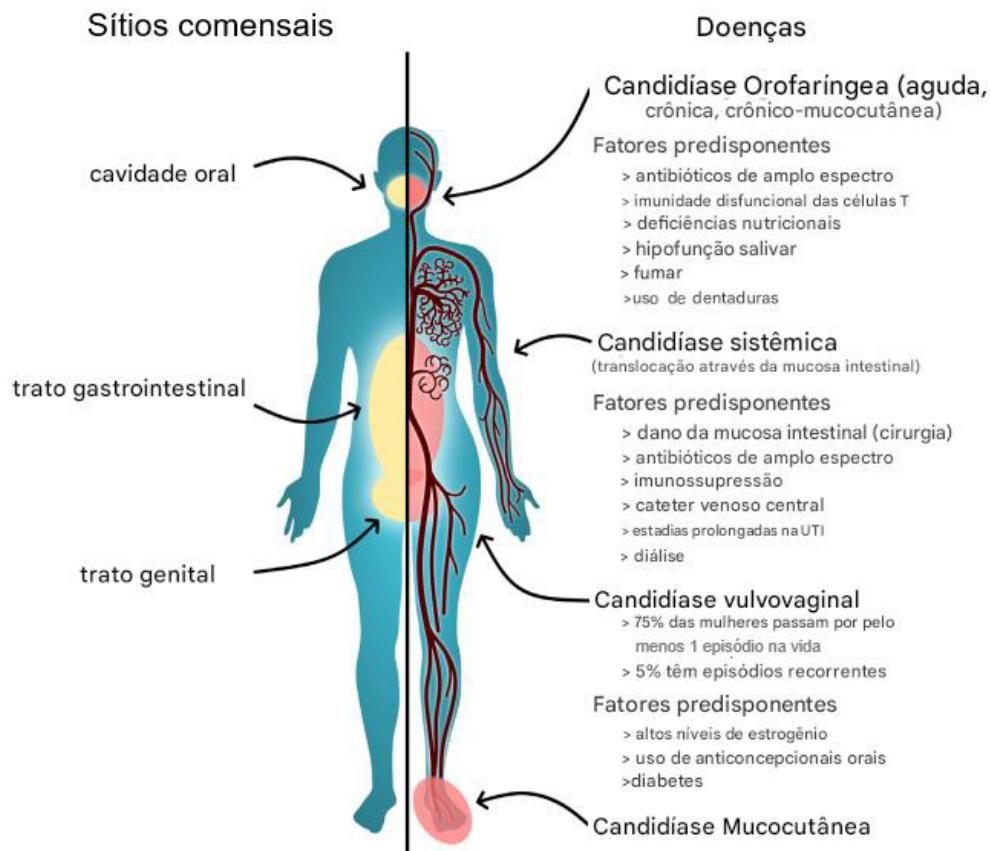
Infecções causadas por fungos são, em sua maioria, crônicas, com diagnósticos difíceis e tratamento que podem demorar meses (Casadevall, 2018). Leveduras do gênero *Candida* são fungos comensais e oportunistas que habitam a microbiota dos seres humanos, colonizando a uretra e os sistemas gastrointestinal, vulvovaginal e respiratório, podendo desencadear um processo infeccioso quando se encontram em um microambiente favorável (Barbedo; Sgarbi, 2010).

A grande adaptabilidade de *Candida* permite a infecção em diversos sítios, causando desde leves lesões nas mucosas até infecções invasivas. Alguns fatores contribuem para essa transição do perfil comensal-patógeno, como a própria imunossupressão, alteração na barreira cutânea, antibioticoterapia prolongada, realização de cirurgias e tempo de permanência em unidades de tratamento, bem como terapias imunomoduladoras, por exemplo (Araujo; Lopes; Cruz, 2020; Valdoleiros *et al.*, 2021; Zaitz, 2010). Dessa forma, grande parte dessas infecções tem origem endógena (Zaitz, 2010).

As manifestações clínicas acontecem de acordo com o sítio de infecção, podendo ocorrer: infecções superficiais, com manifestações cutâneas, orofaríngeas e genitais, e infecções sistêmicas (Whaley *et al.*, 2017). A candidíase mucosa de origem oral ou vaginal costuma acontecer de forma autolimitada, fatores de risco incluem o uso de estrogênio, anticoncepcionais orais e diabetes, mas pode acontecer de forma idiopática em indivíduos

saudáveis (D'Enfert *et al.*, 2021; Zaitz, 2010). Já a candidíase sistêmica pode afetar vários órgãos, como rins, fígado e baço (Barbedo; Sgarbi, 2010; D'Enfert *et al.*, 2021; Zaitz, 2010) (Figura 3).

**Figura 3:** Sítios de comensalismo e patogenicidade de *Candida albicans*.



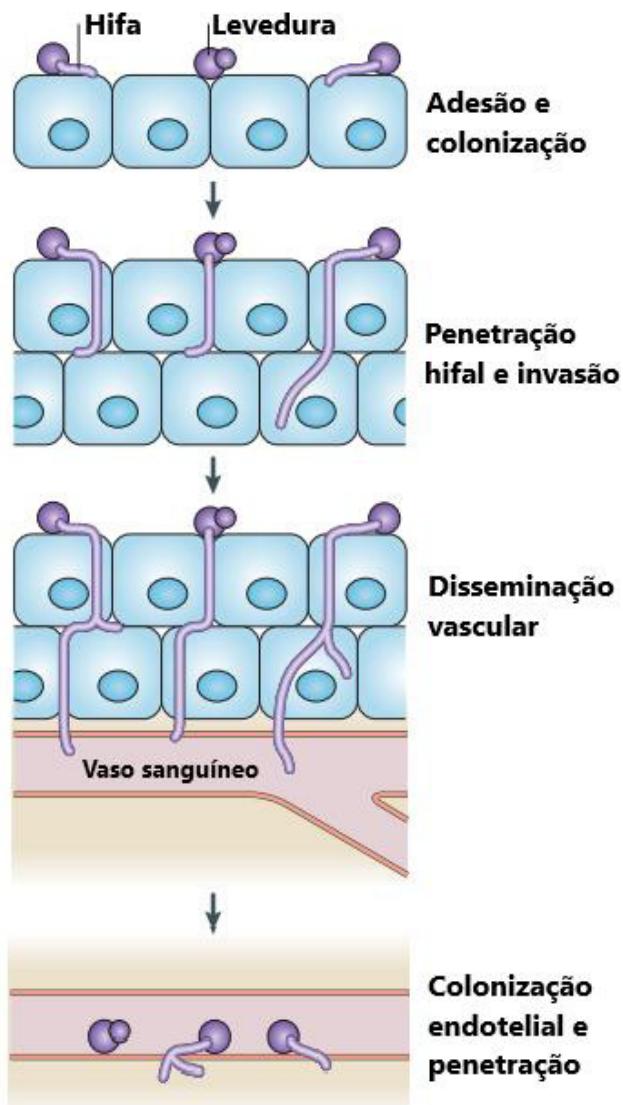
**Fonte:** Adaptado de D'Enfert et al., (2021).

A patogênese acontece geralmente após a colonização tecidual. Alguns fatores contribuem para o crescimento desenfreado de *Candida* no tecido, como uma disbiose local, representada na Figura 4. Em seguida, ocorre a adesão no tecido, com expressão de adesinas e sucessiva formação de hifas, a depender da espécie. Nesse momento, passa a ser estimulada a expressão de genes relacionados à transição morfológica (Mba; Nweze, 2020). Quando se encontra em forma de levedura, *Candida* possui alta capacidade de disseminação, mas é na forma de hifa que há maior facilidade para transpor tecidos (Barbedo; Sgarbi, 2010; Gow *et al.*, 2012).

A produção de enzimas e proteínas citolíticas facilita a invasão, ocasionando injúria tecidual. Espécies que não formam hifas, como *C. glabrata*, desencadeiam processos infecciosos pela formação de biofilmes. Quando há evasão imunológica, *Candida* pode penetrar e se disseminar pela via hematogênica. Uma outra forma de causar infecção sistêmica é por

meio de rotas artificiais, via dispositivos médicos e procedimentos invasivos, por exemplo (Gow; Hube, 2012; Höfs; Mogavero; Hube, 2016; Mba; Nweze, 2020).

**Figura 4:** Invasão tecidual por *Candida albicans*.



**Fonte:** Adaptado de Gow et al., (2012).

### 2.1.3. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp.

O gênero *Candida* engloba cerca de 200 espécies de importância médica, sendo *C. albicans* a mais importante em todo o mundo com ocorrência variando entre 44% a 70% dos casos a depender do local (Ciurea *et al.*, 2020; Garcia-Rubio *et al.*, 2020; Saúde, 2024). Até 1950, *C. albicans* era a única espécie reconhecida como patogênica, porém, após esse período, outras espécies foram descritas como responsáveis por causar infecções em seres humanos, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. auris*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (Nascimento *et al.*, 2024; Saúde, 2024; Zaitz, 2010).

O número de infecções invasivas em unidades de terapia intensiva (UTI) tem aumentado nos últimos anos, em que as espécies de *Candida* estão entre os dez microrganismos mais frequentemente isolados e são responsáveis por aproximadamente 10% das infecções adquiridas em hospitais (Bassetti *et al.*, 2017; Lass-Flörl *et al.*, 2024; Pinho; Miranda; Oliveira, 2024). Por se tratar de um ambiente com elevado número de indivíduos imunocomprometidos, a presença ubíqua de *Candida* facilita sua propagação, tendo em vista seu caráter oportunista (Pinho; Miranda; Oliveira, 2024). Em UTIs, estima-se que o risco de desenvolvimento de infecção por *Candida* é de cinco a 10 vezes maior, inferindo diretamente no tempo de permanência hospitalar, prolongando o sofrimento dos pacientes, além da sobrecarga financeira, demonstrando a necessidade da busca por novos tratamentos para barrar as infecções por cepas resistentes (Nascimento *et al.*, 2024).

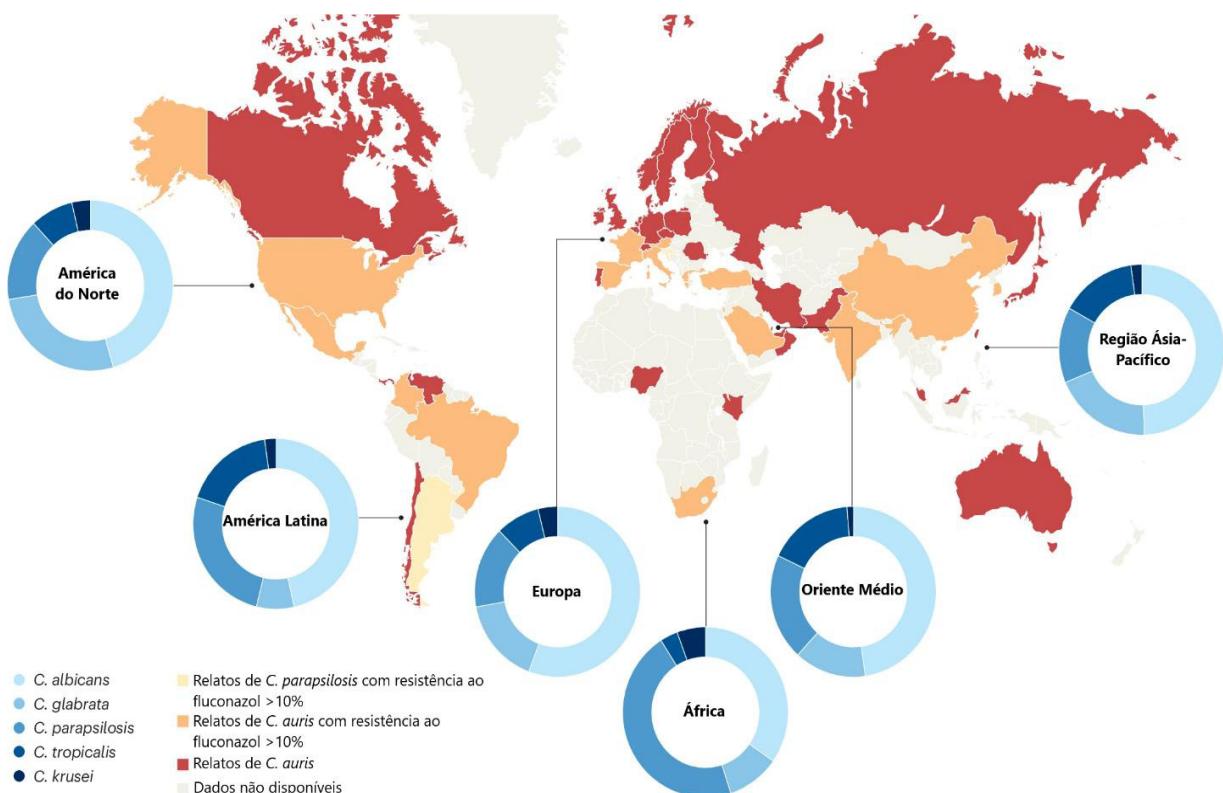
Em 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando critérios como resistência antifúngica, número de óbitos, tratamento, acesso ao diagnóstico, incidência anual, complicações e sequelas da infecção, classificou os patógenos fúngicos prioritários no reforço a vigilância epidemiológica, investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação, bem como intervenções na saúde pública. Dessa forma, as espécies *C. auris* e *C. albicans* foram elencadas como patógenos fúngicos de prioridade crítica, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* como de alto risco e *C. krusei* como médio risco (WHO, 2022).

*C. glabrata* tem sido apontada como responsável por 30% das infecções invasivas por *Candida* nos Estados Unidos, enquanto *C. parapsilosis* representa 15% dos casos (Friedman; Schwartz, 2019). *C. auris* é uma preocupação desde seu primeiro isolamento em 2009, já que se trata de um patógeno com capacidade de adquirir multirresistência, e potencial para causar grandes surtos hospitalares (Friedman; Schwartz, 2019; Lass-Flörl *et al.*, 2024). Na América Latina, as espécies mais comuns são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, onde o aumento das infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* tem se tornado uma preocupação importante devido ao diagnóstico difícil, mudanças epidemiológicas e, principalmente, com o advento da resistência, que é agravada pela terapia empírica e profilática com antifúngicos (Friedman; Schwartz, 2019; Pinho; Miranda; Oliveira, 2024). Adicionalmente, algumas espécies de *Candida*, como *C. krusei* e *C. glabrata*, são naturalmente resistentes ou possuem suscetibilidade reduzida a alguns antifúngicos, o que contribui para o aumento do número de casos associados a essas espécies (Nins, 2023).

A distribuição das espécies está relacionada a fatores como idade da população, renda populacional, terapia e proporção de pacientes com comorbidades, como pacientes oncológicos,

transplantados e vivendo com vírus da imunodeficiência humana (HIV). *C. glabrata*, por exemplo, é mais comum em pacientes idosos, sendo mais frequente em regiões com a população mais idosa e com renda mais alta. *C. parapsilosis* é mais comum em crianças e neonatos, o que representa uma preocupação quanto a origem nosocomial dessas infecções (Lass-Flörl *et al.*, 2024; Pinho; Miranda; Oliveira, 2024). Apesar disso, *C. albicans* ainda é a espécie mais prevalente no mundo todo, sendo responsável por 70-90% dos casos de candidíase vulvovaginal (Macena; Nascimento; Maynard, 2022). Atualmente, a espécie *C. auris* já foi isolada em mais de 40 países e em todos os seis continentes, com taxa de mortalidade entre 30 e 60% (Du *et al.*, 2020b; Friedman; Schwartz, 2019; Pinho; Miranda; Oliveira, 2024). A Figura 5 ilustra a distribuição global das espécies.

**Figura 5:** Distribuição global das espécies de *Candida* spp.



**Fonte:** Adaptado de Lass-Flörl *et al.* (2024).

A tendência de resistência tem sido maior para todas as espécies mais prevalentes de *Candida* citadas anteriormente. O Programa de Vigilância Antifúngica SENTRY coletou informações a respeito da resistência em espécies de *Candida* entre 1997 e 2016 em 39 países. Os resultados demonstraram que as espécies mais frequentemente resistentes ao fluconazol (FLC) eram *C. glabrata* (10,6%) e *C. tropicalis* (9,2%). A resistência a equinocandinas foi de 3,5% para *C. glabrata* e 0,1% para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Quanto à micafungina, a resistência foi mais frequente em isolados de *C. glabrata* (2,8%) e *C. tropicalis* (1,3%) (Pfaller

*et al.*, 2019). Uma revisão sistemática e meta-análise sobre infecções por *C. auris* revelou que o perfil desse microrganismo é de resistência a FLC (91%), anfotericina B (AMB; 12%), caspofungina (12,1%), micafungina (0,8 %) e anidulafungina (1,1%) (Chen *et al.*, 2020).

A incidência de candidemia na América Latina varia entre 0,74–6,0 a cada 1000 admissões hospitalares, com taxa de mortalidade variando entre 30–76% (Alvarez-Moreno *et al.*, 2023), onde no Brasil a taxa de incidência é de 2,49/1000 internações, com mais de 70% dos casos culminando em óbito dos pacientes (Agnelli *et al.*, 2023; Saúde, 2024). Essas taxas estão relacionadas a região geográfica, sistema de saúde, concentração demográfica e fatores ambientais (Lass-Flörl *et al.*, 2024).

Um estudo de coorte realizado em hospitais terciários no Brasil revelou que, no período de 2017-2018, foram relatados 247 casos de candidemia. *C. albicans* foi responsável pela maioria dos casos (40,5%), seguida por *C. parapsilosis* (22,7%), *C. tropicalis* (17%), *C. glabrata* (13%), *C. krusei* (3,2%), *C. guilliermondii* (0,4%) e 3,2% dos casos eram ocasionados por espécies não listadas ou infecções por mais de uma espécie de *Candida*. Esse trabalho mostrou ainda uma taxa de mortalidade de 37,7% em 14 dias e 48,6% em 30 dias após admissão hospitalar (Agnelli *et al.*, 2023).

Um estudo realizado no Nordeste brasileiro identificou a prevalência de infecções por *C. albicans* (35,3%), *C. tropicalis* (27,4%), *C. parapsilosis* (21,6%) e *C. glabrata* (11,8%), associadas a uma taxa de mortalidade de 61,1%, 100% e 27,3% em infecções por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, respectivamente (Medeiros *et al.*, 2019).

No Estado do Ceará, um estudo comparou os isolados de infecções de corrente sanguínea nos períodos pré-pandemia (2018-2019) e pandemia (2020-2021) de COVID-19. Os fungos representavam 30,9% dos isolados analisados, onde as espécies de *Candida* corresponderam a 92,86% destes. No período pré-pandemia, os isolados de *Candida* mais frequentes eram *C. albicans* (38,47%), *C. parapsilosis* (23,08%), *C. tropicalis* (15,38%) e *C. glabrata* (7,69%). Já durante a pandemia, a frequência das espécies foi alterada para *C. tropicalis* (41,38%), *C. albicans* (31,03%), *C. parapsilosis* (13,79%) e 3,45% para *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. orthopsilosis* (Xavier, 2024).

Dessa forma, tendo em vista os dados epidemiológicos de infecções por *Candida* demonstrarem aumento da incidência, bem como o surgimento de novas espécies resistentes, é necessário investir no desenvolvimento de novos tratamentos para conter o avanço dessas infecções.

#### **2.1.4. Fatores de virulência expressos por *Candida* spp.**

A virulência de *Candida* spp. está relacionada às estratégias utilizadas por esses patógenos para driblar os mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro, com a finalidade de se estabelecerem em vários ambientes (Ciurea *et al.*, 2020). Por meio da expressão de fatores de virulência, como adesinas, produção de enzimas, alteração morfológica e formação de biofilme, esses fungos conseguem se adaptar a diferentes ambientes (Chaffin, 2008; Ciurea *et al.*, 2020). Alguns fatores de virulência de *Candida* estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Principais fatores de virulência de *Candida* spp.

| <b>Fator</b>                             | <b>Função</b>  |
|--|--|
| <b>Transição morfológica</b>             | Sobrevivência da célula<br>Resistência a alterações de pH, temperatura, componentes do soro e carência nutricional |
| <b>Formação de biofilme</b>              | Resistência a antifúngicos<br>Resistência ao sistema imune do hospedeiro   |
| <b>Candidalisina</b>                     | Toxina que produz danos a célula do hospedeiro<br>Fuga do sistema imune<br>Auxilia na translocação                 |
| <b>Tigmotropismo</b>                     | Desenvolvimento orientado de hifas através da percepção de contato   |
| <b>Adesinas</b>                          |  |
| <i>Agglutinin-like sequence</i> (ALS)    | Adesão, invasão<br>Promove crescimento de hifas (ALS3)   |
| <i>Hyphal wall protein</i> (HWP)         | Adesão<br>Formação de biofilme<br>Promove crescimento de hifas   |
| <i>Heat shock proteins</i> (HSPS)        | Adesão epitelial<br>Promove crescimento de hifas<br>Resistência a antifúngicos                                     |
| <b>Enzimas</b>                           |  |
| Fosfolipases                             | Dano a célula do hospedeiro<br>Invasão tecidual  |
| Lipases                                  | Adesão, invasão<br>Sequestro de nutrientes   |
| <i>Secreted aspartic proteases</i> (SAP) | Facilitam translocação intestinal<br>Modulação do biofilme<br>Lise de imunoglobulinas e proteínas do complemento   |
| Hemolisinas                              | Hemólise<br>Sequestro de ferro   |
| Catalase e superóxido dismutase          | Proteção contra estresse oxidativo   |

**Fonte:** Autoria própria (2024).

O polimorfismo de algumas espécies de *Candida*, ou seja, a transição morfológica de levedura em brotamento para hifa filamentosa, é importante tanto no comensalismo como no estabelecimento da infecção. *Candida* em forma de levedura pode estar presente em tecidos sem que haja dano ao hospedeiro, diferente da formação da hifa, que está relacionada a condições patológicas (D'Enfert *et al.*, 2021; Höfs; Mogavero; Hube, 2016). Condições não ideais de crescimento estimulam a formação de hifas, como alteração no pH, concentração de nutrientes e microaerofilia, por exemplo. Nesses casos, fatores de transcrição são expressos para estimular a formação de hifas (Höfs; Mogavero; Hube, 2016).

