



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO MESOCARPO DE BABAÇU
(*Attalea speciosa* Mart.) NA INFECÇÃO LETAL POR *Candida* sp.**

NICOLLE TEIXEIRA BARBOSA

São Luís,
2024

NICOLLE TEIXEIRA BARBOSA

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO MESOCARPO DE BABAÇU
(*Attalea speciosa* Mart.) NA INFECÇÃO LETAL POR *Candida* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção de título no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís,
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Teixeira Barbosa, Nicolle.

EFEITO ANTIFÚNGICO DO MESOCARPO DE BABAÇU *Attalea speciosa* Mart. NA INFECÇÃO LETAL POR *Candida* sp / Nicolle Teixeira Barbosa. - 2024.

76 p.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - Ma, 2024.

1. Apigenina. 2. Babaçu. 3. *Candida* Sp. 4. *Tenebrio Molitor*. 5. Biofilme. I. Nassar Meireles Guerra, Rosane. II. Título.

NICOLLE TEIXEIRA BARBOSA

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO MESOCARPO DE BABAÇU
(*Attalea speciosa* Mart.) NA INFECÇÃO LETAL POR *Candida sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção de título no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas Martins França
Universidade Federal do Maranhão

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

Prof. Dr. Aluísio da Silva Oliveira
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Presidente

*Deem graças ao Senhor, porque ele é bom;
o seu amor dura para sempre.*

Salmos 118:29

Dedico este trabalho à minha mãe, riqueza da minha vida. Ao meu marido, fiel companheiro e amigo. Ao meu filho(a) que ainda nem chegou, mas já mudou toda minha história. Aos meus irmãos, que são a alegria do meu viver e aos meus amigos, companheiros de caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu melhor amigo e minha força diária. Minha vida mudou depois que me encontrei com Ele e sei que tudo o que vivo hoje é resultado desse encontro. Por vezes foi meu abrigo e socorro nos momentos difíceis dessa trajetória. Que toda honra seja dada a Ele que é digno!

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosane Guerra, por ter me incentivado a continuar na pesquisa, dando continuidade aos seus ensinamentos tão importantes para a minha trajetória e às pesquisas já desempenhadas anteriormente durante a minha graduação, por ter se disposto a me ajudar, por seu suporte e compreensão neste novo desafio.

Estendo minha gratidão ao Prof. Mestre Josivan Regis Farias por ser mais que um companheiro de laboratório, mas um amigo e incentivador também, você foi essencial nesse momento. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Vou sempre levar isso em meu coração.

Ao laboratório de Imunofisiologia (LIF), onde ingressei, já quase no final da minha graduação, e onde continuei desenvolvendo todas as minhas pesquisas e experiências, me fazendo abrir os olhos para o lindo universo da Imunologia. Foi também o lugar onde conheci pessoas incríveis e professores excepcionais. Estendo minha gratidão a todos os amigos que fiz durante essa caminhada: Ariadina, Pâmela, Danielle, Simone e Priscila. Vocês abrilhantaram meus dias e foram tão cuidadosas comigo que eu nunca me esquecerei.

Agradeço também ao Prof. André Vale e à Profa. Dra. Mayara Cristina Silva por não medirem esforços e estarem sempre a disposição para esclarecer minhas dúvidas e aos demais alunos do laboratório, Hillary, Liane, Nicolly, Rômulo e Thiago por se fazerem presentes nos experimentos, somando e contribuindo para o enriquecimento da minha pesquisa.

À minha família, em especial minha mãe, Erlís Teixeira por ser a minha maior incentivadora e amiga na vida, sua força é o meu exemplo, obrigada por acreditar que eu sempre posso ir mais longe. Aos meus queridos irmãos Arthur, Miguel e Joice por encherem a minha vida de alegria e por me apoiarem incondicionalmente. Ao meu marido, Kleyton Sousa, por sempre confiar no meu potencial, por acreditar em mim e por estar ao meu lado desde o começo da graduação, quando ainda éramos apenas namorados. Você é a minha segunda melhor escolha depois de Cristo.

A todos os meus amigos da Igreja Apostólica da Restauração, vocês são uma parte extremamente importante da minha história e definitivamente eu não teria conseguido sem vocês.

À Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade de continuidade a mim concedida. Aqui recebi ensinamentos que levarei para a vida. Agradeço também ao corpo docente do mestrado em Ciências da Saúde, por todas as horas investidas na minha formação e por toda motivação a mim dispensada. À banca de qualificação e defesa da dissertação, pelo aceite e disponibilidade em participar desse momento tão importante para mim.

Por fim, agradeço 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.

Sou imensamente grata aos que de alguma forma fizeram parte da minha trajetória, mesmo não estando citados aqui, guardo na memória e coração.

SUMÁRIO

Agradecimentos	7
Lista de abreviaturas	10
Lista de figuras	11
Lista de Tabelas	13
Resumo	14
Abstract	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 <i>Candida</i> sp.	17
2.2 <i>Candida albicans</i>	18
2.3 <i>Candida parapsilosis</i>	21
2.4 Sistema imunológico nas infecções por <i>Candida</i> sp.	22
2.5 Sepsis por <i>Candida</i> sp.	24
2.6 Alternativas no tratamento das infecções por <i>Candida</i> sp.	25
2.7 Plantas medicinais	27
2.8 <i>Attalea speciosa</i> Mart. – Babaçu	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANF B	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> - Coleção de culturas do tipo americano
BAE	Extrato etanólico do mesocarpo de babaçu
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CV	Cristal Violeta
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FMB	Farinha do mesocarpo de babaçu
GPIB	Grupo de pesquisa em Imunologia básica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL	Interleucina
IFNγ	Interferon Gama
LIF	Laboratório de Imunofisiologia
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
NO	Óxido Nítrico
NK	Célula <i>natural killer</i> – Célula assassina natural
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura do Instituto Memorial Roswell Park
SAPs	Proteases aspárticas segregadas
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador β
Th	Linfócitos T <i>helper</i> – T auxiliares
TLR	Receptor do tipo Toll
Treg	Linfócito T regulador
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YNB	Base de Nitrogênio de Levedura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características macro e micro morfológicas de <i>Candida</i> sp -----	18
Figura 2	Sítios comensais de <i>C. albicans</i> no corpo humano e manifestações clínicas da infecção por <i>C. albicans</i> -----	19
Figura 3	As mudanças e transições morfológicas de <i>Candida albicans</i> durante o processo de infecção -----	20
Figura 4	Quatro estágios da formação de biofilme de <i>C. albicans</i> -----	21
Figura 5	Morfologia do fruto do babaçu -----	29
Figura 6	Cromatograma do BAE através de análise de injeção de fluxo direto representativo e picos de impressão digital HPLC-PAD-ESI-MS obtidos em modo de íon negativo -----	41
Figura 7	Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados no BAE -----	41
Figura 8	Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) na adesão de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> -----	44
Figura 9	Ação do extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) sobre a formação do biofilme pré-formado de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> -----	45
Figura 10	Efeito do extrato do mesocarpo sobre a viabilidade dos biofilmes pré-formados de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> clínica -----	46
Figura 11	O extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) inibiu a biomassa do biofilme formado de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> -----	47
Figura 12	Atividade inibitória do extrato do mesocarpo sobre a viabilidade dos biofilmes formados de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> -----	48
Figura 13	O tratamento com BAE reduz a infecção de células peritoneais infectadas por <i>C. parapsilosis in vitro</i> -----	49
Figura 14	O extrato do mesocarpo de babaçu tem baixa toxicidade para larvas de <i>Tenebrio molitor</i> -----	50
Figura 15	O tratamento com extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) aumenta a sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i> infectadas letalmente com <i>C. albicans</i> ou <i>C. parapsilosis</i> -----	51
Figura 16	O tratamento com o extrato do mesocarpo de babaçu apresentou efeitos diferenciados quanto ao número de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) em camundongos infectados com <i>Candida parapsilosis</i> -----	52

Figura 17 Efeitos do tratamento com o extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) em camundongos infectados letalmente com *C. parapsilosis* quanto a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD4 ----- **53**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Organização dos grupos experimentais para o ensaio de toxicidade aguda em larvas de <i>T. molitor</i> -----	35
Tabela 2. Organização dos grupos experimentais para o ensaio de infecção letal em larvas de <i>T. molitor</i> -----	36
Tabela 3. Grupos na infecção de macrófagos murinos <i>in vitro</i> -----	37
Tabela 4. Grupos de tratamento dos camundongos infectados com <i>C. parapsilosis</i> -----	38
Tabela 5. Tempos de retenção e absorbâncias dos compostos identificados no extrato de mesocarpo de babaçu (BAE) -----	41
Tabela 6. Atividade antifúngica do extrato de babaçu (BAE) contra isolados clínicos e amostras padrão de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i> -----	42
Tabela 7. Contrações inibitórias mínimas e supra inibitórias do BAE e Anfotericina B frente a diferentes variantes de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i> -----	43
Tabela 8. Avaliação bioquímica do soro de camundongos submetidos a infecção letal por <i>Candida parapsilosis</i> -----	55

RESUMO

As espécies do gênero *Candida* são comuns da microbiota humana e consideradas fungos oportunistas, pois em determinadas situações, causam infecções em diferentes sítios que podem resultar em morte. Assim, há constante busca de compostos com ação antifúngica e, nesse contexto, o babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) surge como uma espécie vegetal com elevado potencial biotecnológico, pois resultados prévios comprovaram sua atividade anti-*Candida in vitro*. Sendo assim, o presente trabalho avaliou as propriedades anti-*Candida sp.* do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu (BAE) *in vitro* e *in vivo*. A composição química do BAE foi determinada por cromatografia líquida, no qual o cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massa e faixa de aquisição foi de m/z 100–1500, com dois ou mais eventos. A atividade anti-*Candida in vitro* determinou o efeito anti-virulência sobre a adesão e formação de biofilme. O efeito anti-*Candida* também foi determinado *in vitro* utilizando macrófagos murinos. As larvas de *T. molitor* foram utilizadas para avaliar a toxicidade e os efeitos do extrato na infecção ocasionada por *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os efeitos do BAE *in vivo* foram avaliados em camundongos Swiss infectados com *C. parapsilosis*. A avaliação química do BAE identificou a presença de sete compostos incluindo: vicenina-2, isoschaftosídeo, schaftosídeo, orientina, apigenina-6-C-glucosídeo-8-C-arabinosídeo, apigenina-7-rutinosídeo e ácido isoclorogênico. O BAE apresentou baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Os resultados *in vitro* mostraram que o BAE inibiu tanto a adesão como o biofilme de amostras padrão e clínicas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os resultados *in vivo*, mostraram que o BAE na concentração de 2× e 4×CIM aumentou a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com *C. albicans* ou com *C. parapsilosis*, além de reduzir a infecção em culturas de macrófagos murinos. O BAE também reduziu a infecção sistêmica de camundongos infectados por *Candida parapsilosis*, na qual a dose correspondente a 2x CIM (33,4 mg/mL) resultou na redução de CFU no sangue, fígado e rins e a dose correspondente ao valor CIM (16,7 mg/mL) foi efetiva em reduzir o número de CFUs no fígado e nos rins. Além disso, o tratamento de camundongos com BAE teve efeitos diferenciados quando avaliamos a ativação de neutrófilos e linfócitos T e sempre reduziu a ativação de macrófagos. Os dados da bioquímica sanguínea de camundongos infectados e tratados com o extrato, mostrou que o tratamento com BAE na concentração de 2×CIM aumentou a concentração de glicose e colesterol, diminuiu a concentração de triglicérides em comparação ao controle positivo, mas não foram diferentes dos demais grupos nas concentrações de ureia e creatinina. Concluímos que o BAE tem ação antifúngica na infecção letal ocasionada por *Candida sp.*, devido a sua capacidade de inibir tanto a adesão como o biofilme resultando na redução da infecção de macrófagos e de camundongos, o que pode estar relacionado à ação sinérgica dos compostos encontrados em nosso extrato.

Palavras-chave: Apigenina; babaçu; *Candida sp*; *Tenebrio molitor*, biofilme, adesão.

ABSTRACT

Species of the genus *Candida* are familiar in human microbiota, but they are also considered opportunistic fungi since they can cause infections at different sites and can be lethal. Thus, there is a constant search for compounds with antifungal action, and, in this context, babassu emerged as a plant species with high biotechnological potential since previous studies have demonstrated the anti-*Candida* activity *in vitro*. Therefore, this study evaluated the anti-*Candida* *sp.* properties of the babassu mesocarp (BAE) ethanolic extract *in vitro* and *in vivo*. The chemical composition of BAE was determined by liquid chromatography, in which the chromatograph was coupled to a mass spectrometer and the acquisition range was m/z 100–1500, with two or more events. The anti-*Candida* activity *in vitro* determined the anti-virulence activity on adhesion and biofilm formation. The anti-*Candida* effect was also determined *in vitro* using murine macrophages. *Tenebrio molitor* larvae were used to assess the toxicity of BAE and its anti-lethal effect after infection with *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The anti-infective effect of BAE was determined *in vivo* using Swiss mice infected with *C. parapsilosis*. The chemical evaluation of BAE identified the presence of seven compounds including: vicenin-2, isoschaftoside, schaftoside, orientin, apigenin-6-C-glucoside-8-C-arabinoside, apigenin-7-rutinoside and isochlorogenic acid. BAE showed low toxicity *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* results showed that BAE inhibited both adhesion and biofilm of standard and clinical samples of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The *in vivo* results showed that BAE at concentrations of 2× and 4× MIC increased the survival of *T. molitor* larvae infected with *C. albicans* or *C. parapsilosis* and reduced infection in murine macrophage cultures. BAE also reduced the systemic infection of mice infected with *Candida parapsilosis*, in which the dose corresponding to 2x CIM (33.4 mg/mL) resulted in a reduction of CFUs in the blood, liver and kidneys and the dose corresponding to the CIM value (16.7 mg/mL) was effective in reducing the number of CFUs in the liver and kidneys. In addition, the treatment of mice with BAE had different effects when evaluating the activation of neutrophils and T lymphocytes and always reduced the activation of macrophages. The blood biochemistry data of infected mice treated with the extract showed that treatment with BAE at a concentration of 2×CIM increased the concentration of glucose and cholesterol, decreased the concentration of triglycerides compared to the positive control, but did not differ from the other groups in the concentrations of urea and creatinine. We conclude that BAE has antifungal action in the lethal infection caused by *Candida* *sp.*, due to its ability to inhibit both adhesion and biofilm, resulting in reduced infection of macrophages and mice, which may be related to the synergistic action of the compounds found in our extract.

Keywords: Apigenin; babassu; *Candida* *sp.*; *Tenebrio molitor*, biofilm, adhesion.

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* são consideradas constituintes comuns da microbiota humana e consideradas fungos oportunistas (ROMO; KUMAMOTO, 2020) pois, em determinadas situações, podem ocasionar infecções nos seres humanos em diferentes sítios e, inclusive, causar morte (VIEIRA et al., 2017; MELETIADIS et al., 2017; LIN et al., 2018; ROMO; KUMAMOTO, 2020).

As candidíases podem ser superficiais ou invasivas. São infecções frequentes em pacientes imunossuprimidos ou naqueles submetidos a tratamentos de longa duração com antimicrobianos de amplo espectro (ROCHA et al., 2021), sendo que *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada e identificada. Há de se ressaltar, nos últimos anos, a emergência de *C. auris*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, como novas ameaças à saúde pública global (LOPES; LIONAKIS, 2021).

Ainda hoje, *C. albicans* é a espécie que apresenta a maior resistência aos medicamentos disponíveis no mercado. Nesse contexto, o aumento de infecções fúngicas resistentes aos medicamentos da classe dos azólicos e da equinocandinas, é uma preocupação adicional (ROCHA et al., 2021), resultando na necessidade constante de buscar novos fármacos que possam, simultaneamente, controlar o crescimento fúngico e terem atividade imunomoduladora para reduzir os danos decorrentes das infecções sistêmicas. Assim, os compostos naturais são alvos de bioprospecção de novos antifúngicos, devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas com aplicações versáteis (RESENDE et al., 2022) em especial o babaçu, devido suas várias propriedades biológicas e grande relevância socioeconômica para as comunidades tradicionais, já que todas as suas partes apresentam potencial de uso (MUNIZ et al., 2016).

Os resultados prévios do nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Imunofisiologia - UFMA, obtidos na minha monografia de graduação mostram que o mesocarpo do babaçu tem atividade anti-*Candida in vitro* contra várias cepas (BARBOSA, 2022).

Com base nessas considerações, e, visando dar continuidade as nossas investigações, esse trabalho tem as seguintes perguntas condutoras: Será que os efeitos anti-*Candida* do babaçu sobre as culturas fúngicas também ocorre em culturas de macrófagos infectados? O babaçu tem efeitos antifúngicos do babaçu *in vivo* em animais submetidos à infecção letal? A

partir dessas perguntas formulamos a hipótese: O babaçu tem ação antifúngica e protege animais invertebrados e vertebrados da infecção letal por *Candida sp.*

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida spp.*

O gênero *Candida*, compreende aproximadamente 200 espécies, e é o principal entre as leveduras patogênicas (SILVA et al., 2020). O gênero é composto por seres unicelulares, eucariotos, heterotróficos e de crescimento anaeróbio facultativo (CAPOTE-BONATO et al., 2022).

As leveduras do gênero *Candida* podem colonizar diferentes superfícies no meio ambiente (CAPOTE-BONATO et al., 2018b) e também são parte integrante da microbiota humana, interagindo com o sistema imunológico e afetando a fisiologia humana. Entretanto, em casos de desequilíbrio entre o hospedeiro e as leveduras, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, podem causar doenças (CAPOTE-BONATO et al., 2022).

Espécies anteriormente raras desse gênero, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. auris* entre outras, têm sido relatados com frequência crescente, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e naqueles que fazem uso de cateteres vasculares por longo período (LOPES; LIONAKIS, 2021).

O gênero *Candida* apresenta a seguinte classificação taxonômica segundo BARBIERI, 2014:

Reino: Fungi
Divisão: Eumycota
Subdivisão: Deuteromicotina
Classe: Blastomicetos
Ordem: Cryptococcales
Família: Cryptococcacea
Gênero: *Candida*

Em relação à morfologia, as espécies são caracterizadas, macroscopicamente, por terem consistência cremosa, serem brilhantes ou opacas, com coloração variando do branca ao creme,

todavia podem apresentar coloração vermelha (GORTHI, 2019). A avaliação microscópica mostra que as espécies podem variar de 5 a 8 µm de diâmetro, e serem encontradas como células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, com parede celular delgada, que se multiplicam quase sempre por brotamento (SILVA et al., 2020) (Figura 1).

Além disso, as espécies desse gênero são dimórficas. Tal característica oportunista está associada ao polimorfismo celular, que nada mais é que uma alternância morfológica entre formas leveduriforme e filamentosa, pelo fenômeno denominado *switching* (ROCHA, 2021).

Ambas encontradas durante infecções sistêmicas, a forma leveduriforme consiste em um brotamento unicelular com formato redondo e bem definido presente na invasão das células do hospedeiro. Enquanto que a forma filamentar, ou de hifas, são alongadas e estão associadas à invasão de tecido, utilizando para tanto de fatores tais como as adesinas (SOUZA et al., 2022).

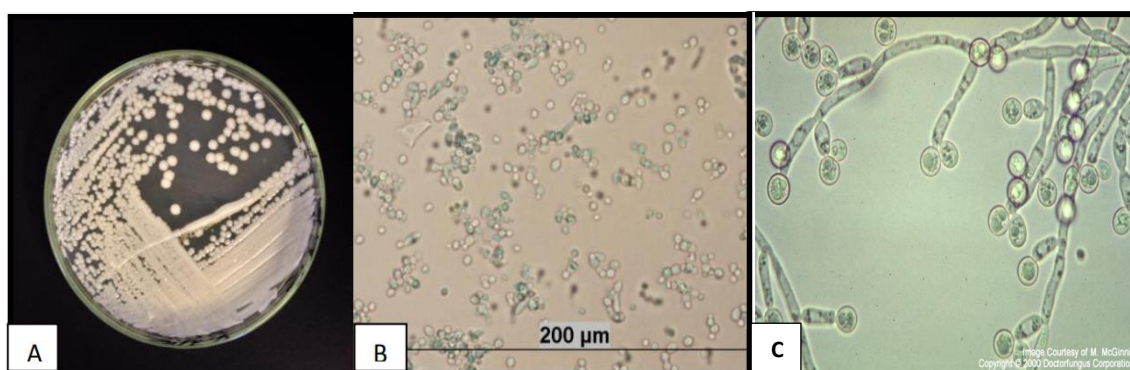


Figura 1. Características macro e micromorfológicas de *Candida* spp. (A) Cultura em ágar Sabouraud; (B) Blastoconídeos; (C) Pseudo-hifas e hifas verdadeiras (RODRIGUES, 2013).

