



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE FARMÁCIA

LUANNA DE OLIVEIRA E LIMA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DI-HIDROJASMONA FRENTE  
CEPAS DE *Candida* spp. FLUCONAZOL RESISTENTES

JOÃO PESSOA – PB

Novembro - 2021

LUANNA DE OLIVEIRA E LIMA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DI-HIDROJASMONA FRENTE  
CEPAS DE *Candida* spp. FLUCONAZOL RESISTENTES

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Graduação em Farmácia, do Centro de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal  
da Paraíba, como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.  
Orientador: Prof. Dr. Felipe Queiroga  
Sarmiento Guerra

JOÃO PESSOA – PB

Novembro – 2021

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L732a Lima, Luanna de Oliveira e.

Atividade antifúngica de di-hidrojasmona frente cepas de candida spp. fluconazol resistentes / Luanna de Oliveira e Lima. - João Pessoa, 2021.

49 f. : il.

Orientação: Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.  
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Candida. 2. Produtos naturais. 3. Terpeno. 4. Antifúngico. I. Guerra, Felipe Queiroga Sarmiento. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 616.98

LUANNA DE OLIVEIRA E LIMA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DI-HIDROJASMONA FRENTE  
CEPAS DE *Candida* spp. FLUCONAZOL RESISTENTES

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Graduação em Farmácia, do Centro de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal  
da Paraíba, como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 25 de Novembro de 2021



---

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra  
Orientador



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloiza Helena Campana  
Examinador interno (DCF/CCS/UFPB)



---

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães  
Examinador interno (DCF/CCS/UFPB)

## DEDICATÓRIA

*Dedico o encerramento desse ciclo a minha vó, minha maior admiradora, que nos deixou esse ano precocemente. A senhora é a base dessa família e jamais será esquecida. Ainda é inacreditável não a ter aqui presente, mas sei que vai continuar nos protegendo com o terço na mão aonde estiver.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, quem me permitiu chegar até aqui, pela proteção, pelas oportunidades e por me dar forças para seguir apesar de tudo.

À minha vó, Eunice, que para sempre será parte de mim. Sei que herdei a força de uma mulher que criou sozinha cinco filhas com quase nada, e ainda teve força e amor para criar dez netos. Sempre foi e sempre será minha fã número um, e de alguma forma está e estará presente em todas as minhas conquistas.

À minha mãe, meu porto seguro, minha melhor amiga, agradeço por todo apoio, amor e admiração que sempre teve comigo. Você é o meu maior exemplo e motivo pelo qual quero ser sempre uma pessoa melhor, e almejo lhe proporcionar as melhores coisas na vida.

Ao meu pai por todos os esforços que foram essenciais para essa conquista. Por sua admiração, cuidado, e por acreditar em mim e me proporcionar as melhores condições dentro de seu alcance.

À toda minha família, irmão, tias, padrinho, primos, por acreditarem e torcerem tanto por mim. Obrigada tias por terem feito parte da minha criação. Obrigada por todos os momentos de reunião, de alegria, e por se manterem unidos acima de qualquer dificuldade.

À Alexandre, por todo companheirismo, cuidado, carinho e paciência. Compartilhei com você tantas angústias, preocupações, dúvidas e você sempre soube me acalmar mesmo distante. Tenho muito orgulho de você, e sou muito grata por ter você do meu lado. Obrigada por todo apoio, principalmente nesse ano.

Aos amigos de tantos anos, que sempre posso contar quando preciso. Kamila, por sempre estar do meu lado, me aconselhando, e me conceder a honra de ser madrinha de Matheus, seu filho. Nathália, pelos 10 anos de amizade, onde mesmo que passemos semanas sem nos falar nada nunca muda. Lucas e Rebecca por sempre me trazerem alegria, e por torcerem tanto por mim. A amizade de vocês é essencial na minha trajetória.

Aos meus afilhados, Pedro e Matheus por serem fonte de felicidade e esperança para mim.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, por me guiar até aqui, durante maior parte da minha graduação. Por toda a paciência e confiança conferida a mim, pela oportunidade de atuar na pesquisa e aprender tanto. Por ser um exemplo de profissional, mestre e ser humano. Obrigada por cada ensinamento, sem dúvidas, fundamentais para minha formação profissional.

Às minhas colegas de laboratório, Larissa e Mariana, que foram fundamentais na realização dos ensaios que alicerçaram esse trabalho.

Aos amigos que ganhei desde o início do curso, Cadu (minha dupla desde o começo), Cleyton, Camila, Géssyca, Lívia, Rickya e Thaíse. Vocês sem dúvidas tornaram momentos difíceis, suportáveis. Deus tá guardando futuros brilhantes para vocês, tenho certeza. Obrigada por tudo.

À Jadon, Myrelle e Radimila, com quem dividi tantos obstáculos nessa graduação. Agradeço por toda ajuda em cada disciplina e em cada burocracia que enfrentamos, e pela amizade que se formou a partir delas.

À turma de farmácia 2016.1 da UFPB, a melhor turma que o destino poderia ter me colocado. Cada um de vocês serão profissionais excepcionais! Obrigada por cada momento compartilhado, pelas risadas, pelas raivas, pelas festas, pelas revisões, pelos aprendizados. Tenho muito orgulho da nossa turma e dos laços que foram formados com ela.

À Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade de crescer profissionalmente através da minha formação e participação em projetos de extensão e pesquisas.

Aos professores Eloiza e Hemerson, por aceitarem o convite e comporem a minha banca, participando desse momento único na minha graduação.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DI-HIDROJASMONA FRENTE CEPAS DE *Candida spp.* FLUCONAZOL RESISTENTES, Luanna de Oliveira e Lima, Coordenação do curso de Farmácia, Trabalho de Conclusão de Curso, CCS/UFPB (2021).

## RESUMO

As candidíases são infecções fúngicas que têm como agente etiológico leveduras pertencentes ao gênero *Candida* e correspondem à aproximadamente 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas. Suas manifestações clínicas podem variar desde infecções cutâneo-mucosas até a forma sistêmica. O tratamento para as diferentes manifestações é cercado de dificuldades, devido os efeitos adversos, custo elevado dos antifúngicos e, ainda, o surgimento de espécies resistentes aos mesmos. Logo, a busca por novas alternativas de maior eficácia e segurança têm crescido, com destaque para o uso de produtos naturais e seus derivados, tais como os terpenos. Diante disso, o estudo avaliou a atividade antifúngica de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida spp.* Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM) pelo método de microdiluição em caldo e posteriormente foi analisado o mecanismo de ação da substância através do ensaio com o sorbitol e com o ergosterol exógeno. A CIM de di-hidrojasmona foi de 128 - 256 µg/mL, dependendo da cepa ensaiada, e os valores da CFM resultaram na razão CFM/CIM menor que 4 para todas as cepas testadas. Foi observado que o mecanismo de ação não ocorre por danos na parede celular, que este é, possivelmente, via ligação ao ergosterol presente na membrana. Dessa forma, observa-se que o terpeno apresenta atividade potencial frente cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol, sugere-se que este possa representar uma nova opção terapêutica no controle de *C. albicans* sendo necessário mais estudos a serem realizados, tais como de toxicidade.

Palavras-chave: *Candida*; produtos naturais; terpeno, antifúngico.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DI-HIDROJASMONA FRENTE CEPAS DE *Candida* spp. FLUCONAZOL RESISTENTES, Luanna de Oliveira e Lima, Coordenação do curso de Farmácia, Trabalho de Conclusão de Curso, CCS/UFPB (2021).

### **ABSTRACT**

Candidiasis are fungal infections whose etiological agent is yeast belonging to the *Candida* genus and account for approximately 80% of cases of systemic fungal infections. Its clinical manifestations can range from cutaneous-mucosal infections to the systemic form. The treatment for the different manifestations is fraught with difficulties, due to the adverse effects, high cost of antifungal agents and, also, the emergence of resistant species. Therefore, the search for new alternatives with greater efficacy and safety has grown, with emphasis on the use of natural products and their derivatives, such as terpenes. Therefore, the study evaluated the antifungal activity of dihydrojasnone against *Candida* spp. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined by the broth microdilution method and later the mechanism of action of the substance was analyzed through the assay with sorbitol and with exogenous ergosterol. The MIC of dihydrojasnone was 128 - 256 µg/mL, depending on the strain tested, and the MFC values resulted in a MFC/MIC ratio less than 4 for all strains tested. It was observed that the mechanism of action does not occur due to damage to the cell wall, which is possibly via binding to the ergosterol present in the membrane. Thus, it is observed that terpene has potential activity against *Candida* strains resistant to fluconazole, it is suggested that this may represent a new therapeutic option in the control of *C. albicans*, requiring further studies to be carried out, such as on toxicity.

## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD: Agar Sabouraud dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

COVID: Corona Virus Disease

DHJ: Di-hidrojasmona

DMSO: Dimetilsulfóxido

sp: espécie

spp: espécies

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

µg/mL: microgramas por mililitro

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1:</b> Micromorfologia de <i>Candida albicans</i> na ausência e presença de antifúngico .....	16
<b>Figura 2:</b> Agentes antifúngicos e seus locais de ação .....	19
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do monoterpene Di-hidrojasmona .....	22
<b>Quadro 1:</b> Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	24
<b>5.1</b> Efeito inibitório de di-hidrojasmona frente cepas de <i>Candida</i> spp. fluconazol resistentes .....	28
<b>Figura 1:</b> Estrutura química de di-hidrojasmona .....	31
<b>Quadro 1:</b> Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	32
<b>Tabela 1:</b> CIM e CFM da Di-hidrojasmona frente cepas de <i>Candida albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> .....	35
<b>Tabela 2:</b> Valores de CIM ( $\mu\text{g}/\text{MI}$ ) da Di-hidrojasmona (DHJ), na ausência e na presença de sorbitol (0.8 M) e ergosterol (400 $\mu\text{g}/\text{MI}$ ) frente <i>Candida</i> spp. ....	36

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	14
2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS .....	14
2.2 CANDIDÍASE E <i>Candida</i> spp. ....	15
2.3 TRATAMENTO .....	18
2.4 PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS .....	20
2.4.1 Terpenos: Di-hidrojasmona .....	21
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 LOCAL DA PESQUISA .....	24
4.2 MICRORGANISMOS .....	24
4.3 SUBSTÂNCIAS .....	24
4.4 INÓCULO .....	25
4.5 DETERMINAÇÃO DA CIM E CFM FRENTE CEPAS DE <i>Candida</i> .....	25
4.6 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO .....	26
4.6.1 AÇÃO SOBRE PAREDE CELULAR FÚNGICA (ENSAIO COM SORBITOL) .....	26
4.6.2 AÇÃO SOBRE O ERGOSTEROL PRESENTE NA MEMBRANA CELULAR FÚNGICA .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 EFEITO INIBITÓRIO DE DI-HIDROJASMONA FRENTE CEPAS DE <i>Candida</i> spp. FLUCONAZOL RESISTENTES .....	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
REFERÊNCIAS .....	41
ANEXOS .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas, à infecção sistêmica, nomeada candidemia. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. As espécies do gênero *Candida* mais isoladas são *Candida albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Estas enfermidades são oportunistas, de consequências graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos, tais como aqueles com neoplasias, transplantados ou mesmo os que se encontram em unidades de terapia intensiva (UTI) (LASS-FLÖRL; SAMARDZIC; KNOLL, 2021). Este cenário foi agravado no último ano pela pandemia COVID-19, sendo relatados casos da doença associada à candidemia, uma vez que o paciente apresenta as condições favoráveis para o desenvolvimento da infecção invasiva (FARIAS; SANTOS; DAMASCENO, 2021).

A terapêutica da candidíase é limitada pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Dentre os antifúngicos utilizados no tratamento de candidíases invasivas destacam-se os azólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina (MUSIOL; KOWALCZYK, 2012). Entretanto, todos apresentam adversidades relacionadas, com duração do tratamento extensa, toxicidade, além do custo, formando obstáculos na adesão do paciente e consequente controle da infecção (ANTINORI et al., 2016).

Outra problemática relacionada ao controle das candidíases é o aumento na incidência de cepas multirresistentes, tais como *C. albicans* e *C. parapsilosis* (MAGALHÃES; QUEIROZ-FERNANDES, 2020) São diversas as causas dessa resistência, por exemplo mudanças nas enzimas envolvidas no mecanismo de ação do antifúngico, capacidade de formar biofilme, dentre outras (ROCHA et al., 2021), e as espécies de *Candida* não *albicans* tem ganhado notoriedade nesse cenário (CHANG et al., 2017). Diante dessas adversidades, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias no uso racional dos antifúngicos e a busca de novas alternativas terapêuticas.

Os produtos naturais e seus derivados são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica. Devido sua abundância, fácil manuseio, e boa capacidade

biossintética, são muito utilizados em diversas áreas da indústria, e uma importante fonte para o desenvolvimento de novas moléculas, de maior eficácia e segurança. Nos últimos anos têm sido berço para esses estudos, resultando em novas opções promissoras de tratamentos, incluindo antifúngicos (SILVA et al., 2017; SIMÕES et al., 2007).

Dentre eles, os óleos essenciais são alvo dessa busca, e hoje há uma gama de atividades farmacológicas atribuídas a muitos de seus constituintes. São isolados das diversas partes das plantas, como folhas, flores, casca, caracterizados por serem óleos voláteis geralmente com odor agradável. Dentre seus derivados mais abundantes destacam-se os terpenos, que são metabólitos secundários que compreendem substâncias ricas em atividade nos processos patológicos devido sua diversidade biológica e química (SILVA FILHO et al., 2017; ZIELIŃSKA-BŁAJET; FEDER-KUBIS, 2020)

Di-hidrojasmona é um monoterpene extraído da casca de *Koelreuteria paniculata*, uma árvore da família *Sapindaceae*, e também das flores de *Carissa spinarum* L., pertencente à família *Apocynaceae*, muito utilizado na indústria de cosméticos como flavorizante, devido seu odor agradável. Existe relato na literatura da sua atividade antifúngica frente espécies de dermatófitos (PINTO, 2019) no entanto não há estudos de sua ação frente leveduras (FATIMA et al., 2013)

Dessa forma, com a perspectiva de encontrar um protótipo que faça parte de um tratamento mais eficaz e seguro para as diferentes manifestações da candidíase foi avaliado a atividade antifúngica *in vitro* da di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS

Embora as infecções bacterianas sejam estatisticamente mais predominantes que as infecções fúngicas, as manifestações clínicas de alguns gêneros revelam a necessidade de atenção para com esses fungos, principalmente os que possuem características oportunistas (SOUZA et al., 2020; WISE; SHTEYNShLYUGER, 2007).

Micoses oportunistas são infecções fúngicas que acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, e sua frequência vêm crescendo nos últimos anos. Muitos são os agentes que apresentam essa característica, como pertencentes ao gênero *Candida* spp., *Aspergillus* spp., à ordem *Mucorales*, dentre outros. O desenvolvimento de perfil de resistência aos antifúngicos de determinadas espécies, colabora para essa problemática. Como consequência, a gravidade das manifestações e desfecho do quadro clínico preocupa a comunidade científica (MAGALHÃES; QUEIROZ-FERNANDES, 2020).

A aspergilose é uma doença causada por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* spp, que apresenta diversas manifestações clínicas, dentre elas a aspergilose broncopulmonar alérgica, a bola fúngica (quando o fungo se aloja em cavidades no pulmão) e a aspergilose pulmonar invasiva (que possui maior taxa de agravamento) (DE MORAES-PINTO; FERRARINI, 2020). A fusariose causada pelo gênero *Fusarium* sp, é a segunda razão de micoses causadas por fungos filamentosos ficando atrás apenas da aspergilose, podendo apresentar variadas manifestações (NUCCI; ANAISSIE, 2007). Em muitos casos pode ocorrer inflamação ocular acarretando em perda da visão ou extração do órgão (PERINI et al., 2013).

Os pacientes que se encontram sendo assistidos em ambiente hospitalar são em grande parte acometidos por essas e outras micoses oportunistas, uma vez que têm predileção por organismos imunocomprometidos. São aquelas causadas por fungos que habitam livremente o ambiente, ou até mesmo que vivem em nossa microbiota da pele, cavidade oral ou trato gastrointestinal. Normalmente, estes microrganismos não causam danos à um hospedeiro imunocompetente, mesmo que o contato seja diário, mas a partir do momento que o indivíduo sofre uma imunossupressão essa relação

pode mudar, gerando dessa forma malefício ao indivíduo (RIVERO-LEZCANO; GONZÁLEZ-CORTÉS; MIRSAEIDI, 2019).

Adicionalmente, muitas infecções fúngicas têm sido observadas em associação à COVID-19, principalmente as oportunistas, como a mucormicose e candidíase. A coinfeção se explica principalmente pelo estado imunológico do paciente. O diagnóstico se torna bastante difícil, uma vez que o quadro geral do paciente já é crítico, e os sintomas se sobrepõem (FEITOZA et al., 2021; MAGALHÃES; QUEIROZ-FERNANDES, 2020; NEUFELD, 2020).

A mucormicose ou zigomicose é uma micose oportunista rara causada por fungos pertencentes à ordem Mucorales, incluindo os gêneros *Rhizopus spp*, *Mucor spp*, *Lichtheimia*. A manifestação da doença pode variar dentre pulmonar, gastrointestinal, disseminada, cutânea (mais comum) e cerebral. Durante a pandemia, surgiram relatos de associação entre as duas doenças em várias partes do mundo, incluindo o Brasil (FEITOZA et al., 2021; TAVARES et al., 2021). (MEKONNEN et al., 2021) relata que a hiperglicemia e a imunossupressão têm papel determinante na ocorrência da infecção por este fungo.

Com o avanço da pandemia do COVID-19 foram documentados casos desta doença associada ao desenvolvimento da candidemia, principalmente em pacientes hospitalizados (FARIAS; SANTOS; DAMASCENO, 2021) É possível fundamentar essa relação ao estado imune do indivíduo, uma vez que hospitalizado está sujeito à procedimentos invasivos, antibioticoterapia, dentre outros cenários. A COVID costuma desenvolver quadro mais grave em pacientes com comorbidades anteriores, como diabetes e obesidade, fatores de risco também relacionados ao desenvolvimento da candidemia (MILLER; ENGLUND, 2020; SILVA et al., 2012).

