



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Giselle Cutrim de Oliveira Santos**

**Efeito de *Terminalia catappa* L. em leveduras de *Candida*: avaliação *in silico*, *in vitro* e *in vivo***

São Luís-MA

2018

**Giselle Cutrim de Oliveira Santos**

**Efeito de *Terminalia catappa* L. em leveduras de *Candida*: avaliação *in silico*, *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Dr. Allan Kardec Duailibe Barros Filho

São Luís-MA

2018



Universidade Federal do Maranhão  
Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária – 65080-805 São Luís-MA  
Telefone (98) 3272- 9531 E-mail: [renorbio@ufma.br](mailto:renorbio@ufma.br)  
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>



## FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

**ALUNO:** Giselle Cutrim de Oliveira Santos

**TÍTULO DO PROJETO:** “Efeito de *Terminalia catappa* em leveduras de *Candida*: avaliação *in silico*, *in vitro* e *in vivo*”.

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

### BANCA EXAMINADORA:

### CONCEITO

### ASSINATURA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – UFMA  
(Presidente)

\_\_\_\_\_

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Quintino da Rocha – UFMA  
(Titular)

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior – CEUMA  
(Titular)

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto - CEUMA  
(Titular)

\_\_\_\_\_

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosane Nassar Meireles Guerra – UFMA  
(Titular)

\_\_\_\_\_

**DATA DA APROVAÇÃO:** 15 de junho de 2018.

**HORÁRIO:** 09:00h.

**LOCAL:** Prédio de Pós-Graduação do CCBS - UFMA.

*“É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada. Mas a graça das graças é não desistir nunca.”*

*Dom Hélder Câmara*

## **Dedicatória**

Ao meu marido, Neto, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de inúmeras incertezas, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos; por fazer parte desse mundo acadêmico e saber entender os meus anseios. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais Valdemir e Helen, que dignamente me apresentaram à importância dos estudos e sempre me conduziram pelo caminho da honestidade e persistência.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar. As dificuldades foram inúmeras na execução dessa etapa da minha formação e Ele foi e continua sendo o meu sustento diário, me ensinando cada vez mais que nenhum obstáculo é maior do que o seu amor por mim e que nessa vida tudo que vem fácil, vai fácil.

À minha orientadora profa. Flávia Nascimento, sempre tão serena em suas palavras e que me tranquilizaram nos momentos de maior aflição. Por ter me feito acreditar que no final tudo daria certo e por ter me permitido desenvolver e executar boa parte dos meus experimentos no Laboratório de Imunofisiologia - LIF. Obrigada pelo carinho e confiança.

Ao meu co-orientador prof. Allan Kardec, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e ter aberto as portas do Laboratório de Processamento da Informação Biológica – PIB.

À profa. Cláudia Rocha, do Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos - LEAF. Se existem anjos aqui na Terra, tenho certeza que a senhora é um deles. Obrigada pela sua disponibilidade e de seus alunos nas análises químicas do meu material, pelas palavras ditas e pelos ensinamentos. A senhora é um dos maiores exemplos de humildade que carregarei sempre comigo.

À profa Cristina Monteiro e à aluna Flaviane, pela parceria que foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao amigo Alberto Jorge, que sempre tão crítico, mas sincero e dinâmico em suas colocações que contribuíram para essa pesquisa. Sei que posso contar com você em todos os momentos da minha vida, muito obrigada!

Aos colegas Maria Cristiane e Matheus Brandão do Laboratório de Farmacognosia por me ajudarem na parte fitoquímica da pesquisa.

Aos queridos colegas do PIB pelos momentos de descontração. Não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém. Levarei vocês comigo no coração.

Aos colegas do LIF, que se tornaram amigos, em especial Thiare, Liana, Patrícia, Lílian e Douglas. O que seria desse trabalho se não fosse vocês na minha vida. Obrigada por SEMPRE estarem dispostos a me ajudar nos incansáveis experimentos, a discutir protocolos, e muitas vezes abrir mão do trabalho de vocês para ajudar no meu. Nada do que eu escreva aqui vai ser suficiente para expressar todo o meu agradecimento.

Às meninas do LEAF, em especial Carla, Jessyane e Alana e ao Marcos, por toda a ajuda na parte química do meu trabalho. Com vocês tudo se tornou menos difícil e mais prazeroso. Muito obrigada!

Aos professores do RENORBIO, ponto focal do Maranhão, que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

Ao meu marido, Neto, por ter sido o meu pilar de sustentação ao longo desse trabalho. Por todo o amor e acima de tudo pela paciência que teve comigo, por entender as minhas crises, meu estresse e o meu desespero quando tudo parecia dar errado. Por ter acreditado em mim mais do que eu mesma e por ter esse coração tão grandioso. Essa vitória também é sua.

À minha família que por muitas vezes entendeu à minha ausência, em especial à minha mãe, Helen, que sempre incentivou o meu crescimento pessoal e profissional. Ao meu pai, Valdemir, que mesmo ausente fisicamente, muitas vezes se demonstrou presente com ligações de incentivo. Ao meu irmão, Felipe, que me deu os maiores presentes que tenho na vida, a Maria e o Miguel, que por incontáveis momentos foram minha válvula de escape para não surtar. À minha “mãedrinha” Maria Carmen, por me ouvir incansavelmente e pelas palavras de conforto, seu amor foi o que muita das vezes também me sustentou.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial ao RENORBIO, pela oportunidade de ter realizado o meu doutorado.

## RESUMO

A espécie vegetal *Terminalia catappa* Linn é uma planta típica de regiões tropicais, que apresenta algumas atividades biológicas já descritas, entre elas a antifúngica, observada em *Candida*. Apesar deste relato, este trabalho buscou ampliar a investigação desta atividade para outras cepas fúngicas, bem como uma melhor caracterização desta atividade e dos possíveis componentes químicos do Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* (EB). Buscou-se também, através de simulações computacionais, prever a atividade *in silico* dos compostos de *T. catappa* e investigar a utilização desta espécie vegetal no tratamento *in vivo* de camundongos em modelos de candidemia. Após o preparo de EB, procedeu-se com a análise fitoquímica e caracterização química do extrato por HPLC-UV, LC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSn. Na tentativa de separar os constituintes de *T. catappa*, EB foi subfracionado por cromatografia em coluna clássica com sílica gel e, aqueles compostos com similaridade de polaridade foram avaliados na CCD e reunidos. Para a análise *in silico*, os compostos identificados por LC-ESI-IT-MS em EB foram estruturalmente esquematizados em 3D. A estrutura da CaCYP51 de *C. albicans* e dos ligantes foi preparada para os cálculos de docagem molecular e, após, procedeu-se com as simulações por dinâmica molecular. A viabilidade celular de EB e das frações aquosa (FAq) e diclorometânica (FDCM) foi determinada pelo método MTT. Para avaliar a ação antifúngica de EB, foram realizados os testes de difusão em ágar e microdiluição com cepas de *Candida*. Na avaliação da sobrevida de camundongos, utilizou-se um modelo de imunossupressão com ciclofosfamida 50 mg/kg 48h antes do início da infecção com *C. albicans* ( $3 \times 10^8$ ). Os tratamentos com anfotericina B (0,6 mg/kg), EB (10 mg/kg) e EB (100 mg/kg) foram feitos 6h antes da infecção ou tratados 6h após a infecção. A análise fitoquímica de EB revelou a presença de taninos, catequinas, saponinas, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavanóis e xantonas, esteróides e triterpenos no extrato. A caracterização química de EB identificou os compostos punicalagina, punicalina, ácido galágico e ácido elágico. A partir do subfracionamento de 2 g de EB foram obtidas 570 subfrações e aquelas com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 16 grupos. Na análise *in silico*, o ácido elágico foi o composto que apresentou os melhores parâmetros de afinidade nos cálculos de docagem molecular com a CaCYP51. Na viabilidade celular, A IC<sub>50</sub> foi de 237,2; 148,0 e 206,2 µg/mL, respectivamente, para o EB, FAq e FDCM. EB inibiu a formação de halos nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL e inibiu o crescimento de *Candida* no ensaio de microdiluição em concentrações que variaram entre 0,007 e 4 mg/mL. O grupo EB 10 após teve 40% de sobrevida e houve um aumento na expectativa de vida de 54,5%. Em conclusão, no modelo *in silico*, o ácido galágico apresentou afinidade com a CaCYP51 de *C. albicans*, EB apresentou atividade em ensaios antifúngicos *in vitro* nas concentrações testadas e aumentou a sobrevida de camundongos imunossuprimidos e com candidemia.

Palavras-chave: *Candida*. *In silico*. Antifúngico. Candidemia

## ABSTRACT

*Terminalia catappa* Linn is a plant typical of tropical regions, which presents some biological activities already described, among them the antifungal, observed in *Candida*. In spite of this report, this work sought to extend the investigation of this activity to other fungal strains, as well as a better characterization of this activity and the possible chemical components of the *T. catappa* Hydroethanolic Extract (EB). It was also sought, through computational simulations, to predict the *in silico* activity of *T. catappa* compounds and to investigate the use of this plant species in the *in vivo* treatment of mice in candidemia models. After preparation of EB, the phytochemical analysis and chemical characterization of the extract were performed by HPLC-UV, LC-ESI-IT-MS and FIA-ESI-IT-MSn. In the attempt to separate the constituents of *T. catappa*, EB was subfractionated by classical column chromatography with silica gel, and those compounds with polarity similarity were evaluated at the CCD and assembled. For *in silico* analysis, the compounds identified by LC-ESI-IT-MS in EB were structurally schematized in 3D. The CaCYP51 structure of *C. albicans* and ligands was prepared for the molecular documentation calculations and, afterwards, the simulations were carried out by molecular dynamics. Cell viability of EB and aqueous (FAq) and dichloromethane fractions (FDCM) was determined by the MTT method. To evaluate the antifungal action of EB, agar diffusion and microdilution tests were performed with *Candida* strains. In the evaluation of the survival of mice, a model of immunosuppression with cyclophosphamide 50 mg / kg 48h before the beginning of the infection with *C. albicans* ( $3 \times 10^8$ ) was used. Treatments with amphotericin B (0.6 mg / kg), EB (10 mg / kg) and EB (100 mg / kg) were done 6 hours before infection or treated 6 hours after infection. The phytochemical analysis of EB revealed the presence of tannins, catechins, saponins, anthocyanins and anthocyanins, flavones, flavanols and xanthenes, steroids and triterpenes in the extract. The chemical characterization of EB identified the compounds punicalagina, punicalina, galálgico acid and elálgico acid. From the subfractionation of 2 g EB, 570 subfractions were obtained and those with similar chromatographic profile were collected in 16 groups. *In silico* analysis, ellagic acid was the compound that presented the best affinity parameters in molecular documentation calculations with CaCYP51. In cell viability, the IC<sub>50</sub> was 237.2; 148.0 and 206.2 µg / mL, respectively, for EB, FAq and FDCM. EB inhibited the formation of halos at concentrations of 25, 50 and 100 mg / mL and inhibited the growth of *Candida* in the microdilution assay at concentrations ranging from 0.007 to 4 mg / mL. The EB 10 group had a 40% survival and an increase in life expectancy of 54.5%. In conclusion, in the *in silico* model, the galálgico acid presented affinity with the CaCYP51 of *C. albicans*, EB presented activity *in vitro* antifungal assays at the tested concentrations and increased the survival of immunosuppressed mice and with candidemia.

Keywords: *Candida*. *In silico*. Antifungal. Candidemia

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALS- Agglutinin-Like Sequence;

ATCC – Coleção de Cultura Tipo Americana;

CFU – Unidades Formadoras de Colônias;

CIM – Concentração Inibitória Mínima;

CFM - Concentração fungicida mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CWPs - Proteínas de Parede Celular;

CYP51 – Lanosterol 14-alfa-demetilase Citocromo P450;

CG - Cromatografia Gasosa

CCD - cromatografia em camada delgada

CG/MS – Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa

DMSO – Dimetilsulfóxido;

EB – Extrato Bruto

ESI – Ionização por Eletrospray;

FAq - fração aquosa

FDCM - Fração Diclorometânica

FIA – Injeção em Fluxo Contínuo;

FDA – Food and Drug Administration

5-FU - 5-fluorouracilo

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

HPLC-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector Ultravioleta.

IT – Íon Trap;

LC – Cromatografia Líquida;

LC-MS – Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massa

MSn – Múltiplos Estágios;

MTT - Brometo de 3- metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio;

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos;

PDB - *Banco de Dados* de Proteínas

PTFE - Filtro Seringa Com Membrana de Teflon

RMN – Ressonância Nuclear Magnética;

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio;

YPD – Extrato de Levedura Peptona Dextrose;

5-FU - 5-fluorouracilo;

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Prospecção fitoquímica de EB coletadas no estado do Maranhão, Brasil.....	48
<b>Tabela 2:</b> Identificação dos compostos em T. catappa por FIA-ESO-MS <sup>n</sup> .....	51
<b>Tabela 3:</b> Frações obtidas no subfracionamento do Extrato Bruto Hidroetanólico de T. catappa (2g). 54	
<b>Tabela 4:</b> Energias livre de ligação e constante de inibição obtidos por docagem molecular dos compostos identificados no EHB de T. cattapa com a estrutura da CaCYP51 .....	55
<b>Tabela 5:</b> Resíduos de aminoácidos da CYP51 que possuem interação com o ácido elágico .....	56
<b>Tabela 6:</b> Valores dos halos em mm do Extrato Bruto Hidroetanólico de T. catappa nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL em diferentes cepas clínicas de Candida sp. O controle positivo foi feito com fluconazol 64 µg/mL. O controle negativo foi feito com PBS e não houve a formação de halo. ....	58
<b>Tabela 7:</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Hidroetanólico de T. catappa .....	59
<b>Tabela 8:</b> Sobrevida de animais infectados com C. albicans e tratados com Extrato Hidroetanólico de T. catappa antes, concomitante e após a infecção. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i> (Gow et al, 2012, adaptado).....	19
<b>Figura 2:</b> Mecanismos fisiopatológicos da sepse (Henki et al., 2009).....	22
<b>Figura 3:</b> Resposta inflamatória em cascata responsiva à infecção (Binkowska, 2015, adaptado). ....	23
<b>Figura 4</b> Formas morfológicas de crescimento de <i>C. albicans</i> (Sudbery, 2011).....	24
<b>Figura 5:</b> Genes envolvidos na virulência de <i>C. albicans</i> (adaptado de Kumar et al., 2006).....	25
<b>Figura 6:</b> Mecanismo de ação de agentes antifúngicos (Madigan et al., 2010) .....	27
<b>Figura 7:</b> Mecanismo básico de resistência antifúngica (Sanglard, 2016) .....	30
<b>Figura 8:</b> <i>Terminalia catappa</i> L. (São Luís – MA).....	33
<b>Figura 9:</b> Cromatografia em Coluna para separação dos compostos do Extrato Bruto Hidroetanólico de <i>T. catappa</i> . ....	41
<b>Figura 10:</b> Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos de folhas de <i>T. catappa</i> .	49
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas do Extrato Bruto Hidroetanólico de <i>T. catappa</i> (A), FDCM (B) e FAq (C) dissolvidos em H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1) à ~ 10 mg/mL. ....	50
<b>Figura 12:</b> Espectro de massa de primeira ordem full-scan do Extrato Bruto Hidroetanólico de <i>T. catappa</i> no modo negativo.....	51
<b>Figura 13:</b> Estrutura de punicalagina (1), punicalina (2), ácido galágico (3) e ácido elágico (4). ....	52
<b>Figura 14:</b> Coluna cromatográfica para separação de compostos do Extrato Bruto Hidroetanólico (1:4) de <i>T. catappa</i> .....	52
<b>Figura 15:</b> Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas a partir do subfracionamento do Extrato Bruto Hidroetanólico de <i>T. catappa</i> . A (subfrações 55 à 86); B (subfrações 91 à 171); C (subfrações 181 à 281); D (subfrações (291 à 391); E (subfrações 401 à 511); F (subfrações 521 à 570); G (subfrações 521 à 570); H (subfrações 71, 72, 73, 74, 75 e 76); I (subfrações 212 à 220).....	53
<b>Figura 16:</b> Frequência de contatos hidrofóbicos (em azul) e ligações de hidrogênio (amarelo) entre o ácido elágico e a CaCYP51. As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.....	56
<b>Figura 17:</b> Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 em EB (A), FAq (B), FDCM (C) após 24h de cultura. * p<0,05 quando comparado ao controle (0).....	57
<b>Figura 18:</b> Curva de sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida infectados com <i>Candida albicans</i> e tratados com EB. Os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (50 mg/kg) 48h antes da infecção com <i>C. albicans</i> (3x10 <sup>8</sup> ). Os tratamentos com anfotericina B (0,6 mg/kg), EB (10 mg/kg) e EB (100 mg/kg) foram feitos 6h antes da infecção (A) e 6h após a infecção (C). Os animais foram acompanhados por 5 dias. *p<0,05 em relação ao grupo controle. ....	60
<b>Figura 19:</b> Conformação espacial obtida após a simulação por dinâmica molecular do ácido elágico (em verde) e posaconazol (em amarelo) com CYP51 (PDB: 5FSA). ....	63

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1 O gênero <i>Candida</i></b> .....	18
2.1.1 Patogenicidade e virulência de <i>C. albicans</i> .....	23
<b>2.2 Tratamento da candidíase e mecanismo de ação das drogas</b> .....	26
<b>2.3 Resistência antifúngica</b> .....	30
<b>2.4 Potencial biológico do gênero <i>Terminalia</i></b> .....	31
<b>2.5 Novas perspectivas e ferramentas para o desenvolvimento de fármacos no controle de <i>C. albicans</i>.</b> .....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	37
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1 Coleta das plantas e preparação do extrato hidroetanólico e frações</b> .....	38
<b>4.2 Análise fitoquímica</b> .....	38
<b>4.3 Análise química</b> .....	39
4.3.1 Análise de EB, FDCM e FAq por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector Ultravioleta (HPLC-UV) .....	39
4.3.2 Análises de EB por Cromatografia Líquida por Ionização Eletrospray com Ion Trap acoplada à espectrometria de massa em múltiplos estágios (LC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSn) .....	39
<b>4.4 Estudos <i>in silico</i></b> .....	42
4.4.1 Estruturas dos compostos e receptor .....	42
4.4.2 Docagem molecular .....	42
<b>4.5 Ensaio de citotoxicidade</b> .....	43
4.5.1 Determinação da viabilidade celular em macrófagos murinos RAW 264.7 .....	43
<b>4.6 Ensaios antifúngicos</b> .....	44
4.6.1 Ensaio de difusão em ágar .....	44
4.6.2 Ensaio de microdiluição .....	45
<b>4.7 Ensaio de sobrevida de camundongos</b> .....	46
4.7.1 Animais .....	46
4.7.2 Manutenção da cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	46
4.7.3 Indução da infecção e acompanhamento da sobrevida .....	46
4.8 Análise estatística .....	47
<b>5. RESULTADOS</b> .....	48

	16
<b>5.1 Análise fitoquímica.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Análise química de EB, FDCM e FAq.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3. O ácido galágico apresentou afinidade com a CaCYP51 de <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 EB reduziu a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7 .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5. EB promoveu a formação de halos no ensaio de difusão em ágar .....</b>	<b>58</b>
<b>5.6 EB inibiu o crescimento de <i>Candida</i> no ensaio de microdiluição.....</b>	<b>59</b>
<b>5.7 EB aumentou a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos e infectados com <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, processos infecciosos causados por microrganismos considerados saprófitos, estão emergindo (Machado, 2015). Dentre estes, estão alguns fungos de baixa virulência que, devido à supressão do sistema imune, tornam-se patogênicos, representando um agravo para a saúde pública (Amrouche et al., 2014). Nesse contexto, destaca-se o gênero *Candida*, que se caracteriza por apresentar infecções localizadas ou superficiais, afetando pele ou mucosas e infecções sistêmicas, que atingem a corrente sanguínea, causando candidemia e disseminando-se para os órgãos internos (Gehring et al., 2016). Aproximadamente 17 espécies estão associadas à candidíase invasiva no ser humano, onde *Candida albicans* é considerada a espécie mais importante e prevalente. Outras espécies também merecem destaque como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Juntas, estas cinco espécies representam mais de 90% dos casos de candidíase (Lepak & Andes, 2011).

O tratamento para a candidíase é feito a partir do quadro clínico desenvolvido pelo paciente. A abordagem medicamentosa envolve agentes antifúngicos tópicos e sistêmicos, destacando-se os pertencentes à classe dos azóis. Dependendo do tipo de infecção, sítio anatômico em que ocorre e perfil de sensibilidade das espécies, outros antifúngicos também podem ser usados. Entre estes, existem polienos, equinocandinas, análogos de nucleosídeos e alilaminas (Pfaller et al., 2013; Pappas et al., 2016).

Entretanto, um dos maiores obstáculos envolvidos nas infecções fúngicas está relacionado à resistência tanto de *C. albicans* como de espécies não-*albicans* aos agentes antifúngicos, dificultando o tratamento. O uso indiscriminado desses agentes na profilaxia ou por longos períodos de tempo também seleciona certas populações de fungos resistentes e a dificuldade no diagnóstico ou o diagnóstico tardio associado ao reduzido número de classes de antifúngicos disponíveis torna o problema ainda maior, favorecendo a mortalidade, em especial no grupo de pacientes imunocomprometidos (Machado, 2015; Niimi et al., 2010).

Diante desse quadro, embora a maioria dos fármacos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, pesquisas voltadas aos compostos naturais têm recebido a atenção dos pesquisadores, com o objetivo de serem elaborados produtos eficazes e com baixa toxicidade para o controle das infecções. Diminuir custos no tratamento das infecções e oferecer à população doente uma nova opção de terapia torna-se um grande desafio para a ciência (Terças, 2013). Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de compostos com as mais diversas atividades biológicas, dos quais derivam fármacos comercializados no mundo inteiro. O Brasil desponta neste cenário devido à sua vasta biodiversidade, como uma alternativa promissora na

busca de compostos ativos com propriedades antifúngicas. A Organização Mundial de Saúde preconiza que plantas medicinais são a melhor fonte em variedades de drogas, no entanto, precisam ser melhor investigadas para compreender sua eficácia e propriedades, garantindo, dessa forma, uma administração segura à população (Agarwal, 2011).

