



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO ACADÊMICO



ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Anacardium occidentale* L. *in vitro* e *in vivo*

ALUISIO DA SILVA OLIVEIRA

São Luís - MA

2022

ALUISIO DA SILVA OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Anacardium occidentale* L. *in vitro* e *in vivo*

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís - MA

2022

ALUISIO DA SILVA OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE *Anacardium occidentale* L. *in vitro* e *in vivo*

Aprovada em: 20/10/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Júnior
Universidade CEUMA

Profa. Dra. Cristina de Andrade Monteiro
Instituto Federal do Maranhão

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

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

Da Silva Oliveira, Aluisio.
ATIVIDADE ANTI-Candida DE Anacardium occidentale L. in
vitro e in vivo / Aluisio Da Silva Oliveira. - 2022.
106 f.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2022.

1. Anacardium occidentale. 2. Antifúngico. 3.
Candida albicans. 4. Candida parapsilosis. 5.
Ciclofosfamida. I. Nassar Meireles Guerra, Rosane. II.
Título.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”
(Albert Einstein)

Aos meus pais Antônio e Maria Celi

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda proteção diária, por guiar meus passos, me livrar dos caminhos do mal e por escolher tantas pessoas boas para fazerem parte da minha vida. Obrigado meu Deus, sou muito grato pelas bênçãos que me tem proporcionado.

A minha orientadora Dra. Rosane Guerra que com a forma convicta na qual falava de ciência e pesquisa durante uma aula, plantou em mim os primeiros anseios em me aprofundar nesse mundo. Naquela mesma tarde conversamos mais sobre e iniciamos projetos que permearam a iniciação científica, o mestrado e agora nos conduzem a concretização do doutorado. A admiro muito pela objetividade, pensamento rápido, pela praticidade, inteligência e o amor com que conduz a ciência, sempre apoiando e acreditando. Obrigado professora Rosane por contribuir tão de perto com minha formação, só posso desejar muita proteção e dias cheios de muitas alegrias.

Aos meus pais, Maria Celi e Antônio Rodriguês, que não tiveram acesso aos estudos e nem por isso deixaram de acreditar, um só momento, que esse era o caminho que deviam me incentivar a seguir, sempre me apoiando. Muito obrigado minha mãe, por ser essa mulher guerreira, verdadeira, honesta e de muita sabedoria e ao meu pai, paciente, sincero, honesto e íntegro. Agradeço imensamente por todo o carinho e amor dispensado, pelos ensinamentos, perseverança, honestidade, lealdade e força

Aos amigos da FA042 (Farmácia –UFMA) que contribuíram para minha formação, em especial a Alexandre Magno, meu grande amigo, um irmão e também colega de trabalho, com o qual divido planos, ideias e que também contribuiu nesse trabalho com sugestões e como grande incentivador e a minha amiga Christianne Azevedo, por quem tenho muito carinho, admiração e por participar sempre de todos os momentos da minha vida. Sou imensamente grato por ter vocês ao meu lado.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) que tem proporcionado aos seus integrantes grandes realizações profissionais e científicas e principalmente aos irmãos de laboratório que me incentivaram e apoiaram a todo momento, em especial ao Regis, que encanta a todos com seu fascínio pelo mundo dos Fungos, compartilhando conhecimento de forma espontânea e brilhante, muito obrigado amigo por ser um dos grandes incentivadores e ter contribuído tão de perto na concretização desse sonho. Aos amigos Douglas, Danielle, Arthur e Nicolle que tornaram essa jornada mais leve ajudando nos experimentos, análises dos dados, críticas e sugestões.

As professoras Dra.Márcia Maciel, Dra.Cristina Monteiro que contribuíram com as sugestões durante o processo de qualificação e, em especial, a Dra. Mayara Cristina que sempre acompanha meus passos científicos e por quem tenho grande carinho e admiração.

Aos amigos “Amantes do suco” que incentivam de perto meu crescimento pessoal e profissional, conhecer vocês sem dúvida fizeram essa caminhada mais leve e divertida. Em especial, à minha grande amiga Amanda Oliveira com quem divido as incertezas, as inseguranças, os momentos bons e mais tensos, tanto da vida acadêmica quanto da vida pessoal, sou grato por tê-la em minha vida e como costume falar: Não consigo imaginar minha vida sem você, porque simplesmente ela não existe.

A turma de doutorado 2018.2, que a pandemia infelizmente tirou o contato presencial, mas o apoio virtual foi importantíssimo nesse momento de dificuldades.