2.2 *Candida albicans*

C. albicans é uma levedura polimórfica, que pode crescer como blastoconídio, pseudo-hifa ou hifa verdadeira (DAGMAR, et al., 2019). Existe como comensal em uma grande proporção da população humana colonizando a cavidade oral, os tratos gastrointestinal e genital de forma assintomática (LOPES; LIONAKIS, 2021).

No entanto, após perturbação da integridade das barreiras e/ou de desequilíbrios imunológicos, esses fungos podem migrar através dos epitélios e acessar nichos anatômicos profundos causando infecção. As infecções clinicamente importantes causadas por *C.*

albicans podem ser amplamente classificadas em dois subtipos: mucosa e sistêmica (Figura 2) (LOPES; LIONAKIS, 2021).

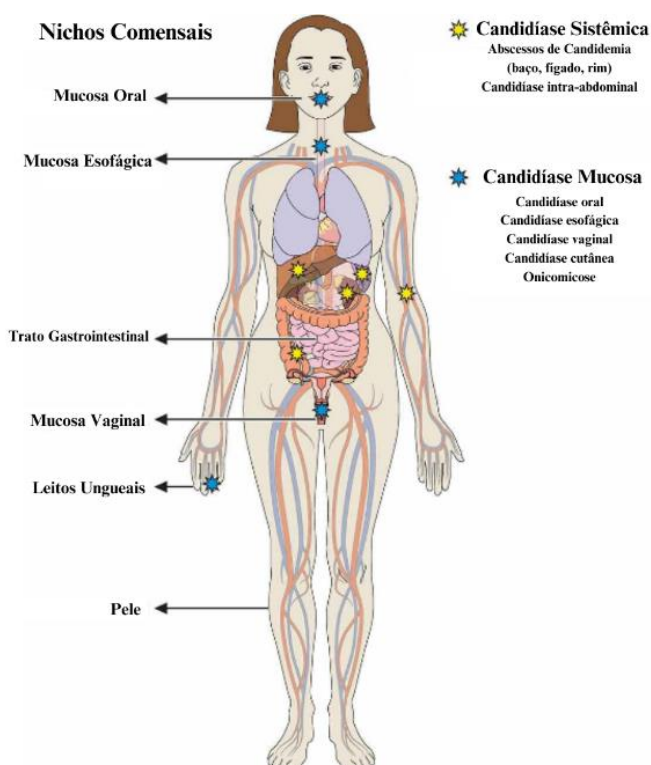


Figura 2. Sítios comensais de *C. albicans* no corpo humano e manifestações clínicas da infecção por *C. albicans*. adaptado de Lopes; Lionakis, 2021.

Os principais fatores de virulência das espécies do gênero *Candida* incluem: secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de adesinas e invasinas, tigmotropismo, bomba de efluxo, formação de biofilme e polimorfismo (TALAPKO et al., 2021).

A morfologia celular das espécies deste gênero é citada com um dos principais fatores de virulência, uma vez que as diferentes formas de apresentação celular (levedura em brotamento, pseudo-hifas e hifas) estão envolvidas em diferentes etapas do processo infeccioso (Figura 3). A plasticidade da forma micelial é uma forma importante durante a fase de infecção e um fator determinante da resistência aos medicamentos. Além disso, a transformação de levedura em hifa contribui para o escape da fagocitose dos macrófagos, resultando em um maior potencial de invasão aos tecidos do hospedeiro e maiores danos (CHEN et al., 2020).

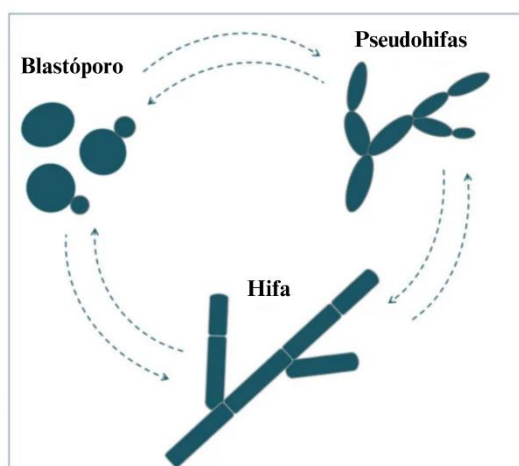


Figura 3. As mudanças e transições morfológicas de *Candida albicans* durante o processo de infecção. As transições morfológicas de blastóporo para pseudohifas e hifas são reversíveis. adaptado de Talapko et al., 2021.

Outro fator que contribui para o potencial patogênico de *C. albicans* é a expressão de proteínas importantes para adesão e invasão. O processo de adesão é afetado por vários fatores, como os tipos de proteína na parede celular e as propriedades físicas e químicas da superfície celular. As adesinas de *C. albicans* se ligam a proteínas, como o fibrinogênio e as fibronectinas (TALAPKO et al., 2021).

A formação de biofilme é um outro fator de virulência de *C. albicans*. A maioria das infecções causadas por *C. albicans* está relacionada à formação de um biofilme no hospedeiro ou em superfícies abióticas (implantes), o que eleva a morbidade e a mortalidade (TALAPKO et al., 2021). Como *C. albicans* pode fazer a transição de levedura para hifas morfológicamente, seu biofilme é uma estrutura complexa de diferentes formas morfológicas (PRIYA; PANDIAN, 2020).

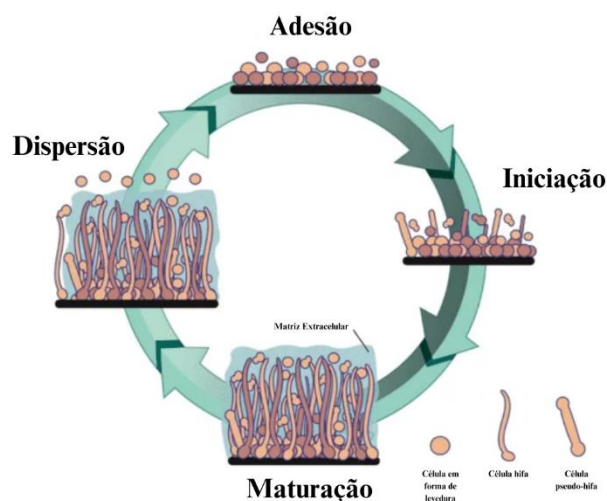


Figura 4. Quatro estágios da formação de biofilme de *C. albicans*. adaptado de Queiroz, 2021.

Alguns estudos estão sendo desenvolvidos a fim de buscar novas moléculas que possam interferir ou inibir a produção/formação destes mecanismos de resistência, principalmente, com enfoque sobre o biofilme destas espécies (BEZERRA et al., 2020; MARTORANO-FERNANDES et al., 2021).

2.3 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis é amplamente distribuída na natureza e é frequentemente isolada de uma variedade de fontes não humanas, como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos (BRANCO et al., 2023).

C. parapsilosis sensu lato, também conhecida como complexo *C. parapsilosis*, inclui *C. parapsilosis* como o fungo mais comum nas infecções humanas, seguido por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, anteriormente conhecidos como *C. parapsilosis* Grupo I, II e III, respectivamente (TÓTH, 2019). Os representantes do complexo *C. parapsilosis* estão agora entre a segunda e a terceira causa mais comum de candidíase, tanto nas infecções oportunistas como nas nosocomiais (PFALLER et al., 2019; MAMALI et al., 2022; ARASTEHFAR et al., 2022). Esse complexo se destaca pela sua transmissibilidade, causando elevadas taxas de colonização em ambientes hospitalares, além do risco subsequente de infecções transmitidas diretamente entre os grupos de pacientes vulneráveis (ASADZADEH et al., 2019; ZHAI et al., 2020; ROLLING et al., 2021).

C. parapsilosis é a espécie mais prevalente nas infecções, sendo a segunda espécie de *Candida* mais isolada nas várias regiões do mundo e mais frequente nas infecções superficiais (GOVRINS- LASS-FLÖRL; 2024).

Embora as infecções por *C. parapsilosis* geralmente apresentem baixas taxas de morbidade e mortalidade em comparação com as infecções por *C. albicans*, há relatos indicando que vários isolados clínicos apresentam menor suscetibilidade às equinocandinas. Além disso, em algumas regiões, observou-se resistência ao tratamento com azóis, complicando a escolha da terapia antifúngica (TÓTH et al., 2019).

A infecção por *C. parapsilosis* tem um elevado risco para indivíduos imunocomprometidos, como portadores de HIV e pacientes cirúrgicos, especialmente aqueles submetidos a cirurgias do trato gastrointestinal. Adicionalmente, pacientes dependentes de cateter venoso central ou outros dispositivos permanentes também são mais suscetíveis devido à capacidade dessa espécie em aderir a superfícies protéticas e aos dispositivos médicos implantados. Nesses casos, os fungos são capazes de formar biofilme logo após a fixação. Quando a estrutura do biofilme amadurece, a capacidade dos antifúngicos atuarem diminui significativamente, acarretando consequências que podem ser fatais (BRANCO et al., 2023).

2.4 Sistema imunológico nas infecções por *Candida* sp.

A adesão de *C. albicans* às células epiteliais é o primeiro passo para a colonização e crescimento, o que pode levar à candidíase mucosa. Assim, a imunidade inata é ativada com a invasão tecidual, onde o fungo de levedura se transforma em hifas que penetram nas células epiteliais por meio de dois mecanismos distintos: endocitose induzida e penetração ativa (ARAÚJO et al., 2020).

A etapa crucial para a ativação de uma resposta imunológica rápida é o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos conservados (PAMPs) por diferentes tipos de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) (ARAÚJO et al., 2020). Os receptores presentes como macrófagos e neutrófilos iniciam a resposta imune ao se ligarem a esses padrões moleculares. Entre os PRRs destacam-se os de manose, os *Toll-like* (TLRs), os receptores de varredura e o receptor dectina-1, que são fundamentais para garantir o controle da infecção (BERNARDIS et al., 2018).

Os TLRs têm sido amplamente estudados no contexto de infecções fúngicas. Os TLR2, TLR4 e TLR6, localizados na membrana celular, são responsáveis por se ligar aos componentes da manoproteína presente na parede celular dos fungos. Dentre eles, TLR2 e TLR4 são os principais envolvidos nas respostas as infecções por *Candida* (ARAUJO et al., 2020).

Os macrófagos nos tecidos possuem uma forte atividade fungicida e são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas que recrutam e ativam outras células do sistema imune no local da infecção. Entre essas células recrutadas estão os neutrófilos, cuja ativação é crucial para a eliminação da *Candida*. Os neutrófilos são os exterminadores mais eficazes de *Candida sp.*, pois são as únicas células capazes de inibir, com sucesso, a transformação das leveduras de *Candida* em hifas (ARAUJO et al., 2020).

Outras células participam do controle da infecção, incluindo as células NK (natural killers) e as células dendríticas. As células dendríticas (DCs) apresentam antígenos fúngicos e ativam linfócitos T auxiliares (Th), embora também possam ingerir e eliminar essas espécies, com menor eficácia do que macrófagos e neutrófilos (BERNARDIS et al., 2018).

Há evidências de que as citocinas mais importantes para controle da infecção por *Candida sp.* são as produzidas por linfócitos Th-17 e Th-1, incluindo IL-17 e IFN γ , respectivamente. O aumento de IFN γ contribui para a ativação de macrófagos com ação fungicida. Além disso, a ativação de linfócitos Th-17, com aumento na produção de IL-17 e IL-22 estimula o recrutamento e a ativação de neutrófilos, além de ativar células epiteliais e estimular a liberação de β -defensinas antifúngicas (ARAUJO et al., 2020).

É importante ressaltar que as células Th17 são mediadores essenciais na imunidade contra infecções fúngicas na barreira, e a IL-2 é a principal citocina que estimula a proliferação celular (ARAUJO et al., 2020). Existe uma clara dicotomia entre as respostas imunes do tipo CD4⁺ TH1 e CD4⁺ TH2: enquanto a resposta TH1, que envolve a produção de IFN γ e IL-2, está associada à resistência à *Candida*, a resposta TH2, caracterizada pela síntese de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada à susceptibilidade ao patógeno (ARAUJO et al., 2020).

Uma compreensão mais profunda dos mecanismos fisiopatológicos das respostas imunes às infecções por *Candida* pode fornecer novas perspectivas moleculares sobre sua patogênese e revelar alvos potenciais para terapias antifúngicas (SILVA et al., 2020).

2.5 Sepses por *Candida* sp.

A sepsis se caracteriza por um conjunto de manifestações produzidas pelo organismo quando se depara com uma infecção. Na tentativa de responder a esse agente infeccioso estranho, o sistema imunológico acaba afetando diferentes órgãos o que pode levá-los a falência. O enfrentamento da sepsis, está no reconhecimento rápido com tratamento imediato. Os principais agentes etiológicos são as bactérias gram-negativas, mas a sepsis pode ser causada também por vírus, fungos, ou protozoários, que causam uma resposta imune complexa levando a alterações hemodinâmicas importantes (LIN et al., 2018).

Além disso, é uma doença que demanda altos custos, representando cerca de 24% a 32% dos custos totais de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (JOST et al., 2019; SILVA et al., 2019). No Brasil, segundo o Conselho Federal de Medicina, estima-se que esse custo é de, aproximadamente, US\$9,6 mil por paciente (MATHIAS, 2019).

Essa patologia, atinge cerca de 15 a 17 milhões de pessoas no mundo por ano, dentre esse número, 5 milhões morrem anualmente devido essa complicação clínica. Está entre as principais causas de admissão em unidades de terapia intensiva (UTI) e de morte nos países desenvolvidos (LOBO et al., 2019). Nos países em desenvolvimento, a incidência de mortes por sepsis é agravada pela interseção de fatores como a pobreza, associada à desnutrição, e a falta de acesso ao tratamento precoce (FREITAS et al., 2018).

Na realidade brasileira, a sepsis ocupa 25% dos leitos em UTIs e se destaca como a principal causa de morte nesses ambientes (PIRES et al., 2020). De acordo com dados do Instituto Latino Americano de Sepsis (ILAS), no Brasil, a letalidade por sepsis foi de 67,4%, comparável apenas com a da Malásia (66,1%) e bem distante da letalidade de outros países (Alemanha –43,4%; Argentina –56,6%; Canadá –50,4%; Índia –39,0%; Estados Unidos –42,9%; e Austrália –32,6%). Esses números evidenciam a gravidade do impacto da sepsis na saúde pública e reforçam a necessidade de estratégias de prevenção e tratamento (SEIBT et al., 2019).

As espécies do gênero *Candida* estão entre os principais agentes causais de infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados, atingindo pessoas de todas as faixas etárias em todo o mundo (MANTADAKIS; PANA; ZAOUTIS, 2018). Nas últimas décadas, infecções por espécies de *Candida* não *albicans* tornaram-se mais prevalentes do que infecções por *Candida albicans* (TÓTH et al., 2019).

A candidemia continua associada a alta mortalidade pois, depois de ter acesso às mucosas e corrente sanguínea, *Candida* sp. apresenta grande afinidade pela invasão do sistema nervoso central, rins, fígado, baço, coração e retina, gerando complicações que comprometem as funções dos pacientes (MANTADAKIS; TRAGIANNIDIS, 2019; GIACOBBE et al., 2020).

Essa taxa de mortalidade em UTI de 28 dias é de cerca de 44% (BASSETTI et al., 2019). Por isso, nos pacientes acometidos, a intervenção medicamentosa deve ser precoce para minimizar os riscos de complicações e de resistência microbiana (ROCHA et al., 2019).

2.6 Alternativas no tratamento das infecções por *Candida* sp.

O surgimento recente de fungos resistentes a mais de uma classe de fármacos antifúngicos é uma preocupação séria. Atualmente, apenas quatro classes primárias de agentes são usadas para tratar infecções fúngicas invasivas: polienos (por exemplo, anfotericina B); azóis (por exemplo, fluconazol); equinocandinas (por exemplo, caspofungina) e os análogos da pirimidina, entretanto uma nova classe (o triterpenóide ibrexafungerp) encontra-se na fase de ensaios clínicos em estágio avançado (PUUMALA et al., 2024).

Os polienos são moléculas anfipáticas naturais e formam a classe mais antiga de medicamentos antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Introduzida na prática médica na década de 1950, a anfotericina B é o polieno mais amplamente utilizado. Ela apresenta uma potente atividade contra uma vasta gama de espécies fúngicas de importância clínica, como diversas espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (LEE et al., 2021).

Embora a anfotericina B tenha um amplo espectro de atividade antifúngica, seu uso clínico é limitado, principalmente devido à sua baixa biodisponibilidade oral e aos efeitos tóxicos que dependem da dose. Esses efeitos adversos são em parte causados pelas semelhanças entre o ergosterol e o colesterol, que afetam o hospedeiro (PUUMALA et al., 2024).

Introduzidos pela primeira vez na década de 1980, os azóis se tornaram a classe de antifúngicos mais frequentemente utilizada na prática clínica. Esses compostos sintéticos heterocíclicos atuam bloqueando a síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica. Essa ação resulta na desestabilização da membrana, afetando sua permeabilidade e comprometendo a função de enzimas associadas à membrana (LEE et al., 2021).

Ao contrário de outros antifúngicos, muitos medicamentos azólicos oferecem uma excelente biodisponibilidade oral e estão disponíveis tanto em formulações orais quanto intravenosas. No entanto, uma desvantagem significativa dos azóis é o seu alto potencial de interagir com outros medicamentos (LEE et al., 2021), além disso, a atividade fungistática da maioria dos azóis contra *Candida* e *Cryptococcus* sp., juntamente com o surgimento generalizado de resistência, ameaça sua vida clínica (PUUMALA et al., 2024).

Uma nova classe de medicamentos antifúngicos a ser introduzida na prática médica nas últimas décadas é a das equinocandinas. Esses fármacos são derivados de produtos naturais e possuem um núcleo hexapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral de ácido graxo ligada ao nitrogênio. As equinocandinas atuam rompendo a parede celular fúngica, uma estrutura ausente em células de mamíferos. Elas se ligam de forma não competitiva à subunidade catalítica da (1,3)- β -D-glucano sintase, que é codificada pelo gene FKS1 em *Candida albicans* e pelos genes FKS1 e FKS2 em *Candida glabrata* (LEE et al., 2021).

As principais vantagens das equinocandinas incluem um excelente perfil de segurança, alta seletividade para fungos e baixo potencial de interações medicamentosas. No entanto, assim como os polienos, as equinocandinas têm baixa absorção oral, o que limita seu uso clínico à administração intravenosa (LEE et al., 2021).

Por fim, o análogo da pirimidina 5fluorocitosina foi aprovado pela primeira vez para uso na década de 1960, entretanto, o rápido início da resistência impede seu uso como terapia exclusiva. A 5fluorocitosina atua ao ser convertida por uma citosina desaminase específica do fungo em 5fluorouracil, um composto tóxico que interfere no metabolismo do DNA e do RNA e apresenta tratamento eficaz apenas quando combinada a outros fármacos, como anfotericina b (PUUMALA et al., 2024).

A mais recente adição ao repertório antifúngico é o primeiro triterpenóide da classe, ibrexafungerp, que é um derivado fungicida semissintético da enfumafungina (NEOH et al., 2023; LEE, 2021). Ainda que possua o mesmo alvo das equinocandinas, ligando-se à 1,3- β -D-glucansintase, algumas diferenças importantes incluem sua biodisponibilidade oral e estrutura química (PUUMALA et al., 2024).

O local de ligação do Ibrexafungerp parece diferir em parte do das equinocandinas, o que possibilita a sua eficácia contra cepas de *Candida* resistentes às equinocandinas (LAMOTH, 2023). Atualmente, o Ibrexafungerp está aprovado apenas para o tratamento oral da candidíase vulvovaginal. No entanto, está em diversos ensaios clínicos avançados para tratar

candidíase invasiva e aspergilose invasiva, em combinação com voriconazol (NEOH et al, 2023).

Ademais, vale destacar que as espécies de *Candida* precisam ser vistas de forma individualizada em relação à administração medicamentosa e que tratamentos prolongados com estes fármacos podem levar à efeitos citotóxicos, bem como resistência aos antifúngicos, o que é uma preocupação emergente em todo o mundo, tanto no espaço quanto no tempo (BARROS et al., 2022). Com isso, novas alternativas capazes de contornar essa problemática se fazem necessárias.

2.7 Plantas Medicinais

As plantas compõem um vasto arsenal de produtos químicos, tanto orgânicos quanto inorgânicos, apresentando diversos potenciais para serem explorados pelo ser humano. Frequentemente, são empregadas como terapia complementar a tratamentos já estabelecidos, influenciadas por práticas milenares ou recomendadas por familiares e pessoas próximas ao longo de gerações (JÜTTE et al., 2017; SZERWIESKI et al., 2017; WEGENER, 2017; DIAS et al., 2018).