Essas características têm motivado a indústria farmacêutica a investir em pesquisas visando o desenvolvimento de fitoterápicos (Trabulsi-Filho et al., 2013). Entretanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo, de alto custo e que envolve diversas áreas do conhecimento (Williams & Hong, 2011). Assim, a química computacional aliada à bioinformática se destaca nesse processo, utilizando bases de ciências como bioquímica, farmacologia, biologia molecular, imunologia, farmacocinética, toxicologia, físico-química, cristalografia de raios-X e métodos de modelagem. Essas análises apresentam como objeto de estudo o planejamento e desenvolvimento de compostos bioativos, que podem ser usados para prevenção, tratamento ou cura de enfermidades humanas e animais, como também podem envolver investigações com fármacos já existentes, avaliando suas propriedades farmacológicas e as relações entre a estrutura química e suas atividades biológicas (Wermuth, 2003).

A espécie vegetal *Terminalia catappa* Linn é uma planta típica de regiões tropicais, pertencente à família *Combretaceae* e popularmente conhecida como amendoeira, amendoeira da praia, amendoeira da Índia, cuca, guarda sol, castanheira da Índia, castanhola e chapéu-de-sol (Coccaro et al., 2013). Algumas atividades biológicas têm sido descritas para esta espécie tais como: tratamento de hepatites e dermatites (Kinoshita et al., 2007), hipoglicemiante (Ahmed et al., 2005), anti-cancerígena (Yang et al., 2010), anti-oxidante (Chen & Li, 2006), antibacteriana (Abiodun et al., 2015) e antifúngica (Ribeiro 2016; Terças et al., 2017).

Apesar dos relatos de sua atividade antifúngica feitos pelo nosso grupo de pesquisa (Terças et al., 2017) ainda se faz necessário ampliar a investigação desta atividade para outras cepas fúngicas, bem como uma melhor caracterização desta atividade e dos possíveis componentes químicos deste extrato responsáveis por esta atividade. Além disto, é importante investigar se o extrato seria promissor como tratamento *in vivo* em modelos de candidemia. A hipótese é que o extrato dessa planta possui metabólitos responsáveis por suas propriedades antifúngicas e que o extrato auxilia no controle da infecção *in vivo*.

A partir deste trabalho, foi gerado um artigo de revisão, submetido e aceito no periódico *Frontiers in Microbiology*, FI 4.076 e qualis A1 para Biotecnologia, intitulado “*Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents”. Além deste, foi gerado um segundo artigo, contendo os dados da química, docagem

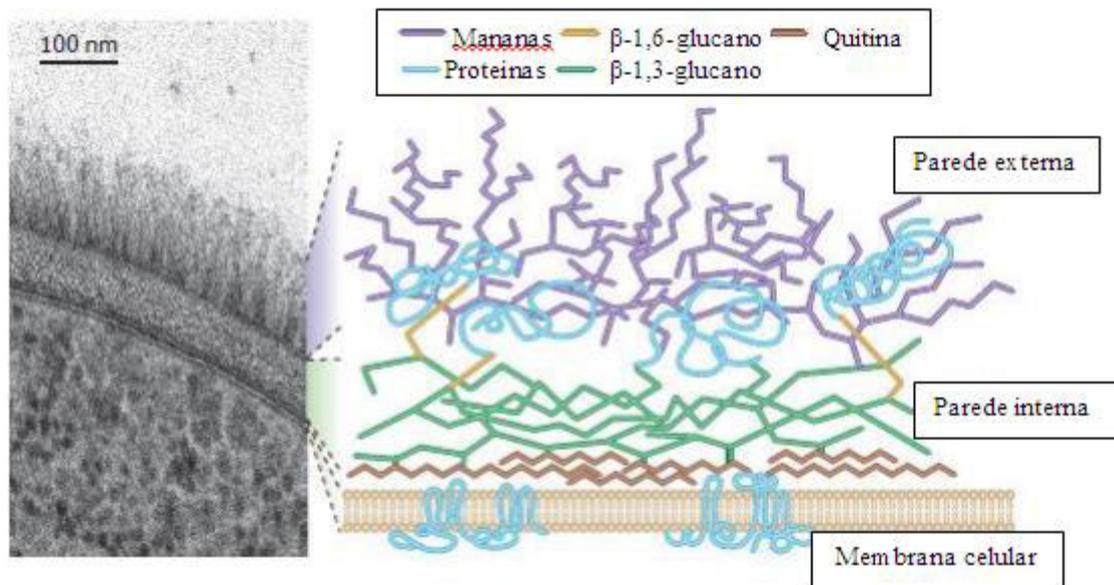
molecular e dos testes *in vitro* e *in vivo* que está em fase de preparação para ser submetido à mesma revista.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* é originário da divisão taxonômica de ascomicetos, caracterizado como leveduras asporogênicas (não formadora de esporo) com a capacidade de formar pseudo-hifas e hifas. São fungos unicelulares, patógenos oportunistas, que constituem parte da microbiota comensal sendo capazes de causar infecções apenas se as barreiras imunológicas do hospedeiro forem violadas. (Sardi et al., 2013, Hammad et al., 2013., Chin et al., 2016).

Morfologicamente, os fungos do gênero *Candida* são formados por parede celular, membrana celular e organelas citoplasmáticas. A parede celular, composta por quitina, polissacarídeos (glucanas e mananas) e proteínas (Gow et al., 2012), está diretamente em contato com o hospedeiro e apresenta grande importância na patogenicidade do fungo permitindo a adesão aos tecidos e às células do hospedeiro, além de participar ativamente de sua resposta imune (Ruiz-Herrera et al., 2006). Entretanto, as proporções desses compostos variam entre as diferentes espécies de *Candida*. Os componentes da parede celular apresentam-se divididos em duas camadas, uma exterior, formada por glicoproteínas, e uma mais interna, formada por polissacarídeos (Netea et al., 2008). Na conversão de levedura para hifa, a parede celular é alterada, a expressão de proteínas de parede celular (CWPs) é altamente regulada durante a transição. Genes que codificam essas proteínas específicas de hifa tais como a proteína da parede de hifas 1 (Hwp1), proteína reguladora de hifa 1 (Hyr1) e sequência semelhante a aglutinina 3 (Als3) estão entre os genes regulados positivamente (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura da parede celular de *Candida albicans* (Gow et al, 2012, adaptado)

A membrana celular ou membrana plasmática é semelhante à de outros organismos, apresentando-se como uma estrutura dinâmica onde as substâncias estão em constante alteração. O ergosterol é o esteroide predominante, sendo essa molécula importante para o desenvolvimento de funções celulares como fluidez, permeabilidade e modulação da espessura da membrana fazendo com que as enzimas ali presentes possam exercer suas funções (Sgherri et al., 2014). A reprodução no gênero *Candida* é do tipo sexuado, obtendo-se espécies haplóides ou diplóides, porém, as diferentes espécies são distinguidas por testes de fermentação de açúcares e de produção de tubos germinativos (Gow & Hube, 2012).

O gênero *Candida* é composto por fungos de grande importância clínica devido a sua alta frequência de colonização e infecção em humanos, causando candidíase. Um dos fatores responsáveis por isso é a sua capacidade de adaptação, podendo desenvolver-se tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (Giolo & Svidzinski, 2010). A infecção por *Candida* ocorre por via exógena ou endógena. Na via exógena, a infecção ocorre principalmente por meio das mãos dos profissionais de saúde ou por contaminação de materiais médico-hospitalares. Já na via endógena, a principal forma de transmissão é quando há colonização do hospedeiro devido à fragilidade de seu sistema imune (Giolo & Svidzinski, 2010; Paramythiotou et al., 2014). Nesse caso, as diferentes espécies de *Candida* tornam-se patogênicas quando a resistência do hospedeiro à infecção é prejudicada local ou sistematicamente por alguns fatores como disfunção de neutrófilos, defeitos na imunidade

mediada por células, desordem metabólica, exposição direta ao fungo, rompimento de barreiras cutâneas e mucosas, que são os principais fatores de risco para infecções disseminadas (Pfaller et al., 2007; Miceli et al., 2011).

As taxas de incidência de candidíase vêm aumentando a partir da década de 1980, estando entre 10% e 49%, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou em doentes hospitalizados sendo, nesse caso, considerada uma infecção nosocomial (Lockhart, 2014, Moriyama et al., 2014). A candidíase é a quarta doença mais comum em todo o mundo, entre as infecções sanguíneas nosocomiais, superando infecções causadas por bactérias Gram-negativas (Rorato, 2013). Esta pode ser dividida de três formas: superficial, mucosa e sistêmica (Papon et al., 2013). A forma superficial tem sua ocorrência na pele, pêlos e unhas, enquanto que a forma mucosa envolve a orofaringe, o esôfago e a região vulvo-vaginal (Papon et al., 2013). Entretanto, a forma mais comum e que envolve qualquer sítio anatômico é a sistêmica (Pappas, 2006).

Quando as leveduras do gênero *Candida* atingem a corrente sanguínea, causam candidemia. Esta é reconhecida como um grave problema de saúde pública, com altas taxas de morbimortalidade entre 40% a 60% (Giolo & Svidzinski, 2010). A presença do fungo no hospedeiro pode induzir a um largo espectro de resposta resultando em colonização, infecção, distúrbios de hipersensibilidade, reações tóxicas e sepse (Delaloye & Calandra, 2014). Conhecida fisiologicamente como uma síndrome clínica resultante da complexa interação entre o hospedeiro e o agente infeccioso, a sepse é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios que podem culminar com o choque séptico (Ferreira et al., 2014).

Diversos fatores estão associados ao aumento das infecções por *Candida*, o que reflete na sua importância clínica principalmente devido à alta da incidência dos casos de candidíase e candidemia. Dentre esses fatores estão a epidemia pelo vírus HIV, o aumento no número de transplantes e no tratamento do câncer, o aumento no tempo de internação hospitalar, uso de antibióticos de amplo espectro, presença de cateteres vasculares, nutrição parenteral, neutropenia, terapia de supressão imune, insuficiência renal ou hemodiálise (Lepak & Andes., 2011, LeibundGut-Landmann et al; 2012). Entre os adultos, a imunodepressão é mais comumente vista em pacientes com leucemia, linfoma e AIDS, assim como em pacientes submetidos à terapia imunodepressora, relacionada ou não a transplantes de órgãos ou de medula óssea. Esses pacientes estão sujeitos a um risco maior para desenvolver infecção devido à deficiência dos mecanismos básicos de defesa. A granulocitopenia, a disfunção celular (principalmente de linfócito T), a deficiência humoral congênita ou adquirida, a esplenectomia

e a deficiência mecânica (especialmente pela presença de cateteres) são os principais fatores que interferem na defesa orgânica desses pacientes (Silva, 2012).

A candidemia e as formas invasivas são as principais formas de candidíase sistêmica, envolvendo uma série de manifestações clínicas como candidíase disseminada aguda e crônica, artrites, osteomielites, infecções endovasculares, meningite, pneumonia, complicações renais e hepáticas entre outras (McCarty & Pappas, 2016). Ela se relaciona estreitamente com uma taxa elevada de morbidade e mortalidade, diferenciando-se assim, das infecções bacterianas. Pode comprometer órgãos vitais e causar sequelas graves, como complicações neurológicas em virtude de meningite fúngica, endocardite e falência renal (Marreto, 2014). Diferencia-se também das infecções bacterianas devido ao seu custo elevado associado, sobretudo à necessidade de maior tempo de internação hospitalar (Paramythiotou et al., 2014)

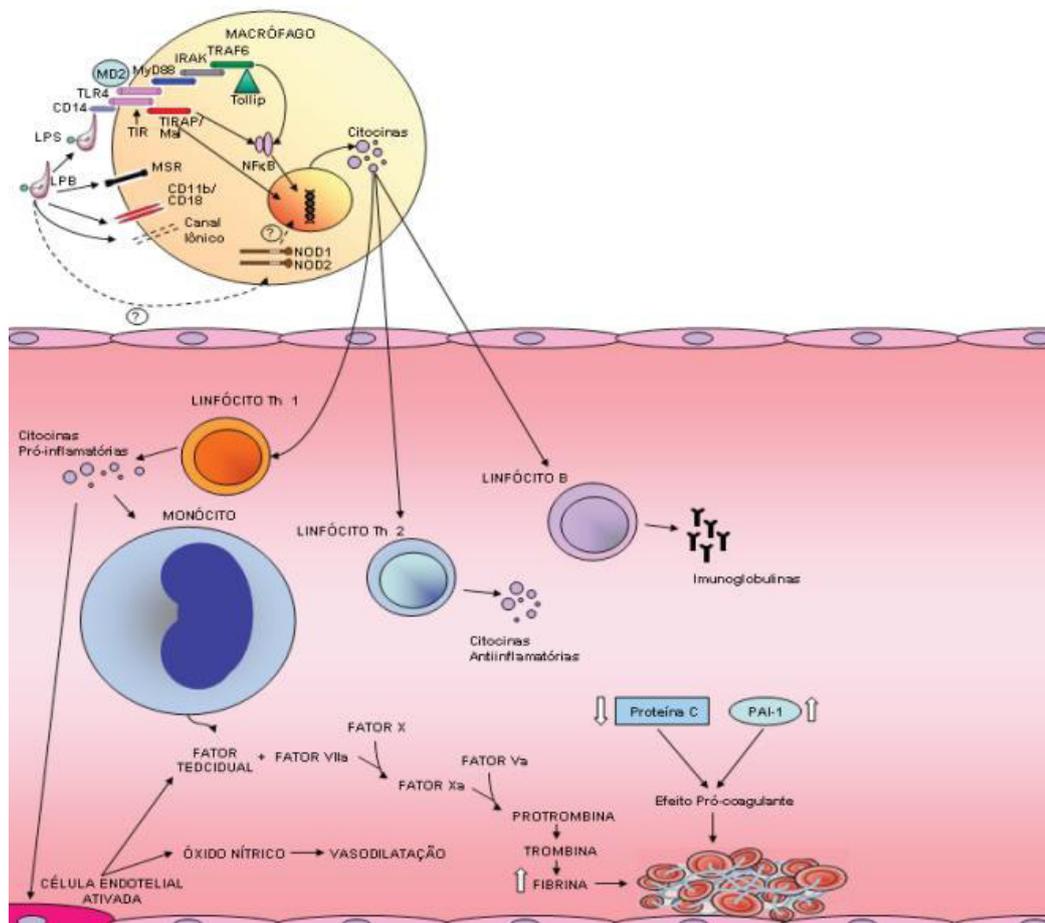
Alguns fatores estão relacionados aos casos de candidemia por espécies não-albicans, entre eles o contato prévio com fármacos antifúngicos, nutrição parenteral e pacientes do sexo feminino (Papadimitriou-Olivgeris et al., 2014). *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são mais comuns na América do Norte. A primeira apresenta alta prevalência na candidemia em pacientes idosos e no âmbito hospitalar. A segunda é mais prevalente como agente de candidemia em crianças e recém-nascidos prematuros.

A espécie *C. tropicalis* costuma ser frequentemente isolada na Ásia e aparece como um agente oportunista em hospedeiros neutropênicos ou quando há supressão da microbiota bacteriana devido ao uso de antibióticos e a danos na mucosa gastrointestinal. *C. krusei* apresenta elevada ocorrência em pacientes neutropênicos com candidemia decorrente de exposição ao fluconazol, já que a espécie é resistente a esse antifúngico e é ocasionalmente isolada de pacientes com doenças hematológicas e transplantados (Colombo & Guimarães, 2003; Pfaller et.al., 2010). Outras espécies de menor importância clínica como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. norvegensis* e *C. inconspícua* também já foram descritas como responsáveis por causar candidíase superficial e sistêmica (Colombo & Guimarães, 2003).

As espécies de *Candida* causam de 10 a 15% das infecções na corrente sanguínea e em torno de 5% de todos os casos de sepse (Vincent, 2009; Delaloye & Calandra, 2014). O tipo de resposta do hospedeiro e as características dos organismos infectantes são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse. A progressão da sepse vai ocorrer quando o hospedeiro não conseguir conter a infecção primária por diversos tipos de resistência, entre elas medicamentosa, à opsonização, à fagocitose e à presença de superantígenos (Russell, 2006).

A resposta imune inata é responsável pelo processo inflamatório inicial na sepse. É mediada por receptores de reconhecimento-padrão como os Toll-like (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Kortegen, 2006). Quando ativados, os TLRs desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que resulta na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição que promove a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (Baldwin, 2001).

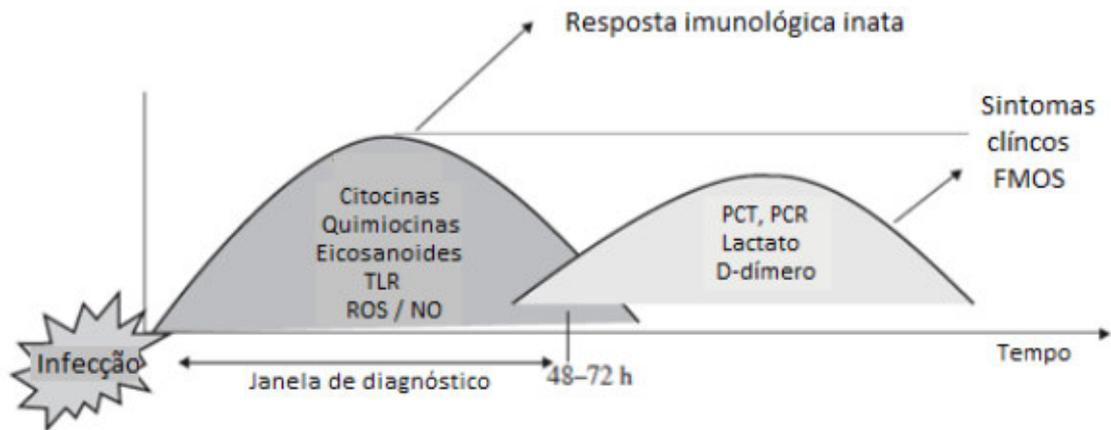
As citocinas estão entre os principais mediadores endógenos que desempenham uma resposta primordial à infecção. Primeiramente são liberadas pelas células residentes para, em seguida, serem liberadas pelas células que são recrutadas para o foco infeccioso. Quando ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8) se inicia uma cascata de eventos que resulta em hipotensão e dano tecidual. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico pode ser caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação de células circulantes ta



**Figura 2:** Mecanismos fisiopatológicos da sepse (Henki et al., 2009).

Em resposta à sepse por *Candida* ocorrem disfunções orgânicas no hospedeiro e, apesar da imunidade inata ser importante para combater a infecção, sua desregulação pode conduzir a

agravos, ocorrendo uma produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que levam à falência múltipla de órgãos (FMOS) e, conseqüentemente, à morte (Wang et al., 2014; Hutchins, 2014) (Figura 3).



**Figura 3:** Resposta inflamatória em cascata responsiva à infecção (Binkowska, 2015, adaptado).

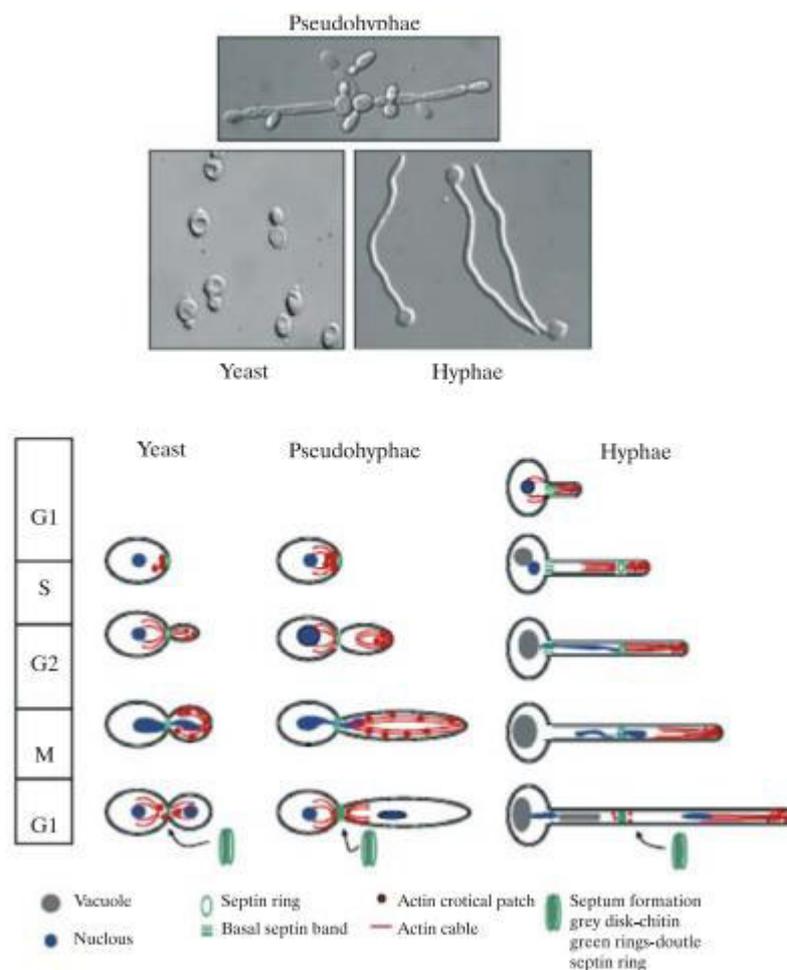
Algumas drogas imunossupressoras podem ser utilizadas em pesquisas com camundongos. Entre estes agentes, os mais empregados são a dexametasona, a ciclosporina e a ciclofosfamida, entre outras (Lallo, 1998; Castro, 1999; Lallo et al., 2002). A dexametasona é um glicocorticóide amplamente utilizado por suas propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias, possuindo atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T (Lill-Elghanian et al., 2002). Já a ciclosporina é um potente imunossupressor, exercendo seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupando as demais células da linhagem mielóide, conferindo-lhe certa seletividade (Matsuda Koyasy, 2000). A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada usada no tratamento de diversos tipos de câncer e de doenças autoimunes, sendo um potente imunossupressor, atuando em células com alta atividade mitótica e inibe tanto a resposta imune humoral quanto a celular (Garcia et al., 2004)

### 2.1.1 Patogenicidade e virulência de *C. albicans*

A espécie *C. albicans* é a mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e é a maior causadora de micoses profundas e candidíase vulvo-vaginal em todo o mundo (Sobel, 2007). Esta espécie pode crescer em três morfologias diferentes, respectivamente levedura, hifa e pseudo-hifa e, as diferenças entre esses tipos celulares, é importante no que se refere ao processo infeccioso, onde a forma de hifa tem

o poder de penetração em tecidos epiteliais bem superior às demais (Dalle et al., 2010). Além disso, no caso de leveduras serem fagocitadas por macrófagos, sua mudança para forma de hifas permite escapar desse fagócito (Jiménez-Lopez & Lorenz, 2013; Uwamahoro et al., 2014).

