



**UFPB**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**KÍVIA SALES DE ASSIS**

**Avaliação das Atividades Antifúngica e Toxicológica do  
Óleo Essencial *Gaultheria procumbes***

**João Pessoa  
2018**

**KÍVIA SALES DE ASSIS**

**Avaliação das Atividades Antifúngica e Toxicológica do  
Óleo Essencial *Gaultheria procumbes***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima**

**Coorientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho**

**João Pessoa  
2018**

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

A848a Assis, Kivia Sales de.

Avaliação das atividades antifúngica e toxicológica do óleo essencial gaultheria procumbens / Kivia Sales de Assis. - João Pessoa, 2018.

100 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

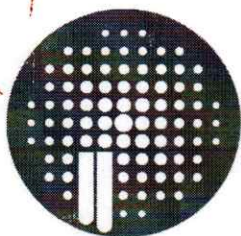
Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Plantas que produzem óleos. 2. Óleo essencial de gaultheria procumbens. 3. Candidíase - Atividade antifúngica. 4. Plantas medicinais. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Oliveira Filho, Abrahão Alves de Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

CDU 633.85(043)



# PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

Ata da 278ª (ducentésima septuagésima oitava) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Kívia Sales de Assis**, candidata ao Título de “Doutora” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e um de fevereiro do ano dois mil e dezoito (21.02.2018), nas dependências do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Kívia Sales de Assis**, candidata ao Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores Abrahão Alves de Oliveira Filho, Ph.D em Farmacologia, Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Ph.D em Tecnologia de Processamentos Químicos e Bioquímicos, Hilzeth de Luna Freire Pêssoa, Ph.D em Farmacologia, Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Ph.D em Farmacologia, Ricardo Dias de Castro, Ph.D em Farmacologia e Edeltrudes de Oliveira Lima, Ph.D em Farmácia. Sendo o primeiro integrante do corpo docente da Universidade Federal de Campina Grande e os demais integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca, professora Edeltrudes de Oliveira Lima, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Kívia Sales de Assis**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Avaliação das atividades antifúngica e toxicológica do óleo essencial de *Gualtheria procumbes*”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA COM DISTINÇÃO**. Em face da aprovação, declarou a Presidente, achar-se a examinada **Kívia Sales de Assis**, legalmente habilitada a receber o Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira (Secretária)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientadora)

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Coorientador)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hilzeth de Luna Freire Pêssoa (Examinadora)

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Examinador)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães (Examinador)



*"Tudo que pedires com fé na oração, vós o alcançareis."*

*(Mateus 21: 22)*

# *Dedicatória*

---

Aos meus pais, **José de Arimatéia Almeida de Assis** e **Maria das Neves Sales de Assis**, por todo amor incondicional e dedicação para com os seus. Muito obrigada. Amo vocês.

Às minhas irmãs **Katyuscia Sales de Assis** e **Kelyonara Maria Sales de Assis**, bem como minha Tia **Maria Lúcia de Sales** e meu sobrinho **Pedro Henrique da Silva Sales** sempre torcendo e rezando por mim.

A meu esposo, **Gustavo César de Souto Ramos Oliveira**, sempre companheiro, amigo, conselheiro e paciente em todos os momentos de minha vida acadêmica. Te amo meu José.

À esta criança que cresce em meu ventre e ainda tão pequena vive emoções tão intensas. Te amo filho.

# *Agradecimientos*

À **Deus** e a **Nossa Senhora**, por sempre conduzirem os meus passos.

A minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima**, que aceitou o desafio de me conduzir, em tempo recorde, nesta etapa acadêmica. Com certeza a levarei na minha vida como exemplo de profissional. Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho** e porque não dizer amigo, pelos seus ensinamentos, compreensão e paciência. Serei eternamente grata.