## **2.2 CANDIDÍASE e *Candida* spp.**

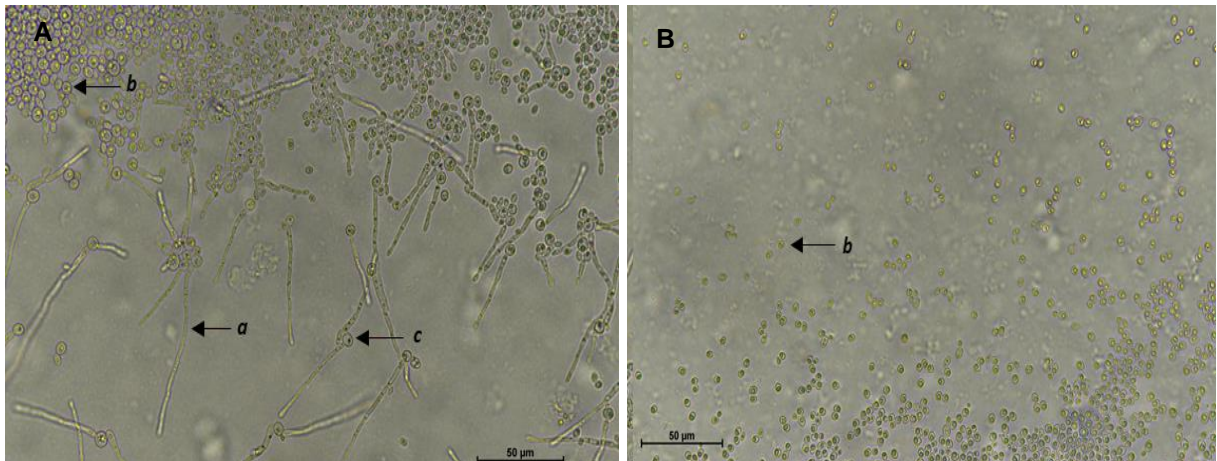
Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* estão presentes na microbiota humana de forma comensal podendo estar em contato com o ser humano constantemente, entretanto é o maior causador de infecções fúngicas no mundo. Sua capacidade de gerar infecção está diretamente relacionada com o estado imunológico do hospedeiro e por isso são patógenos oportunistas. Além disso, os fatores de

virulência e mecanismo de resistência expressos pelo fungo contribuem para essa capacidade (PAPPAS et al., 2018).

O gênero *Candida* pertence à família *Cryptococcaceae*, e por pertencer ao reino fungi apresenta estrutura celular característica, como presença de quitina na parede celular e membrana citoplasmática fosfolipídica constituída de ergosterol, e em condições ideais crescem em forma de blastoconídios. Cerca de 200 espécies são documentadas pertencentes a este gênero, e dentre elas 20 são patogênicas, sendo as de maior incidência a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. (PAPPAS et al., 2018; ROCHA et al., 2021).

Na figura 1 é possível observar a micromorfologia característica (A), com desenvolvimento de extensas pseudo-hifas, média de 20 por campo visual, e também podem ser observados clamidioconídios. Já na presença da nistatina (B) é possível observar alterações na forma dos blastoconídios que se apresentaram piriformes, ovóides e com perda de citoplasma, além de ausência de clamidioconídio.

**Figura 1:** Micromorfologia de *Candida albicans* na ausência e presença de antifúngico



Fonte: Próprio autor

Legenda: (a) Pseudo-hifa; (b) Blastoconídio; (c) Clamidioconídio;

A espécie de maior ocorrência é a *Candida albicans*, e há tempos atrás acreditava-se que ela era a única espécie patogênica do gênero. Uma das principais causas disto, é a sua capacidade de colonizar quase todos os tecidos humanos, mesmo que de características diferentes. Na maioria dos casos a espécie é isolada de amostras da cavidade oral, seu sítio de acometimento mais comum. Embora a alta

incidência e morbidade, *C. albicans* não apresenta alta mortalidade (PEIXOTO et al., 2014).

Porém hoje as candidíases causadas por espécies não *albicans* têm alertado especialistas, sendo *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* as de maior ocorrência (CASTANHEIRA et al., 2016). *C. parapsilosis* apresenta alta capacidade de formar biofilme e de adesão, que conferem à espécie potencial patogênico e um perfil de resistência aos antifúngicos. Esses fatores explicam seu alto isolamento em dispositivos intravasculares, sendo muito comum em amostra clínica de neonatos (BESSA et al., 2021; SOUSA et al., 2020).

O isolamento dessas espécies tem sido associado a um perfil de resistência aos principais antifúngicos utilizados, gerando maiores dificuldades na eficiência terapêutica (OLIVEIRA et al., 2014). Esta está entre as maiores adversidades que cercam as diferentes manifestações do gênero *Candida*. (RODRIGUES et al., 2017), vinculou a alta taxa de mortalidade de *C. glabrata* principalmente à sua alta resistência aos antifúngicos utilizados na terapêutica, além de seus fatores de virulência. A espécie possui aptidão em produzir fosfolipases e hemolisina, e principalmente uma alta capacidade de formação de biofilme. Esses fatores somados ao estado imune do paciente geram agravamento do quadro.

A discussão da multirresistência de cepas de *Candida* spp. ganhou força com a identificação de uma nova espécie patogênica, *Candida auris*, primeiramente no Japão em 2009. Foi identificada pela primeira vez no Brasil apenas em 2020, de uma cultura de ponta de cateter em paciente acometido por COVID-19 (ANVISA, 2020).

Apesar do isolamento recente, sabe-se que a espécie pode ser confundida com outras leveduras, sendo necessário realizar seu sequenciamento genético para correto diagnóstico, o que leva a crer que ocorra subnotificação desses casos. Possui fatores de virulência que conferem sua alta capacidade de gerar infecção, ganhando a via sistêmica, como adesão ao tecido do hospedeiro, capacidade de formar biofilme e secretar enzimas extracelulares (MACHADO; DALMOLIN; BRANDÃO, 2021; PASQUALOTTO; SUKIENNIK; MEIS, 2019).

As manifestações clínicas provocadas por esses fungos são bem variadas. A mais comum é a candidíase mucocutânea, manifestação superficial que afeta as mucosas oral ou vaginal, além de outras regiões úmidas do corpo, como espaços interdigitais, região inframamária. A candidíase vulvovaginal é o diagnóstico mais

comum na rotina da ginecologia, acometendo mais de 50% das mulheres pelo menos uma vez na vida. Na candidíase oral as lesões podem ser leves, agudas ou crônicas, de aspecto variável, e o principal agente etiológico é a *C. albicans* (PEIXOTO et al., 2014; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

A candidemia é a infecção fúngica invasiva, quando se dissemina pela corrente sanguínea, sendo a forma clínica mais alarmante. Pode acontecer via endógena, causada pelas leveduras comensais da microbiota humana que se tornam oportunistas de acordo com a condição do sistema imune do paciente. Também por via exógena, por contaminação do fungo presente no ambiente, principalmente nosocomial. Torna-se muito mais incidente em pacientes hospitalizados, com internação prolongada, submetidos à procedimentos invasivos e em uso de antibióticos de amplo espectro (PAPPAS et al., 2018; PEIXOTO et al., 2014).

### **2.3 TRATAMENTO**

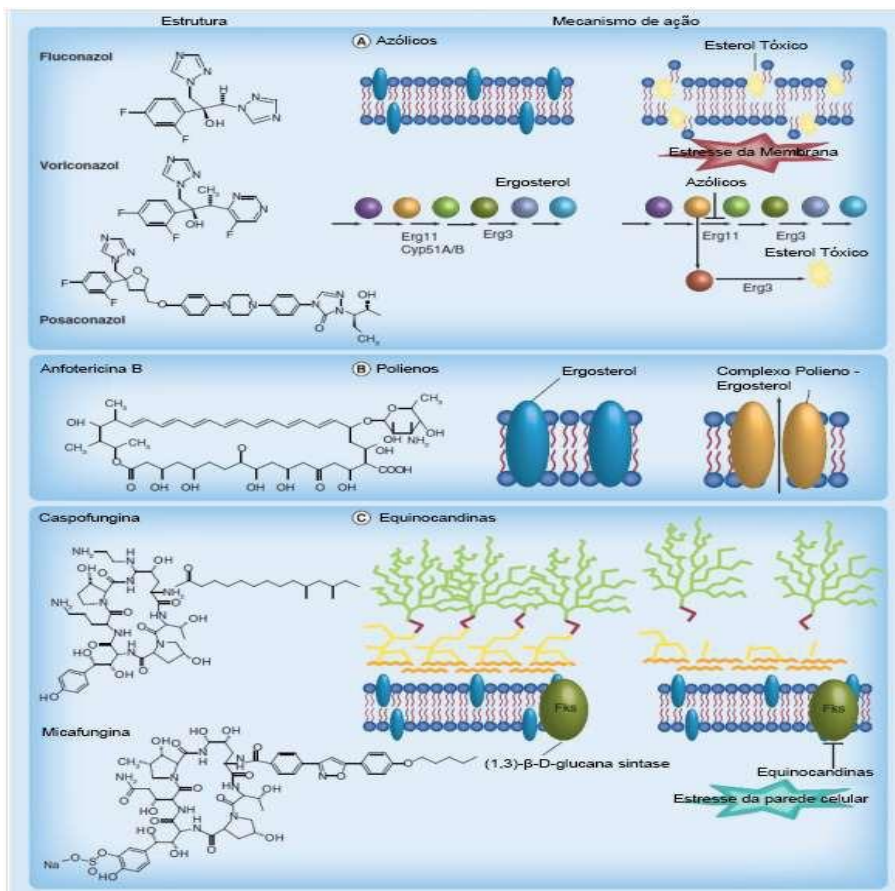
Para combater a alta mortalidade da infecção sistêmica, além de um diagnóstico prematuro e preciso é de suma importância um tratamento antifúngico adequado. E para atingi-lo torna-se cada vez mais necessária a identificação da espécie causadora, e a realização de testes de susceptibilidade, para seleção da terapêutica efetiva (CHANG et al., 2017; PEIXOTO et al., 2014). O tratamento apresenta atualmente três classes de antifúngicos principais.