As adesinas produzidas por *Candida* spp. permitem que esses fungos consigam se aderir a diversas superfícies, outros microrganismos e até células do hospedeiro, sendo um fator importante para a formação de biofilmes. Como uma levedura comensal, *Candida* tende a colonizar diversos sítios, onde necessitam produzir adesinas para se fixarem às superfícies e evitarem a remoção (Chaffin, 2008). Diversas são as adesinas produzidas por *Candida*, como a família *agglutinin-like sequence* (ALS), uma família com 8 proteínas expressas na parede celular. ALS3 é o membro mais estudado dessa família, que possui a capacidade de se ligar a diversos tipos de ligantes, podendo atuar como invasina e no sequestro de ferro (D'Enfert *et al.*, 2021). Outros exemplos de adesinas importantes são a família *hyphal wall protein* (HWP), que são expressas durante a formação de hifas; a *yeast wall protein* (YWP), que auxiliam na disseminação em infecções sistêmicas; e as adesinas epiteliais (EPA), que são importantes na infecção por *C. glabrata* (Chaffin, 2008; Ciurea *et al.*, 2020; D'Enfert *et al.*, 2021).

A invasão tecidual pode ser feita por indução da endocitose ou penetração ativa das células do hospedeiro. Além disso, as espécies de *Candida* produzem enzimas hidrolíticas capazes de degradar células do hospedeiro como forma de obter nutrientes e evadir-se do sistema imune, bem como invadir tecidos (Ciurea *et al.*, 2020; Höfs; Mogavero; Hube, 2016). O tigmotropismo de *Candida* funciona como um contato guiado em que as hifas crescem em direção aos sulcos e fendas dos tecidos para realizar penetração ativa (Samanta, 2015).

As *secreted aspartic proteases* (SAP) são apontadas como enzimas importantes no processo de invasão e danos às células do hospedeiro, podendo agir na alteração da integridade epitelial e degradação de proteínas do tecido (Höfs; Mogavero; Hube, 2016). A produção de hemolisinas por *Candida* facilita o sequestro de ferro, o que facilita a sobrevivência do patógeno, principalmente em candidíase sistêmica ou disseminada (Mba; Nweze, 2020). Outros fatores que provocam dano ao hospedeiro é a produção de lipases e fosfolipases, que causam injúria celular (Ciurea *et al.*, 2020). Além disso, *C. albicans* é capaz de produzir também

candidalisina, uma toxina peptídica capaz de causar danos na membrana celular por meio da alteração da permeabilidade e formação de poros, com posterior deterioração do conteúdo citoplasmático (D'Enfert *et al.*, 2021; Talapko *et al.*, 2021).

As respostas do sistema imune às infecções por *Candida* spp. acabam por gerar estresse às células fúngicas. Dessa forma, esses microrganismos precisam responder a esses estímulos para sobreviver ao ataque. *C. albicans* produz enzimas superóxido dismutase em resposta à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelas células imunes, por exemplo. Fatores externos como temperatura, pH, osmolaridade e terapia antimicrobiana também submetem *Candida* ao estresse. As *heat shock proteins* (HSPS) auxiliam o fungo na sobrevivência em ambiente hostil. A HSPS90 é uma chaperona dependente de ATP (adenosina trifosfato) que age estabilizando transdutores de sinal e na modulação de cinases e fosfatase caucinerina (Lee, Y. *et al.*, 2021a; Lopes; Lionakis, 2022).

A capacidade de formar biofilme é uma propriedade importante para a patogênese de *Candida* spp., já que a maioria das infecções acontece pela formação dessas comunidades em superfícies bióticas, como tecidos do hospedeiro, ou abióticas, como cateteres e válvulas cardíacas protéticas (Talapko *et al.*, 2021).

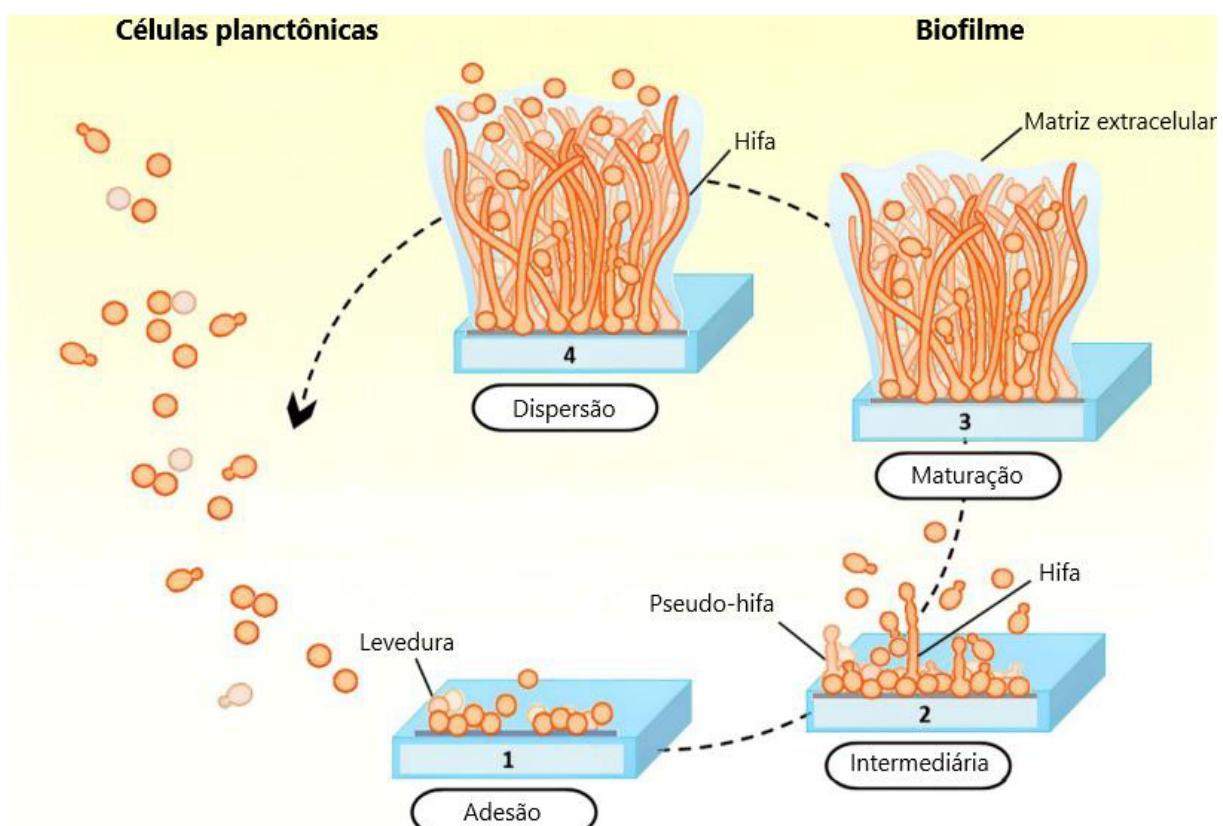
#### 2.1.4.1. Biofilmes

A estrutura tridimensional do biofilme confere proteção contra fagocitose, dificulta a entrada de antifúngicos, além de atuarem na modulação de alvos farmacológicos (Mello *et al.*, 2020). Uma metanálise avaliou a prevalência de biofilmes em infecções sistêmicas por *Candida* spp. em trabalhos publicados entre 1995 e 2020 na Europa, Ásia e América. Nesse período, a taxa de mortalidade por *Candida* spp. foi de 37,9%, com 70% dos casos relacionados a infecções por biofilmes. O estudo demonstrou ainda elevadas taxas de resistência dos biofilmes ao FLC (70,5%), voriconazol (67,9%) e caspofungina (72,8%) (Atiencia-Carrera *et al.*, 2022). Esses dados demonstram a necessidade de explorar novos tratamentos para o combate a essas infecções.

O biofilme de *Candida* spp. passa por algumas fases até a sua maturação final, como demonstrado na Figura 6. A fase inicial começa com a adesão das células a uma superfície, dando origem a camada basal. Em seguida, essas células passam a se proliferar, formando microcolônias, onde podem ser encontradas na forma de leveduras, hifas ou pseudo-hifas, de acordo com a espécie. As células passam então a produzir substâncias poliméricas extracelulares na fase intermediária. A matriz extracelular (MEC) polissacarídica que envolve o biofilme e o protege do ambiente externo é então formada, finalizando a maturação em uma

estrutura tridimensional. Ao final, o biofilme está maduro e as células não aderidas da camada mais externa começam a se desprender, possibilitando a disseminação para outros tecidos (Arafa *et al.*, 2023; Cavalheiro; Teixeira, 2018; Mba; Nweze, 2020; Talapko *et al.*, 2021). Em *C. albicans*, por exemplo, a fase inicial *in vitro* dura aproximadamente 11 horas. A fase intermediária, onde são formadas as substâncias poliméricas, tem duração de 12 a 30 horas, enquanto o processo de maturação é concluído entre 38 e 72 horas (Cavalheiro; Teixeira, 2018).

**Figura 6:** Estágios de formação do biofilme em *Candida albicans*.



**Fonte:** Adaptado de Arafa *et al.*, (2023).

A adesão inicial depende da ação de adesinas ALS, HWP e a família *hyphally upregulated/IPF family F* (HYR/IFF). As *polystyrene protein* (EAP1) são essenciais no processo de adesão de *C. albicans* em superfícies plásticas, como cateteres. O desenvolvimento do biofilme cursa com aumento da biomassa. Nesse ponto, as hifas produzidas por algumas espécies auxiliam na manutenção da estrutura para que outras células possam se fixar. Dessa forma, os biofilmes de *C. glabrata* tendem a desenvolver uma biomassa menos substancial. A MEC é composta por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, e sua importância está, principalmente, na tolerância ao tratamento com antifúngicos e proteção contra o sistema

imune. A etapa da dispersão é influenciada pela presença de YWP, que possui propriedades antiadesivas (Ponde *et al.*, 2021).

A comunicação dentro do biofilme é mantida pela secreção de moléculas de sinalização. O *quórum sensing* pode sinalizar e modificar a transcrição, afetando a virulência expressa pelas células. O farnesol é uma molécula de *quórum sensing* secretada por *C. albicans* e *C. dubliniensis*, que atua na manutenção da parede da célula, hidrofobicidade e no aumento da expressão de genes envolvidos na resistência a azóis (Cavalheiro; Teixeira, 2018; Mba; Nweze, 2020; Ponde *et al.*, 2021).

Os biofilmes de *Candida* possuem ainda uma subpopulação conhecida como *persister cells*, que se encontram na camada mais profunda (cerne do biofilme). Essas células apresentam características de dormência, não realizam divisão celular e, por possuírem alta tolerância a antifúngicos, podem se proliferar para restaurar o biofilme ao final de um estímulo estressor que reduziu o biofilme fúngico (Cavalheiro; Teixeira, 2018; Ponde *et al.*, 2021).

Dessa forma, é essencial que novas estratégias sejam exploradas na busca por opções terapêuticas para combater infecções causadas por *Candida* spp.

### **2.1.5. Antifúngicos disponíveis e mecanismos de resistência**

Nas últimas décadas, o aumento do número de casos de infecção por *Candida* resistente tem sido considerável (Lee, Y. *et al.*, 2021b). Os tratamentos convencionais com antifúngicos tem apresentado falha terapêutica, tanto pela resistência *in vitro* do microrganismo em questão quanto à natureza do grupo de indivíduos afetados, que na maioria das vezes são imunossuprimidos (Vieira; Santos, 2017). O uso prolongado ou inadequado de antifúngicos também resultam na seleção de cepas resistentes de *Candida* (Pereira *et al.*, 2021).

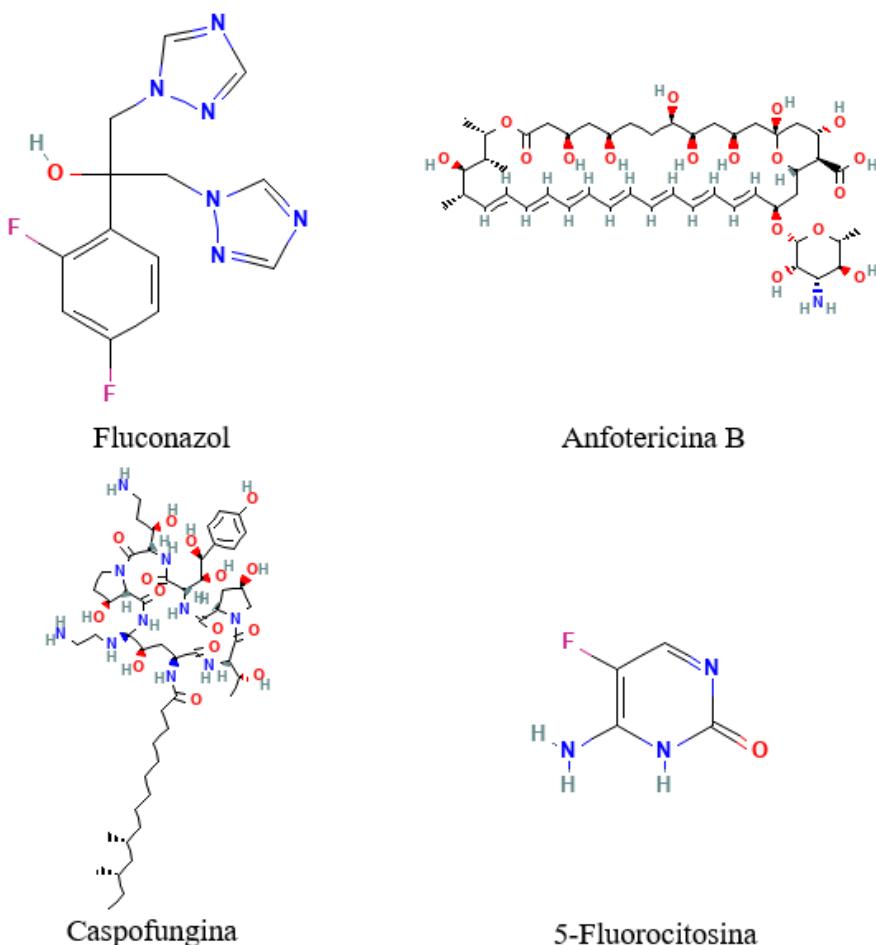
A resistência pode ser adquirida ou intrínseca. A resistência adquirida acontece após exposição ao antimicrobiano e geralmente é resultado de mutação gênica. A intrínseca, por sua vez, é um perfil fenotípico onde o microrganismo apresenta resistência inata sem que ocorra contato prévio com a droga, um exemplo é *C. krusei*, que possui resistência intrínseca ao FLC (Vieira; Santos, 2017).

A resistência a antifúngicos pode ocorrer por mecanismos que envolvem a redução intracelular da concentração da droga, alteração/redução do alvo farmacológico ou diminuição da atividade do medicamento (Lee, Y. *et al.*, 2021b; Pereira *et al.*, 2021). A plasticidade genômica de *Candida* spp. permite a expressão ou mutação de diversos genes relacionados à resistência. Assim, uma mesma espécie pode acumular diversas estratégias para sobreviver à

ação dos antifúngicos (Lee, Y. et al., 2021b). Os mecanismos envolvidos na resistência intrínseca de *C. krusei* ao FLC, por exemplo, incluem a superexpressão de transportadores de cassette de ligação a ATP, alteração da enzima alvo codificada pelo gene *ERG11* e superexpressão de bombas de efluxo (Khalifa et al., 2022).

O arsenal terapêutico voltado para infecções fúngicas é bastante limitado quando comparado à diversidade de classes aprovadas para o tratamento antibacteriano. Somente quatro classes de antifúngicos estão disponíveis atualmente, sendo elas: azólicos, polienos, equinocandinas e pirimidinas (Pereira et al., 2021). A Figura 7 apresenta a estrutura química de um exemplo representativo de cada uma dessas classes. Atualmente, esses medicamentos estão disponíveis na relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME), sendo disponibilizados pelo SUS (Sistema Único de Saúde) (Saúde, 2022).

**Figura 7:** Representação das estruturas químicas dos antifúngicos.



**Fonte:** PubChem (2025).

Os derivados azólicos são a primeira linha no tratamento de infecções por *Candida* spp. Nessa classe estão incluídos os imidazólicos e triazólicos, que possuem um anel imidazólico

em sua estrutura. Os imidazólicos contém três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio. Entre os fármacos desse grupo, destacam-se, entre outros, o miconazol e o cetoconazol. Já os triazólicos possuem dois átomos de carbono e três de nitrogênio, e os principais antifúngicos são FLC e itraconazol (ITR) (Campoy; Adrio, 2017; Martinez, 2006; Pereira *et al.*, 2021). O mecanismo de ação dos azóis caracteriza-se por uma atividade fungistática, onde esses fármacos atuam inibindo a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase (CYP51), que é codificada pelo gene *ERG11*. Portanto, agem no bloqueio da síntese do ergosterol, resultando no acúmulo de intermediários de esterol tóxicos para a célula fúngica, além de alterar a permeabilidade da membrana celular (Lee, Y. *et al.*, 2021a; Lopes; Lionakis, 2022; Martinez, 2006; Pereira *et al.*, 2021).

Uma das principais formas de resistência a azóis está relacionada a mutações em *ERG11* por substituição de aminoácidos. Em *C. albicans*, já foram detectadas mais de 140 substituições de aminoácidos em *ERG11*. Essas alterações reduzem a afinidade de ligação do alvo farmacológico. Esse mecanismo de resistência não é exclusivo de *C. albicans*, tendo sido detectado também em cepas de *C. auris* isoladas no Sul da Ásia, América do Sul e África, mas é incomum em *C. glabrata* (Lee, Y. *et al.*, 2021a).

A superexpressão de bombas de efluxo também acontece para evitar o acúmulo de drogas dentro da célula, sendo um mecanismo de resistência comum para múltiplos antifúngicos. Em *C. albicans*, essa propriedade está relacionada às proteínas de efluxo do cassete de ligação de ATP (família ABC) e da superfamília do facilitador principal (MFS) (Pereira *et al.*, 2021; Prasad *et al.*, 2015). Os principais transportadores envolvidos na resistência de *C. albicans* são *CDR1* e *CDR2*, enquanto em *C. glabrata* são *CgCDR1*, *CgCDR2* e *CgSNQ2*. Já o *MDR1*, da família MFS, está presente em *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Campoy; Adrio, 2017). Mutações de ganho de função são responsáveis pela superexpressão do ativador transcripcional *UPC2*, aumentando a produção de alvos, levando à redução da sensibilidade a azóis (Campoy; Adrio, 2017; Lee, Y. *et al.*, 2021a). Alteração dos genes *ERG1*, *ERG3*, *ERG7*, *ERG9* ou *ERG25*, que fazem parte da via de síntese do ergosterol, também levam à resistência (Campoy; Adrio, 2017).

Os poliênicos são uma classe de antifúngicos com ação fungicida que possuem molécula anfipática heterocíclica com átomos de carbono divalentes dispostos em série. AMB e nistatina estão agrupadas nessa classe. A AMB é utilizada em casos mais graves de doença invasiva, infecção disseminada ou na ausência de outro fármaco eficaz, já que sua utilização deve ser

limitada, pois apresenta toxicidade celular e comum nefrotoxicidade (Martinez, 2006; Pereira *et al.*, 2021).

Os antifúngicos poliênicos tem como alvo o ergosterol da célula fúngica, seu mecanismo de ação está relacionado à formação de poros na membrana, alterando a estabilidade e levando à morte. As moléculas anfifílicas do fármaco se ligam aos esteróis, provocando alteração da temperatura da transição da membrana, liberando íons e pequenas moléculas através dos poros formados (Lopes; Lionakis, 2022; Sanglard, 2017).

A resistência à AMB, apesar de incomum, acontece pelo esgotamento do alvo (Lee, Y. *et al.*, 2021a). A redução da sensibilidade ocorre por mutações no gene *ERG3*, responsável pela codificação da enzima C-5 esterol desaturase, que está relacionada à síntese do ergosterol. Como consequência, há uma redução da interação do fármaco com a membrana da célula (Pereira *et al.*, 2021). Mutações em diversas outras enzimas relacionadas a biossíntese do ergosterol têm sido descritas por seus potenciais de alterarem a sensibilidade em *C. albicans* (*ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG11*), *C. glabrata* (*ERG2*, *ERG6*, *ERG11*) e *C. auris* (*ERG1*, *ERG2*, *ERG6*, *ERG13*) (Lee, Y. *et al.*, 2021a).