Os principais fatores que influenciam na manutenção da utilização de plantas como alternativa terapêutica são: o baixo nível de vida da população e o alto custo dos medicamentos. Dessa forma, usuários de plantas de todo mundo, mantém em alta a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas algumas informações terapêuticas que foram acumuladas durante séculos (SILVA et al., 2021).

O Brasil, como o maior país da América do Sul, abriga a maior biodiversidade do mundo, compreendendo aproximadamente 20% do total. O território brasileiro é lar de mais de 116.000 espécies de animais e mais de 200.000 espécies vegetais, distribuídas em seis biomas terrestres (Pampa, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Caatinga e Amazônia) e três grandes ecossistemas marinhos (BRASIL, 2021).

Apesar dessa riqueza biológica, a exploração da biodiversidade para o desenvolvimento de medicamentos no Brasil ainda é limitada, devido à combinação de processos inovadores e tecnológicos insuficientes e baixos investimentos na área. Essa realidade se reflete no número reduzido de medicamentos fitoterápicos derivados da biodiversidade nativa, em comparação

com outros países. Aproximadamente 70% dos fitoterápicos disponíveis no mercado farmacêutico nacional contêm espécies vegetais não nativas (CARVALHO et al., 2018).

Ainda há, portanto, um extenso percurso a ser trilhado na promoção do uso responsável da biodiversidade pela indústria farmacêutica. Dado o vasto potencial de exploração da biodiversidade para pesquisa, desenvolvimento, inovação e produção de medicamentos, existem diversas lacunas a serem preenchidas. Nesse contexto, o presente trabalho busca avaliar as propriedades antifúngicas do babaçu em relação a espécies e isolados clínicos do gênero *Candida*.

2.8 *Attalea speciosa* Mart. - Babaçu:

O Babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) é classificado taxonomicamente segundo GLASSMAN (1999). como:

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Arecales

Família: Arecaceae

Gênero: *Attalea*

Espécie: *Attalea speciosa*

O babaçu ocorre nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste do Brasil e é uma palmeira típica das zonas de transição entre as florestas úmidas da bacia amazônica e os ambientes de cerrado e caatinga. Característicos de florestas secundárias, os babaçuais recobrem, em diferentes estados brasileiros, uma área que, somada, corresponde a 196 mil km². Apresentam maior concentração nos estados do Maranhão, Tocantins e Piauí, na região conhecida como Mata dos Cocais (transição entre Caatinga, Cerrado e Amazônia), onde também têm elevado valor econômico e sustentável (SANTOS et al., 2020).

A palmeira do babaçu se apresenta como monocaule, podendo ter até 20 metros de altura, com estipe liso de até 41 cm de diâmetro (PAIXÃO et al., 2019). Os frutos têm formato de drupa, são lisos, têm coloração marrom quando maduros, com tamanho aproximado entre 8

e 15 cm e peso entre 90 e 280 g, presentes em cachos que chegam a ter 25 cocos (ANJOS; NETO et al., 2021).

O fruto é composto de epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa. O epicarpo representa a casca do coco e, por ter alto conteúdo lignocelulósico, pode ser usado na queima de caldeiras. O mesocarpo é rico em amido e é usado na alimentação animal e na produção de etanol. Já o endocarpo, usado como forragem ou fertilizante, tem sido usado também na produção de pellets e como matéria-prima para obtenção de produtos de química fina (SOUZA; SEABRA; NOGUEIRA, 2018).

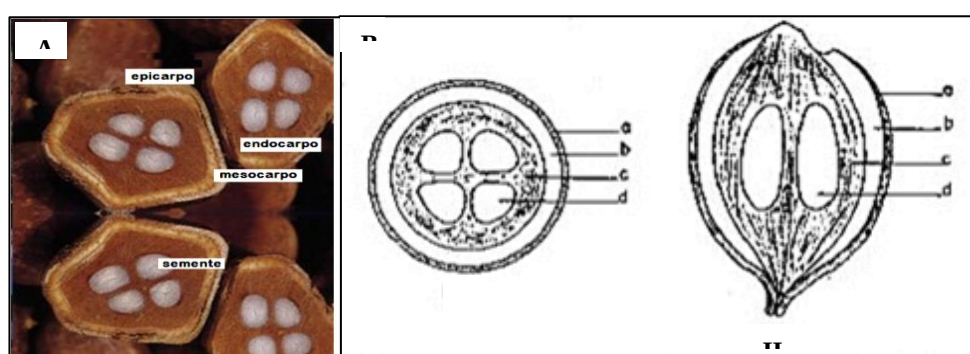


Figura 5. Morfologia do fruto do babaçu. Várias partes do fruto (A) e representação esquemática da morfologia do fruto do babaçu (B). (I) corte transversal e (II) corte longitudinal. (a) epicarpo; (b) mesocarpo; (c) endocarpo e (d) amêndoa (adaptado de EMMERICH, 1987).

O estado do Maranhão responde por cerca de 94,5 % da produção nacional de amêndoas desse fruto, além disso, as demais partes tanto do fruto quanto da planta apresentam potencial de uso (SILVA, 2018). Diante disso, diversas comunidades das regiões norte e nordeste dependem dele para a subsistência e, por isso, a preocupação com a valorização e preservação da palmeira do babaçu tem sido uma luta das quebradeiras de coco (SILVA, 2018).

Um outro aspecto interessante sobre o babaçu é que, o óleo extraído das suas sementes e o mesocarpo podem ser usados para produzir biocombustíveis (COSTA et al., 2019). O epicarpo, mesocarpo e o endocarpo, são utilizados na produção de óleo, amido e etanol respectivamente (TEIXEIRA et al., 2018).

O mesocarpo do coco babaçu, essencialmente uma das partes de maior fração física no coco, tem sido de grande interesse da comunidade acadêmica, em essencial seu uso

farmacológico dado principalmente à presença de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante (PAIXÃO et al., 2019).

Os primeiros relatos investigando os efeitos biológicos do mesocarpo de babaçu no sistema imunológico foram feitos em 1994, por Gaitan e colaboradores. Estes autores detectaram que o bócio era endêmico em uma determinada área do estado do Maranhão entre crianças com idade escolar, identificando que a maioria dessas crianças consumiam, em larga escala, as farinhas de mesocarpo de babaçu e de mandioca, o que os levou a suspeitar que o aparecimento do bócio estava relacionado ao consumo dessas farinhas em detrimento de outros alimentos.

O mesocarpo de babaçu apresenta, ação imunomoduladora (SILVA; PARENTE, 2001; NASCIMENTO et al., 2006; GUERRA et al., 2011; BARROQUEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2018), possivelmente devido sua ação direta sobre a ativação de macrófagos (NASCIMENTO et al., 2006; SILVA et al., 2018) e sobre a ativação de linfócitos T (GUERRA et al., 2011).

Outros efeitos do mesocarpo do babaçu incluem atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e MRSA (BARROQUEIRO et al., 2016; BARROQUEIRO et al., 2024). Além disso, o mesocarpo do babaçu possui efeito anti-inflamatório (OLIVEIRA, 2018), analgésico (BATISTA et al., 2006), cicatrizante (BALDEZ, 2006), antitireoidiano (GAITAN et al., 1994) e antitumoral (SOUSA, 2008).

Em resultados prévios *in vitro* utilizando o extrato etanólico do mesocarpo de babaçu, foi observado que o mesmo foi efetivo em inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Além disso, esse extrato foi capaz de aumentar a sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* infectados letalmente com essas duas espécies de *Candida*, possivelmente devido sua ação sobre fatores de virulência como a adesão e a produção de enzimas (BARBOSA, 2022).

Entretanto, não foi possível determinar os alvos imunológicos envolvidos, pois as larvas de *T. molitor* apresentam organização do sistema imune diversa do encontrado nos vertebrados. Com base nessas considerações, o presente projeto investigou o efeito do extrato obtido do mesocarpo de babaçu na infecção letal por *Candida*, visando avaliar o efeito do extrato sobre o crescimento fúngico, bem como sua ação sobre o sistema imunológico através da utilização de um modelo *in vivo* utilizando camundongos Swiss.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito antifúngico do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* *in vitro* e *in vivo* em invertebrados e em vertebrados.

3.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato etanólico do mesocarpo de babaçu (BAE);
- Avaliar o efeito do tratamento com o extrato *in vitro* sobre os fatores de virulência;
- Analisar o efeito do tratamento com o extrato *in vitro* sobre a infecção de macrófagos;
- Determinar o efeito do tratamento com o extrato na sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* infectados letalmente por *Candida sp*;
- Investigar os efeitos do extrato sobre o sistema imune de camundongos infectados letalmente por *Candida sp*;
- Avaliar os efeitos do tratamento e da infecção sobre a bioquímica sanguínea de camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparo do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu (BAE)

O extrato etanólico do mesocarpo de babaçu foi preparado conforme descrito anteriormente por Barroqueiro et al. (2016) com algumas adaptações. A farinha do mesocarpo de babaçu foi adquirida comercialmente em São Luís, junto a Cooperativa de Quebradeiras de Coco Babaçu (Marca: Nutri Mais, Lote: 10010, São Luís, Maranhão, Brasil).

O extrato foi obtido por maceração exaustiva, durante 7 dias, em temperatura ambiente ($26\pm 3^{\circ}\text{C}$) com etanol P.A, hidromódulo (1:3), utilizando 250g da farinha do mesocarpo de babaçu. Após três coletas sucessivas, a cada 48 horas, o líquido extrator foi evaporado sob pressão reduzida, a 25°C , e liofilizado (Liofilizador Liotop, K105, Brasil) por 48 horas, a -95°C , sob pressão de $12\mu\text{Hg}$. Ao final, o rendimento foi calculado e o extrato foi acondicionado em frascos de vidro, vedado e armazenado a 4°C . O estudo está registrado junto ao SisGen, sob número: A6C0348 (Anexo 1).

4.2 Avaliação química do extrato

O extrato foi analisado usando cromatografia líquida (Shimadzu Prominence) com duas bombas injetoras automáticas (Shimadzu LC-20AD - SIL-20A HT) e coluna C18 Phenomenex Gemini (250 × 4,6 mm – 5 µm). A fase móvel utilizou água ultrapura e metanol acidificados (0,1% HCOOH), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min, considerando o gradiente de metanol: 20-100% em 0-35 min e 100% em 50 min. O volume de injeção foi de 10 µL.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon X, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por *eletrospray* (ESI) e um analisador do tipo *ion-trap* (IT) em modo negativo, nas seguintes condições: voltagem capilar de 5 kV, temperatura 325°C, fluxo de gás de arrastamento (N₂) 12 L/min, pressão do nebulizador de nitrogênio a 10 psi. A faixa de aquisição foi de m/z 100–1500, com dois ou mais eventos.

4.3 Avaliação anti-*Candida* sp. e atividade do extrato sobre os fatores de virulência

4.3.1 Microrganismos

Foram utilizadas amostras padrão de *C. albicans* (ATCC®10231™) e *C. parapsilosis* (ATCC®22019™) e isolados clínicos provenientes diferentes sítios de infecção dessas duas espécies, tais como: *C. albicans* (sangue) e *C. parapsilosis* (secreção traqueal), oriundas da micoteca do Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão. A utilização das amostras clínicas foi aprovada junto à Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética da UFMA CEP/UFMA nº 29660920.7.0000.5087 (Anexo II).

Os isolados fúngicos foram reativados em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Kasvi, Itália) por 24h, à 37 ° C. Após este período, os inóculos foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão resultante foi homogeneizada (Vortex®) durante 15 segundos e a densidade celular ajustada com auxílio de espectrofotômetro a 600nm, resultando na obtenção de suspensão correspondente à 0,5 da escala de McFarland.

Nos testes de microdiluição, as suspensões foram diluídas em meio RPMI 1640, com glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pH 7,0, e tampão com MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) nas concentrações variando entre 1×10^3 e 5×10^3 UFC/mL.

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme descrito no protocolo da CLSI M27-A2 (2012). Foram utilizadas as seguintes amostras de concentrações:

ANFB: Anfotericina B (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), utilizada como

controle positivo em concentrações, diluídas seriadamente, entre 0,03 e 16 µg/mL;

DMSO: utilizado a 1% como controle negativo do ensaio;

BAE: nas concentrações diluídas seriadamente entre 0,2 e 100 mg/mL.

Ao final dos tratamentos as placas foram incubadas por 48h, a 35°C. Após o período de incubação, os resultados foram analisados. Foi considerado como valor CIM a menor concentração sem crescimento fúngico.

Para a determinação da CFM, alíquotas de 10 µL dos poços utilizados para determinação do CIM foram sub-cultivadas em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose. As amostras foram incubadas à 37° C, por 24 e 48h. A CFM foi definida como a menor concentração do extrato sem colônias na superfície (CLSI, 2012).

A razão CFM / CIM foi calculada para determinar se o efeito era fungistático ($CFM / CIM_{90} > 4$) ou fungicida ($CFM / CIM_{90} < 4$) (SIDDIQUI et al., 2013; FREIRES et al., 2014). Todos os ensaios foram realizados triplicatas.

4.3.3 Avaliação do BAE na adesão e na formação biofilmes pré formados e formados

O ensaio da adesão e de formação do biofilme foi desenvolvido de acordo com descrito anteriormente (SILVA et al., 2020), com algumas adaptações. Cada um dos estágios do biofilme de *Candida* sp. foi tratado com diferentes concentrações do extrato e comparados aos controles não tratados e às amostras tratadas com Anfotericina B, utilizadas como controle positivo. Assim, foram utilizadas concentrações correspondentes a $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{2}$ CIM, para adesão e biofilme pré-formado e $2 \times$ CIM e $4 \times$ CIM para biofilme formado.

Para avaliação do efeito do BAE na adesão celular, foram utilizadas suspensões padronizadas correspondendo a 10^7 UFC/mL de *Candida* sp., preparadas em meio Base de

Nitrogênio de Levedura (YNB) estéril contendo 50 mM de glicose. Em seguida, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços, tratadas com o extrato ou com o antifúngico e incubadas por 90 min, a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas, por duas vezes, com 200 µL de PBS estéril. Posteriormente, as células aderentes foram ressuspensas em PBS (100 µL) para determinação da atividade metabólica por MTT (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e determinação da biomassa usando coloração com cristal violeta (SENEVIRATNE et al., 2016).

Na avaliação dos efeitos do BAE sobre biofilme pré-formado, seguiu-se a mesma metodologia utilizada no teste de adesão celular. Entretanto, após a incubação, foram adicionadas às células fúngicas aderidas, concentrações do extrato correspondentes aos valores de ¼ CIM e ½ CIM e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os sobrenadantes foram aspirados e os biofilmes pré-formados foram lavados por duas vezes com PBS estéril para determinação da atividade metabólica por MTT (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e determinação da biomassa usando coloração com cristal violeta.

No ensaio de biofilme formado, seguiu-se a mesma metodologia utilizada no teste de biofilme pré-formado. Só que nesse caso, foi adicionado aos fungos aderidos meio YNB e as placas foram incubadas por 24h (37°C). Ao final desse período, os sobrenadantes foram descartados, os poços foram lavados por duas vezes com PBS estéril e foram adicionadas as concentrações do BAE correspondentes a 2×CIM e 4×CIM. Após a incubação (24h, 37°C), os sobrenadantes foram aspirados e os biofilmes formados foram lavados por duas vezes com PBS estéril para avaliar a atividade metabólica com MTT (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a biomassa com cristal violeta. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.4 Ensaio da toxicidade aguda em larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor*, entre 10° e 12° estágio larval, foram adquiridas comercialmente (Biofábrica, São Luís, MA, Brasil) e mantidas no LIF. Para manutenção, as larvas foram acondicionadas em placas de Petri ao abrigo da luz e com temperatura controlada (26 ± 3°C). A alimentação constou de ração padronizada, a base de farelo de trigo, milho e aveia na proporção (2:2:2). As larvas que apresentaram alterações em sua cor ou na motilidade foram

descartadas e somente as larvas consideradas saudáveis foram utilizadas nos ensaios (SOUZA et al., 2015; NAVARRO et al., 2019).

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito anteriormente (ALVES et al., 2019), com adaptações. Foram utilizadas dez larvas de *T. molitor* por grupo, considerando o peso entre 200 e 300 mg, e comprimentos similares, variando de 1,5 a 2,5 cm. A formação dos grupos levou em consideração as concentrações estabelecidas na determinação da CIM para as duas espécies de *Candida* tratadas com BAE. Portanto os grupos foram organizados conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais utilizados para avaliar a toxicidade aguda do BAE em larvas de *T. molitor*.

Grupo	Tratamento (5 µL, via intrahemocélica)
Limpo	Nenhum
Controle	PBS
BAE2	Extrato na concentração 2×CIM
BAE4	Extrato na concentração 4×CIM
BAE8	Extrato na concentração 8×CIM

Todos os tratamentos foram aplicados no quarto metâmero, na porção ventral, após imobilização das larvas por resfriamento. Após o tratamento as larvas foram transferidas para placas de Petri, contendo ração padronizada e incubadas ao abrigo da luz, em temperatura e umidade controlada. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 10 dias (240 horas) e a morte das larvas foi determinada considerando ausência de motilidade e presença de melanização.

4.3.5 Avaliação do efeito do BAE na infecção letal em larvas de *T. molitor*

Para este ensaio foram selecionadas 10 larvas/grupo distribuídas conforme mostra a Tabela 2:

Tabela 2. Organização dos grupos experimentais para o ensaio de infecção letal em larvas de *T. molitor*.

Grupo	Infecção (5 µL, via ic.)	Tratamento (5 µL, via ic.)
Limpo	Não	Nenhum
Controle	Sim	PBS
BAE2	Sim	Extrato concentração 2×CIM
BAE4	Sim	Extrato concentração 4×CIM
ANFB2	Sim	Anfotericina B concentração 2×CIM
ANFB4	Sim	Anfotericina B concentração 4×CIM

Após a imobilização e assepsia com álcool 70%, as larvas foram infectadas e tratadas a partir da injeção intrahemocélica, com 5 µL da suspensão de *Candida* sp (10^7). Simultaneamente, as larvas receberam, em diferentes esternitos (4° ao 5°) os tratamentos, conforme detalhado na Tabela 2. Após o tratamento, as larvas foram mantidas em placas de Petri, contendo dieta padronizada, em temperatura constante de 37°C. O número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24h, durante 10 dias, considerando ausência de motilidade e presença de melanização.

4.3.6 Avaliação do efeito do BAE na infecção de macrófagos murinos *in vitro*

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos Swiss não infectados, após injeção intraperitoneal de 5 mL de PBS estéril gelado. As células foram recuperadas com seringa e lavadas duas vezes, por centrifugação ($187\times g$), durante 10 min a 4°C, com RPMI suplementado (10% de SFB e 50 µg de gentamicina). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI. Aliquotas das suspensões celulares foram diluídas na proporção de 1:1 com azul de Trypan 0,04% (p/v), para determinar a viabilidade celular utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico de luz comum (400×).

Para a infecção, os macrófagos peritoneais (10^4 células/mL) foram incubados em placas de 24 poços, durante 24 h, a 37°C, em presença de 5% de CO₂. Foram adicionados às células a suspensão de *C. parapsilosis* (10^2 CFU/mL) e o extrato nas concentrações, equivalentes aos valores da CIM (16,7 mg/mL) e 2×CIM (33,4 mg/mL), conforme descrito na Tabela 3. Após o período de incubação, o meio foi aspirado e reservado para a quantificação de NO e citocinas.

As células fúngicas não internalizadas foram removidas por lavagem tripla com 100µL de PBS. Em seguida, foram adicionados aos poços 500 µL de RPMI gelado para a remoção de macrófagos aderentes. O meio contendo as células foi aspirado, e as células foram lavadas, e coradas com Giemsa. As células foram visualizadas em microscopia óptica de contraste de fase (200×).

Foram considerados infectados os macrófagos com, pelo menos, uma célula fúngica internalizada ou aderida à membrana. Assim, foi estabelecido como índice de infecção (IF), o percentual de células infectadas após contagem de 100 células por campo (foram analisados 4 campos) (BARROS, et al., 2013).

Tabela 3. Grupos para a infecção de macrófagos murinos *in vitro*.

Grupo	Infecção (10² CFU/mL de <i>C. parapsilosis</i>.)	Tratamento prévio (concentrações de CIM do BAE)	Tratamento <i>in vitro</i> (concentrações de CIM do BAE)
Controle (CC)	Não	Não	Não
Controle Infectado (CI)	Sim	Não	Não
Tratamento <i>in vitro</i> (BC)	Sim	Não	Sim
Tratamento <i>in vitro</i> (BI)	Sim	Não	Sim
Tratamento prévio (BBC)	Sim	Sim	Sim
Tratamento prévio (BBI)	Sim	Sim	Sim

4.4 Avaliação do efeito do BAE na infecção letal por *Candida* em camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com idade entre 4 e 6 meses. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério de Experimentação em ambiente controlado, com água e ração *ad libitum*. O estudo foi conduzido de acordo com as normas vigentes do Brasil e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da UFMA (Processo nº 23115.037939/2018-75) (Anexo III).