A patogenicidade de *C. albicans* apresenta, como aspecto marcante, o dimorfismo dessa espécie, ou seja, a transição entre as formas de leveduras ou hifas. O crescimento de hifas, forma mais invasiva, ocorre em temperaturas  $> 37^{\circ}\text{C}$ , pH neutro, alta concentração de  $\text{CO}_2$  e presença de N-acetilglicosamina. Em temperaturas de  $30^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} < 6$ , a forma predominante de crescimento das células é a levedura, mais envolvida no processo da disseminação da infecção no organismo. A formação de pseudo-hifas ocorre na temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  e em pH 5,5 (Sudbery, 2011) (Figura 4).

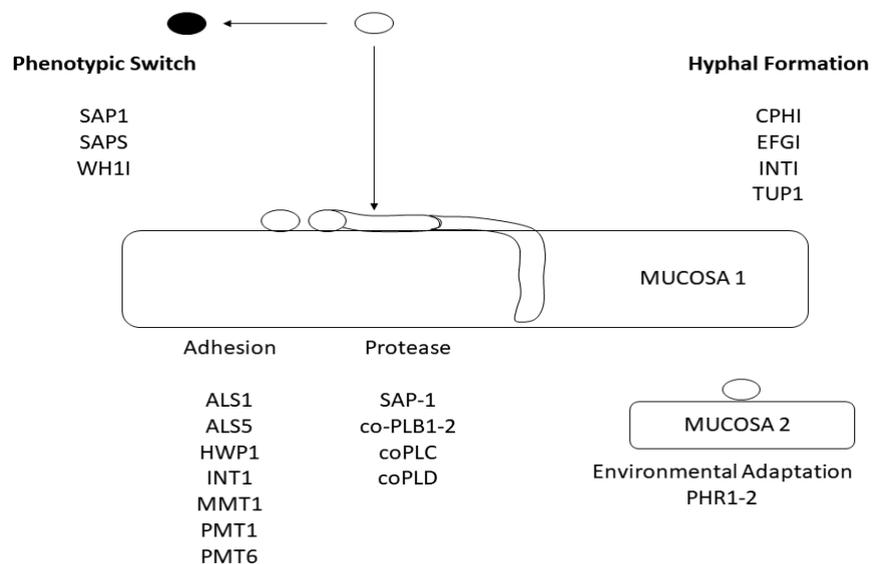


**Figura 4** Formas morfológicas de crescimento de *C. albicans* (Sudbery, 2011)

Alguns fatores genéticos no gênero *Candida*, como a via de transdução de sinais e fatores de transcrição, também influenciam nessa transformação morfológica (Huang, 2012). Isso representa um fator importante para que *C. albicans* possa causar, em humanos, infecções

superficiais, como a candidíase oral ou vaginal e a colonização de órgãos internos, produzindo infecções sistêmicas, de modo a comprometer a vida.

Por ser um patógeno que desenvolveu várias características de virulência, alguns fatores estão associados ao fato de *C. albicans* ser capaz de invadir tecidos e evadir-se de mecanismos de defesa do hospedeiro. O processo inicial de virulência de *C. albicans* é a sua adesão às células do hospedeiro, que pode ser mediado por uma variedade de proteínas expressa na superfície do patógeno e envolve a família de genes Agglutinin-Like Sequence (ALS) (Zhao et al., 2004). A expressão das adesinas é ocasionada por condições ambientais ou fisiológicas encontradas no hospedeiro (Álvares et al., 2007). Dentre outros fatores estão a morfologia da célula e a atividade das fosfolipases e proteinases, que são enzimas hidrolíticas extracelularmente secretadas pelo fungo, capazes de destruir a membrana celular do hospedeiro, favorecendo a invasão tecidual (Yang et al., 2003; Fotedar et al., 2005; Furlaneto – Maia et al., 2008). As fosfolipases têm sua atividade secretora em *C. albicans* regulada pelo gene PLB1, cuja expressão pode ser afetada por fatores nutricionais, condições ambientais e fase de crescimento do fungo. As proteinases são enzimas reguladas pelo gene SAP, com atividade proteolítica e capazes de degradar colágeno, queratina e peptídeos localizados na superfície de mucosas, podendo atuar também sobre componentes do sistema imunológico (Kumar et al., 2006) (Figura 5).



**Figura 5:** Genes envolvidos na virulência de *C. albicans* (adaptado de Kumar et al., 2006)

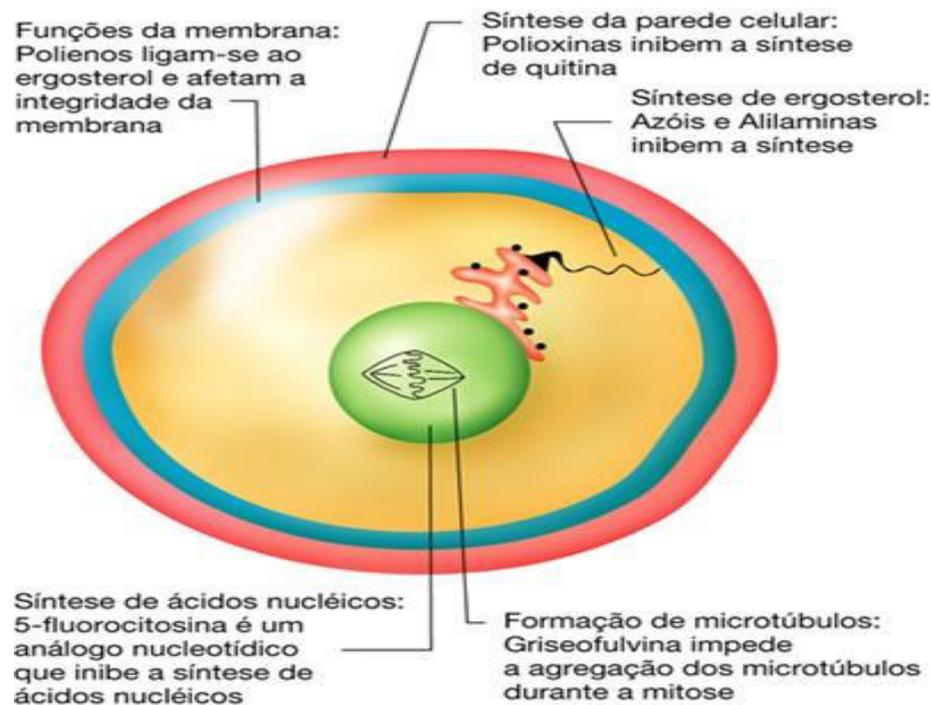
Outro aspecto importante para a patogenicidade e potencial de virulência em *C. albicans* é a formação de biofilmes, que representam uma comunidade microbiana estruturada. Os

biofilmes são constituídos por uma camada basal de células na mucosa ou em um dispositivo médico, como catéteres. Uma matriz extracelular é liberada, criando um micro-ambiente que evita a saída de células de áreas como boca, intestino e vagina, além de promover resistência aos antibióticos e a invasão por células de defesa do sangue (Soll, 2008). Ocorre ainda a produção de células-filhas menos aderidas, que podem se desprender do biofilme maduro, funcionando como um reservatório de células infectantes causando a septicemia no paciente (Ramage et al., 2005; Vinitha & Ballal, 2007).

## **2.2 Tratamento da candidíase e mecanismo de ação das drogas**

A célula fúngica, assim como a célula humana, é eucariótica. Várias drogas antimicrobianas podem ser utilizadas no tratamento das infecções fúngicas, porém essa variedade se torna relativamente pequena quando comparado ao arsenal de drogas disponíveis para o tratamento das infecções bacterianas (Silva, 2016).

Os agentes antifúngicos são classificados de acordo com seu alvo de atuação na célula fúngica. Podem interferir na síntese de ácidos nucleicos, no ergosterol e na integridade da membrana e da parede celular e em outros sítios. A partir da década de 90 tem havido uma descoberta crescente, embora limitada, de componentes e classes antifúngicas pertencentes aos polienos, azóis, equinocandinas e análogos de nucleósidos (Paramythiotou et al., 2014; Sardi et al., 2013) (Figura 6).



**Figura 6:** Mecanismo de ação de agentes antifúngicos (Madigan et al., 2010)

A  $14\alpha$ -desmetilase (CYP51), enzima do citocromo P450 importante no crescimento fúngico, é alvo importante para o desenvolvimento de drogas (Singh et al., 2015). Diferentes isoformas da CYP51 estão presentes em todos os organismos vivos, uma vez que os produtos da via metabólica na qual esta enzima participa, os esteróides, tem importância fundamental na manutenção da homeostasia, mantendo a integridade, fluidez e a permeabilidade da membrana celular. Nos fungos, o ergosterol é o esteroide produzido por esta via metabólica (Sueth-Santiago et al., 2015). O agente antifúngico ideal deve, portanto, ser um potente inibidor da CYP51 fúngica, deixando inalterada a CYP51 humana (Trosken et al., 2006).

A classe dos polienos tem como seus maiores representantes a anfotericina B e a nistatina. Esses fármacos atuam ligando-se aos esteróides da membrana celular. A ligação resulta na formação de canais aquosos e não aquosos, aumentando a permeabilidade da membrana e promovendo o extravasamento dos constituintes intracelulares como potássio, magnésio e açúcares e, conseqüentemente, a morte da célula (Perman et al., 2009). A anfotericina B é o fármaco de eleição para o tratamento da maioria das infecções fúngicas, entretanto, apresenta grande toxicidade sistêmica e local, o que limita o seu uso. A nistatina tem sua ação basicamente restrita à candidíase oral e a flucitosina, além de seu limitado espectro de atividade, apresenta considerável toxicidade.

A nefrotoxicidade é um dos principais efeitos ocasionados pela administração da anfotericina B e, de modo a minimizar esse problema e procurando-se aumentar a eficácia do tratamento, foram desenvolvidas três formulações: a anfotericina B lipossômica, que permite uma menor absorção da anfotericina B pelo sistema reticuloendotelial resultando na sua maior permanência na corrente sanguínea, o complexo lipídico de anfotericina B, composto 50% de anfotericina B e 50% de composto lipídico e a anfotericina B em dispersão coloidal, formada por um complexo estável com o sulfato de colesterol. Entretanto, o custo elevado de todas essas formulações limita o seu uso. (Kontoyiannis et al., 2003, Paramythiotou et al., 2014).

Os azóis representam a classe de antifúngicos com o maior número de fármacos. Os triazóis, representados pelo fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol são os antifúngicos mais usados na candidemia (Spampinato & Leonardi, 2013; Maubon et al., 2014). Atuam inibindo a enzima-alvo lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, que é envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol. O ergosterol é um importante componente da membrana celular fúngica e, dessa forma, ocorrerá o acúmulo do composto tóxico 14-  $\alpha$ -metil- 3,6-diol. Como o ergosterol ficará reduzido, a estrutura da membrana celular será alterada, inibindo o crescimento dos fungos (Sanguinetti, 2015). O fluconazol é o fármaco mais prescrito pelo seu baixo custo e o seu uso é recomendado na candidíase invasiva em pacientes que não tenham sido anteriormente medicados com antifúngicos pertencentes à classe dos azóis (Shoham & Marr, 2012; Paramythiotou et al., 2014.)

Uma nova classe de drogas, as equinocandinas, surgiu com ação em todas as espécies de *Candida*. Agem inibindo a síntese de glucanas, presentes na membrana celular do fungo, inibindo a enzima (1,3)  $\beta$ -D - glucana sintase. A inibição dessa enzima causa o esgotamento dos polímeros de glucana na célula fúngica, resultando em uma parede celular anormal, fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico (Chen & Sorrell, 2007; Kuse et al., 2007). Fazem parte dessa classe a caspofungina, micafulgina e anidulafungina. (Grossman et al., 2014; Koehler et al., 2014; Paramythiotou et al., 2014). As equinocandinas atuam na inibição não competitiva da síntese do polissacarídeo  $\beta$ -(1, 3)-D-glucano que tem como função a síntese da parede celular, mantendo a sua integridade. Sendo assim, aumenta a capacidade de ocorrer lise osmótica levando à morte da célula fúngica. O fato dessa classe de fármacos atuar na parede celular do fungo traz algumas vantagens tais como o menor risco de efeitos colaterais já que células animais não possuem essa estrutura, e a sua utilização nos casos de resistência antifúngicos daquelas classes que atuam na membrana celular (Spampinato & Leonardi, 2013; Grossman et al., 2014; Maubon et al., 2014; Paramythiotou et al., 2014).

Dentro dos análogos de nucleósidos, destaca-se a flucitosina, que tem ação fungistática, entrando na célula fúngica através de citosina permease e convertendo-se em 5-fluorouracilo. O 5-FU vai inibir a enzima timidilato-sintetase e interferir na síntese de DNA e RNA (Cuenca-Estrella, 2010; Spampinato & Leonardi, 2013; Maubon et al., 2014.)

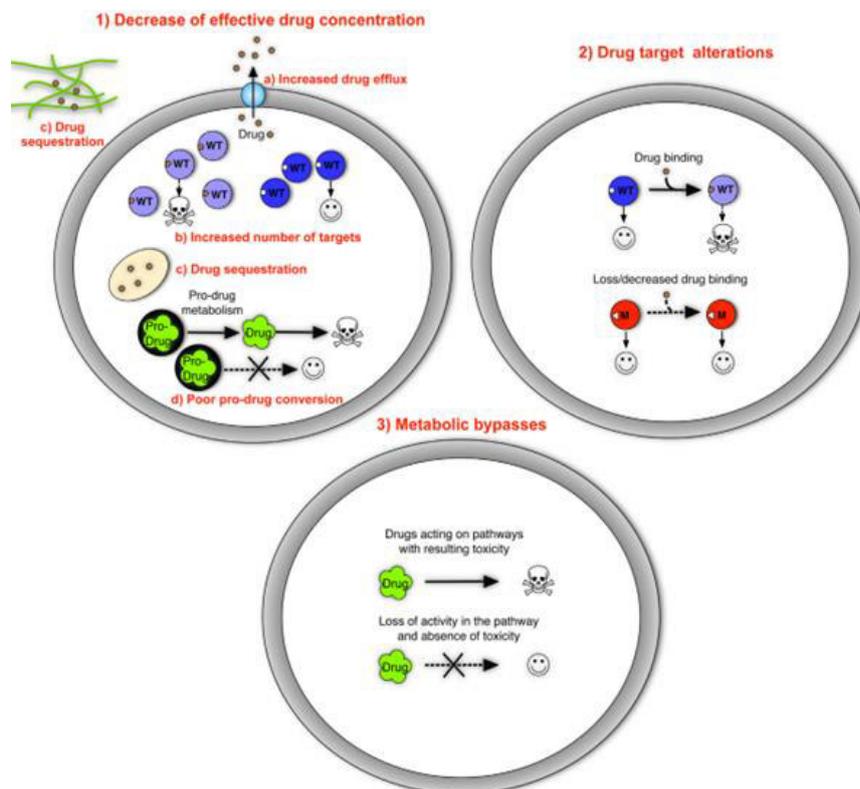
Novas estratégias terapêuticas vêm sendo traçadas para o desenvolvimento de fármacos. Alguns triazóis estão em processo de investigação como o ravuconazol, albaconazol e o isavuconazol. Estudos preliminares vêm demonstrando que esses fármacos apresentam um bom perfil farmacocinético e baixa toxicidade, com propriedades semelhantes ao fluconazol e ao voriconazol e atividade *in vitro* contra *Candida* até mesmo em estirpes resistentes ao fluconazol. O albaconazol tem demonstrado grande atividade *in vitro* e *in vivo* contra *Candida*, com propriedades melhores que a do fluconazol. O isovocunazol, a partir do pró-fármaco sulfato de isavuconazonium, tem demonstrado atividade na candidemia e candidose invasiva, com mecanismo de ação semelhante a outros triazóis e com atividade em fungos resistentes aos triazóis (Allen et al., 2015). Além disso, moléculas como o SCY 078 e o T-2307 estão sendo desenvolvidas para cepas com resistência às equinocandinas. O primeiro é um derivado semissintético da enfumagina e, o segundo, é uma arilamidina que atua destruindo a membrana das mitocôndrias (Moriyama et al., 2014; Lepak et al., 2015; Wiederhold et al., 2015).

Outra estratégia terapêutica que vem sendo desenvolvida para a candidíase é o surgimento de vacinas. Algumas estratégias têm sido exploradas para o desenvolvimento de vacinas contra a candidíase invasiva e mucocutânea, entre elas a utilização de organismos inativados pelo calor e organismos vivos atenuados, proteínas das famílias dos genes SAP e ALS, glicoconjugados, receptores iC3b na superfície celular de *Candida* spp, dentre outras (Edwards, 2012). Entretanto, a ausência de um mercado de massas e o elevado custo, associado à dificuldade de obtenção da vacina, contribuem para que não haja uma evolução clínica no contexto atual (Cassone & Casadevall, 2012).

O surgimento de novos antifúngicos ainda pouco expressivo e essas drogas estão em desvantagens quando se compara o surgimento de novas drogas antibacterianas. Altos índices de resistência dos fungos vêm sendo descritos, fazendo-se necessário a escolha do fármaco adequado e da dose correta a ser administrada ao paciente, evitando-se tanto a sobredosagem ou superdosagem e seus efeitos indesejáveis, assim como a seleção de microrganismos resistentes.

## 2.3 Resistência antifúngica

Atualmente, várias cepas de fungos encontram-se resistentes aos mais diversos compostos químicos, com propriedades antifúngicas, disponíveis comercialmente. A resistência antifúngica pode ser de três tipos. A forma primária ou intrínseca é aquela anterior à exposição antifúngica. A forma secundária ou adquirida ocorre após a exposição antifúngica e pode ser reversível devido à adaptação transitória, ou não-reversível, que é resultado de várias alterações genéticas. A forma clínica refere-se ao desfecho não-favorável do paciente, apesar da terapia antifúngica, e está diretamente ligada às resistências primária ou secundária (Morais, 2012). Em nível molecular, esses mecanismos de resistência se enquadram em diferentes categorias, que incluem a diminuição da concentração efetiva da droga, alterações do alvo das drogas e bypass metabólico (Sanglard, 2016) (Figura 7).



**Figura 7:** Mecanismo básico de resistência antifúngica (Sanglard, 2016)

Com o aumento da população de risco e o maior uso de antifúngicos, tem-se observado um aumento nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) das cepas de *C. albicans*, o que pode estar relacionado às falhas terapêuticas. Em relação aos polienos, a resistência de *C. albicans* é

menos comum à anfotericina B e está associada à substituição do ergosterol por uma molécula precursora ou uma redução geral dos esteróis na membrana plasmática (Kanafani et al., 2008).

A utilização de plantas e suas moléculas bioativas no tratamento da candidíase surgiu como uma alternativa promissora frente à resistência que o gênero *Candida* vem apresentando às diferentes drogas. A fitoterapia é uma das mais antigas práticas terapêuticas da humanidade e, dentre as vantagens que esta prática apresenta se pode citar a dificuldade econômica de grande parte da população, que não permite o acesso à produtos industrializados, a grande possibilidade de utilização da biodiversidade da flora e o difícil acesso à assistência médica e farmacêutica, o que aumenta consideravelmente o uso empírico de diversas plantas.

## 2.4 Potencial biológico do gênero *Terminalia*

A família *Combretaceae*, constituída por aproximadamente 20 gêneros de 600 espécies, apresenta os gêneros *Combretum* e *Terminalia* como os mais relevantes, compreendendo, cada um, cerca de 250 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). No Brasil, ocorrem cinco gêneros nativos com 60 espécies (*Buchenavia*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*) e dois gêneros exóticos (*Bucida* e *Quisqualis*) (Batista, 2011).

Vários estudos que descrevem atividades biológicas das diferentes espécies do gênero *Terminalia* encontram-se descritas na literatura. Entre essas atividades, pode-se enumerar a antifúngica de *T. brachystemma* (Liu et al., 2009), citotóxica e antioxidante de *T. tagifolia* (Ayres et al., 2009), *T. littoralis* como redutora de LDL (Ibegbulem et al., 2013), a atividade antibacteriana de *T. mantaly* (Kokora et al., 2013), anticâncer (Kandil & Nassal, 1998), nas desordens cardiovasculares (Dwivedi, 2007), citotóxica (Saxena et al., 2007; El-Ameen et al., 2013) e antiviral de *T. arjuna* (Cheng et al., 2002), antimicrobiana (Silva et al., 1997) e antihelmíntica de *T. macroptera* (Conrad et al., 1998), antifúngica, antibacteriana, citotóxica (Moshi & Mbwambo, 2005; Eldeen et al., 2006), e antiinflamatória (Mochizuki & Hasegawa, 2007) de *T. sericea* imunossupressora de *T. superba* (Tabopda et al., 2008), anti-anafilática de *T. chebula* (Shin et al., 2001), hipolipidêmica de *T. chebulla* e *T. bellerica* (Saravanan et al., 2007), tripanocida de *T. avicennioids* (Bizimana et al., 2006) e anti-HIV de *T. hórrida* (Mekkawy et al., 1998).