A classe das equinocandinas é constituída por antifúngicos fungicidas que apresentam uma estrutura de hexapeptídeos cíclicos associados a diferentes cadeias laterais, as quais são responsáveis pela atividade antifúngica. Fazem parte desse grupo a caspofungina, micafungina e anidulafungina (Lopes; Lionakis, 2022; Martinez, 2006). Ácidos graxos ocupam a cadeira lateral da caspofungina, enquanto a micafungina apresenta um complexo aromático, e a anidulafungina possui um grupo alcoxitrifenil (Campoy; Adrio, 2017; Martinez, 2006; Pereira *et al.*, 2021).

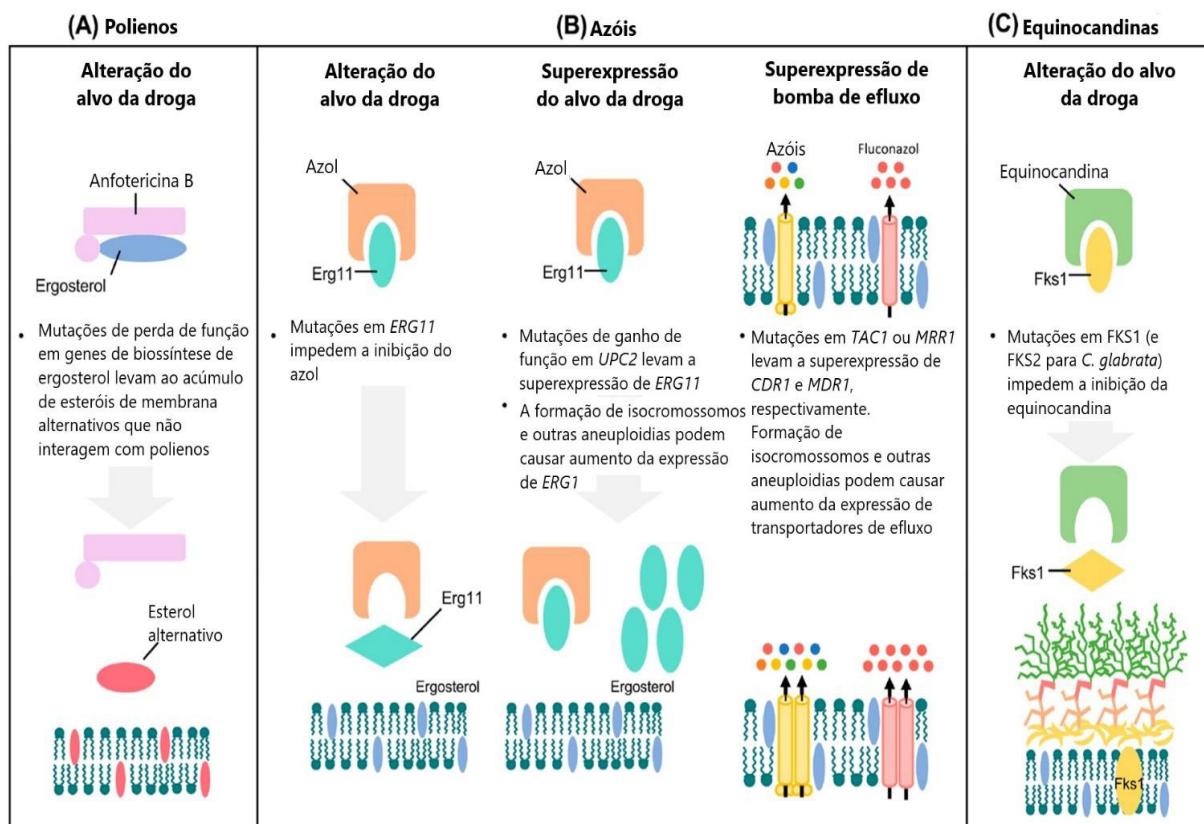
O mecanismo de ação dessas drogas consiste em bloquear a síntese da 1,3- $\beta$ -D-glucano por meio da inibição do complexo enzimático 1,3- $\beta$ -D-glucano sintase, ligando-se principalmente à subunidade *FKS1*. Essa interação implica na ruptura da parede celular, com consequente instabilidade osmótica e morte da célula (Campoy; Adrio, 2017; Lopes; Lionakis, 2022; Martinez, 2006). As cepas de *Candida* spp. resistentes às equinocandinas apresentam mutações no gene *FKS1* e *FKS2*, provocando redução da enzima 1,3- $\beta$ -D-glucano sintase. Em *C. albicans* e *C. auris*, as mutações ocorrem principalmente em *FKS1*, enquanto em *C. glabrata* as mutações são comuns tanto em *FKS1* como em *FKS2* (Campoy; Adrio, 2017; Lee, Y. *et al.*, 2021a; Pereira *et al.*, 2021).

Os análogos das pirimidinas, por sua vez, atuam sobre a inibição da síntese de ácidos nucleicos. A flucitosina (5-FC; 5-fluorocitosina) é um fungistático análogo fluorado da

pirimidina. A 5-FC penetra as células por meio do transportador enzimático citosina permease. Ao adentrar a célula, é convertido pela citosina desaminase na forma ativa 5-fluorouracil (5-FU) onde interfere no metabolismo das pirimidinas, assim como RNA/DNA e síntese proteica (Campoy; Adrio, 2017; Pereira *et al.*, 2021).

A resistência a 5-FC é comum, por isso o fármaco costuma ser associado a outros antifúngicos como AMB e/ou FLC. O perfil de resistência consiste em mutações nos genes *FCY1* da citosina desaminase e *FCY2* da citosina permeasse, além de mutações no gene *FUR1* que é responsável pela síntese da enzima uracila fosforibosiltransferase, alterando a conversão de 5-FU e impedindo a formação de metabólitos tóxicos para o fungo (Campoy; Adrio, 2017; Sanglard, 2017). A Figura 8 ilustra alguns mecanismos de resistência a antifúngicos.

**Figura 8:** Mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos.



**Fonte:** Adaptado de Lee *et al.*, (2021a).

### 2.1.6. Estratégias para o desenvolvimento de novos antifúngicos

Projeções apontam para morte prematura de cerca de 10 milhões de pessoas até 2050 em decorrência de infecções por microrganismos resistentes, além de um impacto econômico de US \$100 trilhões (Chaves, 2022; O'Neill, 2014). A problemática da resistência antimicrobiana requer novas abordagens para o enfrentamento às infecções por esses

patógenos. Dessa forma, estratégias como a utilização de produtos naturais, reposicionamento de fármacos e associação de antimicrobianos podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos tratamentos frente a *Candida* spp. (Chaves, 2022; Giono-Cerezo *et al.*, 2020).

A utilização de recursos naturais para tratamento de doenças é realizada por povos tradicionais há muitas décadas e, até hoje, servem como base para o desenvolvimento de diversos medicamentos (DJOUOSSI *et al.*, 2015). De acordo com Duarte (2006), não se sabe ao certo quando se iniciou o uso de plantas medicinais, mas há registros datados de 1.500 a. C. no manuscrito *Ebers Papirus*, que detalha a aplicação de mais de 700 drogas de origem natural. Até os dias atuais, uma grande diversidade de plantas são objetos de estudo para compreensão de suas propriedades para obtenção de compostos com atividades biológicas. Compostos naturais complexos, como extratos e óleos essenciais, são estudados para avaliar sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (Djouossi *et al.*, 2015; Duarte, 2006).

Os produtos naturais são uma alternativa viável para aumentar o arsenal antimicrobiano, tendo em vista suas propriedades e a facilidade de serem provenientes de fontes renováveis e frequentemente estarem disponíveis em grande quantidade na natureza (Santana; Castro; Paiva, 2022). Os biomas brasileiros possuem altos índices de endemismo e, até 2006, apenas 0,4% das espécies haviam sido estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Gurib-Fakim, 2006; Marangoni, 2015). Embora muitas plantas ainda não tenham sido estudadas, já se sabe que várias plantas nativas brasileiras possuem atividade anti-*Candida*, como *Croton cajucara*, *Pyrostegia venusta* e *Buchenavia tomentosa* (Soliman *et al.*, 2017). Dessa forma, é essencial ampliar as pesquisas que objetivam compreender o potencial de bioprospecção brasileiro.

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que objetiva explorar novas aplicabilidades para medicamentos já aprovados na fase clínica (Chaves, 2022; Serafin; Hörner, 2018). Na literatura, já são relatadas atividades antimicrobianas de diferentes drogas de reposicionamento, como antidepressivos (Cabral *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2023), anti-hipertensivos (Barbosa *et al.*, 2023; do Nascimento *et al.*, 2023) e anti-inflamatórios (Chan *et al.*, 2017; Sampaio *et al.*, 2018), por exemplo.

Já a associação de fármacos na terapia antimicrobiana é uma alternativa que consiste em combinar dois ou mais medicamentos para se obter um resultado mais efetivo, como uma interação sinérgica. É possível também reduzir as dosagens, efeitos adversos e toxicidade das drogas (Bidaud *et al.*, 2021).

## 2.2. Gênero *Caryocar*

### 2.2.1. Importância do gênero na comunidade

Conhecido no meio popular como pequi, piqui ou piquiá, o gênero *Caryocar* é abundantemente explorado de diversas formas. A origem do nome é grega, onde “*Karyon*” significa caroço ou noz, e do latim, onde “*Caro*” faz referência a carne do fruto. Já no tupi-guarani, “*py*” é casca e “*qui*” é espinho, sendo assim, polpa com espinhos (Mariano-da-Silva *et al.*, 2009).

É um importante aliado da medicina tradicional brasileira, bem como da culinária em pratos típicos, além de obter importante valor para a economia local onde é usado para confecção de artesanatos (Cordeiro, 2021). Além do valor socioeconômico, o pequizeiro, árvore do pequi, é preservado por comunidades indígenas, quilombolas e ribeirinhos, que o utilizam como alimento e para tratamento medicinal (Melo, 2021).

No Brasil, essas plantas são encontradas no Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica, onde possuem importância como fonte alimentar e na geração de renda, bem como o incentivo à conservação ambiental. O *C. coriaceum* ocorre, principalmente, na Chapada do Araripe, que compreende os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí. O processamento de cascas, folhas, frutos e semente do pequi dão origem a óleos, doces, licores e extratos com diversas aplicações (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022; Cordeiro, 2021).

Os frutos do pequi são bastante utilizados na medicina popular para o tratamento de pneumonia, gripe, queimadura e problemas renais (Torres *et al.*, 2016). Todas as propriedades medicinais e nutricionais atribuídas ao gênero estão relacionadas a presença de carotenoides, fibras e minerais, bem como proteínas, lipídeos e carboidratos (Arruda; Cruz; Almeida, 2012). Portanto, sendo uma fonte rica para identificação do seu potencial farmacêutico.

### 2.2.2. Atividades biológicas do gênero

Existem cerca de 16 espécies de *Caryocar*, mas nem todas são objetos de estudo por conta de sua distribuição geográfica, sendo as espécies *C. brasiliense*, *C. coriaceum*, *C. villosum* as mais bem documentadas (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022). Dentre as atividades biológicas do pequi, a propriedade antioxidante é a mais ressaltada, estando relacionada principalmente à grande quantidade de flavonoides encontrados em sua composição. As propriedades antioxidantes já foram observadas em *C. brasiliense* (Torres *et al.*, 2016), *C. villosum* (Chisté *et al.*, 2012) e *C. coriaceum* (Alves *et al.*, 2017; Duavy *et al.*, 2012).

O óleo do fruto de *C. brasiliense* também possui propriedades cicatrizantes (Oliveira *et al.*, 2020; Traesel *et al.*, 2016). Oliveira *et al.* (2020) realizaram a avaliação de processo cicatricial de lesões cutâneas quando tratadas com extrato da folha de *C. brasiliense*. Nesse experimento, foram usados modelos *in vivo* de coelhos. As lesões tratadas com o extrato do pequi apresentaram redução da hiperemia, indicando atividade anti-inflamatória. Pires *et al.* (2020) também observaram a cicatrização mais rápida da pele de ratos *Wistar* quando foram tratados com óleo nanoestruturado de *C. brasiliense*.

Ademais, algumas propriedades atribuídas ao *Caryocar* spp. são efeito analgésico (Jorge-Junior *et al.*, 2020), hepatoprotetor (Torres *et al.*, 2016), atividade citotóxica (Alabdul-Magid *et al.*, 2006) e genotóxica (Almeida *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o gênero *Caryocar* está relacionado à atividade antimicrobiana. Segundo (Paula-Junior *et al.*, 2006), o extrato hidroalcóolico das folhas de *C. brasiliense* apresentou atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O extrato bruto etanólico de *C. brasiliense* apresentou intervenção significativa na curva de parasitemia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, provocando uma redução substancial no número de parasitas sanguíneos (Herzog-Soares *et al.*, 2006). A atividade antiparasitária não se limita a patógenos humanos. O extrato aquoso de *C. brasiliense* reduziu significativamente a eclosão e aumentou a mortalidade do nematóide das galhas *Meloidogyne javanica*, demonstrando potencial fitotóxico (Ribeiro *et al.*, 2012).

A respeito da atividade antifúngica, o pequi demonstrou atividade frente a *Cryptococcus neoformans* (Passos *et al.*, 2002), *Paracoccidioides brasiliensis* (Passos *et al.*, 2003), *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Naruzawa; Papa, 2011) e *Candida* spp. (Pereira *et al.*, 2021; Retore *et al.*, 2024).

No estado do Ceará, a espécie *C. coriaceum* Wittm. é a mais abundante, principalmente pela grande quantidade de árvores em regiões de proteção ambiental (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022). A respeito das atividades biológicas dessa espécie, Alves *et al.* (2017) relataram atividade antioxidante quando analisaram extratos da casca e da polpa dos frutos de *C. coriaceum* pelo método de redução de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Duavy *et al.* (2012) observaram a mesma atividade antioxidante de extratos da folha de *C. coriaceum*.

Oliveira *et al.* (2010), em modelos *in vivo* de camundongos, onde trataram lesões cutâneas com pomada à base do óleo de *C. coriaceum*, conseguiram identificar redução de 96,5% das feridas quando comparada ao controle (88%). Saraiva *et al.* (2011) observaram

inibição de 28,5% de processo inflamatório em modelos *in vivo* de edema de orelhas de camundongos, quando tratados com óleo de *C. coriaceum* (8mg/orelha). Outras propriedades de *C. coriaceum* são a capacidade gastroprotetora (Leite *et al.*, 2009) e cardioprotetora (Kerntopf *et al.*, 2015).

### **2.2.3. Atividade antimicrobiana de *Caryocar coriaceum* Wittm.**

O tratamento e o controle eficaz das doenças infecciosas são fundamentais para a promoção da saúde. A investigação da atividade antimicrobiana do pequi já foi alvo de diversos trabalhos, tendo como foco sua ação frente a bactérias, fungos e parasitas. Diversos compostos, como óleos, extratos e produtos farmacêuticos podem ser formulados a partir da casca, polpa ou semente do pequi (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022; Jorge-Junior *et al.*, 2020; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). As diferentes técnicas de extração podem afetar a qualidade dos extratos, influenciadas por fatores como o solvente utilizado, o tempo de extração, a temperatura e o tipo de material, por exemplo (Karabegović *et al.*, 2014).

Há relatos na literatura a respeito da atividade desses compostos frente a bactérias patogênicas. Costa *et al.* (2011a) constataram que o óleo de *C. coriaceum* na dose de 10 µg/disco exibiu propriedades antibacterianas contra *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*.

Esses óleos e extratos podem ainda ser combinados a antimicrobianos para melhorar a eficácia frente a microrganismos, como foi visto por Araruna *et al.* (2013) quando o extrato da folha de *C. coriaceum* Wittm. demonstrou interação sinérgica quando associado à amicacina (50%) e gentamicina (75%) frente a cepas de *S. aureus* resistente à meticilina. O mesmo aconteceu quando esse extrato foi combinado com neomicina contra *E. coli*, aumentando em 75% a atividade antimicrobiana.

Na literatura, as propriedades antiparasitárias do gênero *Caryocar* são as mais bem documentadas. Tomiotto-Pellissier *et al.* (2018) verificaram que extratos de folhas de *C. coriaceum* apresentaram efeito antiparasitário frente a *Leishmania amazonensis*, estimulando a apoptose nas formas promastigotas e resposta antioxidante em formas amastigotas intracelulares desse parasita, levando à depleção de ferro e interferindo na replicação parasitária.

Com relação à atividade antifúngica, a espécie *C. coriaceum* já demonstrou atividade frente a *Microsporum canis* e *Malassezia* spp. (Alves *et al.*, 2017), com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 19,53 e 4.88 µg/mL. Referente às espécies de *Candida* spp.,

alguns trabalhos evidenciaram potencial anti-*Candida* com preparações da polpa de *C. coriaceum*, frente às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Almeida-Bezerra *et al.*, 2023; Oliveira-Filho *et al.*, 2023).

Assim, o potencial antifúngico de *Caryocar* spp. vem sendo avaliado; contudo, a investigação dos mecanismos de ação envolvidos ainda é escassa. Desta forma, é essencial compreender os mecanismos relacionados com as possíveis propriedades antifúngicas do pequi.

### 3. HIPÓTESES

- Os extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. possuem atividade antifúngica, *in vitro*, em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao FLC.
- Compostos fenólicos fazem parte da composição química dos extratos.
- Há sinergismo entre os extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. associado ao FLC, ITR e AMB em cepas de *Candida* spp. sensíveis ou resistentes ao FLC.
- Os extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. apresentam atividade isolados e associados a antifúngicos em biofilme de *Candida* spp.
- Os extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. possuem baixa toxicidade, *in vitro*, em linfócitos humanos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Analisar a composição química e avaliar a atividade de extratos de *Caryocar coriaceum* Wittm. sozinhos e associados a antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp. tanto em sua forma planctônica como em biofilme, bem como os mecanismos de ação envolvidos.

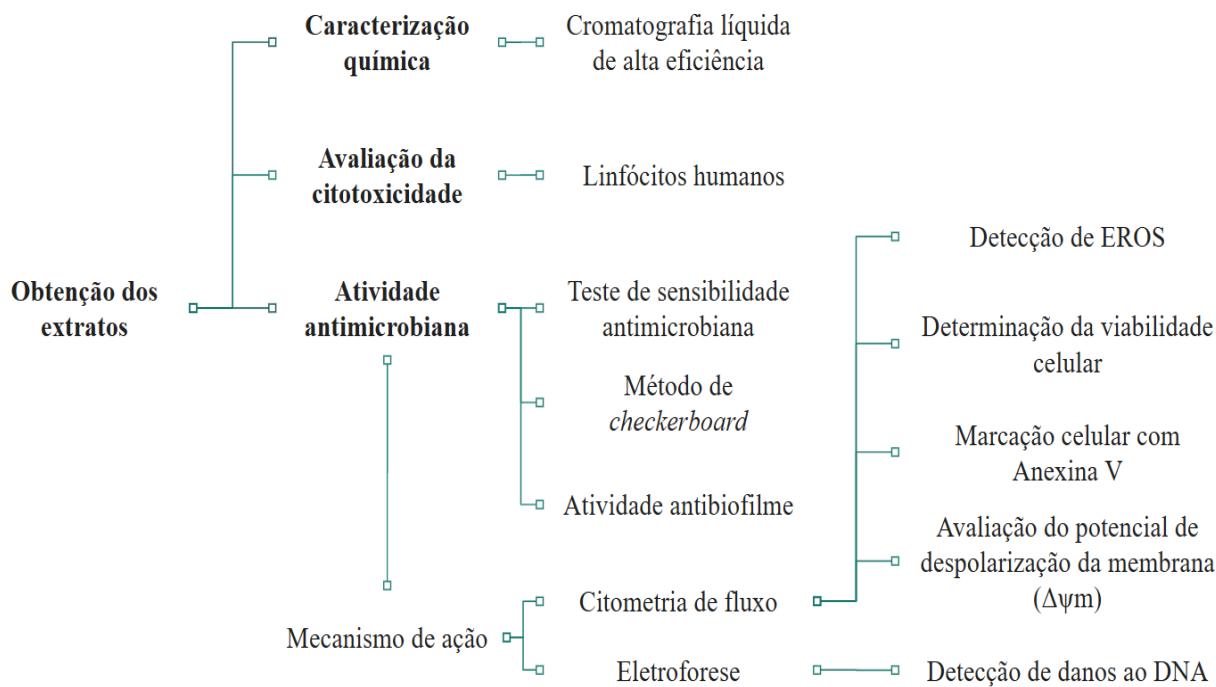
### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar a CIM dos extratos de *C. coriaceum* Wittm e dos antifúngicos FLC, ITR e AMB frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao FLC.
- Determinar o tipo de interação farmacológica *in vitro* dos extratos de *C. coriaceum* Wittm com antifúngicos em cepas de *Candida* spp. sensíveis ou resistentes ao FLC.
- Realizar a caracterização química dos extratos de *C. coriaceum* Wittm.
- Avaliar a ação dos extratos de *C. coriaceum* Wittm. sozinhos e associados a antifúngicos em biofilme maduro de *Candida* spp.
- Analisar o possível mecanismo de ação dos extratos de *C. coriaceum* Wittm frente a cepas de *Candida* spp.
- Avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, dos extratos de *C. coriaceum* Wittm. em linfócitos humanos.