Os azólicos atuam inibindo enzimas presentes na membrana fúngica, responsáveis pela biossíntese do ergosterol, principal esteroide pertencente a membrana (Figura 2). Dessa forma, a estrutura e fluidez desta ficam comprometidas, bem como o poder de crescimento do fungo. A classe dispõe de representantes como fluconazol, itraconazol, voriconazol, além dos imidazólicos miconazol e cetoconazol, dentre outros (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

Na infecção invasiva, o azólico mais utilizado é o fluconazol, um antifúngico triazólico que apresenta boa penetração em tecidos, inclusive no cefalorraquidiano, e por essa razão é muito administrado nos casos de meningite fúngica. Os azólicos formam um grupo de antifúngicos fungistáticos, ou seja, inibem o crescimento fúngico sem causar morte, e isso colabora com o desenvolvimento de resistência a longo prazo (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Os mecanismos relacionados a essa resistência se dão pela expressão aumentada da expressão de bombas de efluxo de drogas (diminuindo a concentração do antifúngico no interior da célula), a maior expressão e modificação na estrutura de sítios alvos (modificando a afinidade do antifúngico com a enzima), além da formação de biofilme (criando uma barreira que impede o contato com o antifúngico) (ROCHA et al., 2021).

**Figura 2:** Agentes antifúngicos e seus locais de ação



Fonte: Reproduzido de Xie, Polvi, Shekhar-Guturja e Cowen (2014).

Já os derivados poliênicos possuem atividade fungicida, embora seu alvo de ação também seja o ergosterol da membrana plasmática (Figura 2). Isso porque ao se ligarem ao esterol formam poros na membrana, o que acarreta na perda da integridade da mesma, e consequente extravasamento do conteúdo intracelular, causando assim a morte celular (CHUDZIK et al., 2015).

Os principais representantes da classe são a nistatina (tratamento tóxico) e a anfotericina B, muito utilizada nos casos de infecções sistêmicas graves e apenas em

ambiente hospitalar, uma vez que sua administração é via endovenosa. Seu uso causa efeitos adversos debilitantes para o paciente, como náuseas, febre, além de ser nefrotóxico, gerando mais uma problemática na busca de um tratamento efetivo (PEIXOTO et al., 2014).

A resistência a essa classe é bem menos relatada, mas está relacionada com a diminuição da expressão das enzimas alvo. Sendo assim, cepas que apresentem uma baixa quantidade de ergosterol em sua estrutura, tem maior propensão a desenvolver resistência ao derivado poliênico. Isto pode acontecer também devido ao uso prévio de agentes inibidores da biossíntese do ergosterol, como os azóis (CHANG et al., 2017; XIE et al., 2014).

Outra classe usada na terapêutica são as equinocandinas, fármacos de primeira escolha no tratamento das candidemia, que possui a caspofungina como principal representante. Ao inibir a enzima (1,3)- $\beta$ -D-glucana sintase (Figura 2) impede a síntese de componentes da parede celular fúngica prejudicando sua integridade e assim, resulta em lise celular. Trata-se da última classe de antifúngicos lançadas com uso na clínica (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

O mecanismo de resistência relacionado à essa classe se dá por mutação no gene que forma a enzima alvo do antifúngico. São casos raros, porém têm aumentado os relatos dessa resistência principalmente de cepas *C. glabrata*, espécie de conhecida multirresistência (CHANG et al., 2017).

Diante disso, as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos principalmente a base de plantas medicinais vêm ganhando força, despertando interesse não só de pesquisas farmacêuticas como também de química de produtos naturais, que estão sendo solicitados para avaliar diferentes produtos e seus derivados, como metabólitos secundários. Dessa forma, é possível avaliar atividade desses contra agentes patológicos e conseqüentemente produzir novas fontes de combate mais eficazes e seguras (JESUS et al., 2019).

## **2.4 PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS**

O uso de plantas medicinais para a contenção de enfermidades e alívio de sintomas sempre esteve presente na rotina do ser humano, e se confunde com a história da própria farmácia. São definidas como plantas que possuem princípios

ativos com capacidade de interferir no funcionamento do organismo (SILVA et al., 2017). Seu uso popular tem aumentado devido a disseminação de informações pela comunidade científica, papel importante também na conscientização da possível toxicidade desses produtos, bem como na comprovação técnica das propriedades, que antes eram conhecidas apenas através da prática popular (LACERDA et al., 2013).

A utilização dos seus derivados no âmbito da ciência, principalmente no desenvolvimento de novos fármacos vem crescendo, devido sua gama de propriedades relatadas na literatura (NUNES; BERNARDINO; MARTINS, 2015). Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais que são misturas de óleos voláteis, lipofílicos, providos de odores e normalmente líquidos. Estes são encontrados nas diversas partes das plantas como folhas, caule, flores, e são ricos em constituintes que caracterizam suas propriedades terapêuticas (SIMÕES et al., 2007).

O mecanismo de ação pelo qual um óleo essencial age frente fungos é difícil de ser definido por possuírem uma mistura complexa de componentes que muitas vezes podem atuar em sinergismo. Na literatura estão descritos diferentes mecanismos, sendo a interação com membrana interferindo na permeabilidade celular e patogenicidade do fungo, a mais predominante (FLORES; BECK; DA SILVA, 2016).

Os fitoconstituintes dos óleos essenciais apresentam uma grande variedade química, tais como, ésteres, fenóis, cumarinas, lactonas, todos muito utilizados na indústria farmacêutica. Porém, os terpenóides são os compostos mais abundantes, além de serem a principal fonte de estudo na busca de novos antimicrobianos, bem como na produção agrícola e alimentícia, saneantes e cosméticos, e muitas outras finalidades, devido sua diversidade biológica e química (BAKKALI et al., 2008; FLORES; BECK; DA SILVA, 2016).

#### **2.4.1 Terpenos: di-hidrojasmona**

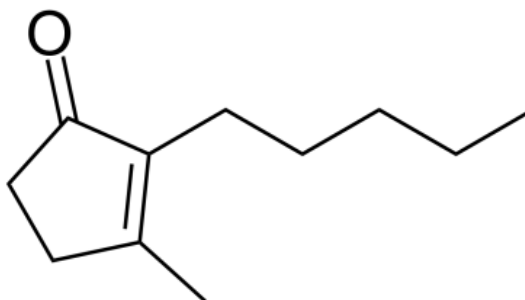
Os terpenos são classificados de acordo com as unidades isoprênicas ( $C_5H_8$ ) que constituem sua estrutura. Isto é, hemiterpenos possuem 1 unidade, monoterpenos possuem 2 unidades, sesquiterpenos 3 unidades, e assim sucessivamente para diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (quando possuírem mais que 8 unidades) (FELIPE; BICAS, 2017). Os monoterpenos são compostos que apresentam 10 carbonos em sua estrutura e baixo peso molecular, correspondendo a um grupo

maior e mais diversificado. Por esse motivo a maioria destes compõem os óleos essenciais (ZIELIŃSKA-BŁAJET; FEDER-KUBIS, 2020).

São relatadas diversas atividades atribuídas a monoterpenos conhecidos até o presente momento. (FERNANDES et al., 2020), avaliou a atividade antiprotozoária *in silico* do monoterpeno ascaridiol, presente em diversas plantas como *Chenopodium ambrosioides* L. de nome popular erva-de-santa-maria, atestando uma boa ação frente parasitas como Leishmania, corroborando com diversos outros estudos da literatura. Assim como esta, são relatadas outras atividades atribuídas a monoterpenos, como antinociceptiva (PRÓSPERO et al., 2019), anti-inflamatória (ROMERO; ROMERO, 2014), antiviral (KAZIYAMA; FERNANDES; SIMONI, 2012), broncodilatadora (GALAN et al., 2020), antifúngica (SOUSA et al., 2020), dentre muitas outras.

Objeto de estudo deste trabalho, di-hidrojasmona (Figura 3) é um monoterpeno que apresenta fórmula molecular  $C_{11}H_{18}O$  e peso molecular 166,26 g/mL. É extraído da casca de *Koelreuteria paniculata*, uma árvore da família *Sapindaceae*, de origem oriental. Também é encontrada nas flores de *Carissa spinarum* L., pertencente à família *Apocynaceae*, muito encontrada na Índia. O terpeno é empregado na indústria de cosméticos e alimentos como flavorizante, devido suas características organolépticas (FATIMA et al., 2013; NCBI, 2021). (PINTO, 2019) relatou sua atividade antifúngica frente dermatófitos, porém não há descrição na literatura de sua atividade frente espécies de *Candida*.