Aos professores **Ulrich Vasconcelos Da Rocha Gomes, Hilzeth de Luna Freire Pêsoa, Hemerson Iury Ferreira Magalhaes e Ricardo Dias De Castro** por terem aceitado participar da banca de doutorado, contribuindo significativamente para o meu trabalho, bem como professora **Caliandra Maria Bezerra Luna Lima** que fez parte da banca de qualificação.

À **Daniele Figueredo**, que foi essencial para a execução deste trabalho, também sempre solicita a me ajudar e tirar dúvidas e a **Cássio** pela colaboração nos trabalhos. Muito obrigada.

À **Natália, Priscilla Maria e Fátima**, torcendo sempre pela minha vitória e me ajudando também nos momentos turbulentos da pesquisa, com palavras de conforto e amizade.

A **José Crispim Duarte** pela amizade que se iniciou durante minha iniciação científica.

As funcionárias **Dona Maria e Mônica Rodrigues** com quem tive o prazer de dividir vários inícios de manhãs durante o meu doutorado.

À **Coordenação** e aos **funcionários do Programa de Pós-graduação** em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial a **Caroline** pela seriedade e competência que exerce seus trabalhos.

Ao **CNPq, CAPES, IPeFarM e UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

*Resumo*

---

## RESUMO

ASSIS. K. S. **Avaliação das Atividades Antifúngica e Toxicológica do Óleo Essencial de *Gaultheria procumbens***. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Área de concentração: Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

Candidíase é uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida*, sejam essas infecções superficiais, da pele e da mucosa ou sistêmicas. A disseminação de fungos resistentes aos medicamentos é uma das mais graves ameaças para o sucesso do tratamento das doenças fúngicas, além disso, algumas drogas são muito tóxicas, dificultando o uso terapêutico, o que estimula a busca por novos agentes antifúngicos mais eficazes, menos tóxicos. Neste contexto os produtos derivados de plantas medicinais são excelentes alternativas para esse propósito. Neste sentido o objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (OEGp) contra cepas do gênero *Candida*, avaliar a sua citotoxicidade, bem como a biodisponibilidade oral e o perfil toxicológico teóricos do constituinte majoritário deste óleo, o salicilato de metila. Para a realização dos estudos antifúngicos utilizou-se o teste de microdiluição com diferentes cepas fúngicas do gênero *Candida* para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para a análise do potencial antimicrobiano do salicilato de metila foi utilizado a análise *in silico* com o software *Pass online*. Para realização dos estudos de atividade citotóxica utilizou-se hemácias humanas. As análises realizadas revelaram que o OEGp apresentou uma atividade antifúngica frente as cepas clínicas de *C. parapsilosis* com uma CIM e CFM de 8 µg/mL e *C. krusei* com uma CIM de 64 µg/mL e CFM e 128 µg/mL, em contrapartida para *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram insensíveis com exceção da *C. tropicalis* LM – 64 que teve CIM de 32 µg/mL. O OEGp também apresentou atividade antifúngica frente a 5 cepas das 8 testadas de *C. albicans*, com uma CIM e CFM entre 4 e 8 µg/mL, e esse efeito teve natureza fungicida. Seu mecanismo de ação não envolve efeito sobre a parede celular bem como na membrana plasmática. Um efeito sinérgico foi observado ao ser associado a anfotericina B (um antifúngico clínico conhecido). Apresentou baixa citotoxicidade para o tipo sanguíneo A e de baixa a moderada para a maioria das concentrações testadas nos diferentes tipos sanguíneos (B e O). Com relação ao estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas teóricas do constituinte majoritário do OEGp, o salicilato de metila, se observou que de forma teórica demonstrou ser um composto que possui vários possíveis efeitos biológicos sobre o corpo humano, bem com boa biodisponibilidade e baixo risco de toxicidade. Em conjunto, esses resultados sugerem que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* representa uma nova e promissora possibilidade entre os produtos com atividade antifúngica em especial contra cepas de *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Óleo essencial de *Gaultheria procumbens*; *Candida*; Atividade antifúngica; Citotoxicidade; *in silico*.