## 5. METODOLOGIA

A Figura 9 ilustra o fluxo metodológico adotado neste estudo, fundamentado na análise dos parâmetros de composição química, citotoxicidade e atividade antimicrobiana dos extratos de *C. coriaceum*.

**Figura 9:** Representação esquemática metodológica.



### 5.1 Microrganismos

Foram utilizadas sete cepas de *Candida* spp. pertencentes ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As cepas incluíram representantes das espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, juntamente com duas cepas controle, abrangendo três cepas sensíveis e quatro resistentes ao FLC. Utilizou-se a cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 como controle de sensibilidade ao FLC e *C. krusei* ATCC 6258 como controle de resistência ao FLC.

### 5.2 Ativos utilizados

#### 5.2.1 Obtenção dos extratos

As folhas de *C. coriaceum* Wittm. foram coletadas em março de 2014 no Campus da Universidade Estadual do Ceará (lat.: -3.792222; long.: -38.556111), Fortaleza, Brasil. A

identificação ocorreu no Herbário Prisco Bezerra sob o código EAC57060. Segundo a metodologia descrita por Alves et al. (2017), a partir das folhas coletadas, procedeu-se à elaboração dos seguintes extratos: extrato acetato das folhas de pequi (EAFP), extrato metanólico das folhas de pequi (EMFP) e extrato etanólico das folhas de pequi (EEFP). Para obter os extratos, as folhas passaram por maceração a frio, utilizando diferentes solventes específicos para cada tipo de extrato, sendo etanol 96% (EEFP), acetato de etila (EAFP) e metanol (EMFP). Após a maceração, os extratos permaneceram por sete dias sem agitação, em ciclo de luz de 12 h para simular condições ambientais. Em seguida, os extratos foram filtrados e os solventes foram evaporados utilizando um evaporador rotativo. Os extratos de pequi estão catalogados com o código A932C1C no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Para ensaios microbiológicos, os extratos foram diluídos no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO). Após diluições, as concentrações de DMSO encontraram-se abaixo de 2,5%, não interferindo no crescimento do microrganismo.

### **5.2.2 Antifúngicos**

Os antifúngicos FLC, ITR e AMB foram obtidos comercialmente em Sigma-Aldrich Co. (EUA). O FLC foi solubilizado em água destilada estéril, enquanto o ITR e AMB foram solubilizados em DMSO puro, alcançando uma concentração de 100%, com posterior diluição onde as concentrações de DMSO encontraram-se abaixo de 2,5%.

## **5.3 Padrões utilizados na caracterização química**

Os padrões analíticos ácido gálico, ácido elágico, rutina e queracetina foram adquiridos em Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Para a extração, foram utilizados solventes de grau analítico (Vetec®), e nas análises os solventes utilizados foram de grau HPLC (J.T. BAKER®). As amostras e soluções preparadas passaram por filtração em membrana de náilon (0,45 µm) e filtro de membrana (0,22 µm - Millipore), respectivamente. Todas os ensaios foram realizados em triplicata.

## **5.4 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) com detecção de arranjo de diodos (DAD)**

O ensaio foi conduzido utilizando um sistema Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Kyoto, Japão), composto por bombas alternativas Shimadzu LC-20AD conectadas a um degaseificador (DGU 20<sup>a</sup>) com um integrador CBM 20A, um detector de matriz de diodos SPD-M20A e o software LC Solution 1.22 SP1. Foi empregada coluna de fase

reversa Shim-pack (CLC) ODS GOLD (4,6 x 250 mm, 5 µm) na análise. As fases móveis utilizadas foram acetonitrila e água Milli-Q acidificada (pH 2,8) com ácido fosfórico, sendo aplicado um gradiente de solvente. A vazão utilizada foi de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, com um volume de injeção de 20 µL e um comprimento de onda de detecção de 350 nm. A solução estoque dos padrões de referência foi preparada em metanol HPLC dentro de uma faixa de concentração de 0,001–0,5 mg/mL<sup>-1</sup> para o ácido gálico, 0,0001–1,0 mg/mL<sup>-1</sup> para o ácido elágico, 0,00032–1,0 mg/mL<sup>-1</sup> para rutina e 0,000067–1,0 mg/mL<sup>-1</sup> para a queracetina. A identificação dos picos cromatográficos foi confirmada através da comparação de seus tempos de retenção com os dos padrões de referência, além da análise dos espectros DAD (200 a 400 nm) (Alves *et al.*, 2017).

As curvas de calibração foram estabelecidas para o ácido gálico:  $y = 3 \cdot 10^{-8}x - 0,0061$  ( $r = 0,9997$ ), ácido elágico:  $y = 2 \cdot 10^{-7}x + 0,003$  ( $r = 0,999$ ), rutina:  $4,0 \times 10^{-8}x + 0,005$  ( $r = 0,999$ ) e queracetina:  $2 \cdot 10^{-8}x - 0,00002$  ( $r = 0,999$ ). A análise foi realizada em triplicata, e as áreas médias dos picos foram medidas para fins de quantificação (Alves *et al.*, 2017).

### **5.5 Avaliação *in vitro* da eficácia antifúngica dos extratos**

A avaliação da sensibilidade das cepas de interesse foi conduzida utilizando a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de estabelecer a CIM dos extratos, seguindo a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os antifúngicos ITR e AMB foram testados na faixa de 16 – 0,031 µg/mL, FLC entre 64 – 0,125 µg/mL e os extratos de *C. coriaceum* Wittm. na concentração de 512 – 0,5 µg/mL. Os microrganismos foram cultivados por 24 h em ágar batata dextrose a 35 °C. Para o preparo do inóculo, as cepas foram suspensas em salina estéril (0,85%) na escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), correspondendo a concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL e em seguida diluídos em meio de cultura (0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, com poços específicos destinados ao controle positivo, que incluía meio de cultura e inóculo, e ao controle de esterilidade, que continha apenas meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) com pH 7,0 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Na placa de 96 poços foi realizada diluição seriada dos ativos (100 µL) e posteriormente foi adicionado 100 µL do inóculo. As placas permaneceram incubadas a 35 °C por 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A leitura foi realizada após 24 h por meio da observação visual. A CIM dos ativos foi definida como a menor concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento fúngico (CLSI, 2008). Adicionalmente, para AMB, a leitura foi realizada de forma a determinar a CIM

100% (concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico), de acordo com o CLSI (2008). As cepas com CIM  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$  para FLC são consideradas resistentes (CLSI, 2012).

### **5.6 Interação farmacológica entre os extratos e agentes antifúngicos**

Cada um dos extratos foi combinado com os antifúngicos FLC, ITR e AMB nas concentrações CIM, sendo a interação posteriormente avaliada por meio do método de *checkerboard* (Odds, 2003). O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) foi calculado pela equação:  $\text{CIM}_{\text{associação (extrato)}}/\text{CIM}_{\text{isolado (extrato)}} + \text{CIM}_{\text{associação (antifúngico)}}/\text{CIM}_{\text{isolado (antifúngico)}}$ . O ICIF foi utilizado para classificar a interação em: sinérgica ( $\text{ICIF} \leq 0,5$ ); aditiva ( $0,5 < \text{ICIF} \leq 1,0$ ); indiferente ( $1,0 < \text{ICIF} \leq 4,0$ ); e antagônica ( $\text{ICIF} > 4,0$ ) (Jorge *et al.*, 2017).

### **5.7 Avaliação do mecanismo de ação**

Foi realizado o preparo das suspensões e tratamento das células de *C. albicans* resistentes ao FLC. A cepa *Candida albicans* 2 foi selecionada como representativa das demais, visto a importância epidemiológica da espécie. As células foram incubadas por 24 h a 35 °C para obtenção de células em fase exponencial para preparo das suspensões em meio caldo extrato de levedura nitrogênio dextrose (YND; Becton Dickinson). As suspensões foram centrifugadas (2500 rpm por 5 min), lavadas três vezes com solução salina 0,85%, ressuspensas ( $1,5 \times 10^6 \text{ U.F.C.ml}^{-1}$ ) em RPMI 1640 (pH 7) e submetidas aos tratamentos (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

Na análise da integridade da membrana, determinação da densidade celular, fragmentação do DNA, medição do potencial transmembrana mitocondrial e formação de EROS, as células de *C. albicans* foram submetidas a tratamento na CIM dos extratos EEFP ( $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), EMFP ( $16 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e EAfp ( $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) isolados e associados a AMB, sendo EEFP + AMB (EEFP 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + AMB 0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); EMFP + AMB (EMFP 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + AMB 0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e EAfp + AMB (EAfp 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + AMB 0,06  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Além disso, uma concentração de AMB (AMB 0,5; 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi empregada para comparação posterior com os resultados dos extratos associados à AMB nas concentrações correspondentes ao ICIF (AMB + EEFP; AMB + EMFP; AMB + EAfp). Microtubos foram designados para o controle negativo, contendo células não tratadas. Células tratadas com AMB na concentração de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram utilizadas como controle de morte celular. O período de incubação foi de 24 horas a 35 °C (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

Para a análise de todos os parâmetros avaliados, foi considerado um total de 10.000 eventos em cada ensaio ( $n = 2$ ), com a exclusão de detritos celulares da análise (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.7.1 Detecção de EROS**

Após o contato com as drogas, as células foram incubadas com 20  $\mu\text{M}$  de 2',7'-Diclorodi-hidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) no escuro por 30 min a 37 °C. Em seguida, foram lavadas, ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA) (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.7.2 Determinação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por iodeto de propídio (PI) na concentração de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A fluorescência celular foi determinada em citômetro de fluxo FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA e no software CytoSoft 4.1 (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.7.3 Marcação celular com Anexina V**

As células tratadas foram submetidas à centrifugação e submetidas à digestão utilizando uma solução composta por tampão fosfato de potássio (PPB; sorbitol 1M, pH 6,0) e zimoliase 20T (2 mg/ml) (Seikagaku Corp., Abingdon, Reino Unido) por 2 horas a 30 °C, visando a remoção da parede celular. Os protoplastos de *C. albicans* foram, então, marcados com Anexina V e PI utilizando um kit de detecção de apoptose (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). Em seguida, as células foram incubadas em tampão de ligação contendo FITC-anexina (5 ml/ml FITC-Anexina V e 5 ml de PI). Foi realizada a análise em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA) (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.7.4 Avaliação do potencial de despolarização da membrana ( $\Delta\psi_m$ )**

A determinação foi realizada por meio da análise de retenção da Rodamina 123 (5 mg/l) após exposição das células com as drogas por 24 h (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.7.5 Detecção de danos ao DNA**

O ensaio de cometa alcalino foi conduzido conforme Miloshev; Mihaylov; Anachkova, (2002). As lâminas receberam 200 µL de agarose a 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) antes da adição da suspensão celular. Células de *C. albicans* passaram por centrifugação por 5 min, lavadas com água destilada e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5). Para obtenção de esferoplastos, alíquotas ( $5 \times 10^4$  células) foram misturadas com agarose contendo Zymolyase 20T e aplicadas nas lâminas, cobertas com lamínulas e incubadas (20 min/ 30 °C). Estes procedimentos foram realizados a uma temperatura entre 8 e 10 °C com o intuito de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas. As lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução (NaOH 30 mM, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM EDTA, pH 12,3) por 1 h objetivando lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetidas à eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada ao longo de 20 min a 0,5 V/ cm e a amperagem de 24 mA. Em seguida, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min e consecutivas incubações em etanol 76% e 96% por 10 min. Após a secagem, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (1 mg/ mL) e observadas em microscópio de fluorescência. Os procedimentos relatados foram realizados em ambiente escuro para evitar danos adicionais ao DNA. Foram selecionadas de forma aleatória 100 imagens de células, sendo 50 células de cada uma das lâminas para análise de cada grupo experimental. A leitura foi feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (não danificado – 0; dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculado para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (Neto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

### **5.8 Cultivo e maturação do biofilme de *C. albicans* para avaliação *in vitro* dos efeitos dos extratos de *C. coriaceum* Wittm.**

O protocolo de formação do biofilme foi executado conforme Pierce *et al.*, (2008) com modificações. Optou-se pela utilização da cepa *C. albicans* 2 resistente ao FLC, em virtude de sua relevância epidemiológica. As células foram cultivadas em caldo YND por 24 h a 35 °C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl a 0,85%) por meio de centrifugação (2500 rpm por 5 min). Em seguida, as cepas foram suspensas em meio líquido RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com MOPS 0,165 M (Sigma-Aldrich) na turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^6$  U.F.C.ml<sup>-1</sup>). Foram distribuídos 200 µL do

inóculo em placas de 96 poços, que permaneceram incubadas por 48 h a 35 °C para formação de biofilmes. Destinaram-se poços específicos para o controle positivo, os quais continham exclusivamente o biofilme em estágio maduro, e para o controle negativo, contendo RPMI.

Após formação do biofilme, as placas foram lavadas três vezes com 200 µl de salina (NaCl a 0,85%). Diferentes concentrações dos ativos diluídos em RPMI 1640 foram utilizadas nos poços contendo biofilme viável. Foram testadas as concentrações (CIM/ 2; CIM; 2x CIM; 4x CIM) dos extratos EEFP (4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL e 32 µg/mL), EMFP (8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL e 64 µg/mL) e EAfp (32 µg/mL; 64 µg/mL, 128 µg/mL e 256 µg/mL) isolados e associados à AMB (EEFP + AMB: 2 µg/mL + 0,125 µg/mL; EMFP + AMB: 4 µg/mL + 0,125 µg/mL; EAfp + AMB: 8 µg/mL + 0,06 µg/mL) nas respectivas concentrações do ICIF, devido a essas serem as concentrações onde houve sinergismo entre as substâncias. Uma concentração de AMB (AMB 0,5) também foi adicionada para fins de comparação. As placas foram novamente incubadas a 35 °C por 24 h.

### **5.8.1 Avaliação da viabilidade celular do biofilme**

A avaliação da atividade metabólica das células foi conduzida por meio do ensaio colorimétrico com brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT). Esta fase foi executada subsequentemente à lavagem dos poços que continham o biofilme tratado ou não tratado com as drogas, seguida da adição de 50 µL de MTT (1 mg/ml; Sigma, MO, USA). A placa foi incubada por um período de 3 horas a 35 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, aguardando 15 minutos para a solubilização do formazan produzido, posteriormente sendo avaliada a viabilidade celular. Em seguida, 100 µL foram transferidos para uma nova placa, onde a análise dos resultados foi conduzida para leitura em um leitor de microplacas Smartreader<sup>tm</sup> 96 (Accuris instruments, NJ, USA) a um comprimento de onda de 570 nm (Pierce *et al.*, 2008).

### **5.8.2 Determinação da biomassa do biofilme**

A quantificação da biomassa foi conduzida mediante a utilização do ensaio com cristal violeta a 0,1%. Após a incubação, o biofilme foi lavado com solução salina (NaCl a 0,85%). Em seguida, 100 µL de metanol foram adicionados aos poços para fixação do biofilme, que permaneceu por 10 minutos antes de ser removido e aguardou-se sua completa evaporação. Posteriormente, 50 µL de solução de cristal violeta a 0,1% foram adicionados a cada poço, onde permaneceram por 20 minutos. O sobrenadante foi removido, e os poços foram submetidos a

três lavagens com solução salina. Após essa etapa, 150 µL de ácido acético foram adicionados aos poços, seguido por uma adequada homogeneização, e, em seguida, 100 µL da solução resultante foram transferidos para uma nova placa para a subsequente leitura. A densidade óptica (DO) foi avaliada por meio de um espectrofotômetro Smartreader<sup>tm</sup> 96 (Accuris instruments, NJ, USA), utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A adesão do biofilme foi determinada mediante a comparação da densidade óptica da cepa em estudo com a do controle, conforme descrito por Stepanović et al., (2000).

### **5.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos sobre linfócitos humanos**

As células foram obtidas a partir do sangue periférico de três pacientes saudáveis ( $24 \pm 3,05$  anos) do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual do Ceará (Brasil) e, em seguida, submetidas a centrifugação em gradiente de densidade em Histopaque-1077 (Cavalcanti et al., 2020). Os procedimentos realizados obtiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (COMEPE-UFC – protocolo número 281/09). Prosseguiu-se com a adição de fitohemaglutinina (2,5%) e posterior suspensão das células com meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U.ml<sup>-1</sup> de penicilina e 171,9 µM de estreptomicina. Os leucócitos permaneceram em incubação a 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Foi realizada técnica colorimétrica com MTT para a avaliação da viabilidade de linfócitos humanos quando expostos a extratos de *C. coriaceum* Wittm. As células foram cultivadas em placas de 96 poços ( $1,5 \times 10^6$  células/mL). Após 48 horas, os linfócitos foram expostos a concentrações de 600 – 1,17 µg/ml dos extratos EAfp, EMfp e EEFp por 24 horas. As placas foram centrifugadas e o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo 0,5 mg/mL de MTT e incubada por 3 horas. A absorbância foi medida usando um leitor multiplacas (Spectra Count, Packard, Ontário, Canadá) a 595 nm (Cavalcanti et al., 2020).

### **5.10 Análise estatística**

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata em dias distintos. Para os testes de sensibilidade, as médias aritméticas das triplicatas correspondentes aos resultados de CIM e ICIF foram obtidas. Os dados dos ensaios de citometria de fluxo e biofilme foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) one way, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para avaliação da significância estatística entre o controle e os testes. As informações

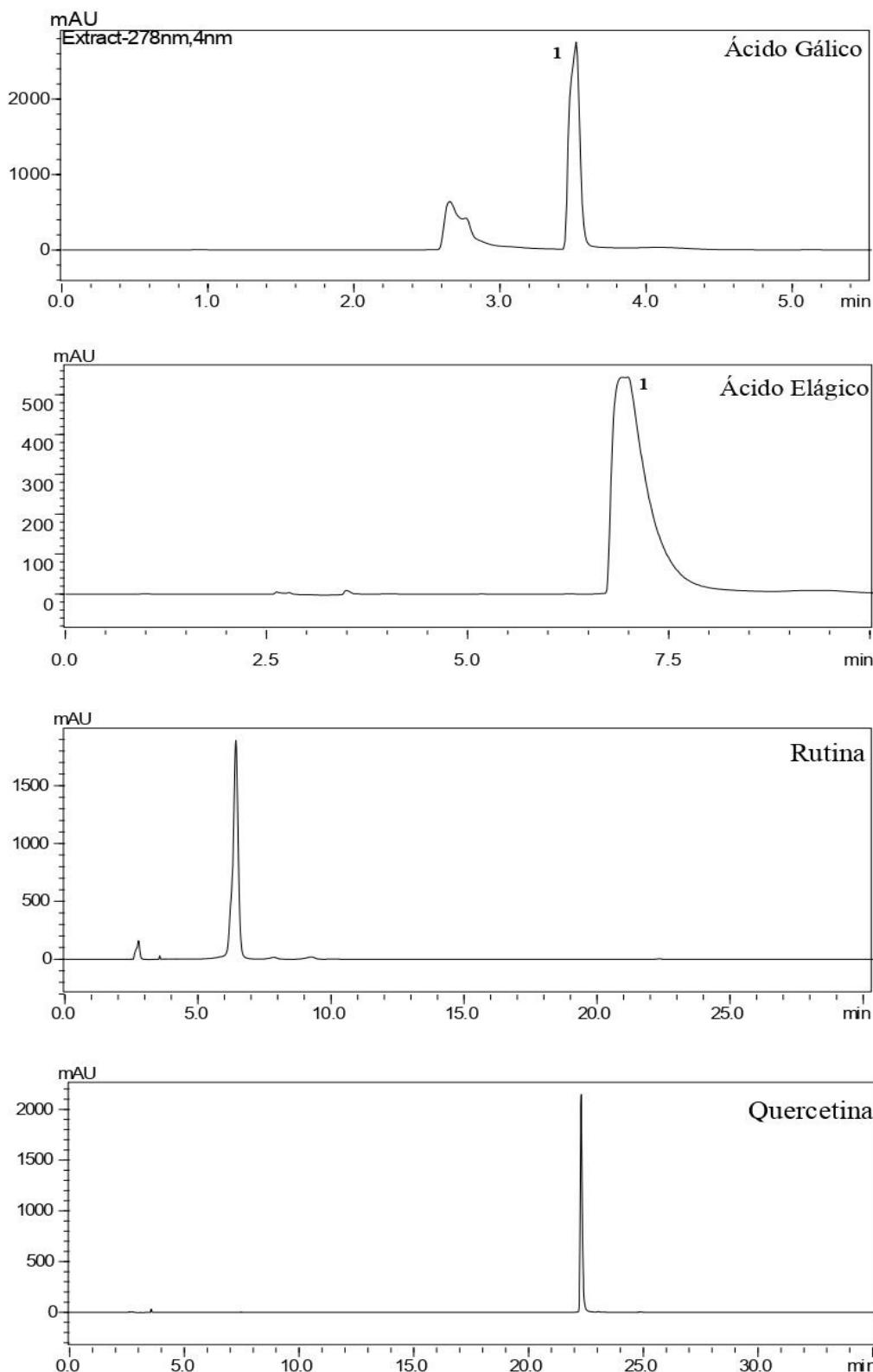
provenientes dos ensaios de biofilme e mecanismo foram compiladas utilizando o programa GraphPad Prism® 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterização química dos extratos foliares de *C. coriaceum* Wittm.