Baba-Moussa et al (1999) afirmaram que uma das atividades mais estudadas para as espécies do gênero *Terminalia* é a antifúngica. Cock & Van Vuuren (2015) avaliaram a atividade antifúngica de duas espécies pertencentes ao gênero *Terminalia* (*T. pruinoides*, *T.*

*sericea*) e comprovaram a atividade das espécies. Aneja et al. (2012) avaliaram o potencial fungicida de *T. arjuna* em três espécies de *Candida*. Masoko & Eloff (2005), trabalhando com extratos alcoólicos de folhas de *T. avennioides* e *T. mollis* demonstraram essa atividade. Batawila et al (2005), em experimentos realizados com extratos de folhas, raízes e caules de *T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis*, *T. sambesica* e com folhas de *T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis*, *T. sambesica*, verificaram que todos os extratos avaliados se mostraram ativos frente às cepas testadas. Carpano et al. (2003) demonstraram a atividade antifúngica de *T. australis* em *C. albicans* e *C. krusei*.

A espécie *T. catappa* encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais, particularmente localizadas em áreas costeiras. É nativa de regiões da costa do Oceano Índico, na Ásia tropical e da região que compreende várias ilhas a oeste do Oceano Pacífico, como Malásia, Indonésia e ilhas da região da Melanésia (Terças, 2013). Apesar de ser uma espécie exótica, é adaptada às condições edafoclimáticas do Brasil, resistente ao calor, frio, escassez de água, ventos fortes e salinidade (Silva, 2012). *T. catappa* pertence ao Super Reino *Eukaryota*, Reino *Plantae*, Divisão *Magnoliophyta*, Ordem *Myrtales*, Família *Combretaceae*.

Popularmente conhecida no Brasil por castanheira, cuca, chapéu-de-sol, amendoeira-da-praia ou sete-copas, *T. catappa* também é largamente utilizada na ornamentação de ruas e avenidas, favorecendo o sombreamento (Terças, 2013). É uma árvore que fornece sombra, possuindo uma copa ampla, com folhas que dão aspecto ornamental (Thomson & Evans, 2006). É plantada também para a produção de castanhas comestíveis, além da sua madeira ser utilizada para confecção de utensílios e objetos decorativos. Seu sistema de raízes desempenha um papel essencial na estabilização do litoral. Apesar de ser comumente encontrada em áreas urbanas litorâneas, ela é adaptável a diferentes solos, incluindo os inférteis e arenosos (Thomson & Evans, 2006). É apreciada pelas suas qualidades ornamentais, alimentares (frutos e amêndoas) e medicinais. Popularmente, é indicada para disenteria, diarreia, cólicas intestinais, verminose, ejaculação precoce e verminoses (Figura 8).



**Figura 8:** *Terminalia catappa* L. (São Luís – MA)

A espécie *T. catappa* apresenta diversas atividades biológicas descritas na literatura como antioxidante (Chyau et al., 2006; Kinoshita et al., 2007), anticâncer (Naitik et al., 2012), antidiabética (Nagappa et al., 2003), antifúngica (Mandloi, 2013; Ribeiro, 2016; Terças, 2017), antibacteriana (Fyhrquist et al., 2002; Manzur et al., 2011), antimalárica (Mudi & Muhammad, 2010) e antinociceptiva (Ratnasooriya et al., 2002). Essas atividades foram atribuídas principalmente à presença de compostos fenólicos, com alguns já isolados e caracterizados, terpenóides, esqualeno, flavonóides (isovitexina, vitexina e rutina), ácido gálico, taninos hidrolisados, como anômeros de punicalagina como compostos majoritários, punicalina, terflavinas A e B, tergalagina, tercatana, ácido chebulágico, geranina, granato B e corilagina (Fan et al., 2004; Lin et al., 2000)

A atividade antioxidante de *T. Catappa* tem sido atribuída principalmente aos taninos hidrolisáveis, onde a punicalina e a punicalagina destacam-se como os compostos mais abundantes associados a essa ação, além de outros compostos fenólicos menos abundantes como ácidos benzóicos e cumáricos e seus derivados (Chyau et al., 2006). Punicalina e punicalagina também estão associadas à atividade antitumoral dessa espécie vegetal (Chen et al., 2000). Ácidos triterpênicos são associados à atividade antiinflamatória, principalmente o ácido ursólico e seu derivado (Fan et al., 2004). Alcalóides presentes nessa planta apresentam

atividade na inibição da ejaculação precoce (Ratnasooriya et al., 2002). Além, disso, a partir de análises cromatográficas, alguns compostos de *T. catappa* já foram identificados.

Mau et al (2003), com o auxílio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) e olfatometria identificaram 18 compostos com atividade aromática e antioxidante, entre eles fitol, terpenos, aldeídos e outros compostos simples. Chyau et al (2006), fazendo uso de CG/MS, identificaram ácidos cumáricos e outros aos quais foi atribuída atividade antioxidante. Ko et al (2002), através de CG e HPLC identificaram o composto esqualeno ao qual foi atribuído atividade antioxidante.

O processo de descoberta de moléculas bioativas envolve a identificação, otimização das propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e a seleção dos compostos líderes para o desenvolvimento posterior dos fármacos. As ferramentas biotecnológicas assumiram grande importância na identificação e desenvolvimento de novas moléculas bioativas (Guido et al, 2010). A partir da elucidação dos constituintes químicos das espécies vegetais, aliados à ferramentas computacionais, surgem novas perspectivas no campo da Bioinformática visando o desenvolvimento de novos fármacos.

## **2.5 Novas perspectivas e ferramentas para o desenvolvimento de fármacos no controle de *C. albicans*.**

O conhecimento das vias de ação dos fármacos gerados pela farmacologia e farmacocinética aliado aos dados de sequenciamento de macromoléculas alvo e da identificação de mutações nestas pela biologia molecular, permite a posterior aplicação de ferramentas de bioinformática para a pesquisa de novos agentes com atividade antifúngica, como também em estudos que visem compreender como estas mutações atuam na resistência das cepas de *Candida* spp aos fármacos tradicionais.

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizaram protocolos de bioinformática para avaliação e seleção de novas moléculas juntamente com a avaliação *in vitro* dessas sobre *C. albicans*. Esses trabalhos utilizaram cálculos de docagem molecular para fazer a seleção de quais dos compostos testados, em sua maioria derivados e análogos a moléculas com conhecido potencial sobre *C. albicans*, configurava-se como mais promissor para o tratamento de *C. albicans*. A docagem molecular indicou com exatidão, na maioria dos trabalhos, qual das moléculas a ser avaliadas pelos autores seriam detentoras de maior afinidade eletrônica com o receptor alvo, fato esse confirmado por testes *in vitro*, onde as moléculas indicadas pela

docagem foram as que exibiram os melhores resultados de atividade biológica sobre *C. albicans* (Allochio Filho et al., 2016; Ansari et al., 2016; Shah et al., 2016; Sethi et al., 2016).

O Banco de Dados de Proteína (PDB) é o principal banco de dados de estruturas cristalográficas. Até o presente momento, existem 136 estruturas cristalográficas de *C. albicans* disponíveis, porém nenhuma dessas estruturas é de alguns dos alvos comumente pesquisados. Os autores que se utilizaram das estruturas cristalográficas, da CYP51, por exemplo, utilizaram a estrutura da CYP51 de outros organismos modelos como *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Essa prática pode não ser a mais adequada, pois existem diferenças consideráveis nas sequências de aminoácidos da CYP51 de *C. albicans* e nas sequências desses alvos, indicando baixa similaridade entre as sequências, resultando em consideráveis diferenças estruturais entre as CYP51. Essas diferenças podem levar à interpretação de resultados que podem não condizer com a realidade. A sequência da CYP51 de *C. albicans* (NCBI BAB03400.1) apresenta apenas 27% de similaridade com a sequência da estrutura da CYP51 de *M. tuberculosis* (PDB ID: 1EA1).

Embora os projetos de genômica estrutural apresentem grande sucesso e que o avanço tecnológico dos métodos de cristalografia de raios-X e RMN estejam em plena expansão, a maiorias das estruturas experimentais de alvos com potencial terapêutico não estarão disponíveis em um futuro próximo (Deane & Bluddell, 2003; Watson et al., 2007).

Caso a estrutura tridimensional não esteja resolvida na literatura, uma etapa extra é realizada para a obtenção de um modelo homólogo. Para tal, pode-se utilizar a técnica de modelagem por homologia onde uma nova estrutura tridimensional é gerada com base em uma ou mais estruturas já conhecidas.

A modelagem por homologia está fundamentalmente baseada na observação geral de que proteínas com sequências similares têm estruturas semelhantes. Utilizando-se de estruturas estabelecidas experimentalmente por cristalografia de raios-x, disponíveis no PDB, chamadas de moldes, modelos 3D de alvos podem ser obtidos para uma sequência homóloga desde que esta última compartilhe similaridade de sequência mínima de 30% com a estrutura molde. A regra geral que relaciona o percentual de similaridade entre o modelo e o alvo a ser modelado com a aplicabilidade da estrutura 3D gerada é considerada a seguir (Cavasotto & Phatak, 2009):

- acima de 50% de similaridade entre as sequências: o modelo gerado é considerado preciso o suficiente para aplicações de descoberta de compostos biologicamente ativos;
- entre 25 e 50% de similaridade entre as sequências: o modelo gerado pode ser usado para avaliar alvos farmacológicos potenciais e para o planejamento de experimentos de

mutagênese; entre 10 e 25% de similaridade entre as sequências: o modelo gerado pode ser usado somente de forma especulativa.

Nesse contexto, a modelagem por homologia é o método mais bem-sucedido de predição de estruturas de proteínas ainda não cristalografadas, sendo uma alternativa versátil e rápida para gerar modelos estruturais confiáveis os quais são utilizados tanto para o estudo da função de proteínas quanto para a descoberta, planejamento e otimização de novos fármacos (Deane & Blundell, 2003; Watson et al., 2007; Cavasotto & Phatak 2009). As estruturas cristalografadas e os modelos gerados em modelagem por homologia são posteriormente utilizados em ensaios de docagem molecular para avaliar a interação destes receptores com os candidatos a fármacos.

A docagem molecular é o principal estudo computacional realizado para estudar as possíveis interações dos candidatos a novos agentes antifúngicos. Consiste na predição do posicionamento (orientação e conformação) de um ligante (fármaco ou candidato a fármaco) dentro de um sítio de interação alvo (Kitchen et al., 2004). Com o aumento de demandas no campo da biologia molecular estrutural e na área de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, a docagem ganhou grande importância, especialmente nas três últimas décadas. O rápido aumento na capacidade de cálculo dos processadores modernos e maior facilidade de acesso às estruturas de pequenas moléculas (ligantes) em bancos de estruturas foram determinantes para isso (Morris & Lim–Wilby, 2008).

Após os cálculos de docagem molecular, se faz necessário que sejam realizadas simulações de Dinâmica Molecular da conformação de interação candidato a fármaco–alvo, para que se estude como essa interação se comporta em um meio biológico simulado, visto que a flexibilidade é atribuída também ao receptor, possibilitando uma amostragem das interações e da complementaridade ligante-receptor. Além disso, a incorporação de íons e moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é essencial para uma caracterização mais aproximada do ambiente fisiológico (Namba et al., 2008).

Trabalhos que se utilizaram de estruturas modelos obtidas por modelagem por homologia podem ser considerados mais eficientes acerca da predição de novos candidatos a fármaco, visto que a similaridade com estruturas disponíveis no PDB que podem ser utilizadas como moldes para os modelos da CYP51 de *C. albicans* chegam até a 66% de similaridade, permitindo assim, a geração de um modelo confiável.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antifúngico *in silico*, *in vitro* e *in vivo* do Extrato Hidroetanólico (EB) de *T. catappa* em leveduras de *Candida*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a citotoxicidade de EB, FDCM e FAq em macrófagos murinos RAW 264.7;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de EB em leveduras de *Candida*;
- Avaliar o efeito de EB sobre a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos.
- Identificar a classe dos metabólitos presentes em EB e caracterizar quimicamente EB e suas frações
- Utilizar simulações computacionais na estrutura do alvo biológico para previsão de atividade *in silico* de substâncias de *T. catappa*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das plantas e preparação do extrato hidroetanólico e frações

As folhas frescas de *T. catappa* (4,3 kg) foram coletadas na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. A espécie foi identificada e catalogada no Herbário do Maranhão, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Maranhão sob número de tombo 9208.

A preparação do extrato e obtenção das frações foi realizada no Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos da Universidade Federal do Maranhão. Para preparação do extrato hidroetanólico de *T. catappa* (EB), as folhas foram secas em temperatura ambiente por aproximadamente 15 dias e, o material seco (1 kg), foi moído em moinho de facas. O pó obtido (660 g) foi submetido à maceração e imerso em EtOH:H<sub>2</sub>O, na proporção de 1:4 (planta e álcool, respectivamente). A troca do solvente foi realizada a cada 48 h, sendo esse processo repetido por três vezes. As soluções extrativas foram filtradas em papel filtro Whatman e reunidas. Posteriormente, foram concentradas em evaporador rotativo à temperatura de 40°C, liofilizadas em liofilizador de bandeja e mantidas em dessecador.

O extrato bruto hidroetanólico de *T. catappa* (EB) foi ressuspenso em H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2 v/v) e submetido à partição líquido-líquido com diclorometano obtendo-se, ao final, duas frações de diferentes polaridades: a fração diclorometânica (FDCM), menos polar e a fração aquosa (FAq), mais polar. A quantidade total de EB utilizado para o fracionamento foi de 7,17 g. FDCM foi concentrada em evaporador rotativo à 35°C e, juntamente com FAq, foi mantida em dessecador (Terças, 2017 com adaptações).

### 4.2 Análise fitoquímica

Para avaliar a presença de metabólitos secundários (taninos, catequinas, resina, saponinas, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, leucoantocianidinas, esteróides, triterpenos e alcalóides), EB foi solubilizado em etanol 70% de acordo com Matos (2009) e procedeu-se com testes fitoquímicos através de ensaios semi-quantitativos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacognosia II da Universidade Federal do Maranhão.

### 4.3 Análise química

#### 4.3.1 Análise de EB, FDCM e FAq por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector Ultravioleta (HPLC-UV)

Para a HPLC-UV foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes dos extratos. As amostras passaram por uma extração em fase sólida utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Os compostos foram eluídos a partir de cartuchos utilizando 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas. O extrato seco foi diluído para 10 mg/mL em solvente no HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas directamente na HPLC-UV com detecção a 270 nm (Mininel et al., 2014)

Utilizou-se um sistema HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário, detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (água e ácido acético a 2%) e B (metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 60 % de B em 60 min. O fluxo foi de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi de 20°C, volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os dados foram processados utilizando o software LC Solution (Shimadzu). O HPLC-UV foi realizado na Central Analítica do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Maranhão.

#### 4.3.2 Análises de EB por Cromatografia Líquida por Ionização Eeletrospray com Ion Trap acoplada à espectrometria de massa em múltiplos estágios (LC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>)

Para o ensaio LC-ESI-IT-MS, dissolveu-se 10 mg de de EB em 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). A amostra foi filtrada através de um filtro PTFE de 0,22 µm, e alíquotas de 20 µL foram injetadas no LC-MS e directamente no sistema FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>.

O EB foi analisado por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific<sup>®</sup>. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex<sup>®</sup> C18 100 Å com poros de 5µm, e dimensões de 4,6 x 100 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água, ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), acrescentadas de ácido fórmico 0,1%, em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 60 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min

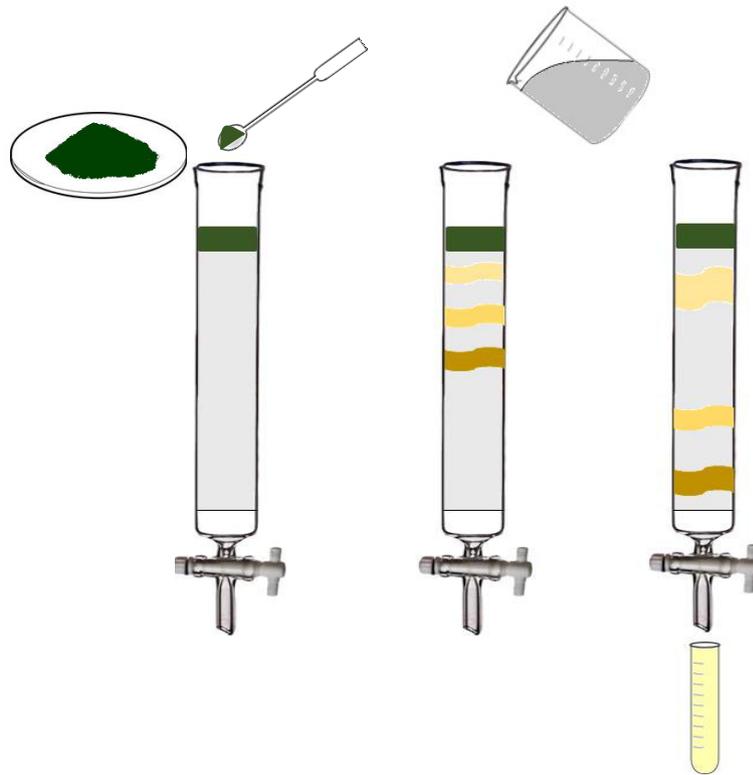
Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific<sup>®</sup>, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por eletrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MSn), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise de todos os espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *dem/z* 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

A infusão de fluxo direto da amostra foi realizada num analisador do tipo Ion trap da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ESI, em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL/min. A análise completa de varrimento foi registrada na gama *m/z* de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa *m/z*. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada utilizando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons de produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos de EB foi feita comparando com a literatura seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bios prospecção de Produtos Naturais do Instituto de Biociências da UNESP.

#### 4.3.3 Separação dos compostos por Cromatografia em Coluna (CC)

Na tentativa de separar os constituintes de *T. catappa*, EB (2g) foi subfracionado por cromatografia em coluna clássica com sílica gel. A coluna foi empacotada com fase estacionária composta por sílica gel 60A (70-230 mesh; Merck<sup>®</sup>). O extrato foi eluído com os solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol, sendo a

quantidade de solvente aplicada determinada pela capacidade de arraste em cada concentração (Figura 9).



**Figura 9:** Cromatografia em Coluna para separação dos compostos do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa*.

As subfrações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de alumínio para cromatografia em sílica gel 60 F250 (Merck<sup>®</sup>) e fase móvel, utilizando luz UV como revelador geral.

A técnica de CCD foi realizada mediante a diferença entre as forças de adsorção das moléculas presentes nas amostras, entre a solubilidade da fase móvel (solvente) e a uma fase estacionária (placa de sílica). Cada cromatoplaca (placa de sílica com as substâncias separadas) foi analisada sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 365 nm. Esta técnica foi empregada sempre ao final de cada subfracionamento para avaliar o perfil de compostos presentes ou reunir de acordo com similaridade de polaridade.

## 4.4 Estudos *in silico*

### 4.4.1 Estruturas dos compostos e receptor

Os compostos identificados por LC-ESI-IT-MS no Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* (ácido elágico, ácido galágico, punicalina e punicalagina) foram estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o GaussView 5.0.8 (Dennington et al., 2009). As propriedades geométricas e vibracionais foram calculadas (otimizadas) no vácuo em nível do método da Teoria do Funcional da Densidade (TFD) utilizando-se o funcional híbrido B3LYP combinado com a base 6-31 ++ G (d, p) com o programa Gaussian 09 (Frisch et al., 2009).

A estrutura 3D da 14-alpha demethylase de *C. albicans* (CaCYP51) foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) código 5FSA, resolvida por cristalografia de raios-x, com resolução de 2.86 Å. O fungicida posaconazol, presente na estrutura, bem como demais moléculas foram removidos, mantendo-se apenas uma das duas cadeias homólogas juntamente com seu grupamento HEME.

### 4.4.2 Docagem molecular

A estrutura da CaCYP51 e dos ligantes foi preparada para os cálculos de docagem com o módulo AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6. A estrutura do CaCYP51 foi considerada rígida enquanto que cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais de Gasteiger foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Hidrogênios apolares de proteína e ligante foram subsequentemente fundidos. Uma caixa cúbica de 120 × 120 × 120 pontos com um espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foi gerada para o alvo proteína inteira. A caixa de grade foi centrada no grupo HEME da CaCPY51. Os métodos de pesquisa global algoritmo genético Lamarckian (LGA) e busca local (LS) pseudo-Solis e Wets foram aplicados na pesquisa de docking. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de docking. O restante dos parâmetros de encaixe foram definidos como os valores padrão. As coordenadas iniciais foram escolhidas utilizando o critério de menor conformação de encaixe do cluster com menor energia combinada com a inspeção visual, segundo Ramos et al (2012) e Silva et al., (2017). O docking molecular foi realizado usando AutoDock 4.2 (Morris et. al., 2009). A coordenada da conformação de menor energia do complexo foi escolhida como ponto inicial para as simulações por dinâmica molecular.

#### 4.4.3 Dinâmica molecular do complexo

As simulações por dinâmica molecular do complexo selecionado na docagem molecular foram realizadas com o software GROMACS 5.1.4 (Abraham et al., 2016) conforme Ramos et al (2012). A topologia dos ligantes foi gerada pelo Automated Topology Builder (ATB) and Repository versão 2.1 (Maldi et. al., 2011). Os estados de protonação das histidinas das proteínas foram determinados utilizando o servidor online H++ - <http://biophysics.cs.vt.edu/hppdetails.php>. Para aumentar a amostragem, foram realizadas três simulações por dinâmica molecular de 10ns de cada complexo usando diferentes velocidades atômicas assinaladas de acordo com a distribuição de Maxwell.

Os dados gerados para os últimos 4 ns de cada sistema simulado foram utilizados para a análise de frequência. Durante o estágio de produção foram obtidos 40 quadros de cada uma das três simulações realizadas, representando o tempo de 100ps. Detalhes das interações foram calculadas usando o programa LigPlot+ (Laskowski & Swindells, 2009). Um mínimo de 50% de contatos (soma de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) dos quadros analisados foi estabelecido como critério de eficiência de ligação.