# *Abstract*

---

## ABSTRACT

ASSIS. K. S. **Evaluation of the Antifungal and Toxicological Activities of the Essential Oil of *Gaultheria procumbens***. Thesis (Doctoral Degree in Natural and Synthetic Bioactive Products - Concentration Area: Pharmacology)/ Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

Candidiasis is an infection caused by yeasts of the genus *Candida*, whether superficial infections, skin and mucosal or systemic. The spread of drug-resistant fungi is one of the most serious threats to the successful treatment of fungal diseases. Furthermore, some drugs are very toxic, hindering to use therapeutic, which stimulates the search for new, more effective, less toxic antifungal agents. In this context products derived from medicinal plants are excellent alternatives for this purpose. In this sense, the objective of this study was to investigate the antifungal activity of the essential oil of *Gaultheria procumbens* (OEGp) against strains of the genus *Candida*, evaluate its cytotoxicity, as well as the oral bioavailability and theoretical toxicological profile of the majority constituent of this oil, salicylate of methyl. To carry out antifungal studies, the microdilution test was used with different fungal strains of the *Candida* genus to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC). For the analysis of the antimicrobial potential of salicylate de methyl was used with the *in silico* analysis software Pass online. To carry out cytotoxic activity studies, human red blood cells were used. The analyzes showed that OEGp showed antifungal activity against clinical strains of *C. parapsilosis* with MIC and CFM of 8 µg / mL and *C. krusei* with MIC of 64 µg / mL and CFM of 128 µg / mL, whereas *C. tropicalis* and *C. glabrata* were insensitive with except for *C. tropicalis* LM-64 which had a MIC of 32 µg / ml. OEGp also had antifungal activity against 5 strains of 8 tested *C. albicans*, with an MIC and CFM between 4 and 8 µg / mL, and this effect had fungicidal action. Its mechanism of action does not involve an effect on the cell wall or plasma membrane. A synergistic effect was observed when combined with amphotericin B (a known clinical antifungal). It showed low cytotoxicity for blood type A and low to moderate for most concentrations tested in different blood types (B and O). Regarding the study of the theoretical pharmacological and toxicological properties of the majority constituent of OEGp, methyl salicylate, it was observed that it was theoretically demonstrated to be a compound that has several possible biological effects on the human body, as well as good bioavailability and low risk of toxicity. Taken together, these results suggest that *Gaultheria procumbens* essential oil represents a new and promising possibility among products with antifungal activity, especially against strains of *C. albicans*.

**Keywords:** *Gaultheria procumbens* essential oil; *Candida*; Antifungal activity; Cytotoxicity; *in silico*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Morfologia de células de <i>Candida albicans</i> . Células leveduriformes (a) podem formar tanto pseudo-hifas (b) quanto hifas verdadeiras (c). Alternância entre pseudo-hifas e hifas é menos frequente.....	23
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de virulência das espécies de <i>Candida</i> relacionados ao processo de patogênico.....	24
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	25
<b>Figura 4</b> - Alvos celulares dos agentes antifúngicos.....	28
<b>Figura 5</b> - <i>Gaultheria procumbens</i> .....	33

### **Análise citotóxica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* e farmacológica e toxicológica do seu constituinte majoritário *in sílico***

<b>Figura 1</b> - Cromatograma obtido do OEGp mostrando seu componente majoritário, o salicilato de metila .....	79
<b>Figura 2</b> - Efeito hemolítico OEGp contra eritrócitos sorotipo A. * p <0,05 versus teste de controle positivo.....	80
<b>Figura 3</b> - Efeito hemolítico OEGp contra eritrócitos sorotipo B. * p <0,05 versus teste de controle positivo.....	80
<b>Figura 4</b> - Efeito hemolítico óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> (OEGp) contra eritrócitos sorotipo O * p <0,05 versus teste de controle positivo.....	81