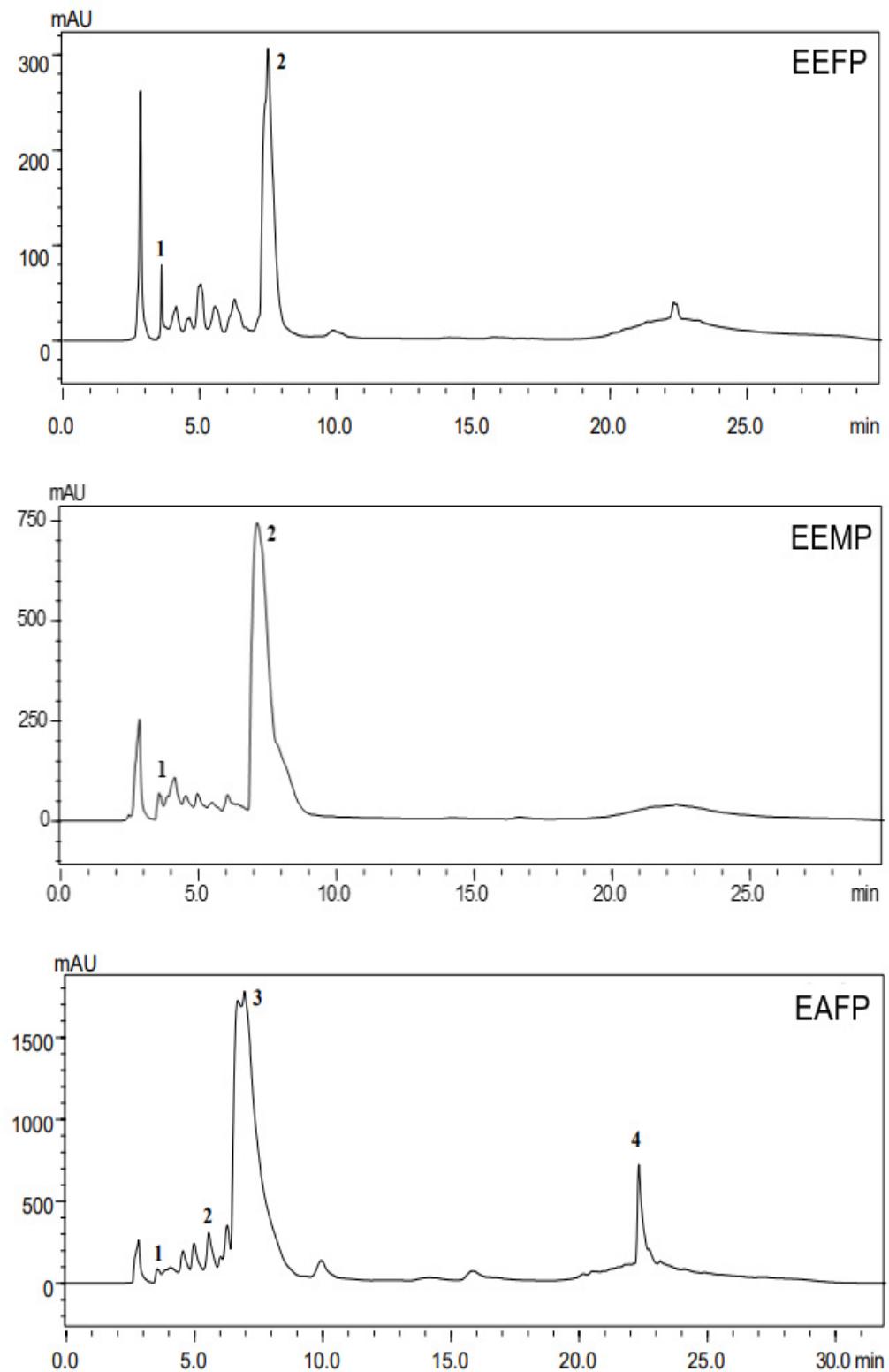
Os extratos EAfp, EMfp e EEfp foram analisados por HPLC. As amostras foram identificadas pela comparação com o tempo de retenção ( $T_R$ ) dos padrões de referência ácido gálico ( $T_R = 3,5$  min), ácido elágico ( $T_R = 7,18$  min), rutina ( $T_R = 6,4$  min) e quercetina ( $T_R = 22,28$  min) (Figura 10). A amostra EAfp revelou a presença de ácido gálico ( $T_R = 3,60$  min, pico 1), rutina ( $T_R = 6,26$  min, pico 2), ácido elágico ( $T_R = 7,81$  min, pico 3) e quercetina ( $T_R = 22,36$  min, pico 4). Já EMfp e EEfp apresentaram somente ácido gálico ( $T_R = 3,60$  min, pico 1) e ácido elágico ( $T_R = 7,81$  min, pico 2) em sua composição (Figura 11). As concentrações dos elementos estão disponíveis na Tabela 2. A Figura 12 demonstra a estrutura química dos compostos identificados na análise.

**Figura 10:** Padrões de referência para caracterização de compostos químicos.



Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD demonstrando os picos correspondentes aos padrões analíticos ácido elágico, ácido gálico, rutina e quercetina, indicando os tempos de retenção ( $T_R$ ) de cada composto analisado.

**Figura 11:** Representação gráfica dos perfis de HPLC dos extratos EAfp, EMfp e EEfp.

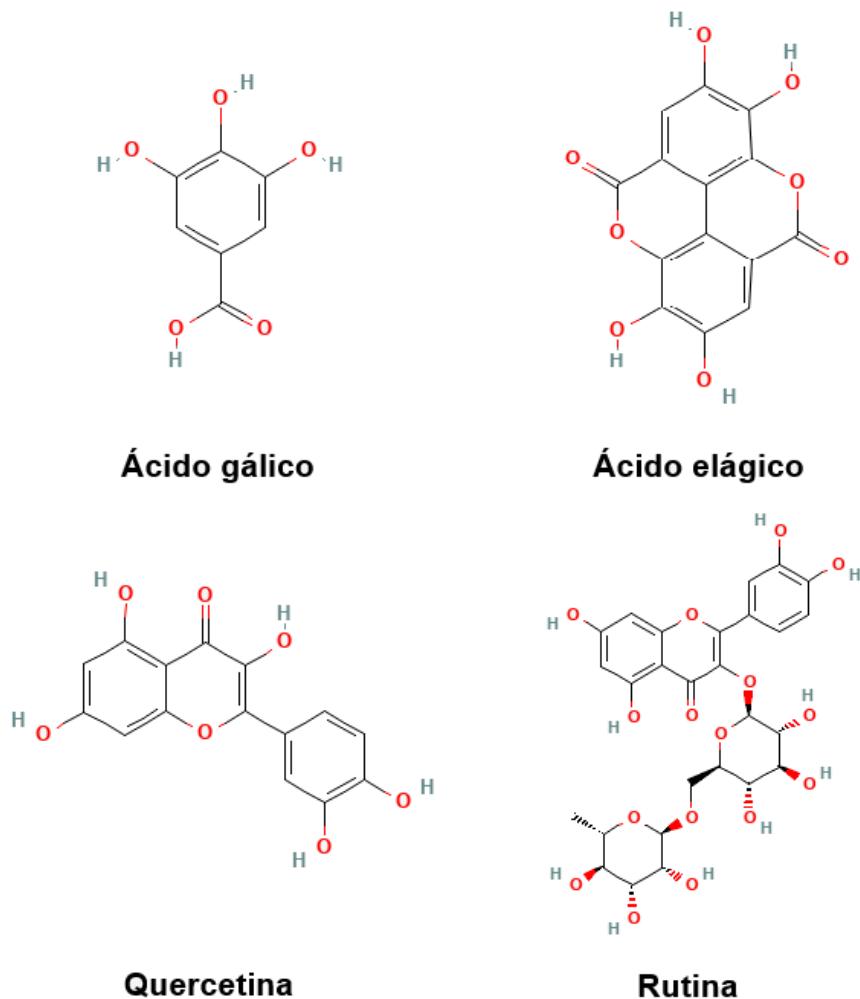


Cromatogramas gerados após injeção das amostras. Os picos correspondem ao tempo de retenção ( $T_R$ ) específicos de cada componente presente na amostra. EAfp: extrato acetato de folha de pequi; EMfp: extrato metanólico de folha de pequi; EEfp: extrato etanólico de folha de pequi

**Tabela 2:** Análise química dos extratos da folha de *C. coriaceum* Wittm. por HPLC.

| Extratos | Ácido Gálico<br>(mg/g extrato) | Ácido Elágico<br>(mg/g extrato) | Rutina<br>(mg/g extrato) | Quercetina<br>(mg/g extrato) |
|----------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| EAFP     | 4,33 ± 0,42                    | 20,19 ± 0,61                    | 9,94 ± 0,21              | 11,80 ± 0,35                 |
| EMFP     | 2,42 ± 0,14                    | 6,83 ± 0,74                     | –                        | –                            |
| EEFP     | 1,30 ± 0,33                    | 4,67 ± 0,66                     | –                        | –                            |

Resultados das concentrações dos compostos encontrados nas amostras, determinados por HPLC-DAD. EAFP: extrato acetato de folha de pequi; EMFP: extrato metanólico de folha de pequi; EEFP: extrato etanólico de folha de pequi.

**Figura 12:** Representação gráfica da estrutura química dos elementos encontrados nos extratos.

**Fonte:** PubChem (2025).

## **6.2 Extratos do pequi possuem atividade antifúngica contra *Candida* spp.**

A atividade dos extratos EEFP, EMFP e EAFP e dos antifúngicos (FLC, ITR e AMB) foi analisada frente a cepas clínicas de *Candida* spp. resistentes e sensíveis ao FLC. O extrato EEFP demonstrou atividade antifúngica com valores de CIM variando de 0,5 a 8 µg/mL. As CIMs do extrato EMFP encontraram-se entre 1 e 16 µg/mL. Por outro lado, o EAFP apresentou CIMs de 8 a 512 µg/mL, indicando uma variação maior na sua eficácia antifúngica. Os antifúngicos FLC, ITR e AMB apresentaram faixas variando de 0,12 a 32 µg/mL, de 0,06 a 2 µg/mL e de 0,25 a 1 µg/mL, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3:** Atividade antifúngica dos extratos de *C. coriaceum* Wittm. e antifúngicos FLC, ITR e AMB.

| Cepas <sup>b</sup>                | Isolado <sup>a</sup> |      |      |   |      |      |      |
|-----------------------------------|----------------------|------|------|---|------|------|------|
|                                   | Extratos             |      |      | Antifúngicos                              |      |      |      |
|                                   | EAFP                 | EMFP | EEFP | CIM 50% ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>c</sup> | FLC  | ITR  | AMB  |
| <i>C. parapsilosis</i>            | 64                   | 8    | 2    |   | 1    | 0,25 | 0,5  |
| ATCC 22019                        |                      |      |      |   |      |      | 1    |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258        | 32                   | 4    | 4    |   | 16   | 0,25 | 1    |
| <i>C. parapsilosis</i> 1          | 8                    | 1    | 0,5  |   | 32   | 2    | 1    |
| <i>C. albicans</i> 1              | 512                  | 16   | 8    |   | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| <i>C. tropicalis</i> 1            | 128                  | 16   | 8    |   | 0,12 | 0,06 | 0,25 |
| <i>C. albicans</i> 2 <sup>Δ</sup> | 64                   | 16   | 8    |   | 16   | 1    | 0,5  |
| <i>C. tropicalis</i> 2            | 32                   | 4    | 4    |   | 16   | 0,5  | 1    |
|                                   |                      |      |      |   |      |      | 2    |

<sup>a</sup> O procedimento foi realizado conforme protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) para medicamentos isolados. <sup>b</sup> Cepas isoladas da coleção. <sup>c</sup> CIM 50%, concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento dos organismos em 50% após incubação por 24 horas. <sup>d</sup> CIM 100%, concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento dos organismos em 100% após incubação por 24 horas. <sup>Δ</sup> Isolado selecionado para experimentos de citometria de fluxo e biofilme maduro. EAFP: extrato acetato de folha de pequi; EMFP: extrato metanólico de folha de pequi; EEFP: extrato etanólico de folha de pequi; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; AMB: anfotericina B.

### **6.3 Interações entre extratos de pequi com antifúngicos frente a *Candida spp.***

No que diz respeito às interações do EAfp com antifúngicos, houve atividade aditiva em 71,42% (n= 5) das cepas tanto quando combinado com FLC como quando associado ao ITR. EAfp exibiu ainda 100% (n= 7) de efeito sinérgico quando combinado com AMB (Tabela 4). Como demonstrado na Tabela 5, o extrato EMFP apresentou 57,14% (n= 4) de efeito aditivo em associação com o FLC, 71,42% (n= 5) de efeito aditivo com ITR e 85,71% (n= 6) de sinergismo quando combinado com AMB. A associação do EEFp a antifúngicos, por sua vez, resultou em uma predominância de interações indiferentes em 57,14% (n = 4) das cepas avaliadas quando associado ao FLC. Além disso, foi constatado 42,86% (n = 3) de efeito aditivo quando combinado com ITR e 85,71% (n = 6) de sinergismo quando associado à AMB (Tabela 6). Dessa forma, nos casos onde houve sinergismo, em comparação ao tratamento com os ativos sozinhos, a interação entre EAfp e AMB resultou em uma diminuição de quatro a 16 vezes na CIM, enquanto as combinações de EMFP e EEFp com AMB reduziram a CIM em aproximadamente quatro vezes.

**Tabela 4:** Atividade antifúngica do extrato EAFP associado aos antifúngicos FLC, ITR e AMB.

| Cepas <sup>c</sup>                   | CIM <sup>a</sup> (µg/ml) |      |      |               |      |      |      |               |      |      |      |               |
|--------------------------------------|--------------------------|------|------|---------------|------|------|------|---------------|------|------|------|---------------|
|                                      | Combinado                |      |      |               |      |      |      |               |      |      |      |               |
|                                      | EAFP                     | FLC  | ICIF | Interpretação | EAFP | ITR  | ICIF | Interpretação | EAFP | AMB  | ICIF | Interpretação |
| <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC 22019 | 32                       | 0,5  | 1    | AD            | 32   | 0,12 | 0,98 | AD            | 4    | 0,03 | 0,13 | SIN           |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258           | 16                       | 8    | 1    | AD            | 16   | 0,12 | 0,98 | AD            | 4    | 0,12 | 0,25 | SIN           |
| <i>C. parapsilosis</i> 1             | 4                        | 16   | 1    | AD            | 4    | 1    | 1    | AD            | 2    | 0,25 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. albicans</i> 1                 | 512                      | 0,25 | 2    | IND           | 512  | 0,25 | 2    | IND           | 64   | 0,03 | 0,25 | SIN           |
| <i>C. tropicalis</i> 1               | 128                      | 0,12 | 2    | IND           | 128  | 0,06 | 2    | IND           | 16   | 0,03 | 0,25 | SIN           |
| <i>C. albicans</i> 2 <sup>Δ</sup>    | 32                       | 8    | 1    | AD            | 32   | 0,5  | 1    | AD            | 8    | 0,06 | 0,25 | SIN           |
| <i>C. tropicalis</i> 2               | 16                       | 8    | 1    | AD            | 16   | 0,25 | 1    | AD            | 8    | 0,25 | 0,5  | SIN           |

<sup>a</sup> CIM, concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento dos organismos em 50% após incubação por 24 horas. <sup>b</sup> Combinação do extrato com antifúngicos. <sup>c</sup> Cepas isoladas da coleção. <sup>Δ</sup> Isolado selecionado para experimentos de citometria de fluxo e biofilme maduro. EAFP: extrato acetato de folha de pequi; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; AMB: anfotericina B; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; SIN: sinérgico; AD: aditivo; IND: indiferente.

**Tabela 5:** Atividade antifúngica do extrato EMFP associado aos antifúngicos FLC, ITR e AMB.

| Cepas <sup>c</sup>                | CIM <sup>a</sup> (µg/ ml) |      |      |           |      |      |      |           |      |      |      |            |
|-----------------------------------|---------------------------|------|------|-----------|------|------|------|-----------|------|------|------|------------|
|                                   | Combinado <sup>b</sup>    |      |      |           |      |      |      |           |      |      |      |            |
|                                   | EMFP                      | FLC  | ICIF | Interpret | EMFP | ITR  | ICIF | Interpret | EMFP | AMB  | ICIF | Interpreta |
|                                   |                           |      |      | ação      |      |      |      | ação      |      |      |      | çao        |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | 4                         | 0,5  | 1    | AD        | 2    | 0,06 | 0,49 | SIN       | 2    | 0,12 | 0,5  | SIN        |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258        | 2                         | 8    | 1    | AD        | 2    | 0,12 | 0,98 | AD        | 1    | 0,25 | 0,5  | SIN        |
| <i>C. parapsilosis</i> 1          | 1                         | 32   | 2    | IND       | 1    | 2    | 2    | IND       | 0,5  | 0,5  | 1    | AD         |
| <i>C. albicans</i> 1              | 16                        | 0,25 | 2    | IND       | 8    | 0,12 | 0,98 | AD        | 4    | 0,06 | 0,5  | SIN        |
| <i>C. tropicalis</i> 1            | 16                        | 0,12 | 2    | IND       | 8    | 0,03 | 1    | AD        | 4    | 0,06 | 0,5  | SIN        |
| <i>C. albicans</i> 2 <sup>Δ</sup> | 8                         | 8    | 1    | AD        | 8    | 0,5  | 1    | AD        | 4    | 0,12 | 0,5  | SIN        |
| <i>C. tropicalis</i> 2            | 2                         | 8    | 1    | AD        | 2    | 0,25 | 1    | AD        | 1    | 0,25 | 0,5  | SIN        |

<sup>a</sup> CIM, concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento dos organismos em 50% após incubação por 24 horas. <sup>b</sup> Combinação do extrato com antifúngicos. <sup>c</sup> Cepas isoladas da coleção. <sup>Δ</sup> Isolado selecionado para experimentos de citometria de fluxo e biofilme maduro. EMFP: extrato metanólico de folha de pequi; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; AMB: anfotericina B; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; SIN: sinérgico; AD: aditivo; IND: indiferente.

**Tabela 6:** Atividade antifúngica do extrato EEFP associado aos antifúngicos FLC, ITR e AMB.

| Cepas <sup>c</sup>                | CIM <sup>a</sup> (µg/ml) |      |      |               |      |      |      |               |      |      |      |               |
|-----------------------------------|--------------------------|------|------|---------------|------|------|------|---------------|------|------|------|---------------|
|                                   | Combinado <sup>b</sup>   |      |      |               |      |      |      |               |      |      |      |               |
|                                   | EEFP                     | FLC  | ICIF | Interpretação | EEFP | ITR  | ICIF | Interpretação | EEFP | AMB  | ICIF | Interpretação |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | 2                        | 1    | 2    | IND           | 2    | 0,25 | 2    | IND           | 0,5  | 0,12 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258        | 2                        | 8    | 1    | AD            | 2    | 0,12 | 0,98 | AD            | 1    | 0,25 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. parapsilosis</i> 1          | 0,5                      | 32   | 2    | IND           | 0,5  | 2    | 2    | IND           | 0,25 | 0,5  | 1    | AD            |
| <i>C. albicans</i> 1              | 8                        | 0,25 | 2    | IND           | 4    | 0,12 | 0,98 | AD            | 2    | 0,06 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. tropicalis</i> 1            | 8                        | 0,12 | 2    | IND           | 8    | 0,06 | 2    | IND           | 2    | 0,06 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. albicans</i> 2 <sup>Δ</sup> | 4                        | 8    | 1    | AD            | 4    | 0,5  | 1    | AD            | 2    | 0,12 | 0,5  | SIN           |
| <i>C. tropicalis</i> 2            | 2                        | 8    | 1    | AD            | 2    | 0,25 | 1    | AD            | 1    | 0,25 | 0,5  | SIN           |

<sup>a</sup> CIM, concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento dos organismos em 50% após incubação por 24 horas. <sup>b</sup> Combinação do extrato com antifúngicos. <sup>c</sup> Cepas isoladas da coleção. <sup>Δ</sup> Isolado selecionado para experimentos de citometria de fluxo e biofilme maduro. EEFP: extrato etanólico de folha de pequi; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; AMB: anfotericina B; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; SIN: sinérgico; AD: aditivo; IND: indiferente.