### 4.5 Ensaio de citotoxicidade

#### 4.5.1 Determinação da viabilidade celular em macrófagos murinos RAW 264.7

A viabilidade celular de EB, FDCM e FAq foi determinada pelo método MTT (brometo de 3- metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com a metodologia descrita por Vila-Nova et al. (2011). Este método baseia-se na redução do MTT por desidrogenases de células viáveis. A viabilidade foi avaliada em macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 1% de soro fetal bovino. Em microplacas de 96 poços, foram semeadas  $2 \times 10^5$  células/poço em 100  $\mu$ L de RPMI completo e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 1h para adesão das células à placa. Posteriormente, as células foram colocadas na presença dos extratos em concentrações finais que variaram entre 0,24 e 500  $\mu$ g/mL e incubadas em estufa, nas mesmas condições citadas anteriormente, durante 24h. As células do controle foram incubadas na presença do meio RPMI sem os extratos. Os extratos foram ressuspensos em DMSO 5%. Após 24h da incubação, 10  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado à cada poço da placa. As placas foram, então,

novamente incubadas em estufa, nas mesmas condições anteriormente citadas, durante 3h e, ao final do período de incubação, a extração do formazan foi feita pela adição de 100 µL de SDS. As absorbâncias foram determinadas após 24h em leitor de microplacas (570 nm). Todos os testes foram realizados em triplicata e o controle negativo feito com as células incubadas em DMSO. Os ensaios foram realizados no laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão.

## **4.6 Ensaios antifúngicos**

### **4.6.1 Ensaio de difusão em ágar**

#### **4.6.1.1 Microrganismos**

Foram utilizadas as seguintes cepas clínicas: *Candida glabrata* (CC, MNJOP, FCSO, FJF e CLMS), *Candida albicans* (VLAG e JPA) e *Candida parapsilosis* (RCL) e duas ATCC (American Type Culture Collection) (ATCC 9028 e ATCC 10231). As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Ceuma e pelo Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Estas foram mantidas em placas de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (Sabouraud 4% Dextrose Agar Granul - Merck®) e mantidas a – 20°C. Para os testes, as cepas foram repicadas em Sabouraud e incubadas por 24h a 37°C.

#### **4.6.1.2 Avaliação da atividade antifúngica**

O método de difusão em poços foi utilizado para testar o efeito antifúngico de EB (Moody et al., 2004; CLSI, 2009, com algumas adaptações). O inóculo padronizado foi espalhado em placas de Petri contendo 20 mL do meio Ágar Sabouraud Dextrose (Sabouraud 4% Dextrose Agar Granul - Merck®). Uma suspensão do microrganismo-teste ( $1,0 \times 10^6$  CFU/mL) de cada um das cepas foi determinada através de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland. O extrato foi sonificado por 40 minutos. As suspensões foram semeadas com auxílio de swabs estéreis. As placas foram perfuradas com cilindros estéreis, formando poços onde foram inoculados 40 µl do extrato nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL). As placas foram incubadas a 35°C por 24h e, após esse período, as

zonas de inibição foram mensuradas. Foi realizada uma nova leitura após 48h, quando o crescimento foi insuficiente. Para o controle positivo foi utilizado fluconazol 64 µg/mL e para o controle negativo salina (0,85%). Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.6.2 Ensaio de microdiluição

##### 4.6.2.1 Microrganismo

Foram utilizadas as seguintes cepas clínicas de *Candida albicans*: MRSM, JPA, CAS e VLFA. As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Ceuma. Estas foram mantidas em placas de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (Sabouraud 4% Dextrose Agar Granul - Merck®) e mantidas a – 20°C. Para os testes, as cepas foram repicadas em Sabouraud e incubadas por 24h a 37°C.

##### 4.6.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada com base na proposta do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (CLSI, 2008). A concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) para EB foi determinada por leitura visual. A solução estoque do EB (100mg/mL) foi dissolvida em PBS. Esta foi então diluída em meio RPMI-1640 (tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico) (Sigma-Aldrich). O extrato foi sonificado por 40 minutos. As concentrações testadas variaram entre 0,007 a 4,0 mg/mL para EB. Foram adicionados 100µL das diluições do EB e 100µL suspensão celular padronizada ( $1,0 \times 10^3$  UFC/mL) em cada poço, sendo uma coluna acrescentado apenas 100µL suspensão celular e meio e uma somente o meio como controles negativo e positivo. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. A figura 12 mostra esquematicamente o teste nas microplacas.

Em seguida, 30µL do revelador resazurina 0,03% foi adicionado em cada orifício das microplacas nos testes com os fungos. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente e, no decorrer de 24 horas, a cor azul representou ausência de crescimento e, a cor rosa, presença de crescimento bacteriano (Palomino et al., 2002).

## 4.7 Ensaio de sobrevida de camundongos

### 4.7.1 Animais

Para o experimento de sobrevida, camundongos Swiss fêmeas com idade entre 10 e 12 semanas e peso médio de 35 g foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram aclimatados para as condições do Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas de da Saúde da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. Durante o experimento os animais foram alojados em gaiolas de plástico, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas e tanto a água como a ração foram fornecidos *ad libitum*. O protocolo experimental para esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Maranhão (protocolo 23115.007015/2016-82).

### 4.7.2 Manutenção da cepa de *C. albicans* ATCC 10231

As cepas foram mantidas em meio YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) líquido em estufa à 37°C durante 24 horas. Após, procedeu-se com o preparo da solução fúngica, onde foi retirado 90 µL do cultivo e adicionado 10 µL de cristal violeta. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum e os ajustes foram feitos para  $3 \times 10^8$  UFC/animal, ressuspensos em um volume de 200 µL de PBS para a posterior inoculação nos animais.

### 4.7.3 Indução da infecção e acompanhamento da sobrevida

Os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (Baxter Hospitalar Ltda), 50 mg/kg pela via intraperitoneal em dose única (Bin-Hafeez et al, 2001). Após 48h da imunossupressão, os animais foram divididos randomicamente em 7 grupos. Tanto o inóculo como os tratamentos foram feitos via intraperitoneal. Os grupos corresponderam:

- I (Controle PBS) – recebeu concomitantemente o inóculo e 200 µL de PBS;
- II (Anfo Antes) – recebeu anfotericina B 0,6 mg/kg, 6 horas antes do inóculo;
- III (Anfo Depois) - recebeu anfotericina B 0,6 mg/kg, 6 horas depois do inóculo;
- IV (EB 10 Antes) – recebeu EB 10 mg/kg, 6 horas antes do inóculo;
- V (EB 10 Depois) – recebeu EB 10 mg/kg, 6 horas após o inóculo;

- VI (EB 100 Antes) – recebeu EB 100 mg/kg, 6 horas antes do inóculo;
- VII (EB 100 Depois) – recebeu EB 100 mg/kg, 6 horas após o inóculo.

Para avaliar a sobrevida, os animais foram observados durante 5 dias após a infecção e a mortalidade foi calculada considerando o tempo médio de sobrevivência (MST), em dias, e o aumento percentual no tempo de vida (ILS), de acordo com a fórmula (Gupta et al., 2000):

$$\text{ILS (\%)} = \frac{(\text{MST do grupo tratado} - \text{MST do grupo controle}) \times 100}{\text{MST do grupo controle}}$$

#### 4.8 Análise estatística

Os resultados dos testes biológicos *in vitro* foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (S.D). O tratamento estatístico foi por análise de variância (two-way ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), para comparar os efeitos de viabilidade para macrófagos Raw 264.7. A concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) foi calculada por meio de análise de regressão não linear. Para a avaliação da sobrevida foi utilizada a curva de Kaplan-Meier. Todas as análises foram feitas com o auxílio do *software Graph Pad Prisma*, versão 6.0. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

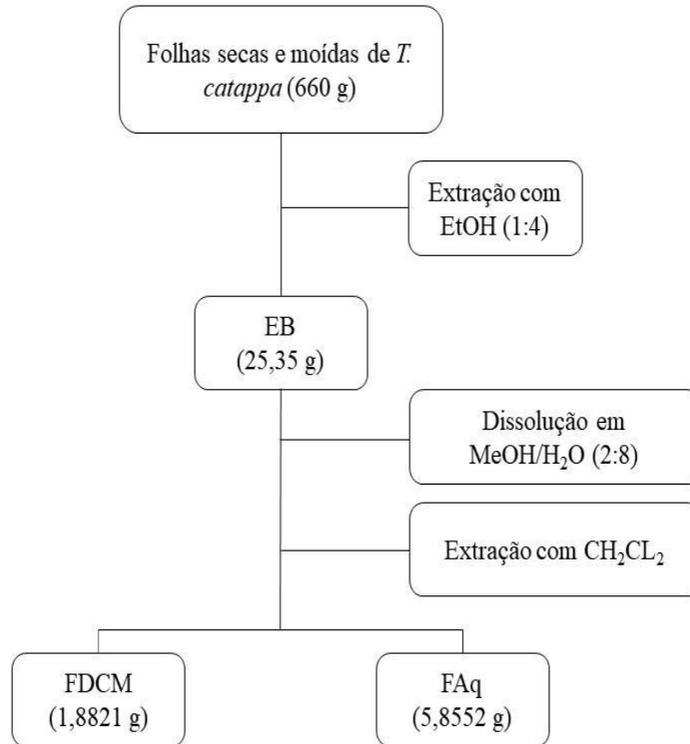
### 5.1 Análise fitoquímica

As análises revelaram a presença de taninos, catequinas, saponina, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, esteróides e triterpenos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Prospecção fitoquímica de EB coletadas no estado do Maranhão, Brasil.

Classe de metabólitos	Reagentes	<i>T. catappa</i>
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+
Catequinas	-	+
Resina	-	-
Saponina	-	+
Antocianinas e Antocianidinas	HCl /NaOH	+
Flavonas, flavonóis e xantonas	HCl /NaOH	+
Leucoantocianidinas	NaOH	-
Esteróides	HCl/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+
Triterpenos	HCl/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+
Alcalóides	Dragendorff/Mayer/Hager	-

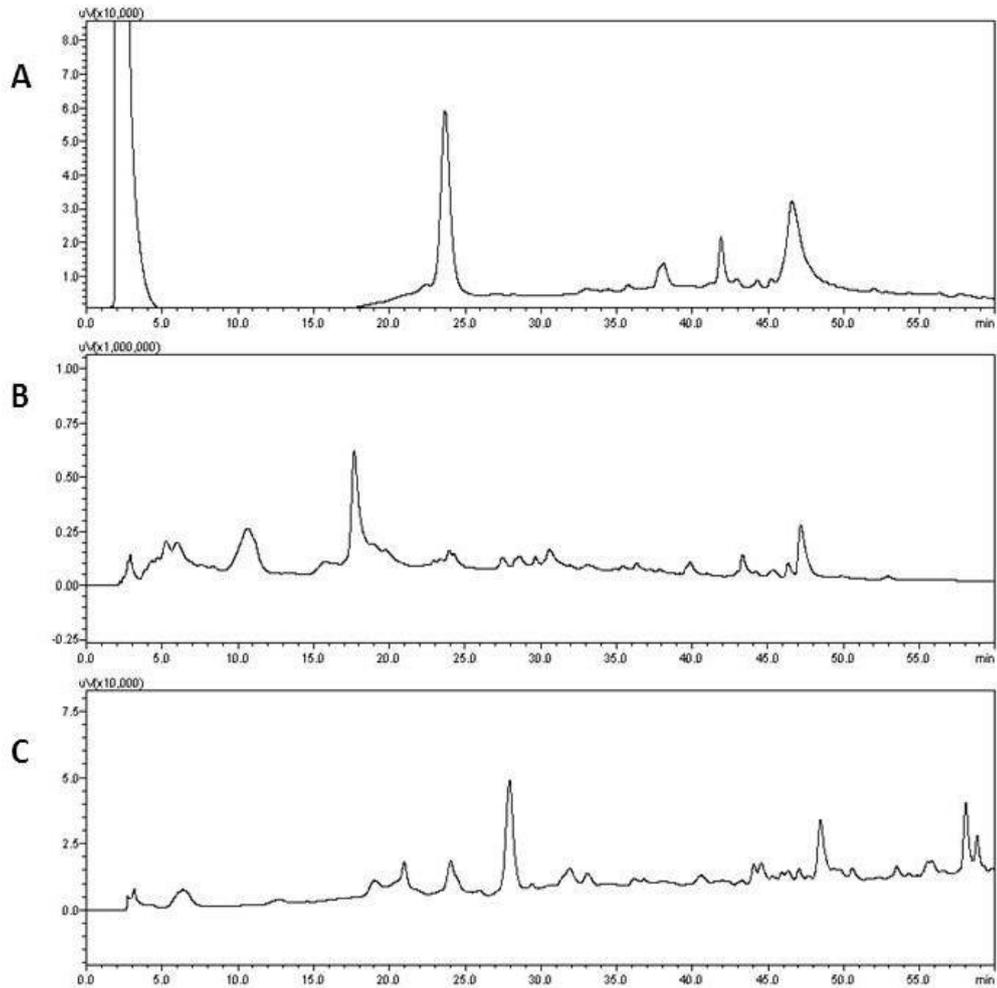
O rendimento de EB foi de 37,25%. Na figura 10 estão sendo apresentadas as massas (g) referentes a EB, FDCM e FAq.



**Figura 10:** Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção dos extratos de folhas de *T. catappa*

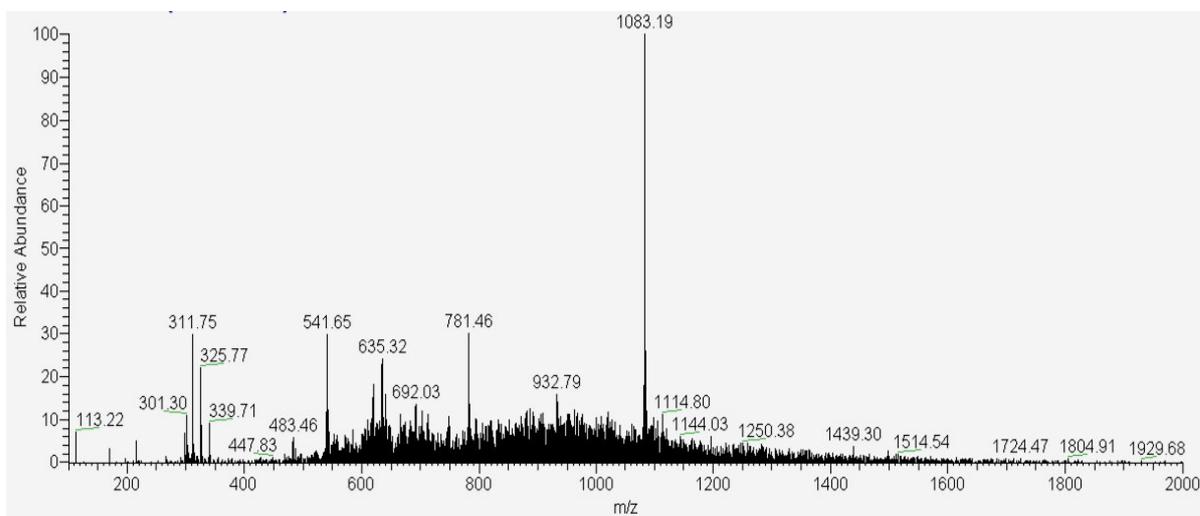
## 5.2 Análise química de EB, FDCM e FAq

O perfil cromatográfico por HPLC-UV de EB, FDCM e FAq é mostrados na Figura 11.



**Figura 11:** Cromatogramas do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa* (A), FDCM (B) e FAq (C) dissolvidos em H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1) à ~ 10 mg/mL.

A análise dos espectros de massa de EB identificou os íons precursores [M-H] -  $m/z$  1083 (punicalagina),  $m/z$  781 (punicalina),  $m/z$  601 (ácido galágico) e  $m/z$  301 (ácido elágico) (Figura 12).

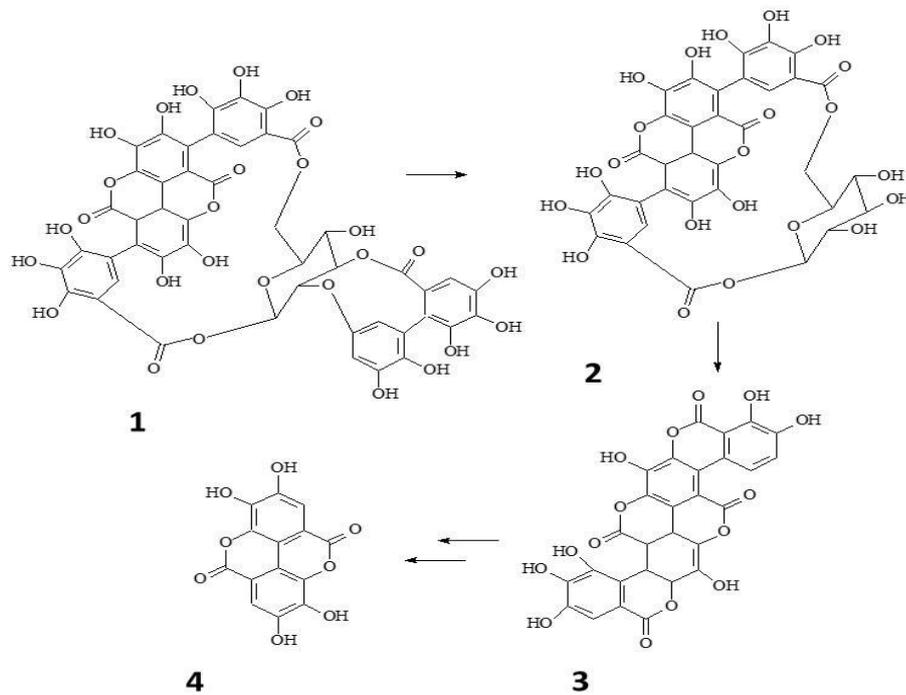


**Figura 12:** Espectro de massa de primeira ordem full-scan do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa* no modo negativo.

A fragmentação de segunda ordem ( $MS^2$ ) confirmou a presença desses metabólitos (Tabela 2), mostrados no esquema da Figura 16 para as substâncias 1-4.

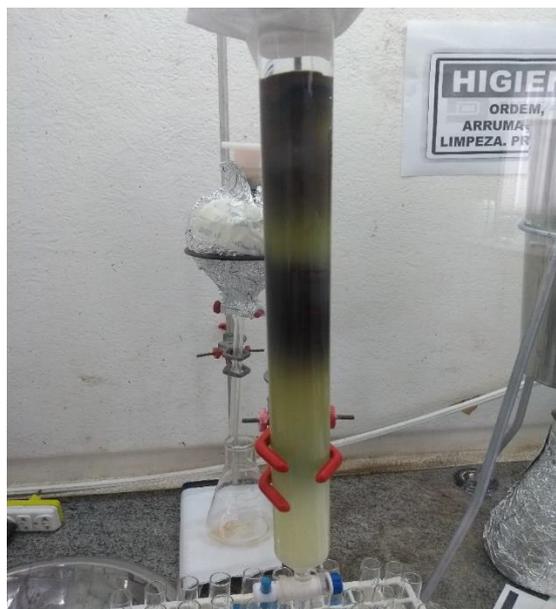
**Tabela 2:** Identificação dos compostos em *T. catappa* por FIA-ESO- $MS^n$

[M-H]	$MS^n$ íons	Identificação
1083	781 [M-152-152-H] 601 [M-152-152-180-H]	Punicalagina (1)
781	601 [M-180]	Punicalina (2)
601	409 [M-44-H]	Ácido galágico (3)
301	229 [M-44-28-H]	Ácido elágico (4)

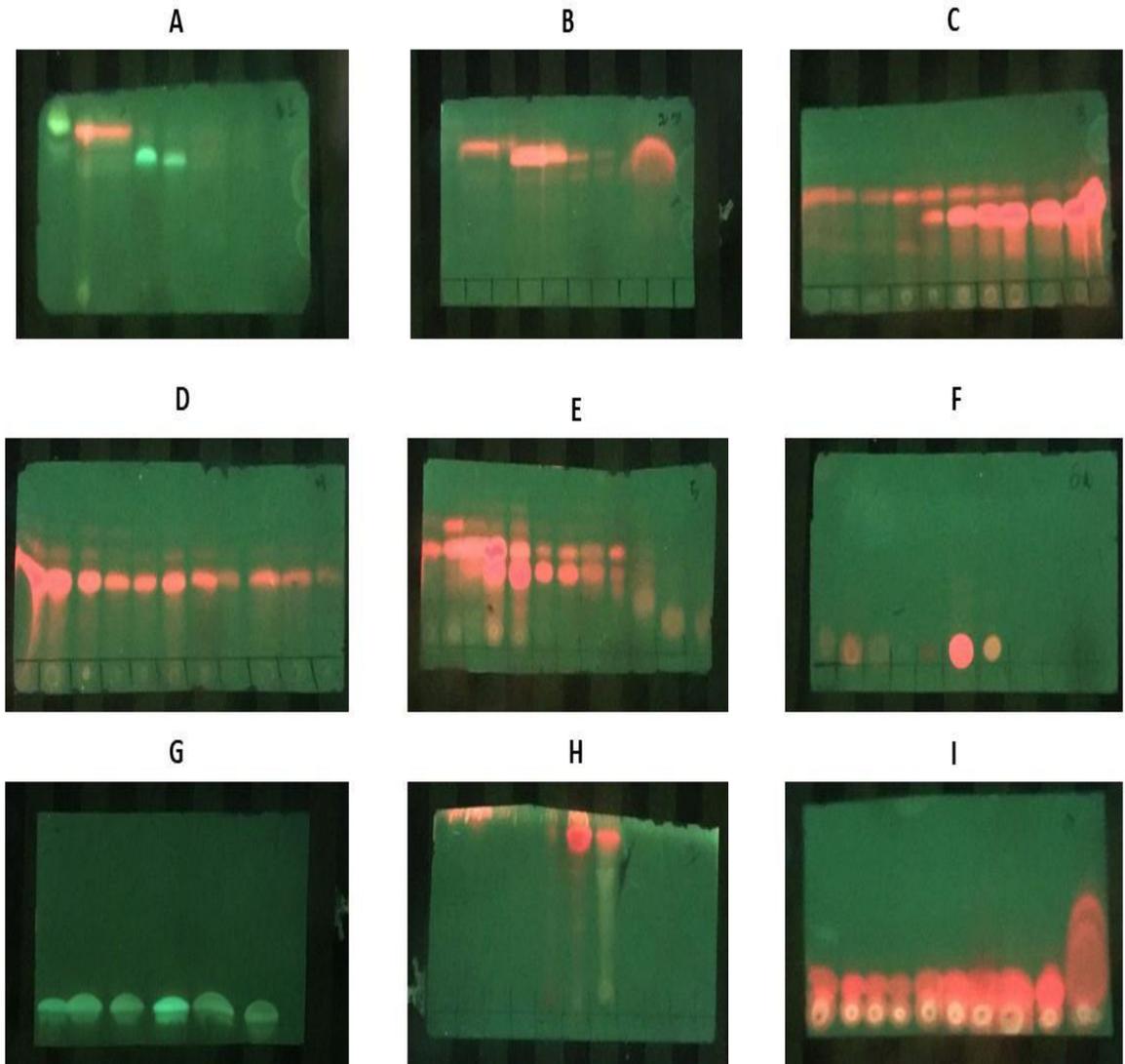


**Figura 13:** Estrutura de punicalagina (1), punicalina (2), ácido galágico (3) e ácido elágico (4).

A partir do subfracionamento de 2 g de EB, foram obtidas 570 subfrações (Figura 15). As frações coletadas foram monitoradas por CCD e aquelas com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas em 16 grupos (Figuras 14 e 15) (Tabela 3).