Para a infecção os animais foram imunossuprimidos, 48h antes, com dose única de ciclofosfamida (50mg/kg/ip Genuxal®) (HAFEEZ et al., 2001).

Os animais imunossuprimidos foram infectados com *C. parapsilosis* (1x10⁸ UFC/mL/200 µL), via intraperitoneal (TUIE et al., 2004) e distribuídos em 6 grupos (n=5 animais/grupo), mostrado na Tabela 4, conforme o tratamento, logo após a infecção. Foram

considerados como parâmetros para imunossupressão a contagem de células sanguíneas na validação da infecção sistêmica, a carga fúngica e a mortalidade (ALVES, 2018).

A Anfotericina B (0,6 mg/kg, ip. – Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 4. Grupos de tratamento dos camundongos infectados letalmente com *C. parapsilosis*.

GRUPOS	IMUNOSSUPRESSÃO	INFECÇÃO	TRATAMENTO
Limpo	Não	Não	Salina
Extrato	Não	Não	BAE CIM (16,7 mg/kg, via oral)
PBS	Sim	Sim	Salina
ANFB	Sim	Sim	Anfotericina B (0,6 mg/kg, ip)
BAE1	Sim	Sim	BAE CIM (16,7 mg/kg, via oral)
BAE2	Sim	Sim	BAE 2X CIM (33,4 mg/kg, via oral)

4.4.1 Obtenção das amostras de soro e das células

Animais foram eutanasiados 24h após a infecção com superdosagem do anestésico (150 mg/kg de cloridrato de cetamina, Vetanarcol®, e 120 mg/kg de cloridrato de xilazina, Rompum®) para avaliação do número de células na cavidade peritoneal, avaliação do número de colônias fúngicas, produção de óxido nítrico (NO) e citocinas.

O sangue foi obtido por punção cardíaca e submetido a centrifugação (2000rpm, 4°C, 10min) para obtenção do soro que foi utilizado para análise bioquímica e avaliação da concentração de citocinas.

No mesmo momento, foram obtidas as células esplênicas por meio da trituração do baço, filtração e ressuspensão em 2mL de PBS e os intestinos a serem utilizados em avaliações futuras quanto ao microbioma.

4.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em órgãos alvos durante o curso da infecção invasiva por *C. parapsilosis*

Para a quantificação da carga fúngica na infecção sistêmica por *C. parapsilosis*, foi utilizado o protocolo descrito por Xin et al. (2019) com algumas adaptações. A contagem de UFC's dos órgãos (coração, fígado, rim e peritônio) foi obtido após a eutanásia, sendo macerados e homogenizados em 5 mL de PBS estéril e realizado diluições seriadas que

variaram de 10^{-1} a 10^{-3} e posteriormente, transferidos volumes de 100µL para placas de petri contendo CHROMagar Candida (Kasvi®) e com o auxílio de uma alça drigalski, foi realizado o espalhamento na superfície do meio de cultivo. Além disso, foram coletados volumes de 100µL do sangue total dos camundongos, e realizado, o mesmo processo de diluição e espalhamento descrito anteriormente. Após os procedimentos, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C durante 48h e as UFC's foram quantificadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a carga tecidual foi usada como marcadores de virulência.

4.4.3 Análise em Citometria de Fluxo

Para a marcação fenotípica, células do peritônio foram suspensas em PBS contendo 1% de BSA na concentração de 2×10^5 células/100 µL. Em seguida, os seguintes anticorpos foram adicionados à suspensão celular nas concentrações recomendadas pelo fabricante: F4/80 Like PE (Clone 6F12, BD Pharmingen, Catálogo: 563899), I-A/I-E FITC (Clone 2G9, BD Pharmingen, Catálogo: 553623), CD11b PE (Clone M1/70, BD Pharmingen, Catálogo: 557397), CD3e Alexa Fluor 488 (Clone 145-2C11, BD Pharmingen, Catálogo: 557666), e Ly-6G PerCP-Cy5.5 (Clone 1A8, BD Pharmingen, Catálogo: 560602). As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente.

Após a incubação, as células foram lavadas com 250 µL de PBS contendo 1% de BSA, centrifugadas a 200g por 5 minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado. A lavagem foi repetida duas vezes para remover o excesso de anticorpos não ligados. As células foram então fixadas em 4% de paraformaldeído por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de PBS.

Para a aquisição dos dados, foram coletados 10.000 eventos utilizando o citômetro de fluxo Guava® easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merck, Catálogo: 0500-4008). Os dados foram analisados com o software FlowJo v10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) para identificar as populações celulares marcadas com os anticorpos específicos. Como estratégia de análise, foi inicialmente feita a exclusão dos duplos, seguida da análise das populações pelos parâmetros de tamanho e complexidade.

O painel CD11b e Ly-6G foi utilizado para marcar monócitos/macrófagos e neutrófilos, F4/80 e I-A/I-E para marcar macrófagos ativados, e CD3e e CD28 para linfócitos ativados. Controles negativos, sem anticorpos, foram incluídos para definir os limites de

autofluorescência. A compensação de fluorescência foi realizada para corrigir a sobreposição espectral entre os diferentes fluoróforos através de marcações simples de cada um dos marcadores utilizados.

4.4.4 Análise Bioquímica

Para a bioquímica, o soro dos animais foi submetido a avaliação utilizando microensaio realizado com kits específicos para cada um dos parâmetros (Bioclin Quibasa Química Básica LTDA e Labtest Diagnóstica® SA, Brasil), considerando as concentrações de glicose, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol. Os valores foram determinados por método colorimétrico, conforme instrução dos fabricantes. Os resultados foram expressos em mg/dL, considerando triplicatas das amostras individuais.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student ou por análise de variância (ANOVA), conforme o caso, seguida do teste de comparações múltiplas (Newman-Keuls) (SOKAL; ROHLF, 1996). Para avaliação da sobrevida foi utilizada a Curva Kaplan-Meier, seguida de teste estatístico de Log-Rank. As análises utilizaram o software GraphPadPrism, versão 10.0, após aplicação do teste de normalidade. Os dados foram expressos em gráficos, considerando os valores da média $\pm$ desvio padrão ($X \pm SD$) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil Químico do BAE

A análise química qualitativa do BAE foi realizada por HPLC-PAD-ESI-MS resultando na elucidação de 7 compostos. O mapeamento completo dos picos no espectro de captura de íons obtidos está descrito na Figura 6. Os principais metabólitos secundários identificados foram: vicenina-2, isoschaftosídeo, schaftosídeo, orientina, apigenina-6-c-glucosídeo-8-c-arabinosídeo, apigenina-7-rutinosídeo e ácido isoclorogênico, (Figura 7). Os respectivos tempos de retenção dos compostos identificados e as absorbâncias são mostrados na Tabela 5.

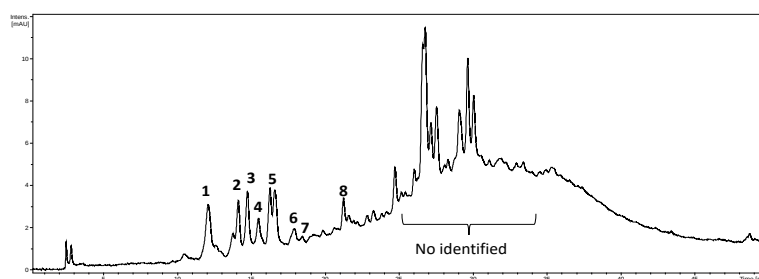


Figura 6. Cromatograma do BAE através de análise de injeção de fluxo direto representativo e picos de impressão digital HPLC-PAD-ESI-MS obtidos em modo de íon negativo.

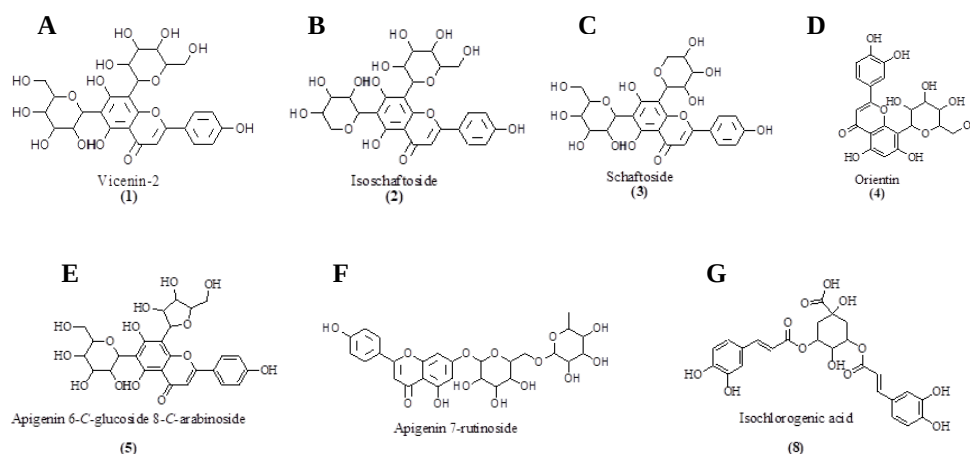


Figura 7. Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados do Extrato Etanólico do Mesocarpo de Babaçu (BAE). (A) vicenina-2, (B) isoschaftosídio, (C) schaftosídio, (D) orientina, (E) apigenina-6-C-glucosídio-8-C-arabinosídio, (F) apigenina-7-rutinosídio e (G) ácido isoclorogênico.

Tabela 5. Tempos de retenção e absorbâncias dos compostos identificados no extrato de mesocarpo de babaçu (BAE)

COMPOSTOS	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ABSORBÂNCIA (nm)
Vicenina-2	12,08	595
Isoschaftosídio	14,3	563
Schaftosídio	14,8	563
Orientina	15,7	447
Apigenina-6	16,8	563
Apigenina-7	18,6	577
Ácido Isoclorogênico	21,3	515

5.2 AÇÃO ANTI-FÚNGICA DE BAE *in vitro*

5.2.1 Atividade do BAE sobre a Concentração Inibitória Mínima - CIM

A Tabela 6 mostra as contrações inibitórias mínimas e supra inibitórias do BAE e da Anfotericina B frente aos diferentes isolados de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

A concentração inibitória mínima (CIM) para *C. albicans* variou entre 5,21 a 29,2 mg/mL com CFM de 16,7 a 33,3 mg/mL, já para a espécie *C. parapsilosis* os valores de CIM mantiveram-se entre 16,7 a 29,2 mg/mL e CFM de 16,7 a 41,7 mg/mL. Os valores do BAE foram sempre maiores do que o controle positivo (Anfotericina B).

A avaliação do perfil de sensibilidade para *C. albicans*, mostrou que o BAE apresentou atividade para todos os isolados, sendo que os resultados mais efetivos ocorreram para cepa clínica isolada do sangue ($5,21 \pm 1,80$) e vagina ($10,4 \pm 3,61$) e a menor efetividade ocorreu em relação à amostra padrão ($29,2 \pm 19,1$).

A avaliação do efeito do BAE sobre *C. parapsilosis* mostrou melhor efeito para a cepa padrão (ATCC®22019™) e isolado clínico da secreção traqueal ($16,7 \pm 7,22$) e menor atividade para a linhagem do sangue ($29,2 \pm 19,1$).

Em relação a razão CFM/CIM possível observar que os valores variaram entre 1 e 3,2, sugerindo atividade fungicida caracterizando um perfil de substância promissora na atividade anti-*Candida*.

Tabela 6. Atividade antifúngica do extrato de babaçu (BAE) contra isolados clínicos e amostras padrão de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*

<i>Candida spp.</i> (10 ⁶ UFC/mL)	EMB (mg/mL)			Anfotericina B (µg/mL)	
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM ₉₀	CFM
<i>C.albicans</i> (ATCC10231)	29.2±19.1 ^a	33.3±14.4	1.14 ^b	0.41±0.14	1.67±0.57
<i>C. albicans</i> (Sangue)	5.21±1.80[#]	16.7±7.22[#]	3.2	0.41±0.14	1.33±0.57
<i>C. albicans</i> (Vaginal)	10.4±3.61[#]	20.8±7.22	2.0	0.33±0.41	3.42±2.45
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC22019)	16.7±7.22[#]	16.7±7.22[#]	1.0	0.66±0.28	1.17±0.76
<i>C. parapsilosis</i> (Sangue)	29.2±19.1	41.7±14.4	1.42	0.66±0.28	1.33±0.57
<i>C. parapsilosis</i> (Traqueal)	16.7±7.22[#]	16.7±7.22[#]	1.0	0.83±0.28	6.42±6.0

a: Média ± Desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata

b: A razão CFM / CIM > 4 = ação fungistática e CFM / CIM₉₀ < 4 = ação fungicida.
(#) p < 0,05 em relação aos outros isolados da mesma espécie.

A Tabela 7 mostra que o extrato apresentou melhor atividade para o isolado sanguíneo de *C. albicans* e atividade similar para as duas amostras de *C. parapsilosis*, considerando os valores inibitórios mínimos e os supra inibitórios.

Tabela 7. Contrações inibitórias mínimas e supra inibitórias do BAE e Anfotericina B frente a diferentes variantes de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*

Tratamento/ <i>Candida spp.</i>	BAE (mg/mL)			Anfotericina B (µg/mL)		
	CIM	2×CIM	4×CIM	CIM	2×CIM	4×CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC10231)	29.2	58.4	116.8	0.41	0.82	1.64
<i>C. albicans</i> (Sangue)	5.21	10.42	20.84	0.41	0.82	1.64
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC22019)	16.7	33.4	66.8	0.66	1.32	2.64
<i>C. parapsilosis</i> (traqueal)	16.7	33.4	66.8	0.83	1.66	3.32

5.2.2 O tratamento com BAE reduz a adesão de *C. albicans* e *C. parapsilosis*

A avaliação da atividade do BAE na adesão levou em consideração os valores subinibitórios de CIM ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$) para as cepas padrão e isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. As duas concentrações do BAE foram efetivas em reduzir a adesão da amostra padrão de *C. albicans* (Figura 8A) e de *C. parapsilosis* (Figura 8C). Já para as amostras clínicas, (Figura 8B e 8D), apenas a concentração ($\frac{1}{2}$) de CIM foi efetiva nessa redução.

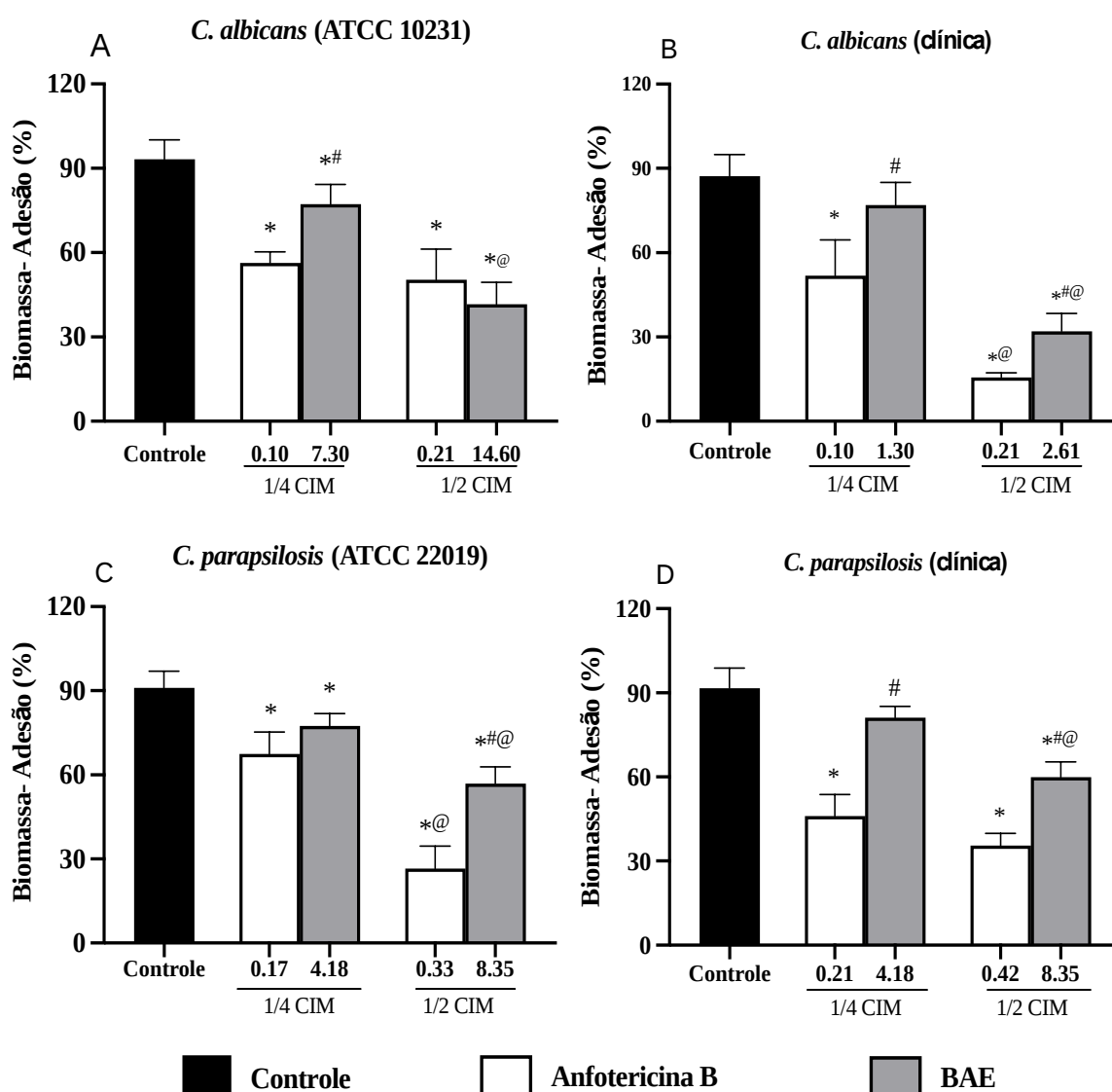


Figura 8. Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) na adesão de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. O tratamento com extrato do mesocarpo de babaçu (BAE), nas concentrações do extrato correspondentes a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração inibitória mínima (CIM), inibiu a adesão, com redução da biomassa de amostras padrão e isolados clínicos de *Candida albicans* (A e B) e *C. parapsilosis* (C e D) em comparação ao controle negativo tratado com PBS. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação a Anfotericina B e (@) $p < 0,05$ na comparação entre as diferentes concentrações dos tratamentos.

5.2.3 O tratamento com BAE inibiu a formação de biofilmes pré-formados e formados

O tratamento com concentrações subinibitórias de CIM ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$) reduziu a biomassa dos biofilmes pré-formados da amostra padrão de *C. albicans* (Figuras 9A), sobretudo quando

utilizado na maior concentração correspondente à $\frac{1}{2}$ CIM. Para a amostra clínica, somente a maior concentração foi efetiva nessa redução (Figura 9B). O extrato também foi efetivo em reduzir os biofilmes pré-formados de *C. parapsilosis* em ambas as amostras, com melhor resultado para as maiores concentrações (Figura 9C e 9D).