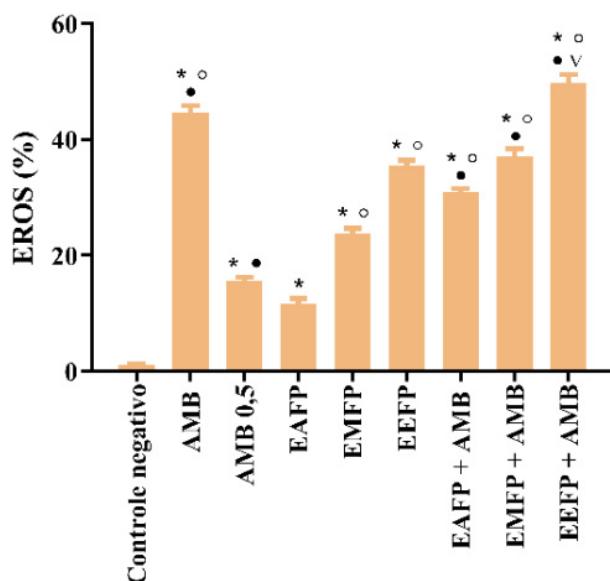
## 6.4 Avaliação do mecanismo de ação por citometria de fluxo

### 6.4.1 O tratamento com extratos do pequi estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em *C. albicans*

Houve um aumento na produção de EROS significativamente estatístico ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos em comparação com o controle negativo. A geração de EROS foi de  $44,73 \pm 4,65\%$  no tratamento com AMB (4 µg/ml) e  $15,37 \pm 1,37\%$  no tratamento com AMB 0,5. Com relação aos extratos isolados do pequi, a produção foi de  $10,58 \pm 2,02\%$  para EAfp,  $24,25 \pm 2,13\%$  para EMfp e  $35,96 \pm 2,14\%$  para EEfp. A formação de EROS também foi elevada em EAfp + AMB ( $30,4 \pm 1,57\%$ ), EMfp + AMB ( $37,21 \pm 3,26\%$ ) e em EEfp + AMB ( $49,93 \pm 3,54\%$ ) em comparação ao controle negativo (Figura 13).

A produção de EROS foi significativamente estatística ( $p < 0,05$ ) em EMfp, EEfp, EAfp + AMB, EMfp + AMB e EEfp + AMB quando comparados à AMB 0,5. Já quando comparado ao controle de morte (AMB), houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da produção de EROS na associação EEfp + AMB. Os extratos isolados foram comparados com sua respectiva associação à AMB. Quando a comparação se deu em relação ao efeito de EAfp, EMfp e EEfp, a produção de EROS foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as devidas associações (EAfp + AMB, EMfp + AMB e EEfp + AMB) (Figura 13).

**Figura 13:** Análise do estímulo do pequi na produção de espécies reativas de oxigênio por *C. albicans*.



(\*)  $p < 0,05$  em comparação ao controle negativo (não tratado), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (°)  $p < 0,05$  em comparação a AMB 0,5 (0,5 µg/ml), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

(•) p<0,05 em comparação ao extrato isolado em sua respectiva associação (EAFP, EMFP ou EEFP), de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (▼) p<0,05 em comparação a AMB (4 µg/ml - controle de morte), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. AMB: 4 µg/ml. AMB 0,5: 0,5 µg/ml. EAFP: 64 µg/ml. EMFP: 16 µg/ml. EEFP: 8 µg/ml. EAFP + AMB: EAFP 8 µg/ml + AMB 0,06 µg/ml. EMFP + AMB: EMFP 4 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml. EEFP + AMB: EEFP 2 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml.

#### **6.4.2 A exposição a extratos do pequi reduz a viabilidade celular e induz *C. albicans* à apoptose**

Todos os tratamentos avaliados resultaram em uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da densidade celular, indicada pelo aumento de células marcadas positivamente com iodeto de propídio (PI), em comparação com o controle ( $2,65 \pm 0,09\%$ ) após 24 horas de exposição (Figura 14A). O extrato EAFP apresentou uma redução de aproximadamente 44,16% ( $1,48 \pm 0,07\%$ ) na densidade celular, enquanto o EMFP correspondeu a cerca de 48,31% ( $1,37 \pm 0,07\%$ ). Já o tratamento com EEFP resultou em uma diminuição da densidade em torno de 58,5% ( $1,1 \pm 0,11\%$ ), todas em concentração equivalente ao CIM. Em relação à atividade dos ativos associados, quando comparados ao controle negativo, a redução da densidade celular foi de aproximadamente 81,14% ( $0,5 \pm 0,06\%$ ) em EAFP + AMB, 81,11% ( $0,48 \pm 0,04\%$ ) em EMFP + AMB e 86,42% ( $0,36 \pm 0,02\%$ ) quando tratadas com EEFP + AMB.

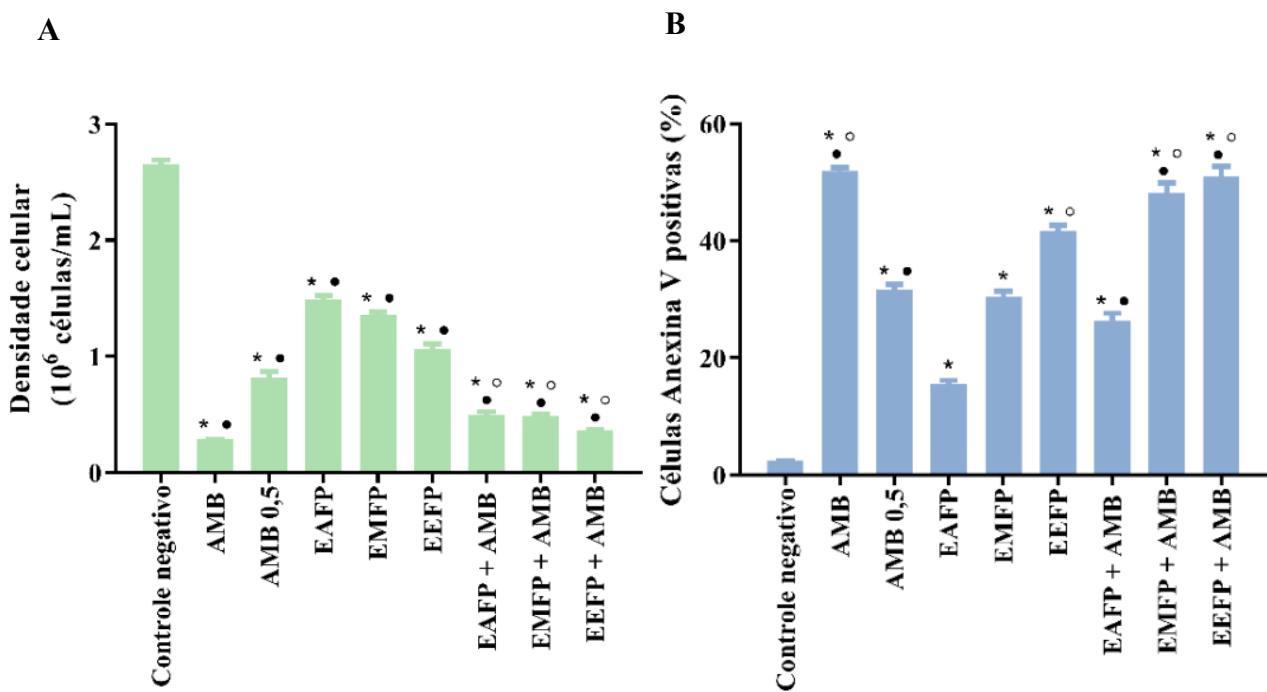
Quando os resultados são comparados com AMB 0,5 ( $0,78 \pm 0,13\%$ ), observou-se uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da densidade celular nos tratamentos combinados dos extratos com AMB. A combinação de EAFP + AMB resultou em uma redução da viabilidade celular para 35,9% ( $0,5 \pm 0,06\%$ ), enquanto EMFP + AMB apresentou uma diminuição de 38,47% ( $0,48 \pm 0,04\%$ ), e a associação EEFP + AMB foi responsável por uma redução de 53,85% ( $0,36 \pm 0,02\%$ ). Os tratamentos com extratos isolados obtiveram resultado significativo quando comparados com AMB 0,5. A alteração na densidade celular foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) no que diz respeito ao efeito de todos os extratos isolados quando comparados às suas devidas combinações com AMB (Figura 14A). A significativa redução da viabilidade das células de *C. albicans* nas associações de extratos com AMB, quando comparadas a AMB 0,5 e aos extratos isolados, sugere que a diminuição ocorreu por ação sinérgica entre as moléculas.

As células de *C. albicans* foram expostas a diferentes tratamentos por 24 horas para avaliação da porcentagem celular com fosfatidilserina externalizada, indicando processo apoptótico ativo (Figura 14B). Houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de células apoptóticas em todos os tratamentos em comparação com o controle negativo ( $2,37 \pm 0,14\%$ ). Verificou-se processo apoptótico de  $52,8 \pm 4,09\%$  no tratamento com AMB e  $32,45 \pm 2,5\%$

para AMB 0,5. Quanto aos extratos isolados, o número de células apoptóticas foi para EAfp, EMfp e EEfp de  $15,7 \pm 1,52\%$ ,  $30,15 \pm 2,35\%$  e  $41,74 \pm 2,43\%$ , respectivamente. Já para os extratos associados à AMB, o número de células apoptóticas foi mais expressivo, sendo de  $25,79 \pm 3,11\%$  para EAfp + AMB,  $48,35 \pm 4,32\%$  para EMfp + AMB e  $51,29 \pm 4,11\%$  quando o tratamento foi feito com EEfp + AMB.

Observou-se uma diferença significativa ( $p<0,05$ ) nas células expressando fosfatidilserina tratadas com AMB, EEfp, EMfp + AMB e EEfp + AMB quando comparadas com AMB 0,5. Com relação ao efeito dos tratamentos, as associações com AMB foram comparadas aos seus respectivos extratos isolados, demonstrando percentuais significativos ( $p<0,05$ ) de células apoptóticas (Figura 14B).

**Figura 14:** Avaliação dos efeitos dos extratos de queijo na viabilidade e indução de apoptose em *C. albicans*.

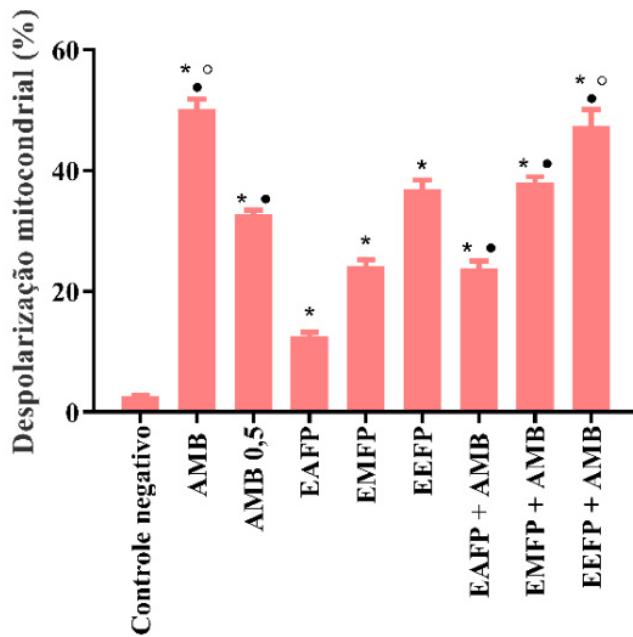


(\*)  $p<0,05$  em comparação ao controle negativo (não tratado), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (°)  $p<0,05$  em comparação a AMB 0,5 (0,5  $\mu$ g/ml), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (•)  $p<0,05$  em comparação ao extrato isolado em sua respectiva associação (EAfp, EMfp ou EEfp), de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. AMB: 4  $\mu$ g/ml. AMB 0,5: 0,5  $\mu$ g/ml. EAfp: 64  $\mu$ g/ml. EMfp: 16  $\mu$ g/ml. EEfp: 8  $\mu$ g/ml. EAfp + AMB: EAfp 8  $\mu$ g/ml + AMB 0,06  $\mu$ g/ml. EMfp + AMB: EMfp 4  $\mu$ g/ml + AMB 0,125  $\mu$ g/ml. EEfp + AMB: EEfp 2  $\mu$ g/ml + AMB 0,125  $\mu$ g/ml.

#### 6.4.3 Modificação do potencial transmembrana mitocondrial ( $\delta\psi_m$ ) em *C. albicans* induzida por extratos de *C. coriaceum*

Foi evidenciada alteração estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), em relação ao controle negativo ( $2,7 \pm 0,22\%$ ), na despolarização induzida por extratos do pequi (Figura 15). As células foram expostas a extratos isolados e combinados com AMB, bem como AMB (controle de morte) e AMB 0,5. Quando comparadas ao controle negativo, o percentual de despolarização mitocondrial foi para EAfp, EMfp e EEfp de  $13,22 \pm 1,9\%$ ,  $23,58 \pm 2,52\%$  e  $37,88 \pm 3,62\%$ , respectivamente, sendo essa modificação de  $50,62 \pm 5,55\%$  para AMB e  $32,59 \pm 1,97\%$  em AMB 0,5. No que se refere à associação dos extratos do pequi à AMB, essa diferença foi de  $23,11 \pm 3,23\%$  em EAfp + AMB,  $37,9 \pm 2,45\%$  para EMfp + AMB e  $45,27 \pm 6,58\%$  para EEfp + AMB. Quando comparadas à AMB 0,5, somente a associação de EEfp + AMB e AMB isolada demonstraram resultados significativos ( $p < 0,05$ ). Comparando os tratamentos com EAfp, EMfp e EEfp isolados com suas específicas combinações com AMB, houve diferença significativamente estatística ( $p < 0,05$ ) em todos os resultados.

**Figura 15:** Alterações na membrana mitocondrial de *C. albicans* induzida por extratos de *C. coriaceum*.



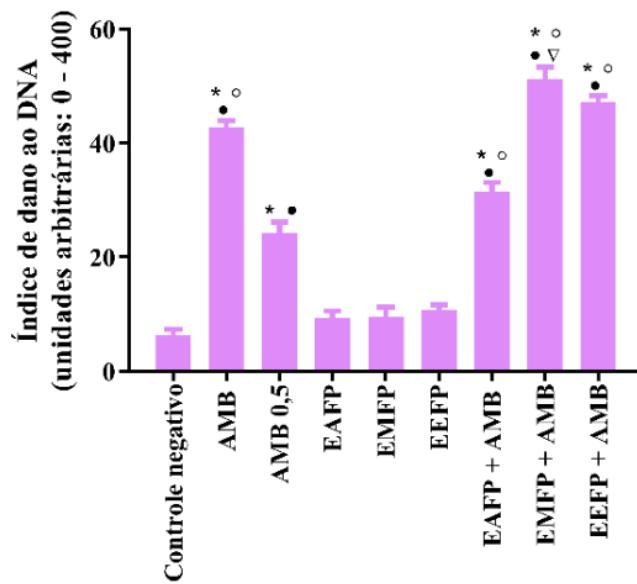
(\*)  $p<0,05$  em comparação ao controle negativo (não tratado), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (○)  $p<0,05$  em comparação a AMB 0,5 (0,5 µg/ml), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (•)  $p<0,05$  em comparação ao extrato isolado em sua respectiva associação (EAfp, EMfp ou EEfp), de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. AMB: 4 µg/ml. AMB 0,5: 0,5 µg/ml. EAfp: 64 µg/ml. EMfp: 16 µg/ml. EEfp: 8 µg/ml. EAfp + AMB: EAfp 8 µg/ml + AMB 0,06 µg/ml. EMfp + AMB: EMfp 4 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml. EEfp + AMB: EEfp 2 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml.

#### 6.4.4 Extratos de pequi associados à AMB danificam o DNA de *C. albicans*

Após um período de tratamento de 24 horas das células de *C. albicans* utilizando o ensaio do cometa alcalino, os extratos isolados do pequi (EAFP,  $9,5 \pm 2,38$ ; EMFP,  $9,5 \pm 4,23$  e EEFP,  $10 \pm 2,33$ ) demonstraram índice de danos mínimos ao DNA em comparação com o controle não tratado (controle negativo). Em relação ao controle negativo, observou-se alteração significativa ( $p < 0,05$ ) no índice de danos ao DNA de  $42 \pm 4,82$  para o tratamento com AMB e de  $24 \pm 3,31$  para AMB 0,5. Resultados significativos também foram observados nos tratamentos com EAFP + AMB ( $31,5 \pm 3,83$ ), EMFP + AMB ( $53 \pm 5,3$ ) e EEFP + AMB ( $47,5 \pm 2,85$ ) (Figura 16).

Em comparação ao tratamento com AMB 0,5, o dano ao DNA foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em AMB, EAFP + AMB, EMFP + AMB e EEFP + AMB. O tratamento que produziu danos ao DNA de forma mais exacerbada foi a associação EMFP + AMB, superando inclusive o dano gerado pelo controle de morte (AMB). Comparando o efeito dos extratos isolados com EAFP + AMB, EMFP + AMB e EEFP + AMB, houve diferença significativa no índice de dano em todos os tratamentos (Figura 16).

**Figura 16:** Extratos de *C. coriaceum* associados a AMB causam danos ao DNA de *C. albicans*.



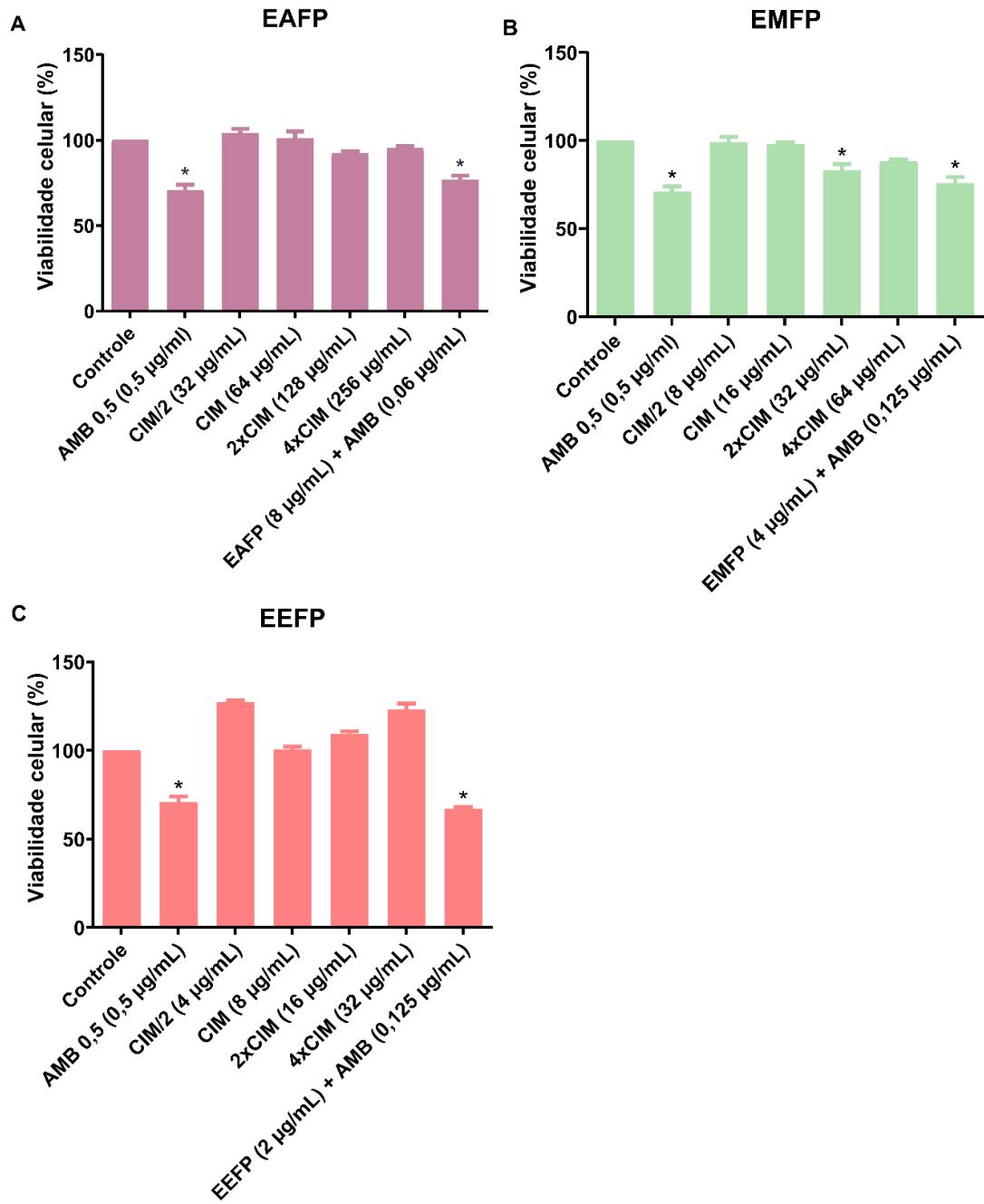
(\*)  $p < 0,05$  em comparação ao controle negativo (não tratado), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (^)  $p < 0,05$  em comparação a AMB 0,5 (0,5 µg/ml), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (•)  $p < 0,05$  em comparação ao extrato isolado em sua respectiva associação (EAFP, EMFP ou EEFP), de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (^)  $p < 0,05$  em comparação a AMB (4 µg/ml - controle de morte), de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. AMB: 4 µg/ml. AMB 0,5: 0,5 µg/ml. EAFP: 64 µg/ml. EMFP: 16 µg/ml. EEFP: 8 µg/ml. EAFP + AMB: EAFP 8 µg/ml + AMB 0,06 µg/ml. EMFP + AMB: EMFP 4 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml. EEFP + AMB: EEFP 2 µg/ml + AMB 0,125 µg/ml.

## 6.5 Ensaios com biofilmes maduros de *C. albicans*

O ensaio colorimétrico utilizando MTT foi conduzido para avaliar a viabilidade do biofilme maduro após a exposição a diferentes concentrações dos extratos de pequi sozinhos e associados à AMB. Os extratos EAFP e EEFP não demonstraram redução significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade dos biofilmes maduros de *C. albicans* em nenhuma das concentrações isoladas (CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM), apenas quando combinado com AMB (EAFP + AMB;  $22,9 \pm 4,5\%$  e EEFP + AMB;  $32,8 \pm 1,8\%$ ). Já o EMFP mostrou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de aproximadamente  $16,9 \pm 6,1\%$  na concentração de 2x CIM e  $24,1 \pm 5,9\%$  quando associado a AMB (EMFP + AMB). Em comparação com o controle positivo, a AMB 0,5 reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade em  $29 \pm 5,2\%$ . No entanto, não houve redução quando os extratos foram comparados com AMB 0,5 (Figura 17).