**Figura 14:** Coluna cromatográfica para separação de compostos do Extrato Bruto Hidroetanólico (1:4) de *T. catappa*



**Figura 15:** Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas a partir do subfracionamento do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa*. A (subfrações 55 à 86); B (subfrações 91 à 171); C (subfrações 181 à 281); D (subfrações (291 à 391); E (subfrações 401 à 511); F (subfrações 521 à 570); G (subfrações 521 à 570); H (subfrações 71, 72, 73, 74, 75 e 76); I (subfrações 212 à 220)

**Tabela 3:** Frações obtidas no subfracionamento do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa* (2g)

Grupo	Frações Reunidas	Massa (g)	Eluente
EB.1	55-60	0,0311	acetato:hexano(1:9)
EB.2	61-70	sem massa	acetato:hexano(1:9)
EB.3	71-76	sem massa	acetato:hexano(1:9)
EB.4	77-90	sem massa	acetato:hexano(1:9)
EB.5	91-196/197-211	0,088	acetato:hexano(1:9/1,5:8,5)
EB.6	212-219	sem massa	acetato:hexano(1,5:8,5)
EB.7	220	sem massa	acetato:hexano(1,5:8,5)
EB.8	221-251	0,095	acetato:hexano(1,5:8,5)
EB.9	252-290	0,0290	acetato:hexano(1,5:8,5)
EB.10	291-370/371-411	0,0291	acetato:hexano(1,5:8,5/2:8)
EB.11	412-421	sem massa	acetato:hexano(2:8)
EB.12	422-455/455- 462/463-471/472- 476/477-481	0,0581	acetato:hexano(2:8/2,5:7,5/3:7/3,5:6,5/4:6)
EB.13	482-485/486-511	0,03101	acetato:hexano(4:6/4,5:5,5)
EB.14	512-514	sem massa	acetato:hexano(4,5:5,5); acetato:hexano(1:1)
EB.15	522-523/524- 554/555-561	0,042	acetato:hexano(1:1); acetato puro; acetato:metanol (1:1)
EB.16	562-570	0,2557	acetato:metanol (1:1)

### 5.3. O ácido galágico apresentou afinidade com a CaCYP51 de *C. albicans*

Para a docagem molecular foram utilizados todos os compostos identificados por LC-ESI-IT-MS no Extrato Hidroetanólico de *T. catappa*. Dentre os compostos identificados, o ácido elágico foi o composto que apresentou os melhores parâmetros de afinidade nos cálculos de docagem molecular com a CaCYP51, sendo -8.29 kcal/mol e 0.84  $\mu$ M, para energia livre de ligação e constante de inibição, respectivamente. Além dos compostos presentes no extrato, foi realizada a também a docagem molecular dos fungicidas comerciais posaconazol e fluconazol.

Observou-se que o ácido elágico apresentou parâmetros de afinidade superiores aos do fluconazol e parâmetros bem próximos ao posaconazol, que é o ligante identificado na estrutura da CaCYP51. Dessa forma, foi realizado um redocking do posaconazol a fim de validar o protocolo da docagem. O desvio quadrático médio da raiz (RMSD) entre a conformação prevista do docking e a estrutura de cristal de raio-X observada do ligante foi de 1,630 Å. Valores abaixo de 2 Å indicam que o protocolo de docking é válido. O ácido galágico teve parâmetros de interações discretos, enquanto punicalina e punicalagina tiveram valores de energia livre de ligação positivos, sugerindo que estas moléculas não realizam interações com a CaCYP51. Os resultados dos valores de energia de ligação de todos os ligantes estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Energias livre de ligação e constante de inibição obtidos por docagem molecular dos compostos identificados no EHB de *T. cattapa* com a estrutura da CaCYP51

CYP51		
Ligand	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)*	Ki ( $\mu$ M)**
Ellagic Acid	-8.29	0.84
Gallagic Acid	-3.98	1.22
Punicalin	+58.59	ND <sup>#</sup>
Punicalagin	+1360.00	ND <sup>#</sup>
Posaconazole	-8.75	0.38
Fluconazole	-6.14	31.61

\* $\Delta G_{bind}$ , binding energy. \*\*Ki, inhibition constant. <sup>#</sup>Not determined

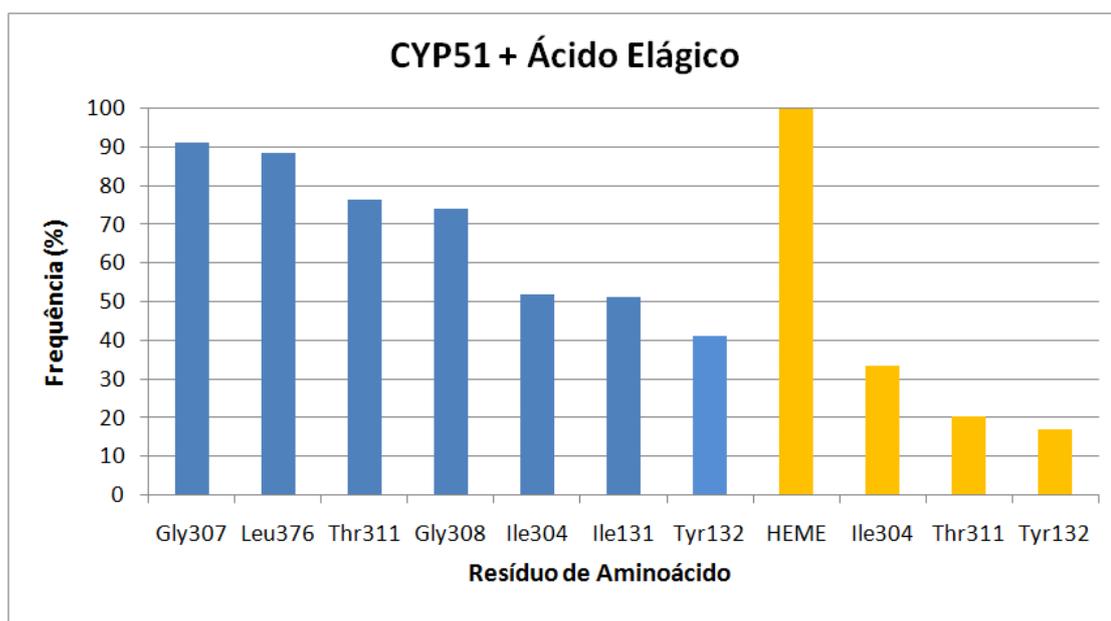
Avaliando-se o complexo ácido elágico e CaCYP51 obtido pela docagem molecular, observamos que o ligante realizou ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr132, Gly307, Gly308 e Thr311 e contatos hidrofóbicos com os resíduos Ile131, Ile304 e Leu376, incluindo também interações com o grupo HEME (Tabela 5).

**Tabela 5:** Resíduos de aminoácidos da CYP51 que possuem interação com o ácido elágico

CYP51		
Ligand	Hydrogens Bonds	Hydrophobic Interactions
Ellagic Acid	Tyr132, Gly307, Gly308, Thr311	Ile131, Ile304, Leu376

De acordo com o resultado da docagem molecular, o ácido elágico foi selecionado como melhor composto para formação do complexo com a CaCYP51 e selecionado para as simulações por dinâmica molecular. Foram considerados relevantes as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio que tiveram frequência de interações moleculares superiores a 50% nos 123 frames observados.

Após a avaliação dos resultados das simulações de dinâmica molecular, verificou-se que o ácido elágico manteve alta frequência de interações com os resíduos Gly307, Leu376, Thr311, Gly308, Ile304, Ile131 e Tyr132, identificados na docagem molecular. As frequências das interações do ácido elágico com a CaCYP51 estão apresentadas na Figura 16.



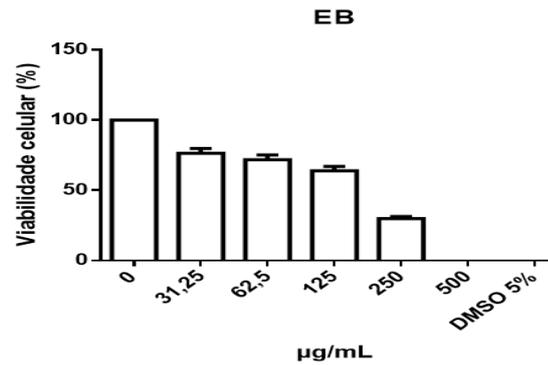
**Figura 16:** Frequência de contatos hidrofóbicos (em azul) e ligações de hidrogênio (amarelo) entre o ácido elágico e a CaCYP51. As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.

#### 5.4 EB reduziu a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7

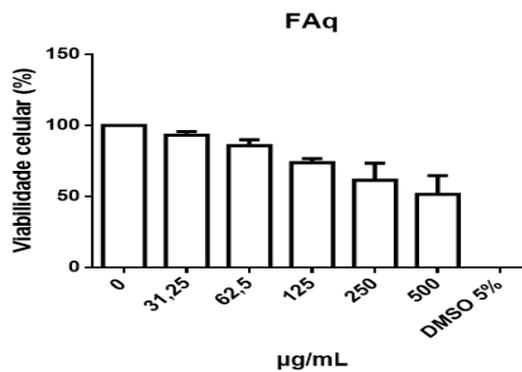
No ensaio de citotoxicidade, EB, FAq e FDCM reduziram a viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7, de maneira dose-dependente (Figura 17). Na maior concentração de EB, 500  $\mu\text{g/mL}$ , todas as células morreram.

A IC50 foi de 237,2; 148,0 e 206,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para EB, FAq e FDCM.

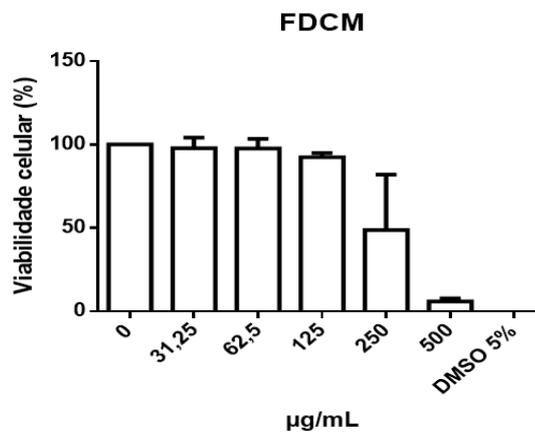
A



B



C



**Figura 17:** Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 em EB (A), FAq (B), FDCM (C) após 24h de cultura. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (0).

### 5.5. EB promoveu a formação de halos no ensaio de difusão em ágar

O extrato promoveu a formação de halos de inibição, com diâmetros que variaram entre 5 e 50 mm, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL em diferentes cepas de *Candida*. Os diâmetros da zona de inibição estão demonstrados na Tabela 6. Não houve formação de halo com em nenhuma das concentrações testadas com a ATCC 90028 e com a ATCC 10231.

**Tabela 6:** Valores dos halos em mm do Extrato Bruto Hidroetanólico de *T. catappa* nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL em diferentes cepas clínicas de *Candida* sp. O controle positivo foi feito com fluconazol 64 µg/mL. O controle negativo foi feito com PBS e não houve a formação de halo.

Cepas	Concentrações (mg/mL)	Halo (mm)	Fluconazol (mm)
CC	25	17	0
	50	20	0
	100	17	0
MNJOP	25	5	0
	50	25	0
	100	20	0
FCSO	25	11	0
	50	20	0
	100	50	0
FJF	100	21	0
CLMS	100	21	16
JPA	100	24	24
VLAG	25	11	0
	50	20	0
	100	25	0
RCL	25	5	0
	50	20	0
	100	25	0

### 5.6 EB inibiu o crescimento de *Candida* no ensaio de microdiluição

A atividade antifúngica do Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* foi avaliada também pelo teste de microdiluição, em concentrações que variaram entre 0,007 e 4,0 mg/mL. Neste teste foram utilizadas 4 cepas clínicas. A partir deste teste, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), por observação visual, frente a cada cepa. Os resultados das CIM mostram que EB apresentou a capacidade de inibir o crescimento dos fungos, como apresentado na Tabela 7.

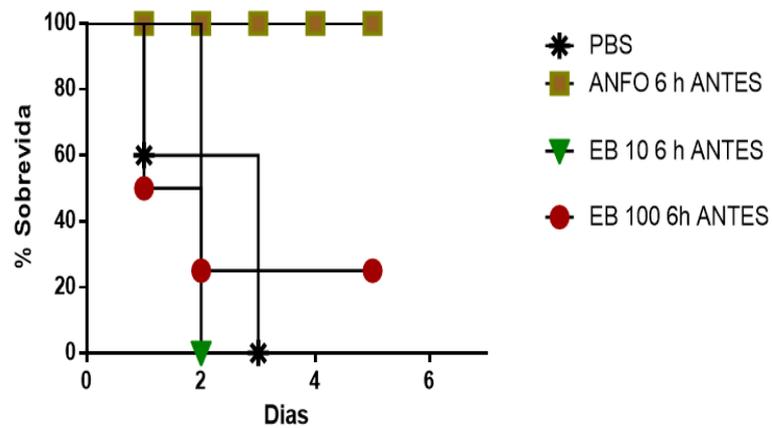
**Tabela 7:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Hidroetanólico de *T. catappa*

Cepa	CIM (mg/mL)
CAS	0,125
JPA	0,25
VLFA	0,125
MRSM	0,25

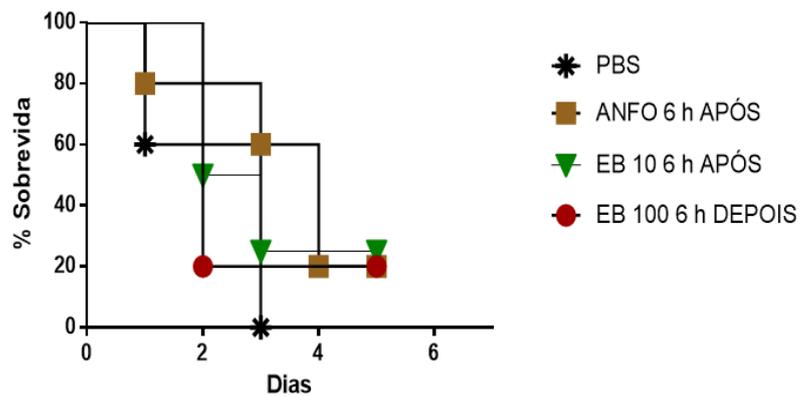
### 5.7 EB aumentou a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos e infectados com *C. albicans*

O grupo Anfotericina 6h antes teve 100% de sobrevivência nos animais infectados com *C. albicans*. O mesmo não se observou no grupo Anfotericina 6h depois, que teve 20% de sobrevivência, entretanto sua expectativa de vida foi aumentada em 54,5%. O grupo EB10 6h antes teve 100% de mortalidade. O grupo EB10 6h após teve 40% de sobrevivência e houve um aumento na expectativa de vida de 54,5. Os grupos EB100 6h antes e EB100 6h após tiveram 20% de sobrevivência e houve um aumento na expectativa de vida de 11,4% e 18,2%, respectivamente (Tabela 8).

A



B



**Figura 18:** Curva de sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida infectados com *Candida albicans* e tratados com EB. Os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (50 mg/kg) 48h antes da infecção com *C. albicans* ( $3 \times 10^8$ ). Os tratamentos com anfotericina B (0,6 mg/kg), EB (10 mg/kg) e EB (100 mg/kg) foram feitos 6h antes da infecção (A) e 6h após a infecção (C). Os animais foram acompanhados por 5 dias. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**Tabela 8:** Sobrevida de animais infectados com *C. albicans* e tratados com Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* antes, concomitante e após a infecção.

Tratamento	MST (Dias)*	ILS (%)**
PBS	2,2	-
Anfo 6h antes	-	-
Anfo 6h após	3,4	54,5
EB10 6h antes	2	-
EB10 6h após	3,4	54,5
EB 100 6h antes	2,25	11,4
EB 100 após	2,6	18,2

\*tempo médio de sobrevivência

\*\*aumento da expectativa de vida

## 6. DISCUSSÃO

Embora existam relatos na literatura da atividade antifúngica de *T. catappa*, nosso estudo ampliou essa investigação. Além disso, a partir da caracterização química do Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* (EB), utilizamos, de maneira inédita, um modelo *in silico* de simulações computacionais dos compostos desta espécie vegetal com a estrutura da CaCYP51 de *C. albicans* e um modelo *in vivo* de candidemia em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e tratados com o extrato.

Partindo-se da investigação fitoquímica, buscamos conhecer as diferentes classes químicas presentes em *T. catappa*. Nosso estudo demonstrou que o EB é rico em fenóis, taninos, saponinas, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, flavonas e flavanóis, esteróides e triterpenos corroborando com os resultados obtidos por Mandloi et al. (2013) e Terças et al. (2017). A partir do conhecimento das classes químicas presentes na planta, direcionamos os estudos para caracterização química de EB por cromatografia, para a elucidação dos compostos químicos e posterior tentativa de isolamento desses compostos.

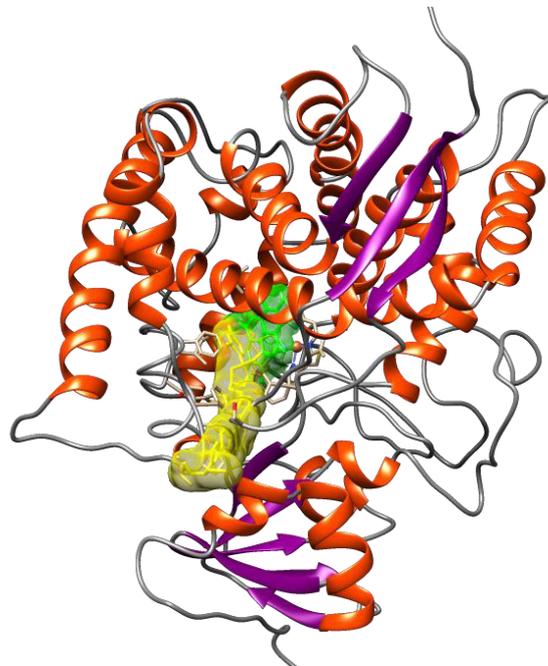
No perfil cromatográfico de EB, evidenciamos a presença de compostos majoritários como os taninos hidrolisáveis punicalagina e punicalina, além dos ácidos galágico e elágico, resultados que correspondem aos obtidos por Mininel et al. (2014). Após esta caracterização, avaliamos que, na busca pela atividade antifúngica dos metabólitos secundários de *T. catappa*, alguns métodos poderiam ser utilizados, como o isolamento biodirigido dos compostos.

Assim, a partir do subfracionamento de 2g de EB, obtivemos 16 subfrações. A técnica do isolamento biofracionado preconiza que, a partir do isolamento dos compostos, se realizem bioensaios, determinando se a subfração testada apresenta maior ou menor atividade quando comparada ao extrato. Dessa forma, caso a subfração testada apresente maior atividade, é novamente subfracionada até a purificação e identificação dos compostos que são responsáveis pela atividade biológica em questão.

Estudos prévios afirmaram que, além dos anômeros da punicalagina, outras substâncias foram isoladas e identificadas a partir dos extratos de *T. catappa*, tais como alguns ácidos fenólicos, o ácido ursólico, o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiurs-12-en-28-óico e o derivado do ácido ursólico, além de flavonóides e seus glicosídeos (Lin et al. 2000, Fan et al. 2004; Chyau et al 2006). Etapas posteriores em nosso trabalho envolvem a realização de testes antifúngicos *in vitro* com as subfrações obtidas para avaliar uma possível atividade e a identificação daquelas que apresentarem atividade, até a purificação do composto.

Com a identificação dos compostos de EB, ácido elágico, ácido galágico, punicalina e punicalagina, estes foram submetidos, inicialmente, à docagem molecular, para avaliarmos a possível interação destes compostos com a estrutura da CaCYP51. Energias livre de ligação negativas indicam que essas interações são favoráveis para formação do complexo ligante-receptor (Guimarães et al., 2014). Assim, através da docagem molecular, verificamos que, dentre os compostos identificados no extrato, o ácido elágico foi o ligante que apresentou parâmetros mais favoráveis para formação do complexo com a CYP51. Por esse motivo, o complexo ácido elágico e CYP51 foi selecionado para a simulação de dinâmica molecular.

Durante a simulação por dinâmica molecular, o ácido elágico permaneceu interagindo com os mesmos resíduos de aminoácidos da CYP51 que foram identificados na docagem, indicando que as interações verificadas na docagem molecular mantiveram-se estáveis em um meio biológico simulado. A Figura 19 mostra a distribuição espacial da conformação do posaconazol (raio-x) e do ácido elágico (dinâmica molecular) no sítio ativo da CaCYP51.