## LISTA DE TABELAS

### **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre espécies do gênero *Candida***

<b>Tabela 1</b> – Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> (OEGp) sobre cepas de <i>C. parapsilosis</i> .....	52
<b>Tabela 2</b> – Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>G. procumbens</i> sobre cepas de <i>C. krusei</i> .....	53
<b>Tabela 3</b> – Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> sobre cepas de <i>C. tropicalis</i> .....	53
<b>Tabela 4</b> – Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> sobre cepas de <i>C. glabrata</i> .....	54

### **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* de *Candida albicans***

<b>Tabela 1</b> – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de <i>G. procumbens</i> (OEGp) sobre cepas de <i>C. albicans</i> . Os valores de CIM e CFM foram expressos em $\mu\text{g} / \text{mL}$ .....	64
<b>Tabela 2</b> – - Efeito do óleo essencial de <i>G. procumbens</i> sobre as cepas <i>C. albicans</i> ATCC 76485 e <i>C. albicans</i> LM- 62 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.....	67
<b>Tabela 3</b> – Efeito do óleo essencial de <i>G. procumbens</i> (OEGp) sobre as cepas <i>C. albicans</i> ATCC 76485 e <i>C. albicans</i> LM- 62 na ausência e presença de na ausência e presença de ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$ .....	68
<b>Tabela 4</b> – Modulação da ação do antifúngico na sua CIM pelo óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> na CIM/8 frente cepas de <i>C. albicans</i> .....	69

### **Análise citotóxica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* e farmacológica e toxicológica do seu constituinte majoritário *in sílico***

<b>Tabela 1</b> – Atividades previstas do salicilato de metila > através da ferramenta <i>PASS online</i> .....	82
<b>Tabela 2</b> – Propriedades ADMET, calculadas no software admetSAR, para o componente majoritário do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> , o salicilato de metila.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolização E Excreção

ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection

CCS - Centro De Ciências Da Saúde

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIM<sub>50</sub> - Concentração Inibitória Mínima Para 50%

CG - Cromatografia gasosa

CSD - Caldo Sabouraud Dextrose

DCF - Departamento De Ciências Farmacêuticas

DL<sub>50</sub> – Dose Letal Média

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPM - Erro Padrão Da Média

*G. procumbens* - *Gaultheria Procumbens*

Hb- Hemoglobina

ICIF - Índice Da Concentração Inibitória Fracionada

OEGp - Óleo Essencial de *Gaultheria procumbens*

Pa- Probabilidade de Ser Ativo

PASS – Previsão do Espectro de Atividade Para Substâncias

PBS – Tampão Fosfato Salino

Pi- Probabilidade de Ser Inativo

UFPB - Universidade Federal Da Paraíba

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22
2.1 ASPECTOS GERAIS DA CANDIDÍASE.....	22
2.2 ATIVIDADE E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA.....	27
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	31
2.4 <i>Gaultheria procumbens</i> .....	33
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 POSICIONAMENTO ÉTICO .....	38
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	38
4.3 QUANTIFICAÇÃO DO COMPONENTE MAJORITÁRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Gaultheria procumbens</i> .....	38
4.4 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> .....	39
4.4.1 Meios de Cultura.....	39
4.4.2 Cepas Fúngicas.....	39
4.4.3 Preparado do Inóculo.....	40
4.4.4 Antifúngicos.....	40
4.4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	40
4.4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	41
4.4.7 Atividade Antifúngica <i>In Vitro</i> com Alvos Específicos.....	41
4.4.7.1 Ação do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> na parede celular fúngica.....	41
4.4.7.2 Ação do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> na membrana celular.....	42
4.4.8 Avaliação da interferência do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> sobre a resistência aos antifúngicos licenciados .....	43
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	43
4.5.1 Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos Humanos.....	43
4.6 ENSAIOS <i>IN SILICO</i> .....	44
4.6.1 <i>Pass Online</i> .....	44
4.6.2 Análise Teórica da Toxicidade e dos Parâmetros Farmacocinéticos....	45