As instituições de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fornecer os recursos para realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram na realização desse projeto,

Meu muito obrigado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Infecção por <i>Candida</i> spp.....	17
2.2 Fatores de virulência	19
2.3 Tratamentos farmacológicos e mecanismos de resistência	23
2.4 <i>Anacardium occidentale</i> L.....	28
REFERÊNCIAS.....	31
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Capítulo I – Artigo 1.....	41
4.2 Capítulo II – Artigo 2.....	67
5. CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CV	Cristal violeta
DO	Densidade Óptica
DMSO	Dimetilsufóxido
EAO	Extrato Etanólico de <i>Anacardium occidentale</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LIF	Laboratório de Imunofisiologia
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pls	Enzima Fosfolipase
Pz	Zona de precipitação
SAP	Enzima Proteinase Secretada
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
YNB	Base de Nitrogênio de Levedura

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Morfologia de <i>C. albicans</i>	16
Figura 2 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	17
Figura 3. Mecanismos moleculares de resistência às drogas antifúngicas.....	24
Figura 4. Aspectos gerais da árvore de <i>A. occidentale</i>	27

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma do processo de busca e análise das referências (2012-2022)....	46
Figura 2. Estrutura química dos principais compostos encontrados nos extratos de plantas da família Anacardiaceae com propriedades antifúngicas contra <i>Candida</i> spp...	57

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estruturas químicas dos compostos identificados no EAO.....	80
Figura 2. Avaliação da atividade hemolítica do EAO	81
Figura 3. Efeito da EAO na cinética do crescimento celular versus tempo (48 horas) de <i>Candida</i> spp	83
Figura 4. Efeito do tratamento do EAO sobre a adesão de cepas padrão e clínicas de <i>Candida</i> spp	84
Figura 5. Efeito do tratamento do EAO sobre o biofilme de <i>Candida</i> spp	85
Figura 6. Curvas de sobrevivência de <i>T. molitor</i> na avaliação da infecção letal	87
Figura 7. Efeito do tratamento com o EAO no número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no sangue (A) e no rim (B).....	89
Figura 8. Efeito do tratamento com o EAO sobre a produção de citocinas em camundongos com infecção por <i>C. albicans</i>	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Extratos de plantas e compostos bioativos da família Anacardiaceae que relataram atividade anti- <i>Candida</i> de 2012 a 2022.....	49
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Atividade antifúngica do EAO sobre linhagens padrão e clínicas de <i>C.albicans</i> e <i>C. parapsilosi</i>	82
Tabela 2. Efeito do EAO sobre as enzimas proteinase e fosfolipase considerando valores médio de Pz para secreção das enzimas entre espécies de <i>Candida</i> spp.....	86

RESUMO

As infecções fúngicas ocasionadas pelas espécies de *Candida* spp. aumentaram em todo o mundo, respondendo pelas maiores taxas de infecções hospitalares e mortalidade. O tratamento da candidíase inclui diferentes tipos de antifúngicos, como o Fluconazol e a Anfotericina B. No entanto, o aumento de cepas resistentes motiva a busca de novos agentes terapêuticos. *Anacardium occidentale*, espécie vegetal nativa do Brasil, utilizada popularmente para tratar infecções e inflamações tem sido alvo na bioprospeção de compostos bioativos. O presente estudo investigou o potencial antifúngico do Extrato Etanólico das flores de *A. occidentale* (EAO) contra *Candida* spp e sua ação *in vitro* sobre alguns fatores de virulência. Também investigamos a composição química e a atividade hemolítica do extrato e o seu efeito antifúngico na infecção em larvas de *Tenebrio molitor* por *Candida* spp. e em camundongos submetidos à infecção por *Candida albicans*. A composição química foi analisada por espectrometria de massa com infusão direta. A atividade anti-*Candida* foi avaliada pelo ensaio de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre as linhagens padrão de *Candida albicans* (ATCC10231) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e isolados clínicos dessas duas espécies. Foi também avaliado o efeito do EAO na adesão, no biofilme e sobre a produção das exoenzimas fosfolipase e proteinase. A atividade hemolítica do extrato foi avaliada em hemácias de carneiro. Larvas de *T. molitor* foram utilizadas para avaliar os efeitos do EAO na sobrevida, após a infecção letal por *Candida* spp. Para infecção por *Candida albicans*, camundongos Swiss, fêmeas, 2 meses de idade foram imunossuprimidos com 50mg/kg de ciclofosfamida, via intraperitoneal, 48h antes da infecção. Os animais imunossuprimidos foram divididos em grupos (N=5) e tratados via subcutânea no momento da infecção: Controle, recebeu salina; ANFO B, tratado com Anfotericina B (0,6 mg/Kg); EAO, tratado com 5 mg/Kg do extrato. Após 24 horas foram eutanasiados para avaliar o efeito do EAO considerando a carga fúngica e a produção de citocinas. No EAO foram identificados como compostos majoritários: heptagalolilglucopiranosídeo, trigalolilglicopiranosídeo, ácido anacárdico e ácido galoilquinico. O EAO apresentou atividade anti-*Candida*, tanto para as linhagens padrão quanto para os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os valores de CIM variaram entre 1,97 a 3,13 mg/mL para as linhagens padrão e 1,97 a 6,25 mg/mL para as cepas clínicas, mostrando que o extrato inibiu o crescimento de todas as cepas fúngicas, com ação fungicida e/ou fungistática de acordo com a relação CIM/CFM. Além disso, o tratamento com EAO inibiu a adesão e o biofilme de todas as espécies testadas e interferiu na produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase, dependendo da concentração. Nos ensaios *in vivo*, o EAO aumentou a sobrevida das larvas de *T. molitor* letalmente infectadas com *C. albicans* e *C. parapsilosis* e reduziu a carga fúngica no sangue e no rim de camundongos infectados por *C. albicans*. Além disso, o tratamento interferiu na produção de citocinas aumentando a produção de IL-6 e reduzindo a produção de TNF- α . Em conclusão o EAO aumentou a sobrevida das larvas de *T. molitor* infectado por *Candida* spp e reduziu a infecção de camundongos infectados por *Candida albicans*, certamente devido a sua ação anti-*Candida* de largo espectro, pois o extrato inibiu eficientemente o crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, e também os fatores de virulência, atividade que pode está relacionada a presença dos compostos identificados no extrato.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; Antifúngico; Ciclofosfamida; Citocinas