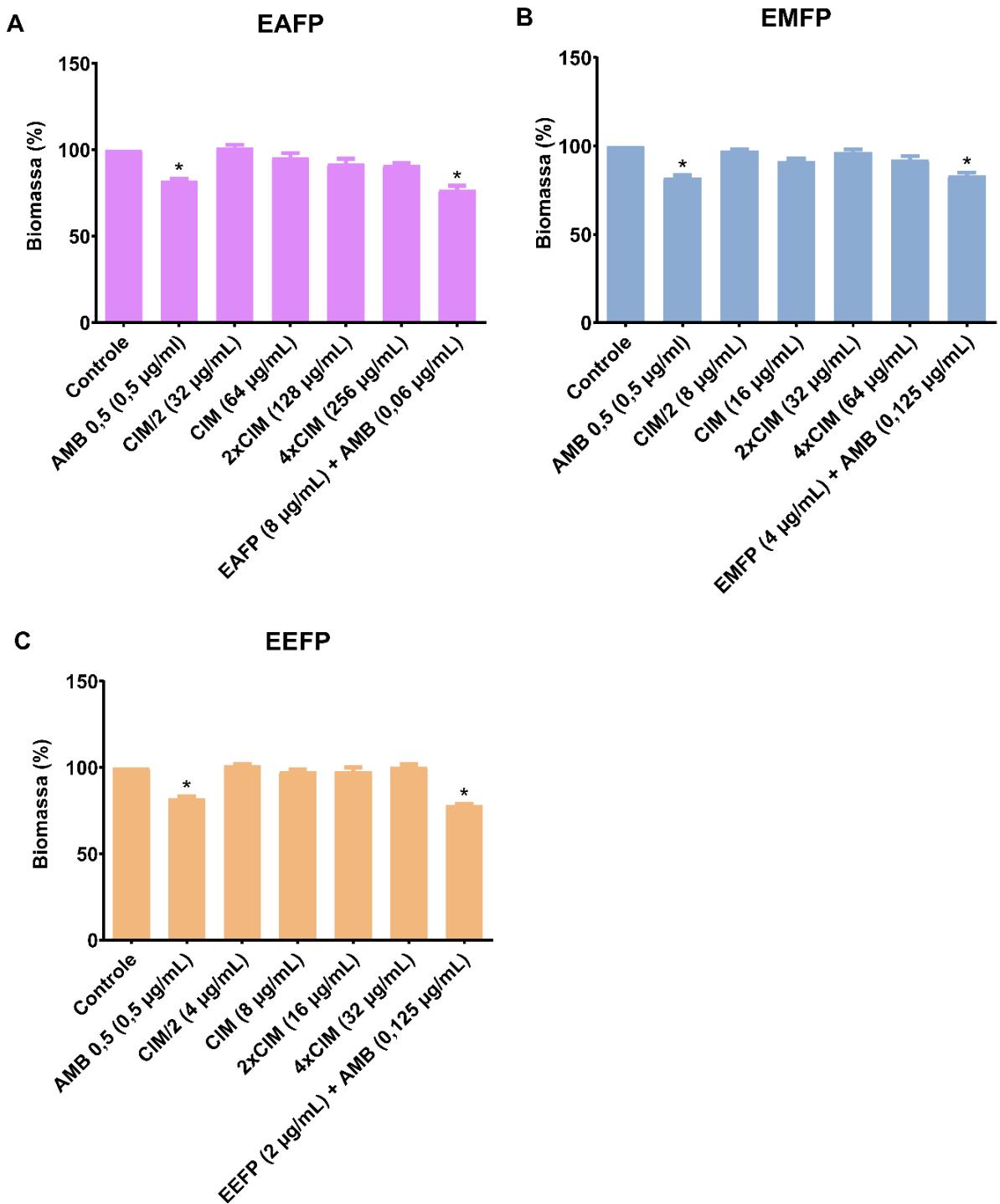
O ensaio com cristal violeta foi empregado para avaliar a quantidade de biomassa presente nos biofilmes maduros após o tratamento com extratos sozinhos e em combinação com AMB. Os extratos isolados não foram capazes de reduzir a biomassa. A redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle só foi observada nas associações com AMB, sendo elas EAFP + AMB ( $23,2 \pm 4,2\%$ ), EMFP + AMB ( $16,7 \pm 2,8\%$ ) e EEFP + AMB ( $21,9 \pm 1,7\%$ ). AMB 0,5 reduziu a biomassa em  $17,9 \pm 2,3\%$ , quando comparada ao controle. Não houve redução quando os extratos foram comparados a AMB 0,5 (Figura 18).

**Figura 17:** Avaliação do efeito dos extratos do pequi sobre viabilidade de biofilme maduro de *C. albicans*.



(\*) p<0,05 em comparação ao controle, de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

**Figura 18:** Atividade dos extratos do pequi sobre a biomassa de biofilme maduro de *C. albicans*.



(\*) p<0,05 em comparação ao controle, de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

## 6.6 Atividade de extratos de *C. coriaceum* Wittm sobre a viabilidade de linfócitos humanos

O teste de citotoxicidade demonstrou que a concentração inibitória média (IC50) dos extratos do pequi foram de  $249,26 \pm 8,71 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $261,58 \pm 4,25 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $232,77 \pm 6,52 \mu\text{g}/\text{ml}$  para EAFP, EMFP e EEFP, respectivamente, após 24 h de exposição.

## 7. DISCUSSÃO

As doenças causadas por *Candida* spp. são cada vez mais frequentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Infecções fúngicas potencialmente fatais afetam cerca de 6,55 milhões de pessoas todos os anos, com estimativa de 626.081 casos anuais de candidemia (Denning, 2024). *Candida* spp. é responsável por aproximadamente 10% das infecções de corrente sanguínea nosocomiais (Lass-Flörl *et al.*, 2024).

As infecções por *Candida* spp. refletem em um grande impacto na saúde e na vida financeira dos pacientes, como maior tempo de internação nas unidades de tratamento e o aumento do desconforto do paciente (Nascimento *et al.*, 2024). Sem vacinas disponíveis no mercado e com o aumento considerável nos índices de resistência, novas alternativas são necessárias para reduzir as taxas de mortalidade dessas infecções, diminuir o uso indiscriminado de antimicrobianos e tratar infecções por fungos resistentes (Denning, 2024). Nesse sentido, este estudo buscou avaliar o potencial antifúngico de extratos foliares de *C. coriaceum* como uma alternativa no tratamento de infecções por cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao FLC, bem como identificar os mecanismos de ação envolvidos.

Corroborando com a caracterização química, os compostos encontrados neste trabalho estão de acordo com o evidenciado na literatura, demonstrando a presença de compostos fenólicos e flavonóides (Araruna *et al.*, 2013; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). Diversos elementos bioativos exibem efeitos farmacológicos. Entre eles, destacam-se aqui os flavonóides quercetina e seu glicosídeo rutina, encontrados no EAfp. Flavonóides são reconhecidos por suas propriedades antifúngicas, bem como antioxidantes, ou seja, possuem capacidade de eliminar radicais livres (Al-Aboody; Mickymaray, 2020; Almeida-Bezerra *et al.*, 2022; Alves *et al.*, 2017). Já são documentadas propriedades antifúngicas frente a *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., por exemplo, nos compostos encontrados nos extratos avaliados neste estudo, como o ácido gálico (Liberato *et al.*, 2022), quercetina (Djouossi *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016), rutina (Oliveira *et al.*, 2016) e ácido elágico (Rossatto *et al.*, 2021).

Este estudo evidencia a atividade antifúngica dos extratos das folhas de *C. coriaceum* Wittm. contra diversas espécies do gênero *Candida*. Morales *et al.*, (2008) propuseram uma classificação de extratos quanto a sua atividade antimicrobiana com base no valor da CIM. A CIM < 100 µg/mL é considerada como uma boa atividade, 100 – 500 µg/mL é moderada, 500 – 1000 µg/mL é fraca, e acima de 1000 µg/mL, o extrato é inativo. Portanto, os extratos EMFP e EEFP demonstraram boa atividade contra todas as cepas testadas. O extrato EAfp exibiu boa

atividade contra cinco cepas avaliadas, enquanto sua atividade variou de moderada a fraca contra uma cepa de *C. tropicalis* e uma de *C. albicans*, respectivamente.

Os resultados indicam que os extratos apresentam efeito antifúngico em concentrações baixas, e que seu efeito se estende a diversas espécie do gênero *Candida*, atuando inclusive sobre aquelas que são resistentes ao FLC. Há um número limitado de estudos que investigam a atividade antifúngica de extratos foliares de *C. coriaceum* Wittm. A maioria das investigações nesta área tem tido o mesocarpo e a casca do fruto como foco de estudo.

Naruzawa e Papa (2011) identificaram que extratos hidroalcoólicos de folhas *C. brasiliense* revelaram alta eficácia contra *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum gloeosporioides*, indicando um potencial uso na agricultura para o controle de fitopatógenos. Esses achados reforçam a ideia de que a atividade antifúngica associada ao gênero *Caryocar* não está limitada a uma única espécie, nem se restringe a patógenos humanos.

Em um estudo desenvolvido por Almeida-Bezerra *et al.* (2023) com extratos do mesocarpo de *C. coriaceum*, a CIM variou de 351 a > 1024 µg/ml em cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. A composição química desses extratos também demonstrou a presença de fenóis ( $11,26 \pm 1,01$  mg ácido gálico/g) e flavonoides ( $5,98 \pm 1,16$  mg quercetina/g), mas em concentrações diferentes das relatadas aqui. Dessa forma, é possível que a concentração desses compostos não seja a única responsável pela atividade antifúngica, mas sofre influência de possíveis metabólitos secundários não investigados neste estudo. Um dado que corrobora com esta hipótese é de que o extrato com maiores concentrações de fenóis e flavonoides (EAFP) não demonstrou a melhor atividade anti-*Candida*, ao passo que os extratos com menores quantidades (EMFP e EEFP) exibiram as menores CIMs em todas as cepas avaliadas, assim como o extrato investigado por Almeida-Bezerra *et al.* (2023), que possuía maiores concentrações. Portanto, é provável que a atividade antifúngica seja atribuível aos efeitos sinérgicos entre seus constituintes químicos.

Alves e colaboradores (2017) relataram o efeito antifúngico do extrato etanólico da casca e da polpa de *C. coriaceum* contra *Microsporum canis* e *Malassezia* spp. A CIM da polpa foi de 19,53 µg/mL frente a *Malassezia* spp. e de 4,88 µg/mL contra *M. canis*. Já o extrato da casca teve a CIM de 9,77 µg/mL frente a *Malassezia* spp. e 4,88 µg/mL para *M. canis*. Assim como em nosso estudo, eles também evidenciaram a presença de constituintes fenólicos e flavonoides, atribuindo a atividade antifúngica aos flavonoides quercetina, rutina e isoqueracetina. Além disso, os valores da CIM são próximos aos observados neste estudo, o que

sugere uma semelhança nos metabólitos presentes em diferentes partes da planta, sendo o solvente utilizado na extração um fator decisivo.

Resultados diferentes foram encontrados por Araruna *et al.* (2013); Martins e Castro (2015) e Passos *et al.* (2003), que constataram que o extrato hidroalcoólico, metanólico e o óleo essencial de espécies de *Caryocar* spp. não apresentaram atividade frente a *Candida* spp.

Essas divergências podem estar relacionadas à diferente composição química dos ativos, que pode variar de acordo com a forma de extração realizada; à região de origem da planta e à densidade pluviométrica do período de coleta, como demonstrado por Passos *et al.*, (2002) em seu estudo, no qual compararam extratos de *C. brasiliense* coletados em meses de alto (março; 207,9 mm de água) e baixo (outubro; 170,8 mm de água) índice pluviométrico. Em seu trabalho, a cera epicuticular da folha coletada em outubro apresentou melhor atividade frente ao *Cryptococcus neoformans*, inibindo o crescimento de 91,3% (21/23) dos isolados. Os autores relacionam esse achado ao mecanismo natural de defesa das plantas em resposta ao estresse ambiental ocasionado pelas mudanças sazonais.

Associar substâncias a fármacos antifúngicos é uma estratégia para aumentar a eficácia da ação antimicrobiana ou reduzir a dose desses fármacos (Almeida-Bezerra *et al.*, 2023; Morais-Braga *et al.*, 2017). Os resultados desse trabalho indicaram uma prevalência de interações aditivas e indiferentes quando os extratos foram associados a FLC e a ITR, e sinergismo quando foram combinados à AMB. A ausência de interações antagonicas indica que não há prejuízo à atividade antifúngica frente às cepas testadas, constatando uma possível associação vantajosa entre esses agentes (Rodrigues *et al.*, 2023).

Interações divergentes foram relatadas por Almeida-Bezerra *et al.* (2023), que observaram efeito sinérgico da associação de FLC ao extrato metanólico de *C. coriaceum* frente a *C. tropicalis* e antagonismo contra *C. albicans* e *C. krusei*. Já Retore *et al.*, (2024) relataram sinergismo entre o extrato etanólico de *C. brasiliense* Camb. e FLC, e interações aditivas com caspofungina e AMB frente a *C. auris*. Essas variações podem estar relacionadas às próprias características de resistência expressas pelas cepas analisadas e os diferentes componentes dos extratos.

Até o presente momento, não foram identificados estudos que tenham relatado a associação entre extratos de *C. coriaceum* a ITR ou AMB. FLC e ITR possuem mecanismos de ação semelhantes, inibindo a biossíntese do ergosterol e alterando a permeabilidade da membrana plasmática das células fúngicas (Soliman *et al.*, 2017). Isso pode estar relacionado às semelhanças nas interações desses fármacos aos extratos.

A associação sinérgica entre os extratos e a AMB é um resultado importante, já que a AMB pode apresentar toxicidade mesmo em pequenas doses (Ali *et al.*, 2011). Dessa forma, os tratamentos podem ser combinados com o objetivo de se obter resultados mais eficazes, reduzindo as doses e os efeitos colaterais tóxicos (Ghosh *et al.*, 2012).

A interação sinérgica entre esses ativos indica que a atividade antifúngica é amplificada, superando a soma das contribuições individuais de cada agente. O mecanismo de ação da AMB consiste na formação de poros da membrana das células (Soliman *et al.*, 2017). Já os mecanismos envolvidos na associação sinérgica de AMB a compostos naturais não são bem estabelecidos, mas alguns trabalhos sugerem que concentrações subinibitórias de AMB possam promover a internalização destes compostos nas células fúngicas, resultando na indução da morte celular, ou ainda, alterando processos bioquímicos (Ali *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2016).

Estes achados estão de acordo com as descobertas de Faria *et al.* (2011), que evidenciaram efeito sinérgico, aditivo e neutro quando AMB, FLC e ITR foram combinados a compostos fenólicos naturais contra cepas de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Esses autores sugeriram que as diversas interações observadas em distintas combinações de drogas fenólicas poderiam ser atribuídas à localização de grupos hidroxila nos anéis aromáticos desses compostos. Esta diversidade pode modificar a resposta da levedura ao fármaco ou promover uma interação entre estes compostos. Essa constatação também pode se aplicar a este trabalho, tendo em vista a complexidade na resposta das leveduras a ação desses agentes.

As vias de indução da morte celular por extratos de *C. coriaceum* ainda não foram completamente elucidadas. De forma geral, produtos de origem natural têm sido retratados como responsáveis por uma variedade de efeitos sobre células fúngicas, como perturbação da membrana plasmática, inibição da formação da parede celular, alteração mitocondrial, supressão da divisão celular, inibição de bombas de efluxo e interferência na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Al-Aboody; Mickymaray, 2020; Soliman *et al.*, 2017). Neste estudo, os ensaios com citometria de fluxo e eletroforese revelaram uma série de alterações nas células tratadas.

Os resultados revelaram que a produção de EROS foi mais proeminente quando os extratos estavam associados à AMB. A combinação EEFP + AMB foi capaz de potencializar a produção de EROS, tendo sido maior do que o controle de morte. A hipótese da atividade sinérgica é reforçada quando se observa que há diferença significativa de EAfp + AMB, EMfp + AMB e EEfp + AMB quando comparados aos efeitos de AMB 0,5 e dos extratos isolados, indicando que a associação sinérgica entre extratos e a AMB está envolvida na geração de

EROS. Estes resultados corroboram com o relatado na literatura, onde o extrato metanólico (Almeida-Bezerra *et al.*, 2022) e o óleo (Almeida-Bezerra *et al.*, 2024) de *C. coriaceum* foram responsáveis pelo acúmulo de EROS em cepas de *Candida* spp.

A atividade antioxidante de fenóis e flavonoides é bem documentada. No entanto, há relatos de que compostos antioxidantes podem agir como pró-oxidantes a depender da sua concentração, presença de íons metálicos e potencial de oxidação-redução (Halliwell, 2008; Sotler, 2019; Terpinc *et al.*, 2011). A quercetina e os fenóis, por exemplo, podem exercer papel pró-oxidante provocando peroxidação lipídica e danos no DNA (Halliwell, 2008; Terpinc *et al.*, 2011; Yordi *et al.*, 2012). Essa pode ser a razão que justifica a atividade pró-oxidante que esses compostos possivelmente desempenharam neste estudo.

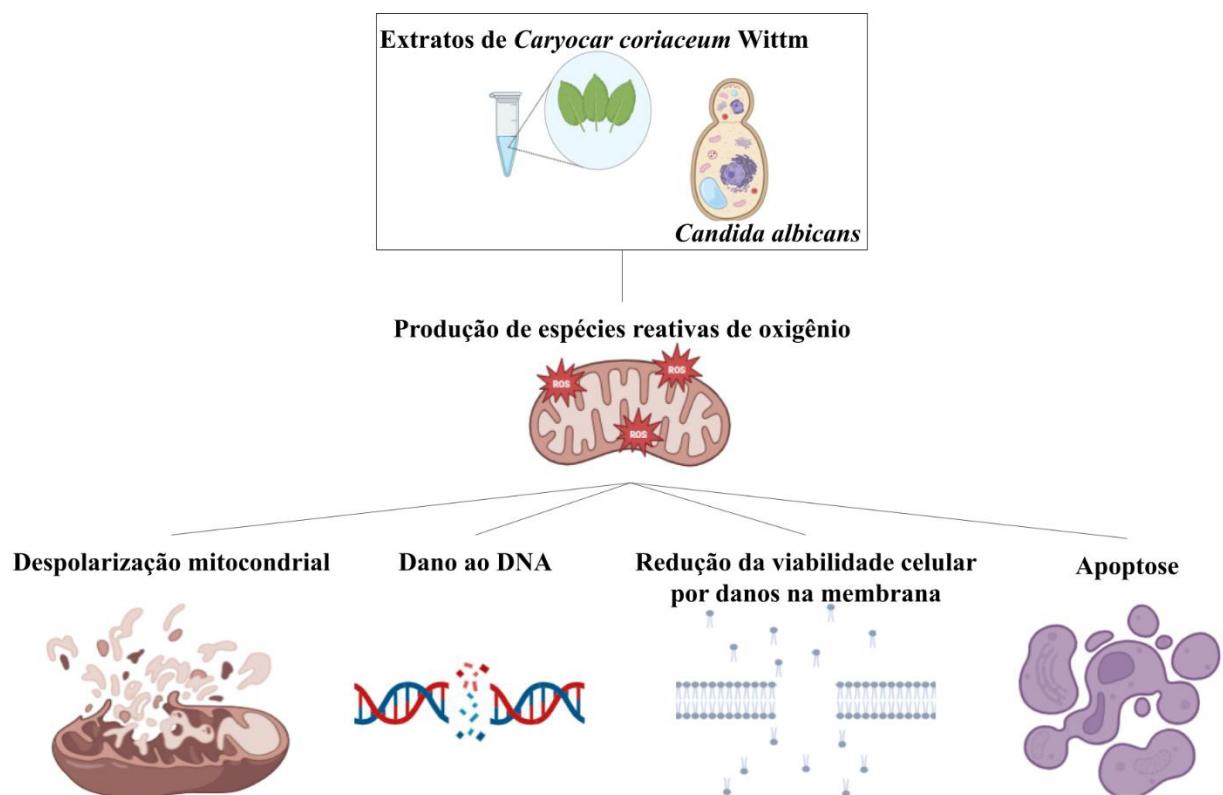
Em condições normais, EROS são produzidas em baixas concentrações pelas células, onde atuam fisiologicamente. No entanto, o acúmulo de EROS causa injúria celular diretamente por danos às biomoléculas intracelulares essenciais, como proteínas, lipídeos e DNA (Birben *et al.*, 2012). EROS acumulados intracelularmente podem desencadear estresse oxidativo, que tem como consequência a indução da apoptose em leveduras (Ott *et al.*, 2007). Neste estudo, foi observada a ocorrência de apoptose através da detecção da exposição da fosfatidilserina e consequente redução da densidade celular, processos que podem ter sido ocasionados pela produção exacerbada de EROS. Esses danos também foram intensificados quando os extratos foliares EMFP e EEFP foram combinados com AMB, onde foi observada diferença significativa de células apoptóticas em comparação a AMB 0,5 e com os extratos isolados, indicando que a atividade resultou da ação conjunta das moléculas.