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> sobre espécies do género <i>Candida</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> sobre <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3 Análise citotóxica do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> e farmacológica e toxicológica do seu constituinte majoritário <i>in sílico</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
Referências.....	91
ANEXO.....	97

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 200 espécies que compõem o gênero *Candida* e dessas, apenas 20 foram associadas com doenças em humanos, tornando-se agentes patogênicos, causando infecções superficiais, da pele e da mucosa e também sistêmicas (HÖFS et.al., 2016). O gênero *Candida* apresenta divergências genômicas entre si e variações fenotípicas. Essas diferenças fenotípicas ocorrem em relação à morfologia, tamanho celular, requisitos de crescimento, composição da parede celular e distribuição de fatores de virulência. Quanto à morfologia são predominantemente leveduriformes (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

A candidíase tem aumentado não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença. O aumento das infecções, com lesões graves têm levado a um alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (GEHRING et.al., 2016).

Espécies não *albicans* como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, embora sejam importantes patógenos destas infecções fúngicas oportunistas, a *C. albicans* é sem dúvida, o agente etiológico que apresenta maior incidência associado a candidíase. (PFALLER; DIEKEMA 2007, SILVA et al. 2012).

Este micro-organismo é um agente causador de infecções bucais e mucocutâneas, entre outras mais graves, como septicemia, endocardite, meningite e peritonite, especialmente em pacientes com função imune reduzida ou que fazem uso de terapias utilizando antibióticos (BRUNKE; HUBE, 2013, MARTINS et al. 2015). A frequência de isolamento dessa espécie nos casos de infecções hematogênicas ou candidemia é de aproximadamente 70% em alguns países da Europa e em países da América Latina este índice chega até 40% (PFALLER; DIEKEMA 2007; SILVA et al. 2012).

Existem cinco classes principais de agentes antifúngicos amplamente utilizado em nível médico contra os principais patógenos fúngicos, incluindo espécies de *Candida*, que são polienos (anfotericina B), azóis (fluconazol e cetoconazol), equinocandinas (caspofugina), alilaminas (terbinafina) e análogos de pirimidinas (flucitosina) (MARTINS et al. 2015, BHATTACHARYA; KAUR, 2015).

Por mais que a terapêutica das micoses tenha evoluído, melhorando não só sua eficácia e espectro de ação mas também sua tolerância, manejo e tempo de tratamento, o uso excessivo destes fármacos tem propiciado o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes (ZAITZ et al., 2010; FREIRE et al., 2016). Além disso, algumas drogas, como a anfotericina B, são muito tóxicas, dificultando o seu tempo de uso terapêutico (SANGLARD; ODDS, 2002).

Desta forma é necessário o desenvolvimento de novas terapias e fármacos antifúngicos que apresentem eficácia e baixo custo, dentre as possibilidades, os produtos naturais e seus derivados têm sido reconhecidos por muitos anos como fontes de agentes terapêuticos e de diversidade estrutural (ORHAN et al. 2010; BOSTROM et al. 2012; LAHLOU, 2013, ANEJA et al. 2016).

Dentre os compostos bioativos produzidos pelas plantas temos os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e geralmente odoríferas, originados do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, devido a sua principal característica que é a volatilidade; óleos etéreos devido à solubilidade em solventes orgânicos apolares como éter; ou essências devido ao aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais (SIMÕES., SPITZER, 2004).

Dentre as plantas ricas em óleos essenciais, encontra-se a *Gaultheria procumbens*, um arbusto pequeno, de baixo crescimento e de folhas perenes, nativo do Norte da América setentrional e amplamente cultivado por todo o Hemisfério boreal devido ao seu valor ornamental e medicinal. As folhas de *Gaultheria procumbens* são, tradicionalmente valorizadas como agentes anti-inflamatórios e analgésicos (LIU. et. al., 2013; MICHEL. et. al., 2017). No Brasil, ela é encontrada geralmente na forma de óleo essencial em casas especializadas e farmácias de manipulação, por sua ação anti-inflamatória e analgésica é recomendada para tratamento de dores musculares, tendinite, reumatismo (nos músculos e tendões, artrite, artrose), câibras e dor ciática (GRUFFAT., 2015).