**Figura 19:** Conformação espacial obtida após a simulação por dinâmica molecular do ácido elágico (em verde) e posaconazol (em amarelo) com CYP51 (PDB: 5FSA).

Os dados de cristalografia de raios-x do complexo da CaCYP51 com itraconazol (PDB ID 5V5Z) de estudos prévios, mostram que este fungicida realiza interações com os resíduos de aminoácidos Tyr132, Gly307, Tyr311 e Leu376, que também mostraram alta frequência de interação com o ácido elágico de acordo com nossos resultados de dinâmica molecular, além de resíduos vizinhos como His377, Ser378 e Phe38. O mesmo ocorre com o complexo

CaCYP51 com o candidato a fármaco VT-1161 (oteseconazole) (PDB ID 5TZ1), que também interagiu com os mesmos resíduos encontrados em nosso estudo.

Quanto aos estudos de docagem molecular com o fluconazol, este apresentou parâmetros de afinidades insatisfatórios quando comparados a outros fármacos. Gómez-García et al. (2018), também avaliaram a interação do fluconazol com a CaCYP51, onde os parâmetros de afinidade com a estrutura da enzima se mostraram pobres, assim como no presente estudo. Os fármacos fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol foram testados *in vitro* sobre *C. albicans*, onde o fluconazol apresentou a baixa eficiência de 54% enquanto posaconazol apresentou a altíssima eficiência de 98%, quando avaliados na mesma concentração (Hargrove et al., 2017). Estes resultados estão em conformidade com os dados *in silico* deste estudo, que reporta parâmetros de afinidade do posaconazol superiores aos do fluconazol.

Neste contexto, estudos *in vitro* com derivados de 3,4-diclorobenzil contra *C. albicans*, também demonstraram que o composto derivado que apresentou os melhores resultados teve atividade comparável ou superior às drogas padrão testadas, incluindo fluconazol. No docking molecular, este mesmo derivado apresentou os melhores parâmetros de afinidade, corroborando os dados *in vitro* (Zhang et al., 2017) e estes resultados foram semelhantes ao observados para o ácido elágico no presente estudo.

Assim também, derivados de triazóis foram avaliados *in vitro* sobre *C. albicans* e os derivados que apresentaram melhores resultados foram avaliados por docagem molecular com a estrutura da CaCYP51 e apresentaram parâmetros de afinidade também superiores ao do fluconazol (Szafranski et al., 2017). Moustafa et al. (2018) também mostraram um consenso entre seus resultados *in silico* e *in vitro*, onde os dipeptídeos derivados de ácido nicotínico que apresentaram os melhores resultados de CIM sobre *C. albicans* também apresentaram os melhores resultados na docagem molecular destes derivados com a CaCYP51.

O ácido elágico foi testado *in vitro*, demonstrando alta atividade sobre *C. albicans* e sobre outros fungos patogênicos como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton schoenleinii*. Também inibiu a biossíntese do ergosterol e reduziu *in vitro* a atividade da 14 $\alpha$ -desmetilase P450 (CYP51) do fungo *T. rubrum* e sua utilização tópica *in vivo* aumentou significativamente a taxa de cura em um modelo de infecção por *T. rubrum* em cobaias (Li et al., 2015). Quando comparado com o ácido gálico, o ácido elágico mostrou-se 10x mais potente sobre *C. albicans*, além de ser altamente eficiente sobre *C. glabrata* (Teodoro et al., 2015). Assim, os dados *in silico* do presente estudo sugerem que a atividade biológica de *T. catapa* sobre *C. albicans*

esteja também associada ao ácido elágico, que deve atuar na inibição da biossíntese de ergosterol, mediada pela CYP51.

Ao se realizar testes biológicos com produtos naturais possíveis candidatos a fármacos, se faz necessário a realização de testes de toxicidade, que são utilizados com o objetivo de avaliar ou prever efeitos tóxicos nos sistemas biológicos, fornecendo informações importantes na triagem desses produtos. Dessa forma, além da busca por propriedades bioativas, se faz necessário que estes apresentem ausência ou baixa toxicidade.

Na avaliação da toxicidade de EB, FDCM e FAq, utilizamos neste estudo o modelo de viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Os extratos reduziram a viabilidade das células de maneira dose-dependente e EB mostrou-se tóxico na concentração de 500 µg/mL. Entretanto, apesar deste indício de toxicidade dos extratos, a IC<sub>50</sub> para EB, FAq e FDCM foi de respectivamente 237,2; 148,0 e 206,2 µg/mL, o que nos indicou que essa toxicidade não foi tão relevante. Em um estudo conduzido por Picolli et al. (2015), utilizando células da linhagem MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), os autores afirmaram que a menor concentração do DMSO que não causa prejuízo ao crescimento celular é 2,5% e, na concentração de 5%, o DMSO causou morte ou inibição do crescimento celular.

Terças et al. (2017), avaliaram a toxicidade de Extrato Hidroetanólico de *T. catappa*, em células mononucleares do sangue periférico e, no geral, o extrato não foi citotóxico, reduzindo apenas a viabilidade em concentrações entre 5 e 10 mg/mL. Um estudo conduzido por Nunes et al (2014), com *Terminalia fagifolia*, demonstrou segurança na administração de extratos dessa espécie vegetal na dose de até 200 mg/kg em ratos, caracterizando-a como de baixa toxicidade. O teste citotoxicidade nos forneceu as primeiras informações sobre a resposta biológica dos compostos em células de mamíferos e, a partir dos dados obtidos *in vitro*, comparando com alguns descritos na literatura, consideramos o extrato e as frações viáveis para testes biológicos *in vitro* e *in vivo*.

O teste *in vitro* de ágar-difusão é uma das estratégias mais usadas para triagem de atividade antimicrobiana *in vitro*. Neste trabalho foi usado para avaliar a atividade antifúngica frente às cepas de *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* e demonstrou potencial antifúngico promissor, com zonas de inibição de crescimento compreendidas entre 5 e 50 mm, apesar de não ter inibido o crescimento da ATCC 90028 e da ATCC 10231.

Beraldo et al. (2015), trabalhando com extrato de *Azadirachta indica* encontrou uma CIM de 2000µg/mL para a ATCC 10231, concentração muito elevada para as faixas de corte dentre as substâncias com alguma atividade antibacteriana e ou antifúngica. Com relação ao

nosso controle positivo, feito com fluconazol, uma das drogas de eleição para o tratamento da candidíase, todas as cepas demonstraram-se resistentes na concentração testada.

Alguns autores afirmam que, quando da triagem da atividade antimicrobiana, halos de inibição com crescimento igual ou superior a 8 mm indicam presença de atividade inibitória (Packer & Luz, 2007; Menezes et al., 2009). Entretanto, se faz necessário a avaliação do extrato frente às cepas resistentes. Babayi et al (2004) avaliaram o efeito antifúngico do extrato metanólico de *T. catappa* em *C. albicans*, pelo método de ágar-difusão, e não encontraram atividade do extrato bruto, mas quando promoveram o subfracionamento de frações do extrato através de cromatografia, encontraram atividade. Dessa forma, a partir de testes posteriores com os isolados obtidos do subfracionamento de EB, poderemos extrapolar nossos resultados para as cepas as quais não demonstraram atividade.

Apesar de ser aceito pela FDA e estabelecido como padrão pelo NCCLS para a pesquisa de novos agentes antimicrobianos, o teste de difusão em ágar deve ser ampliado para o teste de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Estes são alguns aspectos que devem ser considerados quando da perspectiva de novos estudos e validação do uso clínico de *T.catappa*.

Quando se trata de produtos naturais, a técnica de microdiluição é muito vantajosa, uma vez que é uma técnica de baixo custo, rápida, de alto rendimento, podendo ser até 30 vezes mais sensível que outros testes descritos na literatura. Esta técnica permite detectar a CIM dos produtos em estudo (Alves et al., 2008; Ostrosky et al., 2008; Salazar-Aranda et al., 2009; Palombo, 2011). Em nosso estudo, 4 cepas de *Candida* apresentaram atividade no teste de microdiluição e 1 mostrou-se resistente. A utilização da resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) em nossa pesquisa, justifica-se pelo fato desta substância é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (Fukushima et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem microrganismos e até células de mamíferos (O'brien et al., 2000).

Alguns trabalhos indicam que a atividade antimicrobiana desenvolvida pela *T. catappa* L. está associada à presença dos compostos polifenóis, como os taninos hidrolisáveis, (Okuda, 2005; Costa et al., 2008). A presença do ácido gálico na fração n-butanólica de *T. catappa* também intensifica o poder antifúngico, onde algumas pesquisas com esse composto, extraídos de outras plantas, têm comprovado esta atividade (Ahn et al., 2000; Chanwitheesuk et al., 2007). Outros autores relatam que os compostos mais ativos contra fungos estão nas frações mais polares (Nair e Shanda, 2008; Jagessar & Alleyne, 2011).

A presença da punicalagina em *T.catappa* poderia ser outro indício da atividade antifúngica desta planta. Endo et al. (2010), a partir do fracionamento do extrato da casca de *Punica granatum* isolaram punicalagina e, esta demonstrou atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com CIM's de 3,9 e 1,9 µg/mL, respectivamente. Em um estudo realizado por Silva (2017), diferentes espécies de *Candida* apresentaram CIM de 4,0 µg/mL e CFM > 256 µg/mL quando expostas à punicalagina. Na concentração de 4,0 µg/mL o composto foi capaz de inibir 100% (6/6) dos isolados de *Candida* spp.

Outras etapas de nosso trabalho envolvem o método de Checkerboard, que avalia o efeito da substância-teste em combinação com um antimicrobiano, em diferentes concentrações, onde as interações são calculadas a partir de uma equação e, então, definidas como sinérgica, indiferente ou antagonista e comparada com os valores de CIM da substância-teste e do antimicrobiano isoladamente para saber se essa associação é viável ou não (Pillai & Moellering, 2005; Mitchell et al., 2012). No caso de *Candida*, trabalhos posteriores avaliarão o efeito da associação do extrato com fluconazol e anfotericina B.

Ensaio de atividade biológica *in vivo* são de fundamental importância na triagem de um estudo vegetal. Alguns modelos de infecção experimental por *Candida* são descritos na literatura. Odds (1998) e Spellber et al. (2005) sugerem um modelo de candidíase disseminada causada pela injeção intravenosa de *C. albicans* em camundongos, assemelhando-se à infecção humana. Bistoni et al. (1993) apresentam um modelo de candidíase disseminada gástrica em camundongos imunocomprometidos, através da injeção intragástrica de *Candida*. Kamai et al. (2001) sugerem um modelo de candidíase orofaríngea através da imunossupressão de camundongos, com posterior inoculação oral de *Candida*.

Em nosso trabalho, para avaliar o efeito de EB na sobrevivência de camundongos infectados com *C. albicans*, utilizou-se um modelo de imunossupressão farmacológica com ciclofosfamida 50 mg/kg. A ciclofosfamida é um agente alquilante que tem ação imunossupressora não específica para as fases do ciclo celular. É mais supressora para os linfócitos B do que para os linfócitos T e, entre os linfócitos T, afeta mais intensamente as células CD8+ do que os linfócitos T auxiliares CD4 (Fernandes & Zubaty, 2005; Lima 2007).

Conti et al. (2015), afirmam que em modelos de avaliação de sobrevivência, após a disseminação da *Candida*, alguns sinais são observados nos animais, como perda de peso, postura anormal curvada para trás, tremores e apatia, sinais estes que observamos em todos os animais dos nossos grupos experimentais, o que nos deu indício da sepse por *Candida*.

Nesta pesquisa, demonstramos que *T. catappa* controlou a infecção disseminada por *C. albicans* em animais imunossuprimidos, uma vez que interferiu de forma significativa na

sobrevida dos animais. Os grupos EB10 concomitante e EB10 6h depois apresentaram os melhores resultados, com 40% de sobrevida dos animais em ambos os grupos, além de terem promovido um aumento da expectativa de vida em 63,5% e 54,5%, respectivamente. Na dose mais alta, os resultados mais expressivos foram com EB100 6h antes e EB100 6h depois, com 20% de sobrevida dos animais em ambos os grupos e um aumento da expectativa de vida de 11,4% e 18,2%, respectivamente.

Diante destes resultados, concluímos que o extrato se apresentou mais benéfico no tratamento da infecção fúngica na concentração de 10 mg/mL visto que quando, administrado 6 horas antes da infecção, todos os animais do grupo morreram. Assim sendo, não podemos atribuir, portanto, um efeito preventivo ao extrato. Chagas & Vieira (2007) sugerem que existe um problema comum da correlação não-linear entre concentração e eficácia, observada em testes com fitoterápicos, o mesmo que encontramos em nossa pesquisa, onde a menor concentração apresentou-se mais eficaz.

Fortes (2017), avaliando a sobrevida de animais com candidemia imunossuprimidos com dexametasona e tratados com própolis, sugere que o aumento da sobrevida pode estar diretamente relacionada a alguns fatores como a ação fungicida do extrato, o recrutamento e a ativação dos fagócitos para o sítio da infecção e uma possível modulação da resposta inflamatória sistêmica.

Desta forma, é possível que o efeito fungicida observado na sobrevida pode ser justificado por uma ação fungicida comuns aos taninos condensados e aos hidrolisáveis, presentes em *T. catappa*, como a complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças podem estar ligados a essas propriedades (Haslam, 1996).

Além de uma possível ação fungicida direta, há foi demonstrado que o extrato etanólico de *T. catappa* possui atividade imunomoduladora induzindo a produção de IL-1 $\beta$  e nitrito em macrófagos RAW 264.7 (Abiodun et al., 2016). Por outro lado, os autores demonstraram em modelo de colite em ratos que o extrato foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos no cólon e a expressão de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-6 e CINC-1) e iNOS, sugerindo uma atividade imunomoduladora e anti-inflamatória do extrato *in vivo*. É possível, portanto, que nos animais com candidemia deste estudo, o extrato esteja tendo um papel imunomodulador, diminuindo os efeitos deletérios da inflamação sistêmica e aumentando a capacidade fúngica das células no foco da infecção, hipótese que será testada futuramente.

Diante das evidências obtidas em nosso estudo *in vivo* de que *T. catappa* pode vir interferir na virulência de *C. albicans* e apresentar atividade imunomoduladora, sugerem-se novos experimentos *in vivo* com o extrato, de modo que possam ser avaliados parâmetros imunofisiológicos e hematológicos de camundongos tratados com o extrato.

Assim, o presente estudo sugere que no modelo de imunossupressão farmacológica utilizado, o Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* pode ser uma importante alternativa terapêutica, aumentando a sobrevivência de camundongos, controlando a infecção e modulando o processo inflamatório.

## 7 CONCLUSÕES

- O ácido galágico apresentou afinidade com a CaCYP51 de *C. albicans*;
- O Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* inibiu a formação de halos no ensaio de difusão em ágar;
- O Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* inibiu o crescimento de *Candida* no ensaio de microdiluição;
- O tratamento com o Extrato Hidroetanólico de *T. catappa* aumentou a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos e com candidemia;

## REFERÊNCIAS

- AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**. 2009, 30 (16): 2785–2791.
- Abiodun OO, Sood S, Osiyemi OA, Agnihotri VK, Gulati A, Ajaiyeoba EO, Singh, B. (2015). *In vitro* antimicrobial activity of crude ethanol extracts and fractions of *Terminalia catappa* and *Vitex doniana*. **African journal of medicine and medical sciences**. 2015, 44(1): 21-26.
- Abraham MJ, Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B and the GROMACS development team, GROMACS User Manual version 5.1.4. www.gromacs.org. 2016.
- Ahn YJ, Lee HS, Oh HS, Kim HT, Lee YH. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. **Applied Microbiology**. 2000, 30: 105-108.
- Agarwal S, Manchanda V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian journal of medical microbiology**. 2011, 29(2): 172.
- Ahmed SM, Swamy V, Gopkumar P, Dhanapal R, Chandrashekara VM. Anti-Diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. Leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**. 2005, 4(1): 36-39.
- Allochio-Filho JF, Roldi LL, Delarmelina M, Fiorot RG, Andrade JT, Aleixo AA, Carvalho RS, Araújo MGF, Ferreira JMS, Taranto AG, Romão W, Greco, SJ. Synthesis, in vitro Antifungal Activity and Molecular Modeling Studies of New Mannich Bases Derived from Lawson. **J. Braz. Chem. Soc**. 2016, 27 (11):2127-2140.
- Álvares CA, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. bras. patol. med. lab**. 2007; 43(5):319-327.
- Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**. 2008, 31 (5): 1224-1229.
- Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 2015; 13(6):787–98.
- Amrouche A, Benmehdi H, Chabane SD, Bouras S, Cherfaoni N, Hoggan K. Triagem fitoquímica e atividade antifúngica de saponinas extraídas do argelino *Silene hoggariensis* quezel. **Int Res J Pharma**. 2014; 5: 751-6.
- Aneja KR, Sharma C, Joshi R. Antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* Wight & Arn.: An ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. **Brazilian Journal of otorhinolaryngology**. 2012, 78(1): 68-74.
- Ansari, MA, Fatima Z, Hameed, S. Anticandidal Effect and Mechanisms of Monoterpenoid, Perillyl Alcohol against *Candida albicans*. **PloS one**. 2016, 11(9): e0162465.

- Ayres, MCC, Chaves MH, Rinaldo D, Vilegas W, Vieira Júnior GM. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifoliamart.* et. Zucc. **Química Nova.** 2009, 32 (6): 1509-1512.
- Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology.** 1999, 66: 335-338.
- Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah UJJ. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. 2004. **Biokemistri,** 16(2):106-111.
- Batawila K, Kokou K, Koumaglo K, Gbeassor M, De Foucault B, Bouchet P, Akpagana K. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolose traditional medicine. **Fitoterapia.** 2005, 76: 264-268.
- Batista AL. **Tese.** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicular dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchanavia tomentosa* – Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectalis* Aubl.(Ochnaceae). 2011.
- Beraldo JI, de Oliveira Bernardi N, Meurer M, Costa GM, Arantes VP. Estudo da atividade antifúngica de extratos vegetais de *Azadirachta indica* frente a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 10231. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR.** 2015, 19 (1).
- Bin-Hafeez B, Ahmad I, Haque R, Raisuddin S (2001). Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology.** 2001, 75(1): 13-18.
- Bistoni F, Cenci E, Mencacci A, Schiaffella E, Mosci P, Puccetti P, Romani L. Mucosal and systemic T helper cell function after intragastric colonization of adult mice with *Candida albicans.* **J Infect Dis.** 1993, 168:1449–1457.
- Bizimana N, Tietjen U, Zessin, KH, Diallo D, Djibril C, Melzig MF, Clausen PH. Evaluation of medicinal plants from Mali for their *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology.** 2006, 103: 350- 356.
- Carpano SM, Spegazzini ED, Rossi JS, Castro MT, Debenedetti SL. Antifungal activity of *Terminalia australis.* 2003. **Fitoterapia,** 74(3), 294-297.
- Cassone A, Casadevall A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. **Current Opinion in Microbiology.** 2012; 15(4):427–433.
- Castro JM. **Tese.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. SP. Eficácia do albendazol, sulfóxido de albendazol, metronidazol e ciclosporina no tratamento da infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* (protozoa: *microspora*) em camundongos balb/c imunossuprimidos com ciclofosfamida. 1999.
- Cavasotto CN, Phatak SS. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today.** 2009, 14 (13–14):1–8.
- Chagas ACS, Vieira LS. Ação ovicida *in vitro* e *in vivo* de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.** 2007, 44: 49-55

- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**. 2007, 100(3): 1044-1048.
- Chen PS, Li JH. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cell. **Toxicology letters**. 2006, 163(1): 44-53.
- Chen SCA, Sorrel TC. Antifungal agents – new drugs, old drugs. **Med. J. Aust.** 2007; 187(7):404-409.
- Cheng HY, Lin CC, Lin TC. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral research**. 2002, 55(3): 447-455.
- Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host– Pathogen Interaction: A Review. **Int J Mol Sci**. 2016, 17 (10): 1643.
- Chyau CC, Ko PT, Mau JL. Antioxidant properties of aqueous extract from *Terminalia catappa* leaves. **Zeitschrift fur Naturforschung**. 2006, 39:1099-1108, Wayne, PA.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2008. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility for Yeasts, approved standards, CLSI document M27-A3. Wayne, Pennsylvania, USA
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. Wayne, Pennsylvania, USA
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2003.
- Coccaro P, Guimarães LL, Toma W. Avaliação fitoquímica por Cromatografia em *Terminalia catappa*. **UNISANTA Bioscience**. 2013, 2 (2): 110-114.
- Cock I. E, Van Vuuren, S. F. A comparison of the antimicrobial activity and toxicity of six Combretum and two *Terminalia* species from Southern Africa. **Pharmacognosy magazine**. 2015, 11(41), 208.
- Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Roos G, Walter U, Kraus W. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. **Phytochemistry**. 1998, 48 (4): 647-650.
- Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal models for candidiasis. **Current protocols in immunology**. 2014, 19-26.
- Costa EMM, Esmeraldo MRA, de Carvalho MGF, Pinheiro RRLDÁ, Pastro MF, da Silva Júnior FL. Evaluation of the Antimicrobial Action of Propolis and Substances Used in Endodontics against *Enterococcus faecalis*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. 2008, 8(1): 21-25.
- Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: Importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Revista Espanola de Quimioterapia**. 2010; 23(4): 169–176.

Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C., Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular microbiology*. 2010, 12 (2): 248-271.

Deane CM, Blundel TL. Protein homology modelling and drug discovery. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2003, 445–458.

Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**. 2014, 5(1): 161-169.

Dennington R, Keith T, Millam J. **GaussView**. Version 5. Shawnee Mission, KS: Semichem Inc. 2009

Dwivedi, S. *Terminalia arjuna* wight & Arn- a useful drug for cardiovascular disorders. **Journal of Ethnopharmacology**. 2007, 114: 114-129.

Edwards JE. Fungal cell wall vaccines: an update. **Journal of Medical Microbiology**. 2012; 61:895–903.