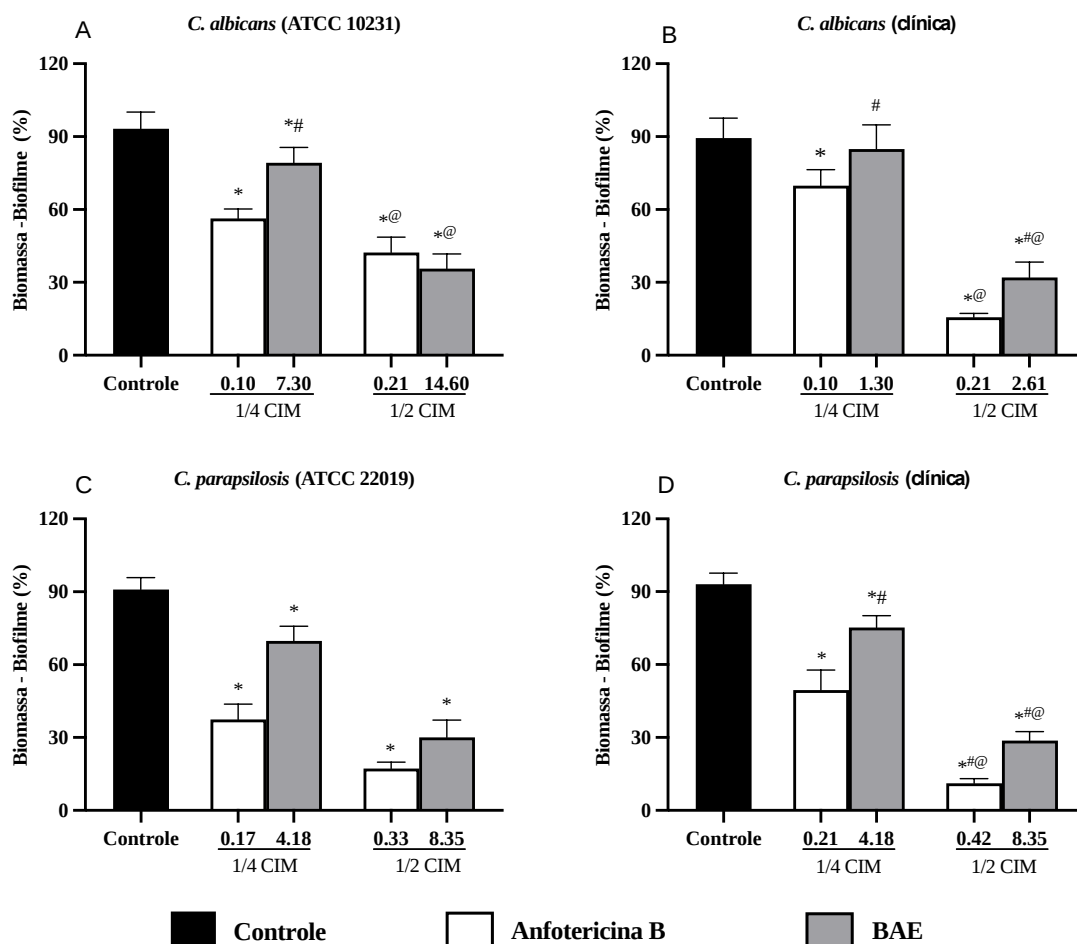


Figura 9. Ação do extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) sobre a formação do biofilme pré-formado de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. O tratamento com extrato do mesocarpo de babaçu (BAE), nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração inibitória mínima (CIM), inibiu a formação do biofilme pré-formado com redução da biomassa das amostras padrão e clínica de *Candida albicans* (A e B) e de *C. parapsilosis* (C e D), quando comparado ao controle negativo tratado com PBS. Nesse ensaio a anfotericina B foi utilizada como controle positivo. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação a Anfotericina B e (@) $p < 0,05$ na comparação entre o tratamento com diferentes concentrações do extrato.

O tratamento com o extrato reduziu a viabilidade dos biofilmes pré-formados de *C. albicans* padrão e clínica (Figura 10A e 10B) e *C. parapsilosis* clínica (Figura 10D), especialmente quando utilizado na maior concentração correspondente a $\frac{1}{2}$ do valor de CIM.

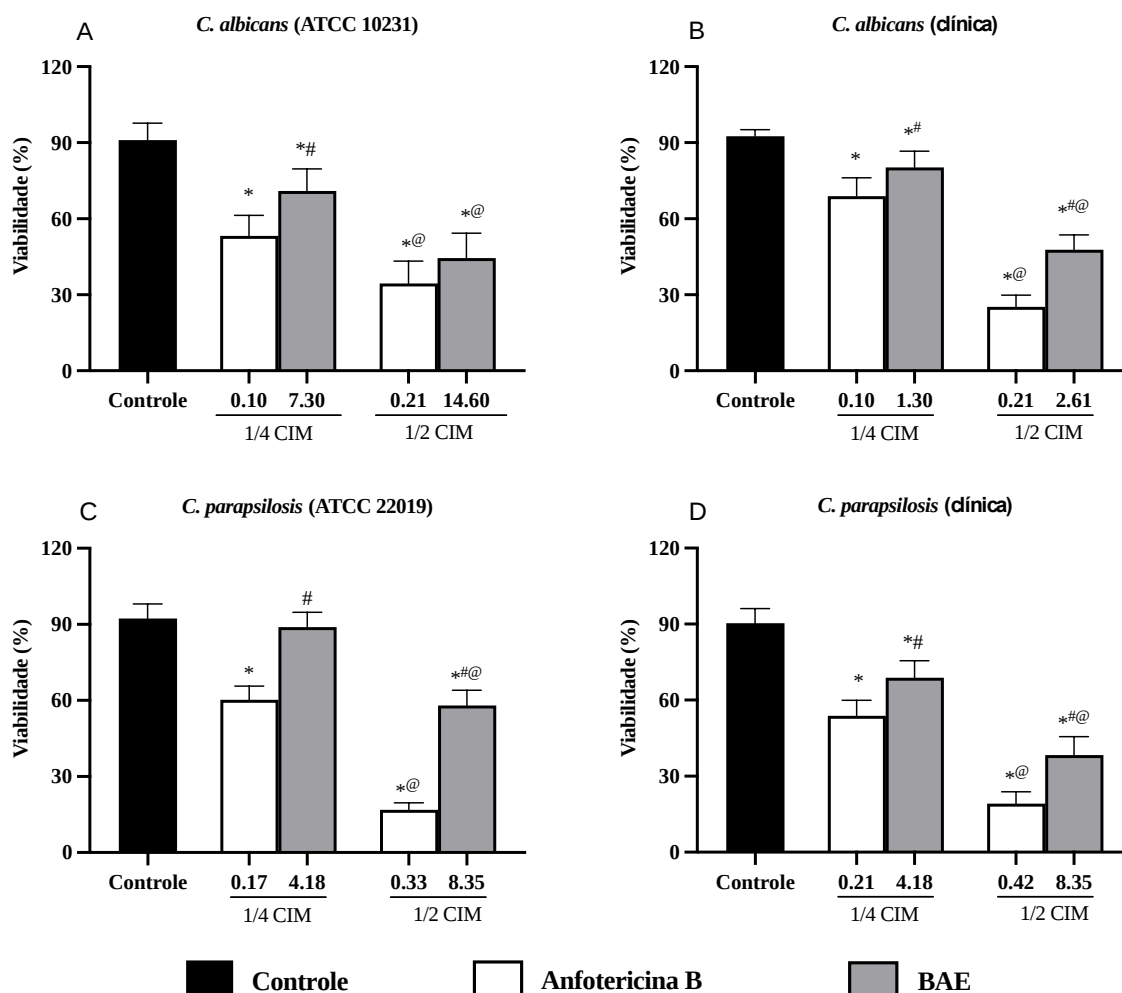


Figura 10. Efeito do extrato do mesocarpo sobre a viabilidade dos biofilmes pré-formados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. O extrato do mesocarpo, nas concentrações do extrato correspondentes a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração inibitória mínima (CIM), reduziu a viabilidade dos biofilmes pré-formados de amostras padrão e isolados clínicos de *Candida albicans* (A e B) e *C. parapsilosis* clínica (D) avaliadas em comparação ao controle negativo tratado com PBS. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação a Anfotericina B e (@) $p < 0,05$ na comparação entre as diferentes concentrações do tratamento.

A Figura 11 mostra a redução da biomassa dos biofilmes formados nos grupos tratados com BAE. Os resultados mostram que o extrato foi eficiente em inibir o crescimento do biofilme maduro tanto para amostra padrão, como para a clínica de *C. albicans* (Figuras 11A e 11B) e *C. parapsilosis* (Figuras 11C e 11D). Sendo a concentração correspondente a 4×CIM do BAE mais efetiva para todas as amostras testadas.

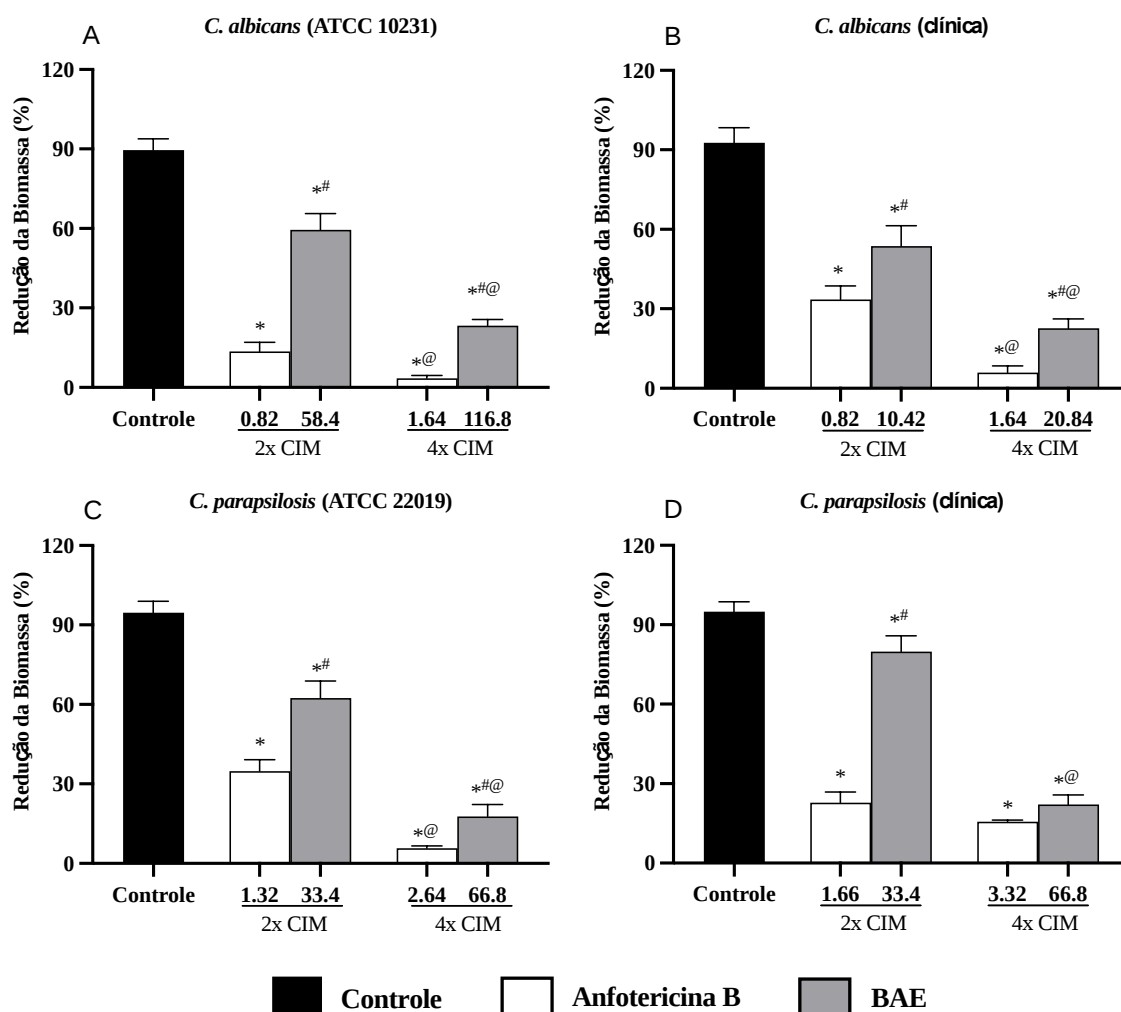


Figura 11. O extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) inibiu a biomassa do biofilme formado de *C. albicans* (A e B) e *C. parapsilosis* (C e D). A avaliação ocorreu após tratamento com o extrato em concentrações correspondentes a 2× e 4× dos valores de CIM. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo e o PBS como controle negativo. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação a Anfotericina B e (@) $p < 0,05$ na comparação entre as diferentes concentrações do tratamento.

O tratamento com BAE reduziu a viabilidade dos biofilmes formados, quando utilizado em doses correspondentes a 2x e 4x o valor da CIM. O tratamento com o extrato foi eficiente em reduzir a viabilidade dos biofilmes das amostras fúngicas em todas as concentrações testadas para *C. albicans* (Figura 12A e 12B) e *C. parapsilosis* (Figuras 12C e 12D). A maior dose de BAE foi a mais efetiva para todas as amostras.

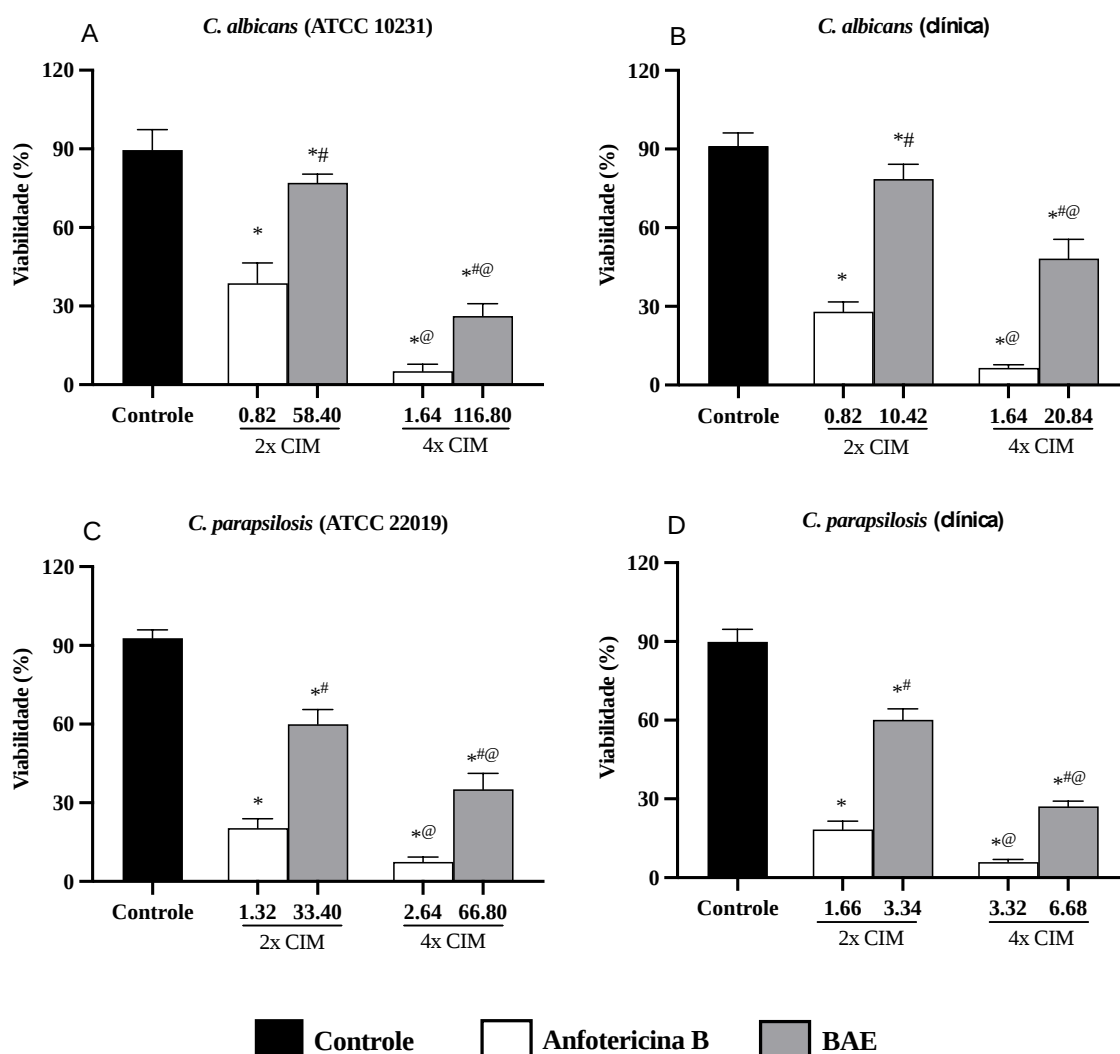


Figura 12. Atividade inibitória do extrato do mesocarpo sobre a viabilidade dos biofilmes formados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. O extrato do mesocarpo reduziu a viabilidade dos biofilmes formados de amostras padrão e isolados clínicos de *Candida albicans*. (A e B) e *C. parapsilosis* (C e D) avaliadas após tratamento com o extrato em concentrações correspondentes a 2x e 4x dos valores de CIM. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo e o PBS como controle negativo. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (#) $p < 0,05$ em comparação a Anfotericina B e (@) $p < 0,05$ na comparação entre as diferentes concentrações do tratamento.

5.2.4 O tratamento com BAE *in vitro* reduz a infecção *C. parapsilosis* em células peritoneais

O tratamento *in vitro* com BAE reduziu a infecção por *C. parapsilosis* em células peritoneais (Figura 15). Essa redução ocorreu independentemente da origem das células, seja de animais previamente tratados com o extrato (BBC e BBI) ou em células apenas estimuladas com o extrato *in vitro* (BC e BI), em comparação às culturas de células peritoneais infectadas e não tratadas (CI).

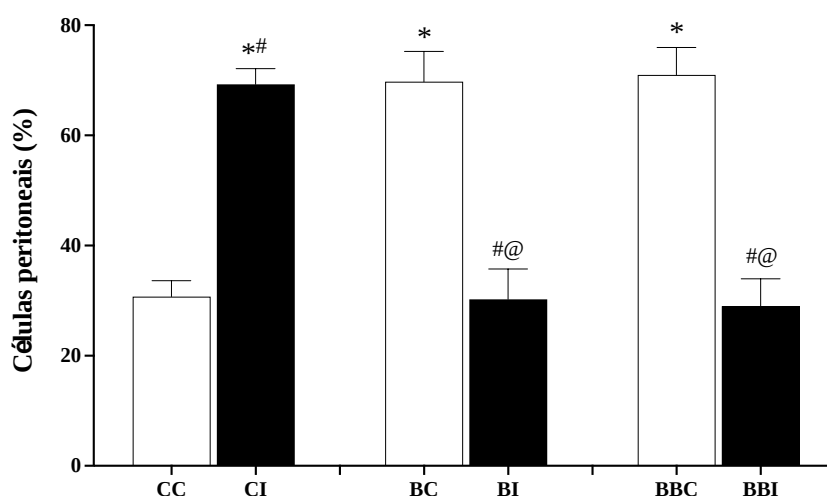


Figura 13. O tratamento com BAE reduz a infecção de células peritoneais infectadas por *C. parapsilosis in vitro*. Células peritoneais (10^4) de animais normais foram tratadas *in vitro* com o extrato (BC) e comparadas aos efeitos do extrato em células de animais tratados *in vivo* e *in vitro* (BBC). Para a infecção as células foram incubadas *in vitro* com *C. parapsilosis* (10^2 CFU/mL) constituindo os grupos BI (só tratamento *in vitro*) e BBI (tratamento com BAE *in vivo* e *in vitro*). Esses grupos foram comparados a células não infectadas e não tratadas (CC) e a culturas de células infectadas e não tratadas (CI). Os dados representam média $\pm$ SD de amostras individuais testadas em quintuplicata. (*) $p < 0,05$ na comparação ao grupo CC; (#) $p < 0,05$ em comparação ao controle dos grupos (BC e BBC) e (@) em comparação ao grupo CI.

5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM BAE *in vivo*

5.3.1 BAE apresentou baixa toxicidade para larvas de *Tenebrio molitor*

O tratamento com BAE apresentou baixa toxicidade para as larvas de *T. molitor*, pois todas as larvas mantiveram-se vivas até o tempo final de avaliação, quando tratadas com concentração correspondente ao valor de $2 \times \text{CIM}$ para *C. albicans* (Figura 14A). No grupo

tratado com a concentração de 4×CIM, a sobrevivência foi de 88% e com a maior dose (233,6 mg/Kg), correspondente a 8×CIM, 80% das larvas permaneceram vivas até o final da avaliação.

Em relação às doses relacionadas ao valor de CIM para *C. parapsilosis* observamos distribuição semelhante, pois a sobrevida foi de 100% para a dose correspondente a 2×CIM do BAE, 89% permaneceram vivas no grupo tratado com a concentração de 4×CIM e 76% de sobrevivência foi observado no grupo tratado com 8×CIM (133,6 mg/Kg) (Figura 14B).