Diante da importância clínica e a alta incidência da candidíase, aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, surgimento de cepas resistentes, toxicidade dos antifúngicos existentes, da busca por novos agentes antifúngicos mais eficazes, menos tóxicos, no qual os produtos derivados de plantas medicinais são

excelentes alternativas para esse propósito, o objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra cepas do gênero *Candida*.

# *Referencial Teórico*

---

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA CANDIDÍASE

A candidíase ou candidose consiste em diversas síndromes clínicas causadas por leveduras do gênero *Candida*. Há aproximadamente 800.000 espécies de fungo descritos na literatura e dentre esses, cerca de 400 espécies são patogênicas para humanos e animais. Estima-se que aproximadamente 200 espécies compõem o gênero *Candida* e dessas, 20 foram associadas a doenças em humanos, tornando-se os agentes patogênicos fúngicos humanos mais comuns (QUINN et al., 2011; HÖFS et al., 2016).

Taxonomicamente as leveduras do gênero *Candida* fazem parte do Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hemiascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida* (HOOG et al., 2011).

A candidíase pode ser subdividida em três principais grupos: candidíase superficial, com ocorrência na pele, pelo e unhas; candidíase de mucosas, envolvendo a orofaringe, esôfago e região vulvovaginal, e candidíase sistêmica, que incluem a candidemia e outras formas de candidíase invasiva (PAPON et al., 2013).

A patogenicidade de *Candida* spp. está relacionada a vários fatores de virulência como pH fisiológico, capacidade de crescimento uma temperatura de 37 °C, tamanho celular, habilidade de se aderir às células dos hospedeiros, plasticidade fenotípica, formação de biofilmes e a produção de enzimas extracelulares como proteinases, fosfolipases, lipases (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

Morfologicamente os fungos de interesse clínico se apresentam de dois tipos: leveduras, que são unicelulares e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares. Existe um subgrupo dentro dos filamentosos, chamados fungos dimórficos, que se apresentam sob ambas as formas, dependendo principalmente da temperatura, mas sob influência também do teor de CO<sub>2</sub> e condições nutricionais (ANVISA, 2014).

As leveduras são células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo e geralmente de forma arredonda. Estas células são assexuadas e se denominam blastoconídios. Por sua vez os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica).

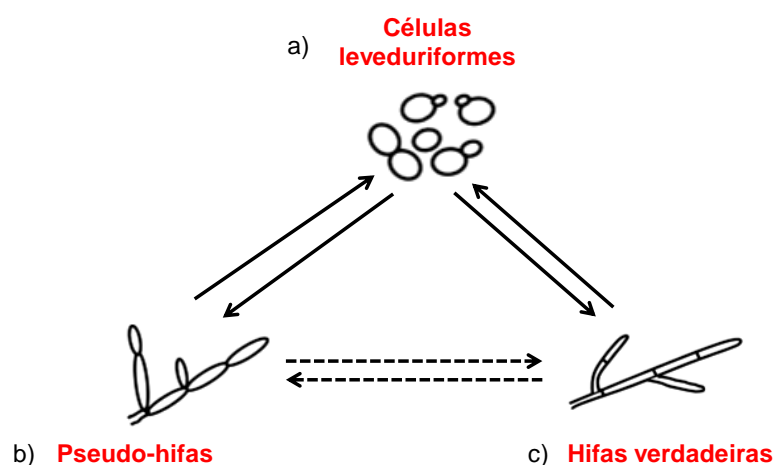
A partir da hifa surgem os esporos, propagando assim a espécie. Em sua grande maioria os esporos podem ser chamados de conídios pois nascem diretamente delas ou sobre estruturas ligadas a elas (ANVISA, 2014).