ABSTRACT

Fungal infections caused by *Candida* spp. increased worldwide, and are related to the high rates of hospitalization and mortality. The treatment of candidiasis includes different types of antifungals, such as Fluconazole and Amphotericin B. However, the increase number of resistant strains motivates the search for new therapeutics. *Anacardium occidentale* L., a plant species native to Brazil, is popularly used for the treatment of infections and inflammation, for this reason, this species is an interesting target for the bioprospecting of new bioactive compounds. The present study investigated the antifungal effect of the Ethanol Extract of *A. occidentale* flowers (EAO) against *Candida* spp, considering the activity against some virulence factors *in vitro*, and the protective effect in alternative against lethal *Candida* infection in *Tenebrio molitor* larvae and mice. The chemical composition of the extract was determined by Mass Spectrometry (MS) with direct melting. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) determined the antifungal activity. It was also determined the EAO effect on *Candida* adhesion, biofilm development and the phospholipase and proteinase exoenzymes. The hemolytic activity of EAO was evaluated using sheep red blood cells. *T. molitor* lethally infected with *C. albicans* or *C. parapsilosis* received EAO (intracoelemic, 5mg/Kg) to evaluate the extract effect on survival. Swiss female mice, 2 months of age, were immunosuppressed with Cyclophosphamide (50mg/kg, via intraperitoneal), 48h before infection. Those animals were divided into three groups (N=5/group): Control, received saline groups; ANFO B, treated with Amphotericin B (0.6 mg/kg); EAO, treated with the extract (5 mg/Kg). After 24 hours the animals were euthanized to evaluate the effect of EAO on fungal burden, cellularity and cytokine production. The major compounds found the EAO included; heptagalloylglucopyranoside, trigalloylglucopyranoside, anacardic acid and galoilquinic were identified. EAO showed anti-*Candida* activity, for reference strains and clinical isolates of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The MIC values ranged from 1.97 to 3.13 mg/mL for the reference strains and 1.97 to 6.25 mg/mL for the clinical strains. The extract inhibited the growth of all fungal species tested, indicating fungicidal and/or fungistatic action according to the MIC/CFM ratio. In addition, EAO inhibited adhesion and biofilm in all tested species and interfered with the production of the proteinase and phospholipase exoenzymes. EAO increased the lifespan of *T. molitor* larvae and mouse and increased IL-6 and decrease TNF- α levels in serum of infected mice. In conclusion, treatment with EAO increased the survival of *T. molitor* larvae and mice showed activity certainly related to a broad spectrum of anti-*Candida* action, since the extract was also able to inhibit the growth of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, the adhesion, biofilm and exoenzymes actions. Those activities may be due to the presence of compounds in this extract.

Keywords: *Anacardium occidentale*, *Candida*, anti-*Candida*, Cyclophosphamide, immunosuppression