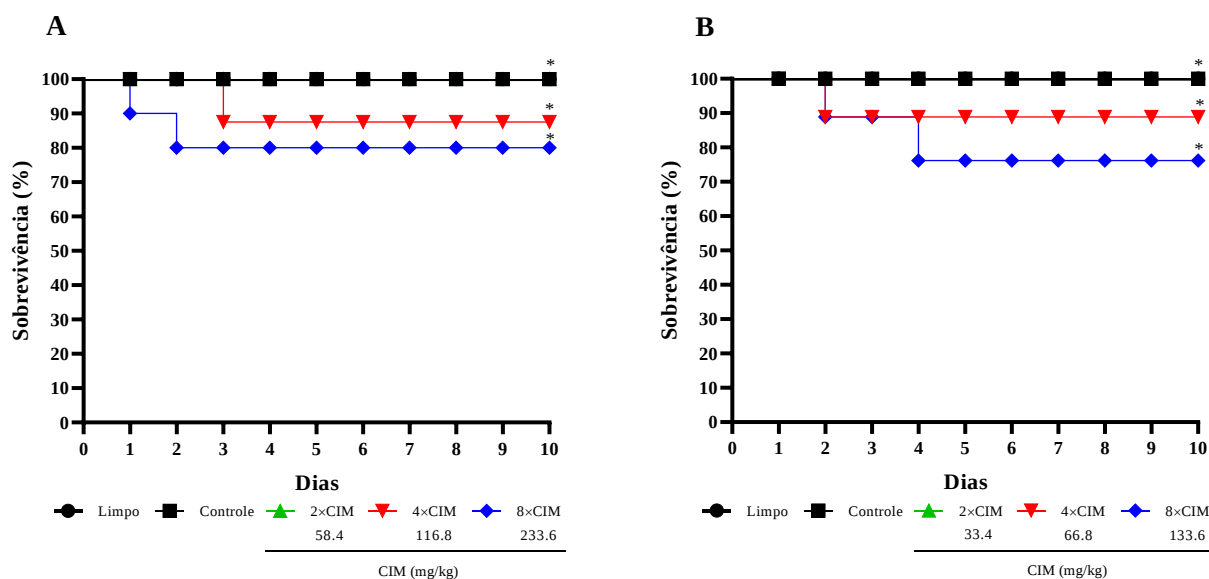


Figura 14. O tratamento com o extrato do mesocarpo de babaçu (BAE), com concentrações correspondentes aos valores de 2, 4 e 8× CIM das culturas de *C. albicans* (A) e *C. parapsilosis* (B), apresentou baixa toxicidade para larvas de *Tenebrio molitor* conforme avaliação durante 10 dias. O tratamento com o extrato foi feito por via intracelômica, para determinação da sobrevida em comparação ao grupo controle que recebeu com PBS. Foi também utilizado um grupo limpo não tratado. Os resultados foram avaliados pela curva de Kaplan-Meier seguido da análise de Log-Rank em grupos com 30 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle que recebeu PBS.

5.3.2 O tratamento com BAE aumenta a sobrevida de larvas de *T. molitor* infectadas letalmente por *C. albicans* ou por *C. parapsilosis*

A Figura 15 mostra que o tratamento com BAE aumentou na sobrevida de larvas de *T. molitor* infectadas letalmente por *C. albicans* ou por *C. parapsilosis*, sendo que o tratamento com a concentração de BAE correspondente a 2×CIM foi capaz de garantir a sobrevida de 54% dos animais infectados com *C. albicans* (Figura 15A) e de 68% dos animais infectados com *C. parapsilosis* (Figura 15C). O tratamento com a maior dose (4×CIM), assegurou a sobrevida de

71% dos animais infectados com *C. albicans* (Figura 15B) e de 90% dos animais infectados com *C. parapsilosis* (Figura 15D). No controle não tratado, todas as larvas morreram em 48 horas após a infecção por *C. albicans* e em 72 horas após a infecção por *C. parapsilosis*.

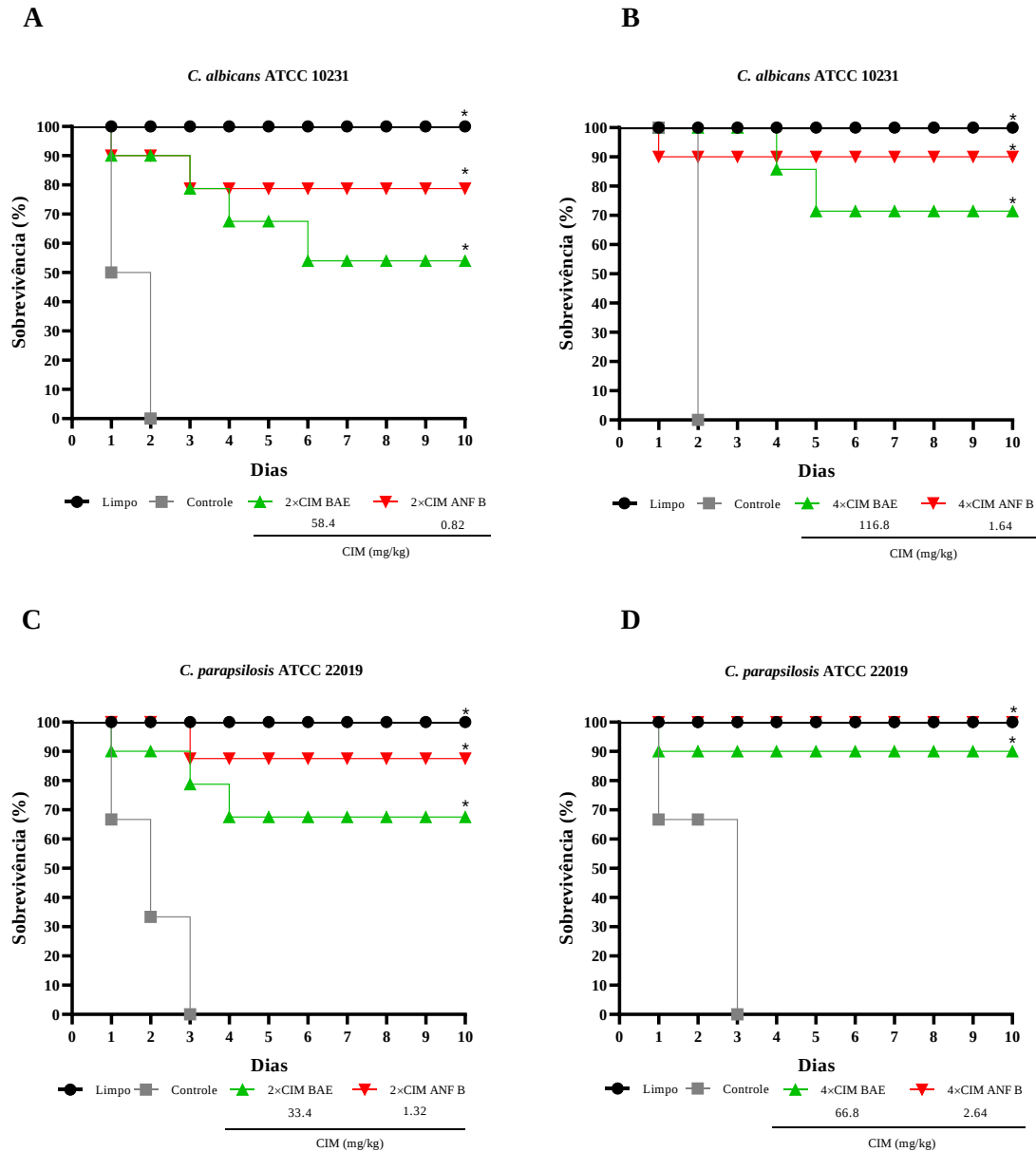


Figura 15. O tratamento com extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) aumenta a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas letalmente com *C. albicans* (A) ou *C. parapsilosis* (B). Os resultados foram avaliados pelo método de Kaplan-Meier seguido de análise por Log-Rank, em grupos com 30 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle infectado e não tratado.

5.3.3 O tratamento com BAE reduz a infecção sistêmica de camundongos infectados por *Candida parapsilosis*

O tratamento de camundongos com a dose correspondente a 2x CIM (33,4 mg/mL) resultou na redução de CFU no sangue (A), fígado (C) e rins (D), mas não foi efetiva no peritônio. Já a dose correspondente ao valor CIM (16,7 mg/mL) foi efetiva em reduzir o número de CFUs no fígado e nos rins, mas não teve efeito nem no sangue e nem no peritônio dos camundongos.

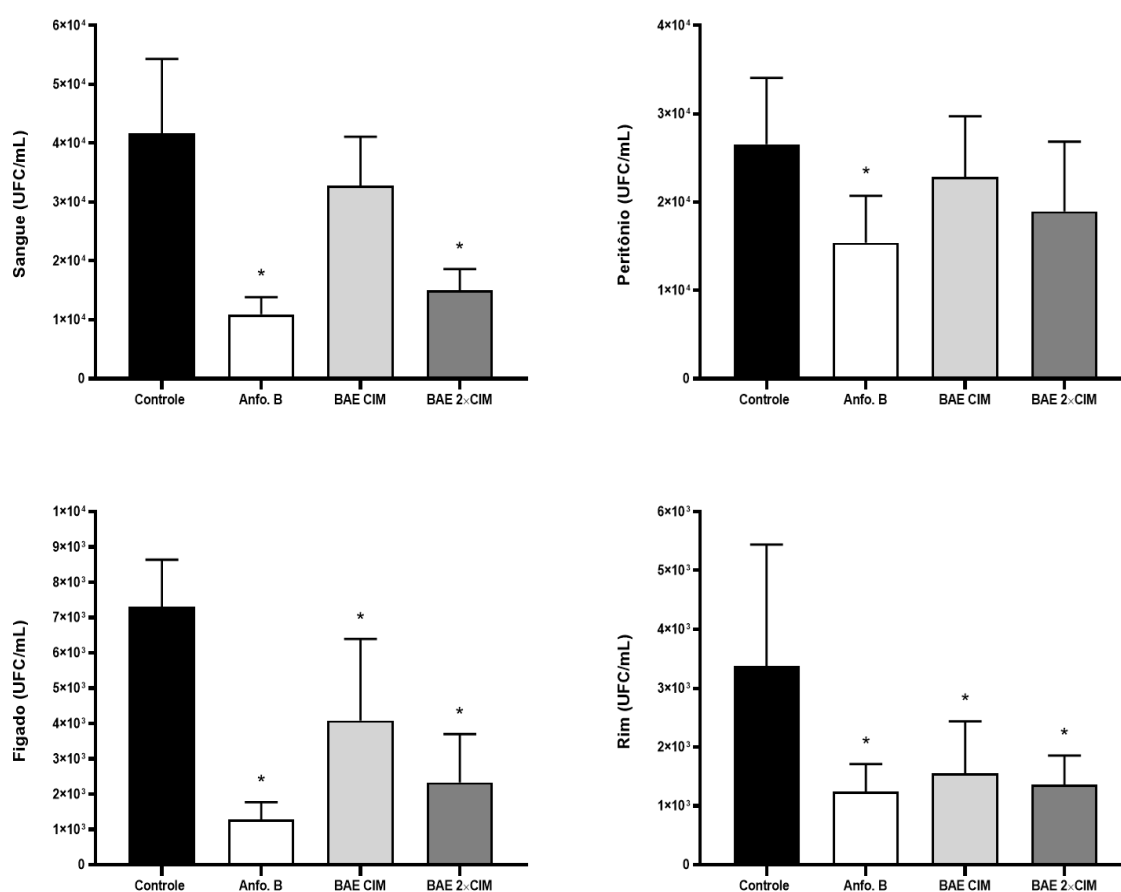


Figura 16. O tratamento com o extrato do mesocarpo de babaçu nas concentrações correspondentes ao CIM e 2x CIM, apresentou efeitos diferenciados quanto ao número de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) no sangue (A), peritônio (B), fígado (C) e rins (D) em camundongos infectados com *Candida parapsilosis* e tratados com o BAE ou Anfotericina B em comparação ao controle não tratado. Os resultados se referem à média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0.05$ em comparação ao controle infectado e não tratado.

5.3.4 Efeito do BAE sobre a distribuição de neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD4 ativados em camundongos infectados letalmente com *Candida parapsilosis*

O tratamento de camundongos com BAE teve efeitos diferenciados, conforme a concentração utilizada, quando avaliamos a ativação de neutrófilos (Figura 17A) e linfócitos T (Figura 17C) e sempre reduziu a ativação de macrófagos (Figura 17B). Na ativação de neutrófilos o tratamento com a menor concentração foi mais efetivo, com resultados similares aos observados para a anfotericina. Já em relação a ativação de linfócitos T a maior concentração de BAE foi a mais efetiva. Entretanto, o tratamento com o extrato sempre reduziu o número de macrófagos ativados, com qualquer das doses utilizadas.

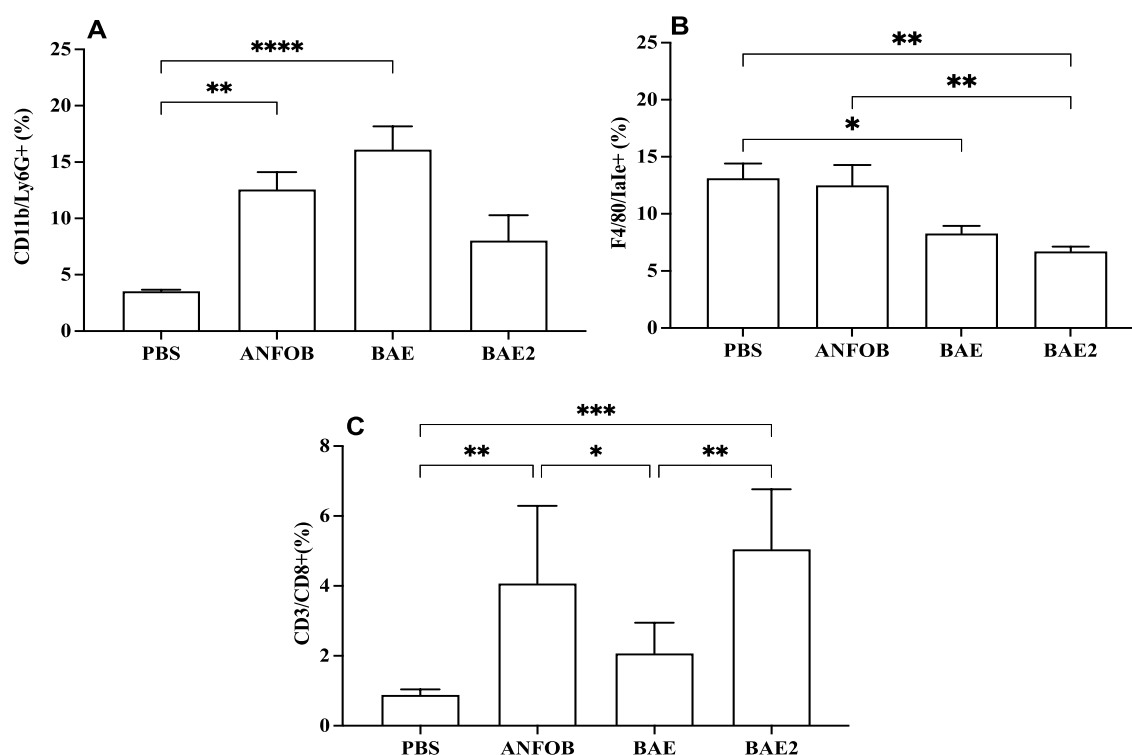


Figura 17. Efeitos do tratamento com o extrato do mesocarpo de babaçu (BAE) em camundongos infectados letalmente com *C. parapsilosis* quanto a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD4. As células foram obtidas de camundongos infectados letalmente com *Candida parapsilosis*. As células peritoneais foram obtidas 24h após a infecção em camundongos tratados com duas concentrações do extrato correspondentes aos valores de CIM (BAE) e 2x CIM (BAE2) e comparados ao grupo tratado com anfotericina B e ao grupo infectado e não tratado (PBS). As células foram avaliadas por citometria de fluxo e os resultados se referem à média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) p < 0.05 em comparação ao controle infectado e não tratado.

5.3.5 O BAE tem efeito variável sobre os parâmetros bioquímicos em camundongos Swiss infectados com *C. parapsilosis*

A Tabela 8 mostra os parâmetros bioquímicos analisados no soro de camundongos Swiss infectados. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de ureia e creatinina ($p>0,05$) em todos os grupos. Entretanto, o tratamento com BAE (2x CIM) aumentou a concentração sérica de glicose e colesterol em relação ao controle negativo e ao controle positivo. Além disso, nesse mesmo grupo observamos redução na concentração de triglicérides.

Tabela 8. Avaliação bioquímica do soro de camundongos submetidos à infecção letal por *Candida parapsilosis*.

Parâmetro	Limpo	Extrato	PBS	Anfotericina B	BAE CIM	BAE 2×CIM
Glicose	103,3 ± 9,49	117,3 ± 11,54	107,6 ± 12,99	99,65 ± 28,07	112,7 ± 7,72	168,5 ± 21,74 ^{*#}
Triglicérides	45,57 ± 6,59	60,13 ± 10,90	54,36 ± 7,90	63,49 ± 6,75	55,33 ± 4,20	42,19 ± 5,44 ^{&}
Colesterol	70,49 ± 8,62	67,93 ± 10,11	75,33 ± 11,48	69,72 ± 13,13	69,24 ± 14,03	113,4 ± 20,51 ^{@#}
Ureia	18,44 ± 0,92	18,18 ± 0,56	18,26 ± 0,57	18,26 ± 0,53	18,29 ± 0,54	18,33 ± 0,64
Creatinina	0,91 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,89 ± 0,02	0,85 ± 0,05	0,91 ± 0,01	0,90 ± 0,04

Os valores representam a média ± desvio padrão (X ± SD) testadas em quintuplicata onde (*) $p \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo (PBS); (#) $p \leq 0,0001$ em relação ao controle positivo (Anfotericina B); (@) $p \leq 0,05$ em relação ao controle negativo (PBS) e (&) $p \leq 0,05$ em relação ao controle positivo (Anfotericina B).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o potencial anti-*Candida* do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu *in vitro* e *in vivo*, além de também determinar sua composição fitoquímica. Os resultados mostraram que o extrato apresentou ação antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Sendo que *in vivo* esse efeito foi observado tanto nas larvas de *T. molitor*, como em camundongos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu identificar sete compostos presentes no extrato, corroborando a presença de uma série de metabólitos bioativos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Sendo que o composto mais evidenciado foi a apigenina, além de schaftoside e isoschaftoside, pertencentes também a classe das apigenina. Esses dados são similares a outros estudos que utilizaram métodos colorimétricos e análises qualitativas para avaliar o mesocarpo de babaçu.

De acordo com estudos anteriores, o mesocarpo de babaçu é composto por uma variedade de substâncias, incluindo carboidratos, lipídios, proteínas e compostos fenólicos, como taninos, que contribuem para a coloração acastanhada característica da planta (ALMEIDA et al., 2011; FIOROTO, 2013).

Segundo Silva et al. (2017) a fração de acetato de etila do extrato hidroalcólico do mesocarpo de babaçu apresentou elevada concentração de compostos fenólicos, como proantocianidinas. Adicionalmente, Holanda et al. (2020), também identificaram flavonoides e ácidos fenólicos, como ácido elágico e catequina, em diferentes frações do extrato de mesocarpo de babaçu utilizando métodos colorimétricos, em avaliações realizadas antes e depois de ensaios *in vitro* que simularam a digestão gástrica.

Importante destacar ainda que a maioria dos resultados anteriores quanto a caracterização química do mesocarpo de babaçu se concentrou na caracterização do amido de babaçu (MANIGLIA; TAPIA-BLÁCIDO, 2016) ou ácidos graxos (FARIAS et al., 2019) ou compostos fenólicos e, ainda, que grande parte deles investigou o perfil químico do babaçu usando apenas ensaios qualitativos colorimétricos. Entretanto, ainda são escassos dados sobre a composição química do mesocarpo de babaçu utilizando técnicas mais sensíveis, como as que utilizamos no presente estudo. Assim, até onde sabemos, o presente estudo é um dos primeiros a determinar o perfil químico do extrato do mesocarpo de babaçu, independente das classes de compostos existentes. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer um marcador

químico para este produto o que pode viabilizar sua utilização como bioproduto no tratamento de doenças.

Outros compostos identificados no nosso extrato como a vicenina, são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, e antifúngicas, (LEE e BAE, 2015; NAGAPRASHANTHA, 2011; ZHANG et. al, 2020). Essas propriedades podem explicar a capacidade do nosso extrato em inibir a formação de biofilmes de *Candida* e reduzir a adesão das células fúngicas ao hospedeiro, bem como reduzir a infecção no fígado e nos rins, como observado em todos os grupos tratados com babaçu.

Há evidências que a atividade antifúngica da vicenina está relacionada à sua capacidade de alterar a parede celular dos fungos, comprometendo a sua integridade e viabilidade, (YIN et. al, 2019) o que pode ter contribuído para o efeito observado contra os fatores de virulência de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

Outros compostos identificados no extrato incluem os isômeros schaftosideo (apigenina 6-C- β -D-glucopiranoside-8-C- α -L-arabinopiranoside) e o isoschaftosideo (apigenina 6-C- α -L-arabinopiranoside-8-C- β -D-glucopiranoside), flavonas pertencentes à classe das apigenina. O composto schaftosideo é facilmente encontrado em medicamentos fitoterápicos. Entre as suas propriedades biológicas destacam-se os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores sobre a resposta imune e a função celular, o que pode contribuir para a diminuição da inflamação associada à infecção por *Candida* sp. (MELO et al., 2005).