**Figura 3:** Estrutura química do monoterpeno Di-hidrojasmona



Fonte: Reproduzido/Adaptado <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62378>>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a atividade antifúngica do monoterpene di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *C. parapsilosis fluconazol resistentes*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- Verificar seu mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica na presença de um protetor osmótico;
- Avaliar sua ação sobre a membrana fúngica na presença do ergosterol exógeno.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB.

### 4.2 MICRORGANISMOS

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas a *C. albicans* ATCC 76485 (American Type Culture Collection) e cepas clínicas de *C. albicans* LM-587, *C. albicans* LM-616, bem como cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* LM-439, *C. parapsilosis* LM-5770, *C. parapsilosis* LM-55117. Estas possuem o respectivo perfil de sensibilidade, exposto no Quadro 1 (CLSI, 2008). Assim, segundo critério estabelecidos pelo documento M27A2 todas as cepas ensaiadas são resistentes ao fluconazol.

**Quadro 1:** Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*

	Cepas	Anfotericina B	Fluconazol
		CIM (µg/mL)	
<i>C. albicans</i>	ATCC 76485	0,25 (S)	32 (R)
	LM-616	0,25 (S)	64 (R)
	LM-587	0,25 (S)	16 (R)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	0,25 (S)	16 (R)
	LM-439	0,50 (S)	32 (R)
	LM-5770	0,25 (S)	64 (R)
	LM-55117	0,50 (S)	32 (R)

Legenda: (S): Sensível; (I): Sensibilidade intermediária; (R): Resistente; segundo documento M27A2, CLSI (2008)

### 4.3 SUBSTÂNCIAS

O Di-hidrojasmona, objeto de estudo, foi escolhido após a realização de uma triagem de diversos terpenos, onde este apresentou resultados mais satisfatórios frente cepas de *Candida* spp. Os meios de cultura utilizados são: Agar Sabouraud dextrose (ASD), Agar Arroz e RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, adquiridos via Sigma-aldrich®. Todos foram preparados conforme orientações do fabricante. A Di-hidrojasmona, antifúngico anfotericina B, ergosterol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tween 80 também foram oriundos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Sorbitol foi adquirido da VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ.

#### **4.4 INÓCULO**

As suspensões foram preparadas a partir de culturas recentes semeadas em ASD e incubadas a 35°C durante 48 horas. Após a incubação, foi transferido aproximadamente 5 colônias (com uma alça estéril) para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0.85 %). agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi padronizada com o tubo de 0.5 na escala de McFarland. A concentração final obtida foi de  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) (CLSI, 2008; SVETAZ et al., 2010).

#### **4.5 DETERMINAÇÃO DA CIM E CFM FRENTE CEPAS DE CANDIDA**

A CIM de di-hidrojasmona, bem como do antifúngico anfotericina B foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®), descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, com algumas modificações. A emulsão da Di-hidrojasmona foi preparada utilizando DMSO e Tween 80, sendo sua concentração de teste variando entre 1024 µg/mL e 0,5 µg/mL. A anfotericina B (controle positivo) foi utilizada nos ensaios em concentrações que variam de 16 a 0,0156 µg/mL.

Controles de viabilidade microbiana, esterilidade do meio e dos solventes utilizados para preparação do composto também foram realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas são então incubadas à 35°C durante 24h.

Após esse tempo, a leitura foi realizada visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico de pelo menos 50% das cepas ensaiadas. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios.

A atividade antifúngica dos produtos naturais foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios:  $\leq 500 \mu\text{g/mL}$  = atividade forte/ótima; 600 - 1500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade moderada; acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade fraca ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004).

Após leitura da CIM, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram adicionadas em meio ágar Sabouraud dextrose e incubadas à  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração do composto em que não acontecerá crescimento de UFCs no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I., 2008).

## **4.6 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO**

### **4.6.1 Ação sobre parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)**

Este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Para a determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, utilizou-se do meio RPMI 1640 sem sorbitol ou previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico convencional com conhecida ação sobre a parede celular, a caspofungina. As placas foram seladas e incubadas em temperatura e tempo adequados à espécie para posterior leitura (ESCALANTE et al., 2008; FROST et al., 1995).

### **4.6.2 Ação sobre o ergosterol presente na membrana celular fúngica**

Outro alvo de ação do produto testado pode ser o ergosterol da membrana celular. Utiliza a metodologia de microdiluição, descrita anteriormente, na presença e na ausência do ergosterol exógeno. Neste caso, o RPMI 1640 é acrescido do ergosterol exógeno numa concentração de 400 µg/mL, e ao realizar a leitura, os valores da CIM são comparados na sua presença e na ausência do mesmo. Assim, o ensaio revela propriedade que o produto tem afinidade pelo ergosterol que compõe a membrana celular fúngica ou não. Para o controle positivo, foi realizado o mesmo ensaio com a anfotericina B, uma vez que essa possui o ergosterol da membrana celular como alvo farmacológico (ESCALANTE et al., 2008).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ARTIGO: Efeito inibitório de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp. fluconazol resistentes

Inhibitory Effect of di-hydrojasmonone against strains of *Candida* spp. fluconazole – resistant

Efecto inibidor de la dihidrojasmona contra *Candida* spp. resistente al fluconazol

#### Resumo

**Introdução:** A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas à infecção sistêmica. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. A terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias.

**Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica in vitro do monoterpene di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* fluconazol resistentes.

**Metodologia:** As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelo método de microdiluição. Posteriormente foi observado se a ação antifúngica de di-hidrojasmona ocorre via parede celular (ensaio com sorbitol) ou via membrana (ensaio com ergosterol exógeno).

**Resultados:** A di-hidrojasmona apresentou uma CIM entre 128 - 256 µg/mL e a CFM teve os mesmos valores de CIM, respectivamente. No ensaio com ergosterol exógeno, a CIM da di-hidrojasmona aumentou na presença do ergosterol exógeno sugerindo que o mecanismo de ação do monoterpene ocorre a partir de sua ligação ao ergosterol presente na membrana. Não houve alteração frente ao uso do sorbitol.

**Conclusão:** Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstra que di-hidrojasmona possui forte atividade antifúngica e sugere que esta atividade esteja relacionada a sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Logo, di-hidrojasmona demonstra ser um promissor bioproducto na busca de alternativas para o tratamento das candidíases.

**Palavras-chave:** Candidíase; Monoterpene; Produtos naturais; Antifúngico.

## Abstract

**Introduction:** Candidiasis is related to a wide variety of clinical manifestations that are expressed from skin and mucosal infections to systemic infection. The latter being associated with a high global mortality rate, ranging from 36% to 63% in different groups of patients. The therapy of invasive fungal infections is limited, as there are only three classes of conventional drugs used. In this scenario, strategies for the rational use of antifungal agents and the search for new therapeutic alternatives are necessary.

**Objective:** To evaluate the in vitro antifungal activity of the monoterpene dihydrojasmane against fluconazole resistant strains of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

**Methodology:** The minimal inhibitory (MIC) and minimal fungicidal (MFC) concentrations were determined by the microdilution method. It was later observed whether the antifungal action of dihydrojasmane occurs via the cell wall (sorbitol assay) or via membrane (exogenous ergosterol assay).

**Results:** Dihydrojasmane had a MIC between 128 - 256 µg/mL and MFC had the same MIC values, respectively. In the assay with exogenous ergosterol, the MIC of dihydrojasmane increased in the presence of exogenous ergosterol, suggesting that the mechanism of action of monoterpene occurs through its binding to ergosterol present in the membrane. There was no change regarding the use of sorbitol.

**Conclusion:** Based on these results, the present study demonstrates that dihydrojasmane has strong antifungal activity, and suggests that this activity is related to its binding to ergosterol in the fungal membrane. Therefore, dihydrojasmane proves to be a promising bioproduct in the search for alternatives for the treatment of candidiasis.

**Keywords:** Candidiasis; Monoterpene; Natural products; Antifungal.

## Resumen

**Introducción:** La candidiasis se relaciona con una amplia variedad de manifestaciones clínicas que se expresan desde infecciones cutáneas y mucosas hasta infecciones sistémicas. Esta última se asocia a una alta tasa de mortalidad global, que oscila entre el 36% y el 63% en diferentes grupos de pacientes. La terapia de las infecciones fúngicas invasivas es limitada ya que solo se utilizan tres clases de fármacos convencionales. En este escenario, son necesarias estrategias para el uso racional de agentes antifúngicos y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

**Objetivo:** Evaluar la actividad antifúngica in vitro de la monoterpene dihidrojasmona

frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* resistentes al fluconazol.

**Metodología:** Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas fungicidas (CMF) se determinaron mediante el método de microdilución. Posteriormente se observó si la acción antifúngica de la dihidrojasmona se produce a través de la pared celular (ensayo de sorbitol) o mediante la membrana (ensayo de ergosterol exógeno).

**Resultados:** La dihidrojasmona tuvo una CMI entre 128 - 256 µg / mL y CMF tuvo los mismos valores de CMI, respectivamente. En el ensayo con ergosterol exógeno, la CMI de dihidrojasmona aumentó en presencia de ergosterol exógeno, lo que sugiere que el mecanismo de acción del monoterpeno se produce a través de su unión al ergosterol presente en la membrana. No hubo cambios con respecto al uso de sorbitol.