O tratamento com os extratos de *C. coriaceum* provocou despolarização mitocondrial, a qual foi exacerbada na presença de AMB, demonstrando um efeito sinérgico entre estes agentes. Isso acontece porque a respiração celular aeróbica, que acontece na mitocôndria, resulta em uma alta produção de EROS como subproduto do seu metabolismo. Assim, as mitocôndrias tornam-se alvos primários da ação de EROS, prejudicando a função dessas organelas (Ott *et al.*, 2007). EROS podem causar despolarização mitocondrial, além de causar dano oxidativo ao DNA mitocondrial (Sevrioukova, 2011). Essa alteração também está associada a apoptose devido a alteração da permeabilidade da membrana da organela. Apenas a associação EEFP + AMB teve resultado estatisticamente significativo quando comparada ao extrato isolado e a AMB 0,5, sugerindo efeito sinérgico.

O ensaio do cometa demonstrou baixos índices de dano ao DNA quando as células foram tratadas com os extratos isolados. Porém, o dano aumentou consideravelmente quando

esses extratos foram combinados com AMB, exibindo resultados significativos quando comparados à atividade de AMB 0,5 e aos extratos isolados, provavelmente pela atividade conjunta das moléculas associadas. Essa alteração também pode ter sido ocasionada pela ação de EROS, conhecidos por serem capazes de induzir alterações no material genético (Birben *et al.*, 2012; Ott *et al.*, 2007). O maior índice de dano ao DNA foi causado pela associação EMFP + AMB, sendo maior do que o dano ocasionado pelo controle de morte. No entanto, a combinação que mais produziu EROS quando comparada ao controle foi EEFP + AMB. Isso sugere que a associação EMFP + AMB pode estar causando danos ao DNA e ativando processos apoptóticos por outros mecanismos, além da produção de EROS. Dessa forma, os mecanismos envolvidos na atividade anti-*Candida* dos extratos de *C. coriaceum* podem estar relacionados a uma série de eventos (Figura 19).

**Figura 19:** Possíveis mecanismos associados a atividade antifúngica de extratos de *C. coriaceum* frente a *C. albicans*.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora utilizando a versão online gratuita de BioRender (<https://www.biorender.com/>).

Com relação aos ensaios com biofilme, os extratos do pequi apresentaram efeito limitado sobre a biomassa e a viabilidade celular. Este dado vai de encontro a Cordeiro (2021), que observou interferência do óleo de *C. brasiliense* Camb. em biofilmes maduros de *Candida*

spp., onde houve redução inicial da biomassa na concentração de 7,8 µg/mL e inibição de 60% do biofilme com CIM de 500 µg/mL. Entretanto, a causa do efeito foi atribuída a propriedades inerentes ao óleo, que em certos casos resultou na formação de um envoltório sobre células individualmente ou em aglomerados, enquanto em outros casos penetrou nas células e envolveu seu conteúdo citoplasmático. É possível que essa atividade esteja relacionada com a própria composição do óleo que, diferente dos extratos, é rico em ácidos graxos que podem ser os responsáveis pela atividade antibiofilme relatada (Lee, J. et al., 2021; Muthamil et al., 2020; Prasath et al., 2020).

Uma característica associada aos biofilmes é a resistência aos antifúngicos, alcançada através da produção de antioxidantes como mecanismo de defesa. Quando comparados a células planctônicas, os biofilmes de *C. albicans* possuem capacidade aumentada contra o estresse oxidativo (Seneviratne et al., 2008). Isso pode explicar a elevada resistência dos biofilmes aos fármacos que induzem a produção de EROS, sendo um desafio adicional a ser superado frente às infecções fúngicas.

O ensaio de citotoxicidade revelou a tolerância dos linfócitos ao tratamento com elevadas concentrações dos extratos de *C. coriaceum* após 24h de exposição. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Tomiotto-Pellissier e colaboradores (2018), que avaliaram a toxicidade dos extratos metanólico e de acetato de etila em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, não tendo demonstrado toxicidade nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml. Esses resultados demonstram a segurança da utilização de extratos de *C. coriaceum* no tratamento de infecções causadas por microrganismos.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho apontam os extratos foliares de *C. coriaceum* como alternativas na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, principalmente por apresentarem interação sinérgica quando combinados à AMB. Contudo, mais estudos são necessários para se obter uma melhor compreensão de seus respectivos mecanismos de ação individuais e associados à AMB, bem como para garantir a segurança terapêutica por meio da realização de ensaios *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AGNELLI, C. *et al.* Prognostic Trends and Current Challenges in Candidemia: A Comparative Analysis of Two Multicenter Cohorts within the Past Decade. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 468, 2023.
- ALABDUL-MAGID, A. *et al.* Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 19, p. 2096–2102, 2006.
- AL-ABOODY, M. S.; MICKYMARAY, S. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. **Antibiotics**, [s. l.], p. 45, 2020.
- ALI, I. *et al.* In vitro antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from Colebrookea oppositifolia. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 1326–1336, 2011.
- ALMEIDA, M. R. *et al.* In Vivo Genotoxicity and Oxidative Stress Evaluation of an Ethanolic Extract from Piquiá ( *Caryocar villosum* ) Pulp. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 268–271, 2013.
- ALMEIDA-BEZERRA, J. W. *et al.* Caryocar coriaceum fruits as a potential alternative to combat fungal and bacterial infections: In vitro evaluation of methanolic extracts. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 181, p. 106203, 2023.
- ALMEIDA-BEZERRA, J. W. *et al.* Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae): Botany, Ethnomedicinal Uses, Biological Activities, Phytochemistry, Extractivism and Conservation Needs. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 13, p. 1685, 2022.
- ALMEIDA-BEZERRA, J. W. *et al.* Exploring the Fluconazole-Resistance Modifying Activity and Potential Mechanism of Action of Fixed Oil from *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) against *Candida* Species. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 21, n. 3, 2024.

ALVAREZ-MORENO, C. A. *et al.* The Mortality Attributable to Candidemia in *C. auris* Is Higher than That in Other *Candida* Species: Myth or Reality?. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 430, 2023.

ALVES, D. R. *et al.* Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2017, n. 1, 2017.

AL-YASIRI, M. H. *et al.* Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 36157, 2016.

ANGIOLELLA, L. *et al.* Identification of Virulence Factors in Isolates of *Candida haemulonii*, *Candida albicans* and *Clavispora lusitaniae* with Low Susceptibility and Resistance to Fluconazole and Amphotericin B. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 212, 2024.

ARAFA, S. H. *et al.* *Candida* diagnostic techniques: a review. **Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 360–377, 2023.

ARARUNA, M. K. A. *et al.* Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. **European Journal of Integrative Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 178–183, 2013.

ARAUJO, I. M.; LOPES, L. P.; CRUZ, C. M. Caracterização sistemática da resposta imune à infecção por *Candida*. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 3788–3803, 2020.

ARRUDA, H. S.; CRUZ, R. G.; ALMEIDA, M. E. F. de. Caracterização química, funcionalidade e toxicidade do pequi. **Nutrição Brasil**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 2–6, 2012.

ATIENCIA-CARRERA, M. B. *et al.* Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. e0263522, 2022.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiases. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.

BARBOSA, A. D. *et al.* Activity of Amlodipine Against *Staphylococcus Aureus* : Association with Oxacillin and Mechanism of Action. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 505–519, 2023.

BARROSO, N. G. *et al.* Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) – Uma Revisão. In: AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - VOLUME 2. [S. l.]: Editora Científica Digital, 2020. p. 336–344.

BASSETTI, M. *et al.* Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 1225–1238, 2017.

BELVONCIKOVA, P. *et al.* The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1046, 2022.

BENEDICT, K. *et al.* Survey of incidence, lifetime prevalence, and treatment of self-reported vulvovaginal candidiasis, United States, 2020. **BMC Women's Health**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 147, 2022.

BIDAUD, A.-L. *et al.* Techniques for the Assessment of In Vitro and In Vivo Antifungal Combinations. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 113, 2021.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BRAND, S. R. *et al.* A Randomized Phase 2 Study of VT-1161 for the Treatment of Acute Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. e1518–e1524, 2021.

CABRAL, V. P. *et al.* Antibacterial Activity of Paroxetine Against *Staphylococcus Aureus* and Possible Mechanisms of Action. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 415–426, 2023.

CAMPOY, S.; ADARIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 133, p. 86–96, 2017.

CASADEVALL, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. **Pathogens and Immunity**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 183, 2018.

CASTELLUCCI, S. *et al.* Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, Município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 51–60, 2000.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Evaluation of Genotoxicity and Mutagenicity of Ketamine on Human Peripheral Blood Leukocytes and in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 62, p. 104718, 2020. Disponível em: Acesso em: 28 jul. 2024.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 5, 2018.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 495–544, 2008.

CHAN, E. W. L. *et al.* Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 10, p. 70–74, 2017.

CHAVES, M. A. de. **Avaliação da atividade antifúngica ou antibiofilme de fármacos com potencial de reposicionamento combinados com antifúngicos comerciais frente a fungos de difícil tratamento**. 2022. 1–91 f. Tese - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2022.

CHEN, J. *et al.* Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of *Candida auris*. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 827, 2020.

CHISTÉ, R. C. *et al.* The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 1740–1749, 2012.

CIUREA, C. N. *et al.* *Candida* and *Candidiasis*—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 857, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/6/857>.

**CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3.** Wayne, PA: [s. n.], 2008.

**CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4.** Wayne, PA: [s. n.], 2012.

CORDEIRO, C. B. **Efeito do óleo de *Caryocar brasiliense* (pequi) em cepas clínicas de *Candida* spp.** 2021. - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2021. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/3415>. Acesso em: 7 ago. 2024.

COSTA, J. G. M. *et al.* Antibacterial Properties of Pequi Pulp Oil (*Caryocar coriaceum* – WITTM.). **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 411–416, 2011.

COSTA, A. G. **Extração e caracterização de manoproteínas da parede celular de levedura de cervejaria e avaliação das propriedades emulsificantes.** 2008. Dissertação - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 13, p. 40–48, 2018.

D'ENFERT, C. *et al.* The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 45, n. 3, 2021. Disponível em:  
<https://academic.oup.com/femsre/article/doi/10.1093/femsre/fuaa060/6000215>.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309923006928>.

DJOUOSSI, M. G. *et al.* Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the leaves of Oncoba spinosa Forssk. (Salicaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 134, 2015.

DO NASCIMENTO, F. B. *et al.* Synergistic Effect of Hydralazine Associated with Triazoles on *Candida* spp. in Planktonic Cells. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 661–672, 2023.

DU, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020a.

DU, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020b.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Jornal Multiciência**, [s. l.], p. 1–16, 2006.

DUAVY, S. M. P. *et al.* ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM. : ESTUDO IN VITRO. **Cadernos de Cultura e Ciência**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2012.

FARIA, N. C. G. *et al.* Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 506–513, 2011.

FRAÇ, M. *et al.* Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018.

FRIEDMAN, D. Z. P.; SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 67, 2019.

GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020.

GHOSH, S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], p. 483, 2012. Disponível em:  
<http://www.dovepress.com/synthesis-of-silver-nanoparticles-using-dioscorea-bulbifera-tuber-extr-peer-reviewed-article-IJN>.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GONO-CEREZO, S. *et al.* Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. **Gaceta Médica de México**, [s. l.], v. 156, n. 2, 2020.

GOW, N. A. R. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 112–122, 2012.

GOW, N. A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 406–412, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008.

HERZOG-SOARES, J. D. A. et al. BIOATIVIDADE DE Stryphnodendron adstringens, S. Polyphyllum, Caryocar brasiliense, PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO, SOBRE Trypanosoma cruzi “IN VIVO”. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 113–118, 2006.

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

JORGE, P. et al. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e0174654, 2017.

JORGE-JUNIOR, A. et al. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Caryocar brasiliense. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 313–322, 2020.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 54, p. 142–148, 2014.

KERNTOPF, M. R. et al. Óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.) e a potencial atividade cardioprotetora. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [s. l.], v. 17, n. 4, 2015.

KHALIFA, H. O. et al. Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of *Candida krusei* Recovered from an International Collection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 66, n. 2, 2022.

KNOKE, M.; BERNHARDT, H. **The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839.** [S. l.: s. n.], 2006.

LAMEGO, É. C. **Caracterização patológica da candidíase em animais.** 2022. 1–75 f. Dissertação - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2022.

LASS-FLÖRL, C. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 20, 2024.

LEE, J. *et al.* Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against *Candida albicans* via mimicking of the quorum-sensing molecule farnesol. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1353–1366, 2021.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021a. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.0c00199>.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021b.

LEITE, G. de O. *et al.* Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 54, 2009.

LIBERATO, I. *et al.* Gallic acid leads to cell death of *Candida albicans* by the apoptosis mechanism. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 599–606, 2022.

LOGUERCIO-LEITE, C. *et al.* A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 17–27, 2006.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.2019950>.

MACENA, M. V. da S.; NASCIMENTO, P. M. R.; MAYNARD, D. da C. Disbiose intestinal e suas correlações com candidíase de repetição. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 16, p. e424111638346, 2022.

MARANGONI, C. **Plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no nordeste do Brasil: potencial antimicrobiano para tratar distúrbios das vias gênito-urinárias**. 2015. 1–122 f. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco , Recife, 2015.

MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás - Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 771–777, 2009.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MARTINS, P. R.; CASTRO, J. de O. Effect of *Caryocar brasiliense* (Pequi) extract on fungus *Candida albicans*. **Revista Conexão Saúde**, [s. l.], v. 2, p. 113–126, 2015.

MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1797–1819, 2020.

MCMANUS, B. A. *et al.* Genetic Differences between Avian and Human Isolates of *Candida dubliniensis*. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 1467–1470, 2009.

MEDEIROS, M. A. P. de *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MEDRANO, D. J. A. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 17–20, 2006.

MELLO, T. P. de *et al.* Drug Repurposing Strategy against Fungal Biofilms . **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 509–516, 2020.

MELO, W. D. de. **Revisão de Aspectos Produtivos e de Importância Socioambiental de Pequi (*Caryocar sp.*)**. 2021. 1–33 f. - Universidade Federal do Tocantins , Gurupi, 2021.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 69–74, 2002.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* Phenolic composition and medicinal usage of Psidium guajava Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence?. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 302–313, 2017.

MORALES, G. *et al.* Antimicrobial Activity of Three Baccharis Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile. **Molecules**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 790–794, 2008.

MURRAY, M. A.; ROSENTHAL, P. R.; PFALLER, K. S. **Microbiología médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2022.

MUTHAMIL, S. *et al.* Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5113, 2020.

NARUZAWA, E. S.; PAPA, M. F. S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 408–412, 2011.

NASCIMENTO, L. O. do *et al.* *Candida* spp. E RESISTÊNCIA FÚNGICA: UMA BREVE REVISÃO. **Revista Multidisciplinar da Faculdade Gilgal**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 14–24, 2024.

NETO, J. B. A. *et al.* Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different Candida Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e93698, 2014.

NIMRICKTER, L. *et al.* The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 789–798, 2005.

NINS, C. D. **Principais mecanismos de resistência de candida albicans e de espécies de candidas não albicans : uma revisão bibliográfica**. 2023. 1–49 f. Monografia - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.

OLIVEIRA, J. E. *et al.* Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas de pele tratadas com extrato da folha de pequi (Caryocar brasiliense). **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 17649–17659, 2020.

OLIVEIRA, M. L. M. de *et al.* *In vivo* topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 214–219, 2010.

OLIVEIRA, V. M. *et al.* Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1029–1034, 2016.

OLIVEIRA-FILHO, J. *et al.* **Avaliação antimicrobiana do extrato etanólico da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) contra microrganismos patogênicos microorganisms**. Araguaína: [s. n.], 2023. Disponível em:  
<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/geografia..>

O’NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**. [S. l.: s. n.], 2014.

OTT, M. *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 913–922, 2007.

PASSOS, X. S. *et al.* Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 623–627, 2002.

PASSOS, X. S. *et al.* Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 319–324, 2003.

PAULA-JUNIOR, W. de *et al.* Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 16, p. 625–630, 2006.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans* : formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 11–22, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/131/1/11/6715364>.

PFALLER, M. A. *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 6, n. Supplement\_1, p. S79–S94, 2019.

PIERCE, C. G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PINHO, S.; MIRANDA, I. M.; OLIVEIRA, S. C. de. Global Epidemiology of Invasive Infections by Uncommon Candida Species: A Systematic Review. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 558, 2024.

PIRES, J. *et al.* Healing of dermal wounds property of *Caryocar brasiliense* oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 150, p. 105356, 2020.

PONDE, N. O. *et al.* *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 91–111, 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2020.1843400>.

PRASAD, R. *et al.* The ABCs of *Candida albicans* Multidrug Transporter Cdr1. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1154–1164, 2015.

PRASATH, K. G. *et al.* Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

RAJENDRAN, R. *et al.* Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], p. 87–93, 2016.

RETORE, Y. I. *et al.* Antifungal activity of *Caryocar brasiliense* Camb. alone or along with antifungal agents against multidrug-resistant *Candida auris*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], p. 118240, 2024.

RIBEIRO, H. B. *et al.* Resíduos de frutos de pequi no controle do nematóide das galhas em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 453–458, 2012.

RITTER, M. R. **Atividade antimicrobiana dos extratos de *Trichilia catigua* contra *Helicobacter pylori* e espécies de *Candida* de relevância clínica.** 2021. 1–99 f. Tese - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2021.

ROCHA, W. R. V. da *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

RODRIGUES, Daniel S *et al.* Sertraline Has Fungicidal Activity Against *Candida* Spp. and Acts by Inhibiting Membrane and Cell Wall Biosynthesis. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 15, p. 1025–1039, 2023.

RODRIGUES, Daniel Sampaio *et al.* Sertraline has in vitro activity against both mature and forming biofilms of different *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 2, 2023.

ROSSATTO, F. C. P. *et al.* Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 763, 2021.

SAMANTA, I. Cutaneous, Subcutaneous and Systemic Mycology. In: VETERINARY MYCOLOGY. New Delhi: Springer India, 2015. p. 11–153.

SAMPAIO, L. S. *et al.* Ibuprofen Antifungal Activity on Both Planktonic and Biofilm Forms of Fluconazole-Resistant *Candida* spp. Strains and its Mechanism of Action Evaluated by Flow Cytometry. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 03, p. 2063–2073, 2018.

SANGLARD, D. Mechanisms of Drug Resistance in *Candida albicans*. In: PRASAD, R. (org.). ***Candida albicans: Cellular and Molecular Biology***. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 287–311.

SANTANA, A. C. de; CASTRO, A. P. de; PAIVA, M. C. de. Compostos naturais com ação inibitória contra *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*:uma revisão. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 21–32, 2022.

SARAIVA, R. A. *et al.* Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SAÚDE, M. da. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) 2022.** Brasília: [s. n.], 2022.

SÁUDE, M. da. **Situação epidemiológica da candidíase sistêmica.** [S. l.], 2024. Disponível em: Disponível em:<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiasesistematica/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 17 nov. 2024.

SENEVIRATNE, C. J. *et al.* ***Candida albicans*** biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. **PROTEOMICS**, [s. l.], v. 8, n. 14, p. 2936–2947, 2008.

SERAFIN, M. B.; HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 252–256, 2018.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 2545–2579, 2011.

SILVA, C. R. da *et al.* Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.

SOLIMAN, S. *et al.* Plants' natural products as alternative promising anti-*Candida* drugs. **Pharmacognosy Reviews**, [s. l.], p. 104, 2017.

SOTLER, R. Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. **Acta Clinica Croatica**, [s. l.], v. 58, 2019.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

TALAPKO, J. *et al.* ***Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection.** **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TERPINC, P. *et al.* Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 62–69, 2011.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al.* Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 98, p. 662–672, 2018.

TORRES, L. R. de O. *et al.* Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 97, p. 205–216, 2016.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TRAESSEL, G. K. *et al.* Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 97, p. 224–231, 2016.

VALDOLEIROS, S. R. *et al.* Protocolo de Prevenção e Tratamento de Infecções Associadas à Terapêutica Imunossupressora de Doenças Autoimunes. **Acta Med Port**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 469–483, 2021.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 49, n. 3, 2017.

WACHOWSKA, U.; IRZYKOWSKI, W.; JĘDRYČZKA, M. Agrochemicals: Effect on genetic resistance in yeasts colonizing winter wheat kernels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 162, p. 77–84, 2018.

WHALEY, S. G. *et al.* Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2017.

WHO. **No time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections.** [S. l.: s. n.], 2019.

WHO. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.** [S. l.: s. n.], 2022.

XAVIER, J. da S. **Resistência Antimicrobiana nas Infecções Primárias de Corrente Sanguínea na Pandemia da Covid-19, o que Mudou em um Hospital do Nordeste do Brasil?** 2024. 1–94 f. Dissertação - Universidade Federal do Ceará , Fortaleza, 2024.

YORDI, E. *et al.* Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: NUTRITION, WELL-BEING AND HEALTH. [S. l.]: InTech, 2012.

YURKOV, A. M. Yeasts of the soil – obscure but precious. **Yeast**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 369–378, 2018.

ZAITZ, C. **Compêndio de Micologia Médica.** 2. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2010. v. 2