Eldeen IMS, Elgorashi EE, Mulholland DA, Van Standen J. Anolignan B: a bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2006, 103: 135-138.

El-Ameen SM, Refahy LA, Mahmoud MA, Saad AM, Abdo AM, Mohamed AS. Chemical Investigation and Antioxidant Activity of Phenolic Acids from the Leaves of *Terminalia arjuna*. **Global Journal of Pharmacology**. 2013, 7(4): 448-456.

Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**. 2010, 161(7): 534-540.

Fan YM, Xu LZ, Gao J, Wang Y, Tang XZ, Zhao XN, Zhang ZX.. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**. 2004, 75 (3-4): 253–260.

Fernandes NC, Zubaty VM. Cyclophosphamide pulse therapy for pemphigus: report of seven cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2005, 80(2): 165-168.

Ferreira RC, Mello RR., Silva KS. Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. **Jornal de Pediatria**. 2014, 90(3): 293-299.

Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, 2005; 48(1):62-67.

Fortes, TS. **Tese**. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA. Extrato padronizado de propólis (EPP-AF ®) aumenta a sobrevivência em camundongos imunossuprimidos com sepse induzida por *Candida albicans*. 2017.

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR. et al. **Gaussian 09**, Revision, D.01. Wallingford, CT: Gaussian, Inc. 2009.

Fyhrquist P, Mwasumbi L, Haeggström C-A, Vuorela H, Hiltunen R, Vuorela P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002, 79 (2): 169–177.

- Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. *In vitro*, evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**. 2008; 166(4):209-217.
- Garcia M, Sertório SP, Alves GJ, Chate SC, Carneiro R, Lallo MA. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunossupressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2004, 24 (3): 115-119.
- Gehring GM, Carrilho CM, Pelisson M, Perugini M, Tano ZN. Candidemia: Revisão Bibliográfica. **Journal of Infection Control**. 2016, 4(4).
- Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 2010, 46(3): 225-234.
- Gómez-García O, Andrade-Pavón D, Campos-Aldrete E, Ballinas-Indilí R, Méndez-Tenorio A, Villa-Tanaca L, Álvarez-Toledano C. Synthesis, molecular docking, and antimycotic evaluation of some 3-acyl imidazo[1,2-a]pyrimidines. **Molecules**. 2018, 23 (3): 1–17.
- Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current opinion in microbiology**. 2012, 15(4): 406-412.
- Gow NA, Van De Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**. 2012, 10(2): 112-122.
- Grossman NT, Chiller TM, Lockhart SR. Epidemiology of echinocandin resistance in *Candida*. **Current Fungal Infection Reports**. 2014; 8(4): 243–248.
- Guido RVC, Andricopulo AD, Oliva G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**. 2010, 24(80): 81-98.
- Guimarães AG, Scotti L, Scotti MT, Mendonça FJB, Melo NSR, Alves RS, De Lucca W, Bezerra DP, Gelain DP, Quintans LJ. Evidence for the Involvement of Descending Pain-Inhibitory Mechanisms in the Attenuation of Cancer Pain by Carvacrol Aided through a Docking Study. **Life Sciences**. 2014, 116 (1): 8–15.
- Gupta, M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay D. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**. 2000, 72(1-2): 151-156.
- Hammad MM, Darwazeh AM, Idrees MM. The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2013, 116 (3): 321-326.
- Hargrove TY, Friggeri L, Wawrzak Z, Qi A, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, York JD, Peter Guengerich F, Lepesheva G. I. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**. 2017, 292 (16): 6728–6743.
- Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible mode of action. **J. Natl. Prod**. 1996, 59: 205-215.
- Henkin CS, Coelho JC, Paganella MC, de Siqueira RM, Dias FS. Sepse: uma visão atual. **Scientia medica**. 2009, 19(3).

- Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**. 2012; 3(3):251-261.
- Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. **Trends Mol Med**. 2014: 1-10.
- Ibegbulem CO, Igwe CU, Eyong EU, Essien EU. LDL-cholesterol lowering effect of *Terminalia littoralis* decoction: hypothesized mechanisms. **Pharmacologia**. 2013 (4): 34-37.
- Jagessar RC, Alleyne R..Antimicrobial potency of the aqueous extract of leaves of *Terminalia catappa*. **Academic Research International**. 2011, 1: 362-371.
- Jiménez-López C, Lorenz MC. Fungal immune evasion in a model host–pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. **PLoS Pathog**. 2013, 9(11): e1003741.
- Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler S. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001, 45:3195–3197.
- Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. 2008; 46(1):120-128.
- Kandil FE, Nassal, ML. A tanninanti-cancer promoter from *Terminalia arjuna*. **Phytochemistry**. 1998, 47:1567-1568.
- Kinoshita S, Inoue Y, Nakama S, Ichiba T, Aniya Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**. 2007, 14 (11): 755-762.
- Kitchen DB, Decornez H, Furr J, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews drug discovery**. 2004, 3(11):935 – 949.
- Ko TF, Weng YM, Chiou YY. Squalene content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* leaves and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2002, 50 (19): 5343-5348.
- Koehler, P, Tacke D, Cornely O. Our 2014 approach to candidemia. **Mycoses**. 2014; 57(9), 519–524.
- Kokora PA, Ackah JAAB, Nanga ZY, Kra MAK, Loukou GY, Coulibaly A, Djaman J. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medicinal plants on the *in vitro* growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**. 2013 (3): 113-116.
- Kortegen A, Hofmann G, Bauer M. Sepsis: current aspects of pathophysiology and implications for diagnosis and treatment. **Eur J Trauma**. 2006, 32:3-9.
- Kontoyiannis DP, Hachem R, Lewis R.E, Rivero G.A, Torres HA, Thornby J, Champly R, Kantarjian H, Bodey G, Raad II. Efficacy and toxicity of caspofungin in combination with liposomal amphotericin B as primary or salvage treatment of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. **Cancer**. 2003;98(2):292-299.
- Kumar CPG, Kumar, SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**. 2006;161: 213-218.

Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, Sekhon JS, Freire A, Ramasubramanian V, Demeyer I, Nucci M, Leelarasamee A, Jacobs F, Decruyenaere, Pittet D, Ullmann AJ, Ostrosky-Zeichner L, Lortholary O, Koblinger Sm Diekmann-Berndt H, Cornely OA. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *The Lancet*. 2007;369(9572): 1519-1527.

Lallo MA. **Tese**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. SP. Estudo da infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos Balb-c tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina. 1998.

Lallo MA; Santos MJ, Bondan EF. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Revista de Saú de Pública**. 2002, 36(5), 621-626.

Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2011, 51 (10): 2778–2786.

LeibundGut-Landmann S, Wüthrich M, Hohl TM. Immunity to fungi. **Current opinion in immunology**. 2012, 24(4), 449-458.

Lepak AJ, Marchillo K, Andes DR. Pharmacodynamic target evaluation of a novel oral glucan synthase inhibitor, SCY-078 (MK-3118), using an in vivomurine invasive candidiasis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2015;59(2):1265–72.

Lepak A, Andes D. Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. **Critical care clinics**. 2011, 27(1): 123-147.

Li Z, Guo X, Dawuti G, Aibai S. Antifungal Activity of Ellagic Acid *In Vitro* and *In Vivo*. **Phytotherapy Research**. 2015, 29 (7): 1019–1025.

Lill-Elghanian D, Schwartz K, King L, Fraker P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. **Experimental Biology and Medicine**. 2002, 227(9): 763-770.

Lima H. Facts and myths about immunomodulators. **An Bras Dermatol**. 2007, 82(3): 207-21.

Lin YL, Kuo YH, Shiao MS, Chen C-C, Ou J-C. Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**. 2000, 47(1): 253–256.

Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. **Fitoterapia**. 2009, 80: 369-373.

Lockhart SR. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**. 2014, 36 (17): 131-136.

Machado, GRM. **Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Determinação da atividade antifúngica de *Acca sellowiana*. 2015.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 2010, 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed.

- Maldí AK, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair PC, Oostenbrink C, Mark AE. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**. 2011, 7 (12): 4026–4037.
- Mandloi S, Mishra R, Varma R, Varughese B, Tripathi J. A study on phytochemical and antifungal activity of leaf extracts of *Terminalia catappa*. **International of Pharma and Bio Sciences**. 2013, 4: 1385-1393.
- Manzur A, Raju A, Rahman S Antimicrobial activity of *Terminalia catappa* extracts against some pathogenic microbial strains. **Pharmacology & Pharmacy**. 2011, 2: 299–305.
- Marreto JPM. Tese. Universidade de São Paulo. Ribeiro EEC. Dissertação. Caracterização da candidemia por *Candida parapsilosis* (sensu lato) em recém-nascidos: aspectos epidemiológicos, clínicos, moleculares e susceptibilidade a antifúngicos. 2014.
- Masoko P, Eloff JN. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**. 2005, 4 (12): 1425-1431.
- Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza; UFC; 2009.
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**. 2000, 47 (2): 119– 125.
- Mau JL, KO PT, Chyau CC. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Research International**. 2003 36: 97-104.
- Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive care medicine**. 2014; 40(9):1241-1255.
- McCarty TP, Pappas PG. Invasive candidiasis. **Infectious disease clinics of North America**. 2016, 30(1): 103-124.
- Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Rev Odontol UNESP**. 2009, 38(3): 184-91.
- Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawata T, Otake T. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1 protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. 1998, 49:1651-1657.
- Miceli MH., Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet infectious diseases**. 2011, 11(2): 142-151.
- Mininel FJ, Leonardo-Junior CS, Espanha LG, Resende FA, Varanda EA, Leite CQF, Vilegas W, Dos Santos LC. (2014). Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn.(Combretaceae) and their mutagenic activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014, 2014.
- Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, Séguin DL, Guay I, Gattuso M, Marsault E, Bouarab K, Malouin F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant

- Staphylococcus aureus and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2012, 67: 559- 568.
- Mochizuki M, Hasegawa N. Anti-inflammatory effect of extract of *Terminalia Sericea* roots in an experimental model of colitis. **Journal of Health Science**. 2007, 53 (3): 329-331.
- Moody JO, Adebisi OA, Adeniyi BA. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **J Ethnopharmacol**. 2004, 92: 57-60
- Morais ASQCNO. Mechanisms of antifungal resistance in pathogenic yeasts: evaluation of the in vitro and in vivo expression. 2012.
- Moriyama B, Gordon LA, McCarthy M, Henning SA, Walsh TJ, Penzak SR. Emerging drugs and vaccines for candidemia. **Mycoses**. 2014; 57(12): 718-733.
- Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. **Molecular Modeling of Proteins**. 2008, 365-382.
- Moshi MJ, Mbwambo ZH. Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005, 97: 43-47.
- Moustafa G, Khalaf H, Naglah A, Al-Wasidi A, Al-Jafshar N, Awad H. The Synthesis of Molecular Docking Studies, *In Vitro* Antimicrobial and Antifungal Activities of Novel Dipeptide Derivatives Based on N-(2-(2-Hydrazinyl-2-oxoethylamino)-2-oxoethyl)-nicotinamide. **Molecules**. 2018, 23 (4): 1–13.
- Mudi SY, Muhammad A. Antimalaria activity of ethanolic extracts of leaves of *Terminalia catappa* L. Combretaceae [indian almond]. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**. 2010, (2): 14–18.
- Nagappa NA, Thakurdesai PA, Venkat Rao N, Singh J. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **J Ethnopharmacol**. 2003, 88 (1): 45-50.
- Nair R, Chanda S. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betel* leaf extract. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2008, 70: 390-393.
- Naitik P, Prakash T, Kotresha D, Rao NR. Effect of *Terminalia catappa* on lipid profile in transplanted fibrosarcoma in rats. **Indian Journal of Pharmacology**. 2012, 44: 390-392.
- Namba AM, Silva VB, Silva CHTP. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**. 2008, 33:13-24.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**. 2008, 6(1): 67-78.
- Niimi M, Firth NA, Cannon RD. (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**. 2010, 98(1): 15-25.
- Nunes, PHM, Martins MDCC, Oliveira RDCM, Chaves MH, Sousa EA, Leite JRSA, Vêras LM, Almeida FRC. Gastric Antiulcerogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **BioMed research international**. 2014, 2014.

- O'Brien J, Wilson I, Orton T; Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**. 2000, 267 (17): 5421-5426.
- Odds FC. Pathogenesis of candidosis. In: Odds FC, editor. *Candida and Candidosis*. Bailliere Tindall; Oxford: 1998. pp. 252–278.
- Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**. 2005, 66: 2012–2031.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2008, 18 (2): 301-307.
- Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**. 2007,17(1): 102-107.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistant in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. 2002, 46 (8): 2720-2722).
- Palombo E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. 2011, 2011: 1-15.
- Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Fligou F, Manolopoulou P, Spiliopoulou I, Vrettos T, Dodou V, Filos KS, Anastassiou ED. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-*albicans* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**. 2014, 80(3): 227-232.
- Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathog**. 2013, 9(9): e1003550.
- Pappas PG. Invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**. 2006, 20: 485-506.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, OstroskyZeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*. 2016, 62(4): e1-50.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**. 2014; 19(1):1085-1119.
- Perman J, Canton E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 2009; 7(4):453-60.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev**. 2007, 20 (1): 133-163.
- Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparasion of European Committee ond Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST) and Etes Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. **J Clin Microbiol**. 2010. 592-1599.

- Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles of opportunistic yeast and mould clinical isolates (2010–2011): Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values to characterize geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51: 2571–2581.
- Picoli T, Barbosa JS, Vargas GDÁ, de Oliveira Hübner S, Fischer G. Toxicidade e Eficiência do Dimetilsulfóxido (DMSO) no Congelamento de Células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). *Science And Animal Health.* 2015, 3(2): 159-168.
- Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antibiotics in laboratory medicine. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** 5th edn. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 365-440. 2005.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms: an update. **Eukaryotic cell.** 2005; 4(4):633-638.
- Ramos RM, Perez JM, Baptista LA, De Amorim HLN. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-Acetyltransferase from mycobacterium tuberculosis with isoniazid: A computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling.** 2012, 18 (9): 4013–4024.
- Ratnasooriya WD, Dharmasiri MG, Rajapakse RAS, De Silva MS, Jayawardena SPM, Fernando PUD, De Silva WN, Nawela AJMDNB, Warusawithana RPYT, Jayakody JRC, Digana PMCB. Tender leaf extract of *Terminalia catappa* antinociceptive activity in rats. **Pharmaceutical Biology.** 2002, 40 (1): 60–66.
- Ribeiro EEC. **Dissertação.** Universidade CEUMA, São Luís, MA. Atividade antifúngica, do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* contra isolados de *Candida albicans*. 2016.
- Rorato VC. **Dissertação.** Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS. Investigação química, toxicidade *in vivo*, citotoxicidade e propriedades antifúngicas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão sobre *Candida* spp. Isoladas de candidíase vulvovaginal. 2013
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res.** 2006, 6(1): 14-29.
- Russell JA. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine.** 2006, 355(16): 1699-1713.
- Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza B.A, Torres NW. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2009, 2011: 1-6.
- Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in medicine.** 2016, 3.
- Sanguinetti M, Brunella, Cornelia LF. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses.** 2015; 58(S2): 2-13.

Saravanan S, Srikumar R, Manikandan S, Parthasarathy NJ, Devi RS. Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**. 2007, 127(2): 385-388.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**. 2013, 62(1): 10-24.

Saxena M, Faridi U, Mishra R, Gupta MM, Darokar MP, Srivastava SK, Singh D, Luqman S, Khanuja SPS. Cytotoxic agents from *Terminalia arjuna*. *Planta medica*. 2007, 73(14): 1486-1490.

Shah J. J, Khedkar V, Coutinho E. C, Mohanraj K. Design, synthesis and evaluation of benzotriazole derivatives as novel antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, 25(17):3730–3737

Shin TY, Jeong HJ, Kim DK, Kim SH, Lee JK, Kim DK, Chae BS, Kim JH, Wang, HW, Lee CM, Lee KC, Park ST, Lee EJ, Lim JP, Kim HM, Lee YM. Inhibitory action of water-soluble fractions of *Terminalia chebula* on systemic and local anaphylaxis. **Journal of Ethnopharmacology**. 2001, 74: 133-140.

Shoham S, Marr KA. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Future microbiology**. 2012;7(5):639-655. 28

Silva DF. **Dissertação**. Universidade Federal da Paraíba (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia). Avaliação da atividade biológica de –citronelol sobre *Candida albicans*. 2016.

Silva LPD. **Dissertação**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP. Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e cicatrizante do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). 2012.

Silva O, Duarte A, Pimentel M, Viegas S, Barroso H, Machado J, Oires I, Cabrita J, Gomes E. Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. **Journal of Ethnopharmacology**. 1997, 57: 203-207.

Silva RHM, Lima N de FM, Lopes AJO, Vasconcelos CC, De Mesquita JWC, De Mesquita LSS, Lima FCVM, Ribeiro MNdS, Ramos RM, Cartágenes MdoSdeS, Garcia JBS. Antinociceptive activity of *Borreria verticillata*: In vivo and in silico studies. **Frontiers in Pharmacology**. 2017, 8 (May): 1–14.

Silva TC. **Tese**. Universidade Federal de Goiás (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública), Goiânia, GO. Atividade da punicalagina em leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e de espécies de *Candida*. (2017).

Singh BN, Upreti DK, Singh BR, Pandey G, Verma S, Roy S, Naqvi AH, Rawat A. K. S. Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2015, 59(4): 2153–2168.

Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**. 2007, 369 (9577): 1961-1971.

- Soll DR. Candida biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology**.2008; 18(16): R717-R720.
- Souza VC, Lorenzi H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2005. Nova Odessa: Plantarum.
- Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**. 2013; 2013.
- Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards JE, Jr, Filler SG. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. **J Infect Dis**. 2005, 192:336–343.
- Sudbery, PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(10):737-748.
- Sueth-Santiago V, Franklim TN, Lopes ND, de Lima. CYP51: Uma Boa Ideia? **Revista Virtual de Química**. 2015, 7(2): 539-575.
- Szafrański K, Sławiński J, Kędzia A, Kwapisz E. Syntheses of novel 4-substituted N-(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)pyridine-3-sulfonamide derivatives with potential antifungal activity. **Molecules**. 2017, 22 (11): 1–17.
- Tabopda TK, Ngoupayo J, Liu J, Ali MS, Khan SN, Ngadjui BT, Luu B.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors ellagic acid and derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 2008, 56 (6): 847-850.
- Terças, AG. **Tese**. Universidade Federal do Maranhão, São Luís. MA. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antifúngica de *Terminalia catappa* contra leveduras de *Candida* diagnosticadas da cavidade oral de pacientes internados com AIDS. 2013.
- Terças AG, Monteiro AS, Moffa EB, Dos Santos JRA, De Sousa EM, Pinto ANRB, Costa PCS, Borges ACR, Torres LMB, Barros-Filho AKD, Fernandes, E. S, Monteiro CAD. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**. 2017,8.
- Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Khouri S, Gontijo AVL, Pascoal ACRF, Salvador MJ, Koga-Ito CY. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future Microbiology**. 2015, v. 10 (6):917–927.
- Thomson L, Evans B. Species profiles for pacific island agroforestry: *Terminalia catappa* (Tropical Almond). 2006.
- Trabulsi-Filho FA, Andrade KCS, Silva EC, Castro ATO, Batista MCA, Ribeiro MNS, Amaral FMM. Estudo de padronização de extratos de *Anacardium occidentale* L. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. **Cad. Pesq**. 2013, 20:7-15.
- Trösken ER, Adamska M, Arand M, Zarn JA, Patten C, Völkel W, Lutz WK. Comparison of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles. *Toxicology*. 2006, 228(1): 24-32.
- Uwamahoro N, Verma-Gaur J, Shen HH, Qu Y, Lewis R, Lu J, Bambery K, Master SL, Vince JE, Naderer T, Traven A. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. **MBio**. 2014, 5(2): e00003-14.

Vila-Nova NS, Morais SM, Falcão MJC., Machado LKA, Bevilaqua CML, Costa IRS, Brasil NVGP, Andrade HF. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two *Annonacea* species cultivated in Northeastern Brazil. **Revta Soc. Bras. Med. Trop.** 2011, 44:567-571

Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Limpman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama.** 2009, 302(21): 2323-2329.

Vinitha M, Ballal M. Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. **World J Med Sci.** 2007; 2(1):46-48.

Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, Yu B, Fan Y, Sun X. Functional Polymorphisms of Interferon-gamma Affect Pneumonia-Induced Sepsis. **PLoS One.** 2014, 9: 1-20.

Watson JD, Sanderson S, Ezersky A, Savchenko A, Edwards A, Orengo C, Joachimiak A, Laskowski RA, Thornton JM. Towards Fully Automated Structure-based Function Prediction in Structural Genomics: A Case Study. **Journal of molecular biology.** 2007, 367 (5):1511–22.

Wermuth CG. *The Practice of Medicinal Chemistry.* 2 ed, Academic Press. 2003

Wiederhold NP, Najvar LK, Fothergill AW, Bocanegra R, Olivo M, McCarthy DI, Kirkpatrick WR, Fukuda Y, Mitsuyama J, Patterson TF. The novel arylamidine T-2307 maintains in vitro and in vivo activity against echinocandin-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2015; 59(2):1341–1343.

Williams CH, Hong CC. Multi-step usage of in vivo models during rational drug design and discovery. **International Journal of Molecular Sciences.** 2011, 12(4):2262–74.

Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, Yang JS, Zavras AI, Hsieh YH, Su SC, Kao TY, Chen PN, Chu SC. Antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. on oral cancer via a down-regulation of metastasis-associated proteases. **Food and chemical toxicology.** 2010, 48(4): 1052-1058.

Yang, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology Immunology and Infection.** 2003;36(4):223-228.

Zhang Y, Damu GLV, Cui S-F, MI J.-L, Tangadanchu VKR, Zhou C-H. Discovery of potential antifungal triazoles: design, synthesis, biological evaluation, and preliminary antifungal mechanism exploration. **MedChemComm.** 2017, 8 (8): 1631–1639.

Zhao X, Oh S-H, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Leng RP, Brown AJP, Hoyer LL. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology.** 2004; 150:2415–2428.