**Conclusión:** Con base en estos resultados, el presente estudio demuestra que la dihidrojasmona tiene una fuerte actividad antifúngica y sugiere que esta actividad está relacionada con su unión al ergosterol en la membrana fúngica. Por tanto, la dihidrojasmona resulta ser un bioproducto prometedor en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la candidiasis.

**Palabras clave:** Candidiasis; Monoterpeno; Productos naturales; Antifúngico.

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas à infecção sistêmica. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. As espécies do gênero *Candida* mais isoladas são *C. albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Estas enfermidades são oportunistas, causando doenças graves, principalmente, em pacientes imunossuprimidos, tais como aqueles com neoplasias, transplantados ou mesmo os que se encontram em unidades de terapia intensiva (UTI), cenário agravado no último ano pela pandemia COVID-19 (FARIAS; SANTOS; DAMASCENO, 2021; LASS-FLÖRL; SAMARDZIC; KNOLL, 2021).

A terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada, pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se os azólicos, como fluconazol,

derivados poliênicos, como anfotericina B, e do grupo das equinocandinas, a caspofungina (MUSIOL; KOWALCZYK, 2012).

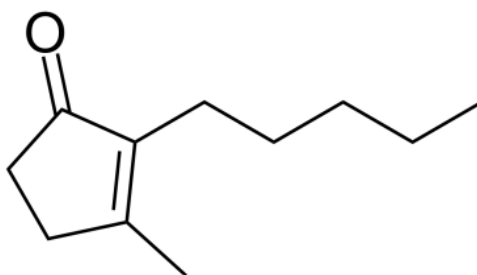
Entretanto, todas possuem inconvenientes, com duração extensa do tratamento, toxicidade, além do custo, se tornam obstáculos na adesão do paciente (ANTINORI et al., 2016). Adicionalmente, observa-se um aumento na incidência de cepas multirresistentes, tais como *C. albicans* e *C. parapsilosis* (CHANG et al., 2017).

Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. Os produtos naturais e seus derivados são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica. Devido sua abundância, fácil manuseio, e boa capacidade biossintética, estes são uma importante fonte para o desenvolvimento de novas moléculas, de maior eficácia e segurança. Nos últimos anos esses produtos e seus derivados têm sido berço para esses estudos, resultando em novas opções promissoras de tratamento, incluindo antifúngicos (SCORZONI et al., 2016).

Dentre os derivados destacam-se os terpenos, que são metabólitos secundários presentes abundantemente na natureza, e que compreendem substâncias de importante função nos processos patológicos (SILVA FILHO et al., 2017).

Di-hidrojasmona é um monoterpreno de peso molecular (PM) de 166,26 g/mol, extraído da casca de *Koelreuteria paniculata*, uma árvore da família *Sapindaceae*, e também das flores de *Carissa spinarum* L., pertencente à família *Apocynaceae*, (Figura 1) muito utilizado na indústria de cosméticos como flavorizante, devido seu odor agradável. Existe relato na literatura da sua atividade antifúngica frente espécies de dermatófitos (PINTO, 2019) no entanto não há estudos de sua ação frente as leveduras.

**Figura 1:** Estrutura química de di-hidrojasmona



Fonte: Reproduzido de NCBI, 2021.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* fluconazol resistentes.

## 2. METODOLOGIA

### Microrganismos

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas a *C. albicans* ATCC 76485 (*American Type Culture Collection*) e cepas clínicas de *C. albicans* LM-587, *C. albicans* LM-616, bem como cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* LM-439, *C. parapsilosis* LM-5770, *C. parapsilosis* LM-55117. Estas possuem o respectivo perfil de sensibilidade, exposto no Quadro 1 (CLSI, 2008). Assim, segundo critério estabelecidos pelo documento M27A2, todas as cepas ensaiadas são resistentes ao fluconazol.

**Quadro 1:** Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Cepas	Anfotericina B	Fluconazol	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		
<i>C. albicans</i>	ATCC 76485	0,25 (S)	32 (R)
	LM-616	0,25 (S)	64 (R)
	LM-587	0,25 (S)	16 (R)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	0,25 (S)	16 (R)
	LM-439	0,50 (S)	32 (R)
	LM-5770	0,25 (S)	64 (R)
	LM-55117	0,50 (S)	32 (R)

Legenda: (S): Sensível; (I): Sensibilidade intermediária; (R): Resistente.

### Reagentes

Os meios de cultura utilizados foram: Agar Sabouraud dextrose (ASD), Agar Arroz e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem

bicarbonato de sódio, adquiridos via Sigma-aldrich®. Todos foram preparados conforme orientações do fabricante. A di-hidrojasmona, antifúngico anfotericina B, ergosterol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tween 80 também foram oriundos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O sorbitol foi adquirido da VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ.

### **Inóculo**

As suspensões foram preparadas a partir de culturas recém semeadas em ASD e incubadas a 35 °C durante 48 horas. Após a incubação, foi transferido aproximadamente 5 colônias (com uma alça estéril) para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0.85 %), e agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi padronizada com o tubo de 0.5 na escala de McFarland. A concentração final obtida foi de  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) (CLSI, 2008; SVETAZ et al., 2010).

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima e (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima CFM**

A CIM de di-hidrojasmona, bem como do antifúngico anfotericina B foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®), descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008, com algumas modificações. A emulsão da di-hidrojasmona foi preparada utilizando DMSO e Tween 80, sendo sua concentração de teste variando entre 1024 µg/mL e 0,5 µg/mL. A anfotericina B (controle positivo) foi utilizada nos ensaios em concentrações que variam de 16 a 0,0156 µg/mL.

Controles de viabilidade microbiana, esterilidade do meio e dos solventes utilizados para preparação do composto também foram realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram então incubadas à 35 °C durante 24h. Após esse tempo, a leitura foi realizada visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico de pelo menos 50% das cepas ensaiadas. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios.

A atividade antifúngica dos produtos naturais foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios:  $\leq 500 \mu\text{g/mL}$  = atividade forte/ótima;  $600 - 1500 \mu\text{g/mL}$  = atividade moderada; acima de  $1500 \mu\text{g/mL}$  = atividade fraca ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004).

Após leitura da CIM, alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram adicionadas em meio ágar Sabouraud dextrose e incubadas à  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração do composto em que não acontecerá crescimento de UFCs no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I., 2008)

#### **Ação sobre parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)**

Este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a  $0,8 \text{ M}$ , um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos.

Para a determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, utilizou-se do meio RPMI 1640 sem sorbitol ou previamente adicionado de sorbitol ( $\text{PM} = 182,17$ ) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico convencional com conhecida ação sobre a parede celular, a caspofungina. As placas foram seladas e incubadas durante 48 horas à  $35\text{-}37^\circ\text{C}$  para posterior leitura (ESCALANTE et al., 2008; FROST et al., 1995)

#### **Ação sobre o ergosterol presente na membrana celular fúngica**

Outro alvo de ação do produto testado pode ser o ergosterol da membrana celular. Para isso foi utilizada a metodologia de microdiluição, descrita anteriormente, na presença e na ausência do ergosterol exógeno. Neste caso, o meio RPMI 1640 é acrescido do ergosterol exógeno numa concentração de  $400 \mu\text{g/mL}$ , e ao realizar a leitura, os valores da CIM são comparados na sua presença e na ausência do mesmo. Assim, o ensaio revela a qual propriedade o produto tem afinidade pelo ergosterol que compõe a membrana celular fúngica ou não. Para o controle positivo, foi realizado o

mesmo ensaio com a anfotericina B, uma vez que essa possui o ergosterol da membrana celular como alvo farmacológico (ESCALANTE et al., 2008)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecções fúngicas invasivas ou persistentes tem sido particularmente um problema no ambiente hospitalar, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Principalmente devido pequeno arsenal terapêutico antifúngico, além do alto custo total do tratamento, efeitos adversos dos fármacos e aparecimento de cepas resistentes. Isso impulsiona a busca de alternativas a este cenário (HEARD; WU; WINTER, 2021)

Os valores da CIM e CFM de di-hidrojasmona estão demonstrados na Tabela 1. O terpeno apresentou uma CIM de 128 - 256 µg/mL, dependendo da cepa ensaiada, demonstrando, segundo critérios de (SARTORATTO et al., 2004) forte atividade antifúngica. Sua CFM foi igual a CIM, demonstrando natureza fungicida, uma vez que a razão CFM/CIM < 4 (SIDDIQUI et al., 2013)

**Tabela 1:** CIM e CFM da Di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*

Microrganismos		Di-hidrojasmona			Natureza de Atividade	*Anf B	Controles	
		CIM	CFM	CFM/CIM		CIM	**MO	***Est
<i>Candida albicans</i>	ATCC 76485	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-587	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
	LM-616	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-439	256	512	2	Fungicida	0,50	+	-
	LM-55117	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-5770	256	256	1	Fungicida	0,50	+	-

Legenda: \*anfotericina B; \*\*microrganismo; \*\*\*esterilidade; (+) crescimento positivo; (-) ausência de crescimento.

Fonte: Autores.

No estudo realizado por (PINTO, 2019) o di-hidrojasmona apresentou CIM entre 256 e 512 µg/mL frente cepas de dermatófitos testadas, corroborando com os nossos achados e afirmando seu potencial antifúngico.