Já seu isômero isoschaftosideo, tem efeitos neuroprotetores e a propriedade de reduzir o estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na micróglia na inflamação induzida por LPS (SHUYUAN et al., 2022). Essa redução pode ter um impacto positivo no controle de infecções fúngicas, visto que esses fatores estão intimamente relacionados à resposta imunológica do hospedeiro. Sendo assim, esse efeito pode colaborar para a resposta imunomoduladora do extrato observada em nossos testes com macrófagos, onde foi verificada a diminuição da infecção por *Candida parapsilosis* e também a redução de macrófagos ativados.

O tratamento com BAE apresentou efeitos antifúngicos variáveis frente aos isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, apresentando melhores resultados para linhagem clínica de *C. albicans* e para as duas variantes de *C. parapsilosis*. Dados semelhantes foram anteriormente descritos por nosso grupo em relação a essas duas espécies, corroborando com os resultados aqui obtidos (BARBOSA, 2022).

O efeito inibitório do BAE na adesão de todas as cepas testadas é de particular interesse, pois a adesão é o estágio inicial da infecção e da colonização (SANTOS et al., 2018; ROSCETTO et al., 2018). Além disso, em nossos estudos prévios com o extrato de mesocarpo de babaçu, embora os resultados sobre a adesão tenham sido parecidos com o do presente estudo, quando analisado a redução de biomassa, nota-se que o presente estudo apresentou resultados mais satisfatórios, conseguindo inibir a formação da biomassa em ambas as espécies de *Candida* independentemente da concentração usada do extrato (BARBOSA, 2022).

Adicionalmente, o BAE apresentou efeito inibitório sobre os biofilmes pré-formados e formados de *C. albicans* (ATCC10231) e *C. parapsilosis* (ATCC22019). Esse aspecto é crucial, pois biofilmes fúngicos conferem resistência aos tratamentos convencionais, sendo um dos principais desafios no manejo de infecções por *Candida* (HARGROVE et al., 2017). O efeito do extrato em biofilmes pré-formados e formados foi particularmente promissor, sugerindo que o BAE pode não apenas prevenir a infecção, mas também mitigar infecções estabelecidas.

Esses resultados evidenciam a importância do nosso estudo visto que ele parece ser um dos pioneiros em demonstrar a atividade antifúngica do babaçu *in vitro*, assim, inferimos que a ação direta sobre os fungos, inibição da adesão e a diminuição do biofilme aumentam as expectativas do uso do BAE como alvo na prospecção de novos compostos com ação antifúngica, razão pela qual investigamos também se os dados observados *in vitro* ocorriam *in vivo*, usando larvas de *T. molitor* e camundongos.

Os testes com as larvas mostraram que o BAE aumentou a taxa de sobrevivência das larvas infectadas por *C. albicans* e *C. parapsilosis*, evidenciando a eficácia do extrato em condições biológicas mais complexas. Estudos semelhantes, como os de Oliveira et al. (2022), também demonstraram aumento na sobrevivência de larvas infectadas, embora em proporções menores do que observamos em nosso estudo (45% e 60% respectivamente).

Adicionalmente, um estudo conduzido por Barroqueiro et al. (2024) demonstrou efeito semelhante em camundongos Swiss infectados letalmente com *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), no qual o extrato do babaçu foi capaz de aumentar em 60% a taxa de sobrevivência desses animais.

A baixa toxicidade do extrato, mesmo em concentrações superiores a 100 mg/kg, é um aspecto relevante, uma vez que as larvas mantiveram uma taxa de sobrevivência superior a 70% em ambas as cepas de *Candida* testadas. Esse perfil de baixa toxicidade foi também observado

por Barroqueiro et al. (2011), que não relataram efeitos tóxicos agudos como alteração no peso corporal, nem alterações cutâneas, neurológicas ou comportamentais em ratos tratados com o mesocarpo de babaçu, e em estudo conduzido por Debia et al. (2022) que testou o extrato em ensaios com *Artemia salina*, uma espécie de microcrustáceo fundamental no fluxo de energia da cadeia alimentar marinha.

A utilização de *T. molitor* como modelo invertebrado tem ganhado destaque em estudos de infecção fúngica devido ao seu sistema imune inato eficiente, que inclui a via Toll e mecanismos de autofagia (SEO, 2016; MCGONIGLE et al., 2016). Esses mecanismos tornam as larvas um modelo adequado para avaliação de atividades antimicrobianas e anti-virulência em *Candida*, corroborando para a validade dos nossos achados.

Entretanto, ainda existe um número reduzido de trabalhos experimentais com relação a toxicidade de babaçu (BARROQUEIRO et al., 2001), sendo que esse é um dos primeiros a avaliar o seu efeito em larvas de *T. molitor*. Dessa forma, novos dados sobre a toxicidade aguda do extrato do mesocarpo de babaçu adquirem maior importância, considerando seu amplo uso pela população como alimento e como medicamento (SOUZA et al., 2011).

Um outro dado interessante foi a redução da infecção no fígado e nos rins observada nos animais tratados com babaçu, independente da dose utilizada, mesmo que a infecção sistêmica só tenha sido reduzida no grupo tratado com a maior dose. Essa atividade pode tanto se relacionar aos efeitos fungicidas do extrato, como a sua ação sobre os fatores de virulência e sobre a resposta imune, observados após a infecção de camundongos com *C. parapsilosis*.

Como já descrito aqui, há no extrato vários compostos, em especial aqueles do grupo das apigeninas, com ação fungicida, anti-inflamatória (YORDANOV et al., 2008) e imunomoduladora (WOO et al., 2006; NICHOLAS et al., 2007; HENKELS et al., 2011) o que nos leva a supor que os efeitos observados se devem a ação sinérgica dos vários compostos.

Nossos resultados mostram efeitos do BAE sobre as contagens de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T auxiliares ativados nos camundongos letalmente infectados com *C. parapsilosis*. Nesse contexto, é possível que essa atividade esteja relacionada a presença de apigenina, flavonoide identificado na avaliação química do BAE. Essa substância, que tem ação anti-inflamatória, reduz a produção de mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β e TNF- α , em células humanas e de camundongos (KOWASKI et al., 2005; WOO et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória da apigenina tem sido relacionada à inibição da fosforilação de NF- κ B em macrófagos. Adicionalmente a apigenina afeta a quimiotaxia de

neutrófilos *in vitro* (NICHOLAS et al., 2007; HENKELS et al., 2011), reduz a apoptose de células endoteliais cultivadas com LPS, restaurando a atividade mitocondrial normal do Complexo I (DUARTE et al., 2013) e diminui a expressão de moléculas de adesão (MYHRSTAD et al., 2002).

Além disso, a apigenina pode ter um efeito quelante sobre metais, o que além de contribuir para a modulação da resposta imunológica pode reduzir a produção de radicais livres, que são cruciais no controle de infecções fúngicas. Sua capacidade de estimular enzimas de desintoxicação de fase II em células também pode contribuir para a proteção celular e para o aumento da resistência do hospedeiro durante a infecção fúngica (MIDDLETON, 2000).

Assim, é razoável propor que a presença dos compostos no extrato pode ter resultado numa maior ativação de linfócitos e uma menor ativação de macrófagos, sobretudo se considerarmos que as infecções fúngicas apresentam um elevado potencial inflamatório. Por outro lado, poderiam também explicar a ativação de neutrófilos aqui observada, como mecanismo imunológico de controle da infecção, ainda que na fase aguda, já que essas células são importantes no controle das infecções agudas ocasionadas por fungos. Confirmando mais uma vez o efeito imunomodulador do mesocarpo de babaçu, só que agora na infecção ocasionada por *C. parapsilosis*.

Em relação aos efeitos imunológicos, o extrato também demonstrou interferir na resposta imunológica do hospedeiro, reduzindo a infecção de macrófagos por *C. parapsilosis*. Embora não existam estudos prévios sobre a interação do babaçu com *C. parapsilosis* nesse contexto, resultados semelhantes foram descritos para *C. albicans* em outros estudos com extratos vegetais, como o de *Curcuma longa* L. (FIGUEIRA, 2017). O comportamento dos macrófagos na fagocitose e eliminação de patógenos fúngicos é um fator crítico na defesa do hospedeiro (ERWIG & GOW, 2016), o que sugere que o extrato de babaçu pode ter um papel imunomodulador relevante.

O tratamento com BAE apresentou efeitos mínimos sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos, como ureia e creatinina, indicando funcionamento renal normal nos modelos *in vivo*. Esses valores estão próximos aos encontrados nos estudos anteriores (DANTAS et al., 2006; e LIMA et al., 2014; SOARES et al., 2021).

No entanto, quando comparados os resultados do presente estudo com os valores expressos anteriormente (LIMA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2008) observou-se um aumento na concentração de glicose no grupo BAE2, provavelmente devido a maior concentração do

extrato e, ainda, aos efeitos da infecção terem sido mais marcantes nesse grupo, como mostram os dados de CFU. Nossas suposições são reforçadas pelas variações nas concentrações de triglicerídeos e colesterol também observadas nesse mesmo grupo (BAE2).

A avaliação bioquímica é uma ferramenta essencial para determinação do perfil fisiológico das linhagens e/ou populações de animais. Além de permitir a criação de valores de referência que reflitam a condição da colônia mantida em cada laboratório (LIMA et al., 2014). No entanto, estabelecer um intervalo de valores de referência para roedores é difícil, pois muitas variáveis devem ser consideradas, como: sexo, idade, variação genética, dieta e condições ambientais em que estes animais são submetidos (CLSI, 2000). Assim, as variações encontradas podem ser pontuais, o que precisa ser mais investigado em animais submetidos a várias doses de BAE durante infecções fúngicas.

Ao que tudo indica os resultados aqui apresentados parecem ser pioneiros em determinar a ação antifúngica do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu incluindo avaliações *in vitro*, considerando efeito sobre fatores de virulência e *in vivo* considerando a ativação de células imunes durante a infecção por *C. parapsilosis*.

Dessa forma é razoável propor que o mesocarpo de babaçu pode ser utilizado como protótipo de novas drogas, considerando seus efeitos nas infecções fúngicas causada por *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com destaque para a sua ação sobre fatores de virulência, aumento da sobrevivência de animais, baixa toxicidade e efeitos imunomoduladores, já descritos anteriormente por nosso grupo (SILVA; PARENTE 2001; NASCIMENTO et al, 2006; GUERRA et al., 2011; SILVA et al., 2018) e por outros, e aqui reafirmados, o que reforça a sua viabilidade como uma alternativa terapêutica na busca de novos compostos para o tratamento de infecções fúngicas, particularmente as associadas à *Candida*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que o extrato etanólico do mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) apresentou ação anti-*Candida* para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, por atuar inibindo o crescimento dessas espécies, além de reduzir a adesão e o biofilme. Essas atividades, em conjunto, podem ter contribuído para assegurar a sobrevivência de larvas de *T. molitor* e a redução da infecção de macrófagos murinos durante a infecção letal bem como a redução da infecção por *C. parapsilosis* em camundongos Swiss, possivelmente devido sua

ação anti-*Candida* de largo espectro e sua capacidade de reduzir o número de macrófagos ativados. Os achados podem ser atribuídos à presença e à ação sinérgica de compostos identificados no extrato, devido ao seu potencial antifúngico. Portanto, esses resultados podem ser úteis na bioprospecção e desenvolvimento de novos antifúngicos com ação anti-*Candida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANGO D, DIOSA-TORO M, ROJAS-HERNANDEZ LS, SCHWARTZ JL, MO X, JIANG J, SCHMITTGEN TD, DOSEFF AI. Dietary apigenin reduces LPS-induced expression of miR-155 restoring immune balance during inflammation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59: 763–772; 2015.

ALMEIDA AS, FALEIROS ACG, TEIXEIRA DNS, COTA UA, CHICA JEL. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, 44(6): 429-432; 2008.

ALMEIDA RR, LACERDA LG, MURAKAMI FS, BANNACH G, DEMIATE IM, SOCCOL CR, CARVALHO FILHO MAS, SCHNITZLER E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babaçu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. *Thermochimica Acta*, 519: 50–54; 2011.

ALVES AV, DE LIMA FF, DA SILVA TG, DE OLIVEIRA VS, KASSUYA CA, SANJINEZ-ARGANDONA EJ. Safety evaluation of the oils extracted from edible insects (*Tenebrio molitor* and *Pachymerus nucleorum*) as novel food for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 102: 90-94; 2019.

ANJOS SSN, NETO JON. The impact of economic subsidy policies in the Babassu palm biodiesel productive chain. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(1); e8348; 2021.

ARASTEHFAR A, ÜNAL N, HOŞBUL T, ÖZARSLAN MA, KARAKOYUN AS, POLAT F, FUENTES D, GÜMRAL R, TURUNÇ T, DANESHNIA F, PERLIN DS, LASS-FLÖRL C, GABALDÓN T, ILKIT M, NGUYEN MH. Candidemia Among Coronavirus Disease 2019 Patients in Turkey Admitted to Intensive Care Units: A Retrospective Multicenter Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(4); 2022.

ARAUJO IM, LOPES LP, CRUZ CM. Systematic characterization of immune response to *Candida* infection. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(2): 3788–3803; 2020.

ASADZADEH M, AHMAD S, AL-SWEIH N. High-resolution fingerprinting of *Candida* parapsilosis isolates suggests persistence and transmission of infections among neonatal intensive care unit patients in Kuwait. *Scientific Reports*, 9: 1340; 2019.

BARBIERI, DDSAV. Variabilidade genética e produção de biofilme *in vitro* por *Streptococcus mutans* em associação com leveduras do gênero *Candida*. Tese de doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 126; 2014.

BARBOSA NT. Efeito anti-virulência do extrato do mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* mart.) Em isolados de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. 66p. Monografia de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA; 2022.

BARROQUEIRO ATLS, MACIEL MCG, VALE AAM, SILVA MCP, MAIA ACS, SANTOS APA, NASCIMENTO JR, NASCIMENTO FRF, ROCHA CQ, FERNANDES ES, GUERRA RNM. The anti-infective and immunologic effect of babassu (*Attalea speciosa*, Mart. ex Spreng) reduces mortality induced by MRSA-*Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 320; 2024.

BARROQUEIRO ES, CHAGAS AP, NASCIMENTO FR, GUERRA RN. B cell, macrophage activation and the diabetogenic effect of babassu mesocarp. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 34: 72-78; 2001.

BARROQUEIRO ESB, BARROQUEIRO FSB, PINHEIRO MT, MACIEL MCG, BARCELLOS PS, SILVA LA, LOPES AS, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM. Evaluation of acute toxicity of babaçu mesocarp in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Maranhão, 21(4): 710-714; 2011.

BARROQUEIRO ESB, PRADO DS, BARCELLOS PS, SILVA TA, PEREIRA WS, SILVA LA, MACIEL MCG, BARROQUEIRO RB, NASCIMENTO FRF, GONÇALVES AG, GUERRA RNM. Immunomodulatory and antimicrobial activity of babaçu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016: 1-7; 2016.

BARROS DB, LIMA LO, SILVA LA, FONSECA MC, DINIZ-NETO H, ROCHA WPS, BELTRÃO GVM, CASTELLANO LRC, GUERRA FQS, SILVA MV. Antifungal effect of α -pinene alone and in association with antifungals against *Candida albicans* strains. *Research, Society and Development*, 11(4): e58711427748; 2022.

BASSETTIM, GIACOBBE DR, VENA A, WOLFF M. Diagnosis and treatment of candidemia in the intensive care unit. In *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers, 40 (4): 524-539; 2019.

BATISTA CP, TORRES OJM, MATIAS JEF, MOREIRA ATR, COLMAN D, LIMA JHF, MACRI MM, RAUEN RJ, FERREIRA LM, FREITAS ACT. Effect of watery extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in the gastric healing in rats: morfologic and tensiometric study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(3): 26-32; 2006.

BEZERRA IM, BRITO ACM, CAVALCANTI YW, ALMEIDA LFD. Inhibitory effect of phytochemicals on *Candida albicans* biofilms on denture liners surfaces. *Research, Society and Development*, 9(10): 2279108587; 2020.

BRANCO J, MIRANDA IM, RODRIGUES AG. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *Journal of Fungi*, 9: 80; 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/mma/ptbr/assuntos/biodiversidade].

CAPOTE-BONATO F, SAKITA KM, OLIVEIRA AGJ, BONFIM-MENDONÇA PS, CRIVELLENTI LZ, NEGRI M, ESTIVALET SVIDZINSKI TI. In vitro interaction of *Candida tropicalis* biofilm formed on catheter with human cells. *Microbial Pathogenesis*, 125: 177-182; 2018b.

CAPOTE-BONATO FG, FRANCISCATO CS, MELLO NM, BARROS BA, TRAMONTIN MLD, BONATO DV, TEIXEIRA PPM, SVIDZINSKI TIE. Urinary tract infection by yeast of the genus *Candida*-literature review. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 26(3); 2022.

CARVALHO ACB, LANA TN, PERFEITO JPS, SILVEIRA D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 212: 29- 35; 2018.

CHEN H, ZHOU X, REN B, CHENG L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1): 337–348; 2020.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline (CLSI document C28-A2). Wayne: CLSI, 59; 2000.

COSTA RS, VIEIRA LHS, GHOSH A, SANTOS MAS, FERREIRA OP, GALDINO YSN, DA SILVA CJ. Casa e Paisagem pantaneira: conhecimento e práticas tradicionais. Cuiabá, MT: Carlini&Cniato; 2019.

DANTAS JA, AMBIEL CR, CUMAN RKN, BARONI S, BERSANI-AMADO CA. Reference values of some physiological parameters of rats from the central vivarium of the state university of Maringá, state of Parana. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 28(2): 165-170; 2006.

DEBIA N, NOBRE TA, SOUSA ABS, SOUZA JSN, MELO BAC, CASTRO E SILOUSA JM. Evaluation of toxicity and antioxidant potential of babaçu mesocarp extract in pre-clinical studies. *Brazilian Journal of Case Reports*, 2(3): 1124–1133; 2022.

DIAS ECM. TREVISAN DD, NAGAI SC, RAMOS NA, SILVA EM. Use of herbal medicines and potential risks of drug interactions: reflections for safe practice. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 41(2): 2306; 2018.

DUARTE S, ARANGO D, PARIHAR A, HAMEL P, YASMEEN R, DOSEFF AI. Apigenin protects endothelial cells from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by decreasing caspase-3 activation and modulating mitochondrial function. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 17664–17679; 2013.

ERWIG LP, GOW NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*.14: 163-76; 2016.

FARIAS GB, RODRIGUES JLS, RIBEIRO MNS, MAGALHÃES LO, FERREIRA AG, LIMA, MP. Chemical constituent analysis of the Babassu (*Orbignya phalerata* Mart.) mesocarp. *Universitas Scientiarum*, 24(2): 323-335; 2019.

FIGUEIRA, LW. Efeito do extrato de *Curcuma longa* L. sobre infecções in vitro por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* em macrófagos murinos (RAW 264.7). Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp)- São José dos Campos: [s.n.], 46f; 2017.

FIOROTO AM. Estudo de métodos para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu. Instituto de Química - Universidade de São Paulo (Dissertação). São Paulo, 96p; 2013.

FREIRES IA, MURATA RM, FURLETTI VF, SARTORATTO A, ALENCAR SM, ROSALEN PL. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets A_ected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS ONE*, 9: e99086; 2014.

FREITAS FGR, SALOMÃO R, TERERAN N. The impact of duration of organ dysfunction on the outcome of patients with severe sepsis and septic shock. *Clinical Sciences*, 63(4); 2018.

GAITAN E, COOKSEY RC, LEGAN J, LINDSAY RH, INGBAR SH, MEDEIROS-NETO G. Antithyroid effects in vivo and in vitro of babassu and mandioca: a staple food in goiter areas of Brazil. *European Journal of Endocrinology*, 131: 138-144; 1994.

GIACOBBE DR, MARAOLO AE, SIMEON V, MAGNÈ F, PACE MC, GENTILE I, CHIODINI P, VISCOLI C, SANGUINETTI M, MIKULSKA M. Changes in the relative prevalence of candidaemia due to non-albicans *Candida* species in adult in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Mycoses*, 63: 334–342; 2020.

GLASSMAN SF. A taxonomic treatment of the palm subtribe Attaleinae (Tribe Cocoeae). *Illinois Biological Monographs*, 59: 416; 1999.

GORTHI LV. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). In *Fungal Infections of the Central Nervous System* (pp. 23-30). Springer, Cham: Elsevier; 2019.

GOVRINS, M., LASS-FLÖRL, C. *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting. *Nature Reviews Microbiology*, 22:46–59; 2024.

GUERRA RNM, BARROQUEIRO ESB, CHAGAS AP. Increase of self-antibodies and glucose levels in mice treated with babassu (*Orbignya phalerata*, Palmae). *Scandinavian Journal of Immunology*, 54: 66; 2001.