Assim como a di-hidrojasmona, o timol é um monoterpeneo, que se diferencia do DHJ por possuir uma hidroxila em sua estrutura, peso molecular menor (150,22 g/mol)

e atividade antimicrobiana já relatada. No estudo de (SOUSA et al., 2020), sua atividade foi avaliada frente cepas de *C. parapsilosis*, incluindo a ATCC 22019 também testada no presente estudo. O timol apresentou atividade fungicida diante todas as cepas testadas, com razão CFM/CIM menor que 4.

Uma vez estabelecido a forte atividade antifúngica da di-hidrojasmona, este estudo buscou determinar por qual mecanismo o monoterpeno agiria. Para este fim, utilizou-se o ensaio com sorbitol e com ergosterol exógeno, e os resultados estão plotados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da Di-hidrojasmona (DHJ), na ausência e na presença de sorbitol (0.8 M) e ergosterol (400  $\mu\text{g/mL}$ ) frente *Candida* spp.

Microrganismos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
Fármacos	- Esteroides		+ Sorbitol		+ Ergosterol			
DHJ	256	128	256	128	512	512		
Anfotericina B	0,25	0,25			4	4		
Caspofungina	0,031	0,031	1	1				

Legenda: DHJ: di-hidrojasmona.

Fonte: Autores

Observa-se que a CIM da di-hidrojasmona frente as cepas ensaiadas, aumentou na presença do ergosterol exógeno e permaneceu a mesma na presença do sorbitol, sugerindo que o mecanismo de ação de DHJ ocorre a partir de sua ligação ao ergosterol presente na membrana. Este é o primeiro estudo que demonstra tal mecanismo.

No ensaio realizado com o monoterpeno timol de acordo com Sousa et al., (2020), não foi observada alteração nos valores da CIM na presença do sorbitol nem do ergosterol frente *C. parapsilosis*, constatando que o monoterpeno utiliza um outro mecanismo para atuar sobre a levedura, excluindo a parede celular fúngica e a membrana fúngica(SOUSA et al., 2020).

O estudo de (OLIVEIRA; SANTOS, 2021) demonstrou que a ação antifúngica atribuída ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* se dá pela presença de seu

composto majoritário, o terpeno citral. (SILVA et al., 2017) avaliou a atividade do óleo frente *C. albicans* e *C. tropicalis*, determinando sua CIM, CFM e ação na presença do sorbitol. Foi observada forte atividade antifúngica, com CIM entre 125 µg/mL e 250 µg/mL, bem como atividade fungicida, e que a presença do protetor osmótico não interferiu na ação.

#### 4. CONCLUSÃO

Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstra que o monoterpene di-hidrojasmona possui forte atividade antifúngica frente espécies de *Candida* fluconazol resistentes e sugere que esta atividade esteja relacionada a sua ação no ergosterol de membrana. Logo, di-hidrojasmona demonstrou ser um promissor produto na busca de alternativas para o tratamento das candidíases. O que impulsiona para testes mais específicos de estudos pré-clínicos e clínicos.

#### REFERÊNCIAS

ANTINORI, S. et al. **Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review** *European Journal of Internal Medicine* Elsevier B.V., 1 out. 2016.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. **Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review** *Journal of Pharmaceutical Analysis* Xi'an Jiaotong University, 1 abr. 2016.

CHANG, Y. L. et al. **New facets of antifungal therapy** *Virulence* Taylor and Francis Inc., 17 fev. 2017.

CLSI. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>. Acesso em: 9 nov. 2021.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, 24 out. 2008.

FARIAS, L. A. B. G.; SANTOS, A. P. DE S.; DAMASCENO, L. S. CANDIDEMIA ASSOCIADA À INFECÇÃO POR SARS-COV-2: UM RELATO DE DOIS CASOS. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101385, 1 jan. 2021.

FROST, D. J. et al. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, p. 306–310, 1995.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 232–241, 1 jun. 2021.

LASS-FLÖRL, C.; SAMARDZIC, E.; KNOLL, M. Serology anno 2021—fungal infections: from invasive to chronic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 9, p. 1230–1241, 1 set. 2021.

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics - A Highway to New Drugs or a Dead End? **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, 1 mar. 2012.

NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.

OLIVEIRA, C. C. A. DE; SANTOS, J. S. Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e263101220281, 19 set. 2021.

PINTO, Â. V. **POTENCIAL MODULADOR DE MONOTERPENOS SOBRE A SENSIBILIDADE DE DERMATÓFITOS A TERBINAFINA**. [s.l: s.n.].

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275–280, 2004.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68–78, 1 abr. 2016.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237–243, 1 abr. 2013.

SILVA FILHO, C. A. M. et al. PRODUÇÃO DE TERPENOIDES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À CANDIDA SP CAPÍTULO PRODUÇÃO DE TERPENOIDES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À CANDIDA SP. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://repositorio.asc.es.edu.br/handle/123456789/1246>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

SILVA, N. L. et al. Determinação da atividade antioxidante e teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam. **Conexão Ciência (Online)**, v. 12, n. 1, p. 46–53, 2017.

SOUSA, J. P. DE et al. Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 489, 5 dez. 2020.

SVETAZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137–158, 8 jan. 2010.

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

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monoterpeneo testado apresenta potencial antifúngico promissor frente cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol. Sua CIM de 256 µg/mL o classifica com forte poder antifúngico, além de ter apresentado característica fungicida contra as cepas testadas, importante na resistência aos antifúngicos. Além disso, sua ação sobre o ergosterol exógeno aponta a membrana celular como alvo, corroborando com as características de grande parte dos monoterpeneos descritos na literatura. Sendo assim, são necessários testes adicionais mais específicos para tê-lo como opção de um protótipo no tratamento das candidíases.

## REFERÊNCIAS

- ANTINORI, S. et al. **Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review***European Journal of Internal Medicine* Elsevier B.V., , 1 out. 2016.
- ANVISA. **Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa n o 01/2020** . [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil>>. Acesso em: 31 out. 2021.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 1 fev. 2008.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. **Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review***Journal of Pharmaceutical Analysis* Xi'an Jiaotong University, , 1 abr. 2016.
- BESSA, M. A. DE S. et al. **PERFIL MOLECULAR DE CANDIDA PARAPSILOSIS ISOLADAS DO AMBIENTE DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**. Anais do I Congresso Nacional de Microbiologia Clínica On-Line. **Anais...Revista Multidisciplinar em Saúde**, 14 jun. 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/article/view/1183>>. Acesso em: 15 nov. 2021
- CASTANHEIRA, M. et al. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 2, jun. 2016.
- CHANG, Y. L. et al. **New facets of antifungal therapy***Virulence* Taylor and Francis Inc., , 17 fev. 2017.
- CHUDZIK, B. et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 1–2, 4 fev. 2015.
- CLSI. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>. Acesso em: 9 nov. 2021.
- DE MORAES-PINTO, M. I.; FERRARINI, M. A. G. **Opportunistic infections in pediatrics: when to suspect and how to approach***Jornal de Pediatria* Elsevier Editora Ltda, , 1 mar. 2020.
- ESCALANTE, A. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, 24 out. 2008.
- FARIAS, L. A. B. G.; SANTOS, A. P. DE S.; DAMASCENO, L. S. CANDIDEMIA ASSOCIADA À INFECÇÃO POR SARS-COV-2: UM RELATO DE DOIS CASOS. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101385, 1 jan. 2021.
- FATIMA, A. et al. TREATMENT OF VARIOUS DISEASES BY CARISSA SPINARUM L.-A PROMISING SHRUB. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 7, p. 2489, 2013.

FEITOZA, L. P. G. DE C. et al. **MUCORMICOSE EM PACIENTES ACOMETIDOS POR COVID-19: REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA**. Anais do I Congresso Brasileiro de Doenças Infectocontagiosas On-line. **Anais...Revista Multidisciplinar em Saúde**, 8 out. 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/article/view/2162>>. Acesso em: 14 nov. 2021

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, 2017.

FERNANDES, V. D. G. et al. Avaliação in silico da atividade antiprotozoário do monoterpeno ascaridol. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e202996891, 16 ago. 2020.

FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; DA SILVA, C. DE B. Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1–2, 19 fev. 2016.

FROST, D. J. et al. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, p. 306–310, 1995.

GALAN, D. M. et al. Eucalyptol (1,8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders? **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 2, 3 mar. 2020.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 232–241, 1 jun. 2021.

JESUS, T. C. et al. Uso de infusiones de plantas medicinales en el control de *Candida albicans* en cepillos dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 2019.

KAZIYAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, 2012.

LACERDA, J. R. C. et al. Conhecimento popular sobre plantas medicinais e sua aplicabilidade em três segmentos da sociedade no município de Pombal-PB. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 9, p. 14–23, 2013.

LASS-FLÖRL, C.; SAMARDZIC, E.; KNOLL, M. Serology anno 2021—fungal infections: from invasive to chronic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 9, p. 1230–1241, 1 set. 2021.

MACHADO, G. S.; DALMOLIN, T. V.; BRANDÃO, F. CANDIDA AURIS – FUNGO EMERGENTE QUE AMEAÇA A SAÚDE GLOBAL / CANDIDA AURIS – EMERGING FUNGUS THAT THREATENS GLOBAL HEALTH. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9673–9681, 2021.

MAGALHÃES, J. C. DOS S.; QUEIROZ-FERNANDES, G. PERFIL DE RESISTÊNCIA DE AGENTES DE MICOSES OPORTUNISTAS NO BRASIL. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 4, 6 dez. 2020.

MEKONNEN, Z. K. et al. Acute Invasive Rhino-Orbital Mucormycosis in a Patient With COVID-19-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. **Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 37, n. 2, p. e40–e80, 19 mar. 2021.

MILLER, R.; ENGLUND, K. Clinical presentation and course of COVID-19. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 87, n. 7, jul. 2020.

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics - A Highway to New Drugs or a Dead End? **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, 1 mar. 2012.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 62378, Dihydrojasnone. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydrojasnone>. Accessed Nov. 16, 2021.

NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.

NEUFELD, P. M. A COVID-19 e o diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, 2020.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. **Fusarium infections in immunocompromised patients** *Clinical Microbiology Reviews*, out. 2007.

NUNES, M. G. S.; BERNARDINO, A.; MARTINS, R. D. Use of medicinal plants by people with hypertension. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 16, n. 6, 21 dez. 2015.

OLIVEIRA, V. K. P. et al. FUNGEMIA CAUSED BY Candida SPECIES IN A CHILDREN'S PUBLIC HOSPITAL IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL: STUDY IN THE PERIOD 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, jul. 2014.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 11 maio 2018.

PASQUALOTTO, A. C.; SUKIENNIK, T. C. T.; MEIS, J. F. Brazil is so far free from Candida auris. Are we missing something? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, maio 2019.

PEIXOTO, J. V. et al. CANDIDÍASE - UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 75–82, 2014.

PERINI, G. F. et al. Fusariose disseminada com endoftalmite em paciente com neoplasia hematológica. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 4, dez. 2013.

PINTO, Â. V. **POTENCIAL MODULADOR DE MONOTERPENOS SOBRE A SENSIBILIDADE DE DERMATÓFITOS A TERBINAFINA**. [s.l: s.n.].

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: **Yeast Membrane Transport**. [s.l: s.n.]. v. 892p. 327–349.

PRÓSPERO, D. F. A. et al. Isopulegol apresenta atividade antinociceptiva e outras ações farmacológicas importantes: Uma Revisão Integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4271–4280, 2019.

RIVERO-LEZCANO, O. M.; GONZÁLEZ-CORTÉS, C.; MIRSAEIDI, M. The unexplained increase of nontuberculous mycobacteriosis. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2019.

- ROCHA, W. R. V. DA et al. Gênero Candida - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 17 abr. 2021.
- RODRIGUES, C. et al. Candida glabrata Biofilms: How Far Have We Come? **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 11, 1 mar. 2017.
- ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L. **Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico** UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. [s.l.: s.n.].
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, jun. 2015.
- SARTORATTO, A. et al. COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC PLANTS USED IN BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275–280, 2004.
- SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68–78, 1 abr. 2016.
- SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237–243, 1 abr. 2013.
- SILVA FILHO, C. A. M. et al. **PRODUÇÃO DE TERPENÓIDES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À CANDÍDA SP** CAPÍTULO PRODUÇÃO DE TERPENÓIDES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À CANDÍDA SP. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://repositorio.asc.es.edu.br/handle/123456789/1246>>. Acesso em: 9 nov. 2021.
- SILVA, N. C. D. S. et al. A UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS EM PROL DA SAÚDE THE USE OF MEDICINAL AND PHYTOTHERAPY PLANTS FOR HEALTH. **Unica Cadernos Academicos**, v. 3, 2017.
- SILVA, S. et al. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. [s.l.] UFRGS, 2007.
- SOUSA, J. P. DE et al. Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de Candida parapsilosis resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 489, 5 dez. 2020.
- SOUZA, M. S. et al. Perfil microbiano de infecções oculares em pacientes atendidos no hospital universitário do estado do Rio Grande Do Norte. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19758–19775, 2020.

SVETAZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137–158, 8 jan. 2010.

TAVARES, R. M. et al. Aspergilose e mucormicose – micoses sistêmicas de importância em COVID-19: Artigo de revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e59410717101, 26 jun. 2021.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. et al. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 5, p. 381–394, maio 2013.

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

WISE, G. J.; SHTEYNHLYUGER, A. How to diagnose and treat fungal infections in chronic prostatitis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 1, n. 1, 2 jun. 2007.

XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 523–542, abr. 2014.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, M.; FEDER-KUBIS, J. Monoterpenes and their derivatives—recent development in biological and medical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, 1 out. 2020.

## ANEXOS

**ANEXO 1: Artigo submetido para a revista Research, Society and Development; Qualis A3; Fator de impacto 1,78**

**RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT***Carta de Aceite*

O trabalho intitulado "Efeito inibitório de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp. fluconazol resistentes", submetido em "10/11/2021" foi aceito para publicação e será publicado em até 30 dias na Revista Research, Society and Development - ISSN 2525-3409.

O trabalho é de autoria de:

Luanna de Oliveira e Lima, Larissa Alves da Silva, Mariana Cavalcante Fonseca, Hermez Diniz-Neto, Edeltrudes de Oliveira Lima, José Maria Barbosa Filho, Josean Fachine Tavares, Walicyranison Plinio da Silva-Rocha e Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.

São Paulo, 21 de novembro de 2021.



Dr. Ricardo Shitsuka  
Editor

## **ANEXO 2: Instrução aos autores para submissão na revista Research, Society and Development**

### **Diretrizes para Autores**

#### 1) Estrutura do texto:

- Título em português, inglês e espanhol.
- Os autores do artigo (devem ser colocados nesta sequência: nome, ORCID, instituição, e-mail). OBS.: O número do ORCID é individual para cada autor, e ele é necessário para o registro no DOI, e em caso de erro, não é possível realizar o registro no DOI).
- Resumo e Palavras-chave em português, inglês e espanhol (o resumo deve conter objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 a 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, na qual haja contextualização, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores de suporte a metodologia; 3. Resultados (ou alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens); 4. Discussão e, 5. Considerações finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter no mínimo 20 referências as mais atuais possíveis. Tanto a citação no texto, quanto no item de Referências, utilizar o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas. Colocadas em ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência. Não devem ser numeradas. Devem ser colocadas em tamanho 8 e espaçamento 1,0, separadas uma das outras por um espaço em branco).

#### 2) Layout:

- Formato Word (.doc);
- Escrito em espaço 1,5 cm, utilizando Times New Roman fonte 10, em formato A4 e as margens do texto deverão ser inferior, superior, direita e esquerda de 1,5 cm.;
- Recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);
- Os artigos científicos devem ter mais de 5 páginas.

#### 3) Figuras:

O uso de imagens, tabelas e as ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito. Obs: o tamanho máximo do arquivo a ser submetido é de 10 MB (10 mega).

As figuras, tabelas, quadros etc. (devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridas. Após a sua inserção, deve constar a fonte (de onde vem a figura ou tabela...) e um parágrafo de comentário no qual se diga o que o leitor deve observar de importante neste recurso. As figuras, tabelas e quadros... devem ser numeradas em ordem crescente. Os títulos das tabelas, figuras ou quadros devem ser colocados na parte superior e as fontes na parte inferior.

#### 4) Autoria:

O arquivo em word enviado (anexado) no momento da submissão NÃO deve ter os nomes dos autores.

Todos os autores precisam ser incluídos apenas no sistema da revista e na versão final do artigo (após análise dos pareceristas da revista). Os autores devem ser registrados apenas nos metadados e na versão final do artigo (artigo final dentro do template) em ordem de importância e contribuição na construção do texto. OBS.: Autores escrevam o nome dos autores com a grafia correta e sem abreviaturas no início e final artigo e também no sistema da revista.

O artigo deve ter no máximo 15 autores. Para casos excepcionais é necessário consulta prévia à Equipe da Revista.

#### 5) Vídeos tutoriais:

- Cadastro de novo usuário: <https://youtu.be/udVFytOmZ3M>
- Passo a passo da submissão do artigo no sistema da revista: <https://youtu.be/OKGdHs7b2Tc>

#### 6) Exemplo de referências em APA:

- Artigo em periódico:

Gohn, M. G. & Hom, C. S. (2008). Abordagens Teóricas no Estudo dos Movimentos Sociais na América Latina. *Caderno CRH*, 21(54), 439-455.

- Livro:

Ganga, G. M. D.; Soma, T. S. & Hoh, G. D. (2012). *Trabalho de conclusão de curso (TCC) na engenharia de produção*. Atlas.

- Página da internet:

Amoroso, D. (2016). *O que é Web 2.0?* <http://www.tecmundo.com.br/web/183-o-que-e-web-2-0->

7) A revista publica artigos originais e inéditos que não estejam postulados simultaneamente em outras revistas ou órgãos editoriais.

8) Dúvidas: Quaisquer dúvidas envie um e-mail para [rsd.articles@gmail.com](mailto:rsd.articles@gmail.com) ou [dorlivete.rsd@gmail.com](mailto:dorlivete.rsd@gmail.com) ou WhatsApp (55-11-98679-6000)

### **Declaração de Direito Autoral**

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

1) Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

2) Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

3) Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado.

### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.