GUERRA RNM, SILVA VMG, ARAGÃO-FRANÇA LS, OLIVEIRA PR, FEITOSA R, NASCIMENTO FRF, PONTES-DE-CARVALHO LC. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th) 1 dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. *BMC Immunology*, 12(1): 13; 2011.

HARGROVE TY, FRIGERI L, WAWRZAK Z, QI A, HOEKSTRA WJ, SCHOTZINGER R J, IORQUE JD, GUENGERICH F, LEPESHEVA GI. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 292: 6728–6743; 2017.

HENKELS KM, FRONDORF K, GONZALEZ-MEJIA ME, DOSEFF AL, GOMEZ-CAMBRONERO J. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by janus kinase 3 (Jak3). *FEBS Lett*, 585: 159–166; 2011.

HOLANDA AC, FREIRE LS, ALENCAR GRR, MOURA RC, TORRES, EAFS, LIMA A. Bioacessibilidade dos polifenóis presentes no mesocarpo e na amêndoa do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.). *Brazilian Journal of Development*, 6(4): 19237-19247; 2020.

JOST MT, MAYER KL, OLIVEIRA APA, LINCH GFC, PAZ AA, CAREGNATO RCA. Morbimortality and hospitalization cost of patients with sepsis in Brazil, Rio Grande do Sul and Porto Alegre. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 9(2): 149-154; 2019.

JÜTTE R, HEINRICH M, HELMSTÄDTER A, LANGHORST J, MENG G, NIEBLING W, POMMERENING T, TRAMPISCH HJ. Herbal medicinal products-Evidence and tradition from a historical perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 207: 220-225; 2017.

KHODDAMI A, WILKES MA, ROBERTS TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-75; 2013.

KOWALSKI J, SAMOJEDNY A, PAUL M, PIETSZ G, WILCZOK T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor- α genes in j774.2 macrophages. *Pharmacological Reports*, 57: 390–394, 2005.

LAMOTH F. Novel therapeutic approaches to invasive candidiasis:considerations for the clinician. *Infection and Drug Resistance*, 16:1087–1097; 2023.

LEE A. Ibrexafungerp: first approval. *Drugs* 81:1445–1450; 2021.

LEE W, BAE JS. Antithrombotic and antiplatelet activities of vicienin-2. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 26(6): 628-634; 2015.

LEE Y, PUUMALA E, LEAH NR, COWEN E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical Reviews*, 121(6): 3390–3411; 2021.

LI H, ZHANG C, CHEN Z, SHI W, SUN S. A promising approach of overcoming the intrinsic resistance of *Candida krusei* to fluconazole (FLC) – combining tacrolimus with FLC. *FEMS Yeast Research*, 14: 808-811; 2014.

LIMA CM, LIMA AK, MELO MGD, DÓRIA GAA, LEITE BLS, ALBUQUERQUE-JÚNIOR RLC, ARAÚJO AAS. Hematological and biochemical reference values of rats (*Rattus*

novergicus Wistar lineage) from the vivarium of the Tiradentes University. *Scientia Plena* 10: 1-9; 2014.

LIMA JAL, SILVA FH, ALVES JVO, MARTINS CCB, OLIVEIRA SS, ROCHA MLA, SILVA SM, SILVA VMMA, SILVA RL, ARRUDA LG, SILVA MV. *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (*Arecaceae*): An integrative review of the main biotechnological characteristics. *Brazilian Journal of Development*, 6(7): 48639–48661; 2020.

LIN L, CHEN L, LIN J, WU H, OKUNIEFF P, WU B, YANG B, CHEN J, LIN J, ZHANG L. A novel approach for fast detection of sepsis with Gram-negative bacterial infection. *Microbial Biotechnology*, 11(6): 1121-1123; 2018.

LOBO SM, REZENDE E, MENDES CL, OLIVEIRA MC. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 31(1): 1–4; 2019.

LOPES JP, LIONAKIS MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1): 89–121; 2021.

MAMALI V, SIOPI M, CHARPANTIDIS S, SAMONIS G, TSAKRIS A, VRIONI G, on behalf of the Candi-Candi Network. Increasing incidence and shifting epidemiology of candidemia in Greece: Results from the first nationwide 10-Year Survey. *Journal of Fungi*, 8(2):116; 2022.

MANIGLIA BC, TAPIA-BLÁCIDO DR. Isolation and characterization of starch from babaçu mesocarp. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, 55: 47-55; 2016.

MANTADAKIS E, PANA ZD, ZAOUTIS T. Candidemia in children: Epidemiology, prevention and management. *Mycoses*, 61(9): 614-622; 2018.

MANTADAKIS E, TRAGIANNIDIS A. Invasive fungal infections in the pediatric intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(9): 216-218; 2019.

MARTORANO-FERNANDES L, RODRIGUES NC, BEZERRA NVF, BORGES MHS, CAVALCANTI YW, ALMEIDA LFD. Cinnamaldehyde and α -terpineol as an alternative for using as denture cleansers: antifungal activity and acrylic resin color stability. *Research, Society and Development*, 10(3): 28010313512; 2021.

MATHIAS TTPA, SOUZA DSR, IKEDA CS, SILVA DPT. Sepsis: an evolution of concepts. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, 03: 32-46; 2019.

MCGONIGLE JE, PURVES J, ROLFF J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology*, 59: 34-38; 2016.

MELO GO, MUZITANO MF, LEGORA-MACHADO A. C-glycosylflavones from the área parts of *Eleusina indica* inhibit LPS-induced lung inflammation in mice. *Planta Medica*, 71(4): 362-363; 2005.

MUNIZ CPL, GIRALDIN O, MELO VMC. “Árvore da providência”; “refrigério da pobreza”. O universo cultural do babaçu no Bico do Papagaio. Universo Cultural da Palmeira Babaçu. 9-22; 2016.

MYHRSTAD MCW, CARLSEN H, NORDSTROM O, BLOMHOFF R, MOSKAUG JØ. Flavonoids increase intracellular glutathione levels by transactivating the promote of the catalytic subunit of glutamylcysteine synthetase.. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32: 386–393; 2002.

NAGAPRASHANTHA LD, VATSYAYAN R, SINGHAL J. "Anticancer effects of the new flavonoid vicienin-2 as a single agente and in synergistic combination with docetaxel in prostate câncer”. Biochemistry Pharmacology, 82 (9): 1100-1109; 2011.

NASCIMENTO FRF, BARROQUEIRO ESB, AZEVEDO APS, LOPES AS, FERREIRA SCP, SILVA LA, MACIEL MCG, RODRIGUEZ D, GUERRA RNM. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. Journal of Ethnopharmacology, 103: 53-58; 2006.

NAVARRO MO, SIMIONATO AS, PÉREZ JC, BARAZETTI AR, EMILIANO J, ANDRADE G. Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: in vitro activity against clinically important strains and in vivo efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Microbiology, 10: 2431; 2019.

NEOH CF, JEONG W, KONG DCM, SLAVIN MA. The antifungal pipeline for invasive fungal diseases: what does the future hold? Expert Review of Anti-infective Therapy, 21:577–594; 2023.

NICHOLAS C, BATRA S, VARGO MA, VOSS OH, GAVRILIN MA, WEWERS MD, GUTTDRIGE DC, GROTEWOLD E, DOSEFF AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and pro-inflammatory cytokines expression by inactivating NF-κB through the suppression of p65 phosphorylation. The Journal of Immunology, 179: 7121–712, 2007.

OLIVEIRA AS, NASCIMENTO JR, TROVÃO LO, ALVES PCS, MACIEL MCG, SILVA LDM, MARQUES AA, SANTOS APSA, SILVA LA, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM. The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. Journal of Ethnopharmacology, 236: 345-353; 2018.

OLIVEIRA CS, COLOMBO AL, FRANCISCO CE, LIMA B, GANDRA RF, CARVALHO MCP, CARRILHO CMDDM, PETINELLI R, PELISON M, HELBEL C. Clinical and epidemiological aspects of candidemia in eight medical centers in the state of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 25: 101041; 2022.

PAIXÃO LC, BORBA ERC, SOUSA IC, FILHO AKDB, COUTINHO DF, JUNIOR LMC, CARTAGENES MSS, BORGES MOR, RIBEIRO RM, ABREU IC, MONTEIRO FS, BORGES ACR. Pharmaceutical applications and bioproducts of babassu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng): review. Revista Ciências da Saúde 21(2); 2019.

PFALLER MA, DIEKEMA, DJ, TURNIDGE JD, CASTANHEIRA M, JONES RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6: 79–94; 2019.

PIRES HFM, RIBEIRO MS. Sepsis in an intensive care unit in a public hospital: study of prevalence, diagnostic criteria, risk and mortality factors. *Brazilian Journal of Development*, 6(7): 53755–53773; 2020.

PRIYA A, PANDIAN SK. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 11(756); 2020.

PUUMALA E, FALLAH S, ROBBINS N, COWEN LE. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. *Clinical Microbiology Review*, 37(1); 2024.

QUEIROZ KO. Potential of new drug delivery systems in the topical management of recurrent candidiasis in the vaginal mucosa. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, 8: 194-211, 2021.

RESENDE CAA, MERI JÚNIOR AE, CASTRO AP, BITTENCOURT WJM, RESENDE KA, MARCONDES HC. In vitro antifungal activity of *Mikania cf hirsutissima* ethanolic extract against *Candida albicans* isolates. *Research, Society and Development*, 5: e52811528494; 2022.

ROCHA MAR, CARVAHO CG, MAGALHÃES SR. The importance of oral hygiene in newborns kept in a Neonatal Intensive Care Center (CTI): an approach to invasive candidiasis. *Revista Uniabeu*, 12: 32; 2019.

ROCHA WRV, NUNES LE, NEVES MLR, XIMENES ECPA, ALBUQUERQUE MCPA. *Candida* genus - Virulence factors, epidemiology, candidiasis and resistance mechanisms. *Research, Society and Development*, 4: e43910414283; 2021.

RODRIGUES TJS. Cepas do complexo *Candida parapsilosis* de origem animal: classificação taxonômica, sensibilidade antifúngica e atributos de virulência in vitro. 2013 .41 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2013.

ROLLING T, ZHAI B, GJONBALAJ M. Haematopoietic cell transplantation outcomes are linked to intestinal mycobiota dynamics and an expansion of *Candida parapsilosis* complex species. *Nature Microbiology*, 6:1505–1515; 2021.

ROMO JÁ, KUMAMOTO CA. On Commensalism of *Candida*. *Journal of Fungi*. 6(1): 16; 2020.

ROSCETTO E, CONTURSI P, VOLLARO A, FUSCO S, NOTOMISTA E, CATANIA MR. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. *Scientific Reports*, 8: 17570; 2018.

SANTOS FDRP, BELFORT MGS, LUCENA VB, VIANA MB, DE CASTRO AA. Use of babassu coconut oil (*Attalea speciosa*) as an emollient in a phytocosmetic formulation with moisturizing action. *Revista Cereus*, 12(4); 2-13; 2020.

SANTOS GCO, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, CARTAGENES MSS, DUALIBE FILHO AK, NASCIMENTO FRF, RAMOS RM, PIRES ERB, ANDRADE MS, ROCHA FMG. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1351; 2018.

SEIBT ET, KUCHLER JC, ZONTA FNS. "Incidence and characteristics of Sepsis in an intensive care unit of a mixed hospital in Paraná". *Revista de Saúde Pública do Paraná*, 2(2); 2019.

SENEVIRATNE CJ, RAJAN S, WONG SW, TSANG DNC, LAI CKC, SAMARANAAKE LP, JIN L. Antifungal susceptibility in sérum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. *Frontiers of Microbiology*, 7; 2016.

SHUYUAN G, LINGBIN S, XIHUA W, XIRUI H, TAO L. Isoschaftoside inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglia by regulating HIF-1 α -mediated metabolic reprogramming. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022: 8; 2022.

SIDDIQUI ZN, FAROOQ F, MUSTHAFA TN, AHMAD A, KHAN AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of new halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17: 237–243; 2013.

SILVA AF, ROCHA CQ, SILVA LCN, CARVALHO JÚNIOR AR, MENDES INFV, ARARUNA AB, MOTTA EP, SILVA RDS, CAMPOS CDL, FARIAS JR. Antifungal and antivirulence activities of hydroalcoholic extract and fractions of *platonina insignis* leaves against vaginal isolates of *Candida* species. *Pathogens*, 9: 84; 2020.

SILVA BP, PARENTE JP. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia* 72: 887-893, 2001.

SILVA ICV, KALUDEROVIC G, OLIVEIRA PF. Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an enriched flavonoid extract from *Passiflora mucronata*. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(10):1405-1416; 2018.

SILVA LMN, RAPOSO LM, OLIVEIRA LPL, CARNEIRO RF, OLIVEIRA TA, SUGITA DM. The cost of hospitalization for sepsis based on the current protocol for managing the illness. *Revista Educação em Saúde*, 7(1): 47 -57; 2019.

SILVA MCP, BRITO JM, FERREIRA AS, VALE AAM, SANTOS APA, SILVA LA, PEREIRA PVS, NASCIMENTO FRF, NICOLETE R, GUERRA RNM. Antileishmanial and immunomodulatory effect of babassu-loaded PLGA microparticles: a useful drug target to *Leishmania amazonensis* infection. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine ECAM*, 1-14; 2018.

SILVA PES, FURTADO CO, DAMASCENO CA. Use of Medicinal Plants and Herbal Medicines in the Brazilian Public Health System: an Integrative Review. *Brazilian Journal of Development*, 7(12): 116235-116255; 2021.

SILVA S, NEGRI M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS, DW, AZEREDO J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2): 288-305; 2012.

SILVA SL, LIMA ME, SANTOS RDT, LIMA EO. Onychomycoses due to fungi of the genus *Candida*: a literature review. *Research, Society and Development*, 9(8), e560985771; 2020.

SILVA VC, BARBOZA JR, DUTRA RP, BATISTA MCA, VERAS KS, GODINHO JWLS, MESQUITA JWC, MESQUITA LSS, AMARAL FMM, RIBEIRO MNS. Identification of Phenolic Compounds by LC/MS-MS and Antioxidant and Anti Tyrosinase Activities of the *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng Mesocarp. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(1): 268-276, 2017.

SILVA, SL, MAÍSA EL, RAISSA DTS, OLIVEIRA EL. Onychomycoses due to fungi of the genus *Candida*: a literature review. *Research, Society and Development*, 9. 10.33448/rsd-v9i8.5771; 2020.

SOARES MCR, SILVA MCP, ALMEIDA-JUNIOR FADS, NASCIMENTO JR, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM. Effect of Babassu Mesocarp As a Food Supplement During Resistance Training. *Journal of medicinal food*, 24(4): 411–421; 2021.

SOUZA FMI, CHAIN AE, BORGIO M, STEFFANI SBT, ALMEIDA MM. *CANDIDA* sp, uma breve revisão bibliográfica. - *Revista Científica Saúde e Tecnologia*, 2(5), e25129; 2022.

SOUZA PAVR, PALUMBO JRA, ALVES LM, SOUZA VP, CABRAL LM, FERNANDES PD, TAKIYA CM, MENEZES FS, NASCIUTTI LE. Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on benign prostatic hyperplasia. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(1): 135-46; 2011.

SOUZA PC, MOREY AT, CASTANHEIRA GM, BOCATE KP, PANAGIO LA, ALMEIDA RS. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of Microbiological Methods*, 118: 182-186; 2015.

SOUZA SP, SEABRA JEA, NOGUEIRA LAH. Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. *Biofuels*, 9(4): 455-478; 2018.

SZERWIESKI LLD, CORTEZ DAG, BENNEMANN RM, SILVA ES, CORTEZ LER. Use of medicinal plants by elderly people in primary care. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, Goiânia, 19: 04; 2017.

TALAPKO J, JUZBAŠIĆ M, MATIJEVIĆ T, PUSTIJANAC E, BEKIĆ S, KOTRIS I, ŠKRLEC I. *Candida albicans* — The Virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2):79; 2021.

TEIXEIRA PRS, TEIXEIRA ASNM, FARIAS EAO, SILVA DA, NUNES LCC, LEITE CM S, SILVA FLHO EC, EIRAS C. Chemically modified babassu coconut (*Orbignya* sp.) biopolymer: characterization and development of a thin film for its application in electrochemical sensors. *Journal of Polymer Research*, 25: 127-138; 2018.

TÓTH R, NOSEK J, MORA-MONTES HM, GABALDON T, BLISS JM, NOSANCHUK JD, TURNER SA, BUTLER G, VÁGVÖLGYI C, GÁCSEK A. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2); 2019.

VIEIRA AJH, SANTOS JI. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungal's fluconazole, amphotericin B and caspofungin. *Brazilian Journal of Clinical Analyses*, 49(3): 235-239; 2017.

XIN H, MOHIUDDIN F, TRAN J, ADAMS A, EBERLE K. Experimental mouse models of disseminated *Candida auris* infection. *Msphere* 4, e00339-19; 2019.

WOO ER, POKHAREL YR, YANG JW, LEE SY, KANG, KW. Inhibition of nuclear factor- κ b activation by 2,1,811-biapigenin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 976–980; 2006.

YIN Y, YE L, NIU Z. "Anti-inflammatory effects of vicienin-2 on colitis induced by sodium dextran sulfate in mice". *Drug developer. Res*, 80(5): 546-555; 2019.

YORDANOV M, DIMIROVA P, PATKAR S. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Can. J. Microbio*, 54: 435 – 440, 2008.

ZHAI B, OLA M, ROLLING T. High-resolution microbiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. *Nature Medicine*, 26:59–64; 2020.

ZHANG Z, ZHAO Q, LIU T. Effect of vicienin-2 on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 129: 110474; 2020.

ANEXOS

ANEXO I - Sisgen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A6C0348

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

Número do cadastro: **A6C0348**

Usuário: **Rosane NM Guerra**

CPF/CNPJ: **756.037.807-20**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**

Finalidade do Acesso:



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Orbignya phalerata babaçu

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudo da atividade imunológica do Babaçu**

Equipe

Rosane NM Guerra

INDEPENDENTE

Data do Cadastro: **06/11/2018 18:57:25**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:39** de **23/09/2022**.



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

ANEXO II – Parecer da Plataforma Brasil sobre amostras clínicas de *Candida* spp.

UFMA - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO MARANHÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy L. CONTRA *Candida* spp.

Pesquisador: ELIZANGELA ARAUJO PESTANA MOTTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29660920.7.0000.5087

Instituição Proponente: Universidade Federal do Maranhão

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHÃO -
FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.956.307

Apresentação do Projeto:

Candida albicans apresenta uma flexibilidade de patogenicidade que é atribuída a vários fatores de virulência, dentre eles a capacidade de formar biofilme e produzir enzimas proteolíticas. *Vismia guianensis*, planta da região amazônica, tem apresentado interesse contra microorganismos e que possui atividade anti-candida. O objetivo do presente estudo será para explorar o potencial anti-candida diante desses fatores de virulência utilizando linhagem de *Candida albicans* (ATCC 10231) e linhagens clínicas cedidas por um laboratório denominadas de *Candida albicans* sensível (CAS) e *Candida albicans* resistente (CAR) ao fluconazol. O potencial anti-candida será avaliado pela realização dos testes de CIM, CFM, curva de crescimento, atuação sobre as exoenzimas secretadas biofilme e inibição da formação de hifas. Será avaliado, também, o efeito do extrato associado aos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol. Como resultados, espera-se ação fungicida do extrato para todas as cepas desse estudo, com o controle do crescimento semelhante aos controles positivos, Fluconazol e Anfotericina B, bem como a redução da formação do biofilme e que a espécie vegetal seja uma promissora alternativa para atividade antifúngica diante das espécies de *Candida*, quer seja de forma isolada ou associada ao tratamento convencional. Palavra-chave: *Candida*. *Vismia*. Tratamento.

ANEXO III – Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**CERTIFICADO (13/2022)**

Certificamos que a proposta intitulada: “**NATUMED - Desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais com atividade antimicrobiana**” Processo 23115.037939/2018-75, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 30 de setembro de 2018.

We certify that the proposal: “**NATUMED - Drug development from natural products with antimicrobial activity**”, Process 23115.037939/2018-75, under the responsibility of Prof. Dr. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of September 30, 2018.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 01/04/2022 a 31/12/2024

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da UFMA, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB e Universidade de Campinas – UNICAMP

Espécie: *Mus musculus* **Sexo:** Ambos **Idade:** 2-5 meses
 var Swiss, Balb/c **sexos** **Peso:** 25-45g
 e C57Bl/6

AMOSTRA
 1142 Swiss
 384 Balb/c
 384 C57Bl/6

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação CCBS-UFMA

São Luís, 31 de março de 2022

Bruno Araújo Serra Pinto
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Documento assinado digitalmente:
 Bruno Araújo Serra Pinto
 Data: 31/03/2022 14:57:00-0300
 Verifique em <https://verificador.itib.br>