Durante as últimas décadas, as infecções por *Candida* têm aumentado não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença. O aumento das infecções, com lesões graves têm levado a um alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (GEHRING et.al., 2016).

Embora outras espécies não *albicans* como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* estejam envolvidas como importantes patógenos destas infecções fúngicas oportunistas o agente etiológico que apresenta maior incidência associado à candidíase sem dúvida é a *C albicans* (PFALLER; DIEKEMA 2007, SILVA et al. 2012).

*Candida albicans* é um fungo conhecido pela sua forma leveduriforme (blastocónídeos) no estado saprofítico, que está associado com a colonização assintomática; ou em formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) observadas em situações de processos patológicos sob algumas condições de crescimento subótimas, (CANNOM et al., 2002; BERMAN, 2006). Sendo assim, *C. albicans* compartilha a capacidade para alternar, reversivelmente, entre duas formas distintas: leveduriformes e filamentosas (**Figura. 1**) (ROONEY; KLEIN, 2002; ROMÁN et al., 2007).

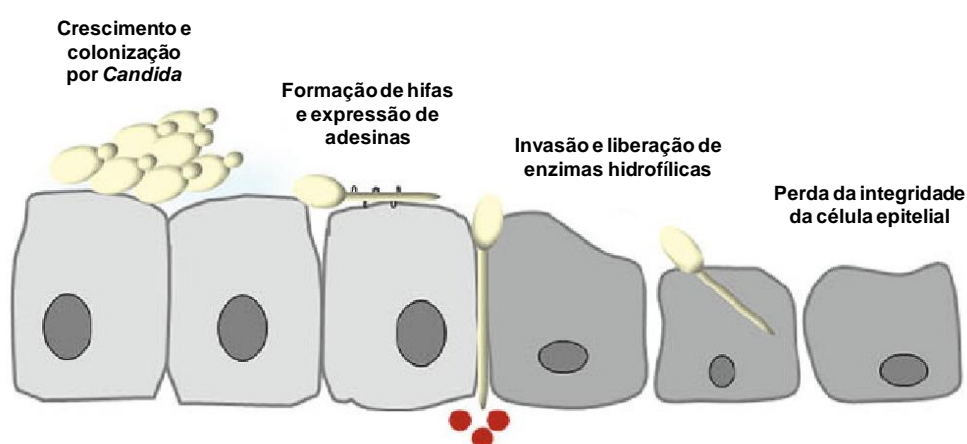
**Figura. 1.** Morfologia de células de *Candida albicans*. Células leveduriformes (a) podem formar tanto pseudo-hifas (b) quanto hifas verdadeiras (c). Alternância entre pseudo-hifas e hifas é menos frequente



Fonte: Adaptado de THOMPSON, et. al., 2011.

Essa característica morfogênica da *C. albicans* é um dos fatores de virulência envolvidos nos processos infecciosos causados por *Candida*. Fatores extrínsecos como temperatura, pH e composição do meio onde as células estão inseridas podem influenciar nessa transição de morfologia (MAYER et al. 2013). Dentre os demais fatores de virulência temos a aderência à superfície celular, formação de biofilme, produção e secreção de enzimas hidrolíticas (**Figura 2**) e resistência aos antifúngicos (SANTANA et al. 2013; SARDI et al. 2013).

**Figura 2.** Mecanismos de virulência das espécies de *Candida* relacionados ao processo de patogênico.



Fonte: Adaptado de HOFS et al. 2016.

Tanto o processo infeccioso quanto o de colonização iniciam-se com a aderência da levedura nas células e isso é essencial para colonização e sobrevivência no hospedeiro. O processo de adesão ocorre entre a interação de adesinas de *Candida* com receptores de células hospedeiras (CHAFFIN, 2008; MOYES et al., 2015). A forma filamentosa proporciona maior aderência às células humanas devido a maior quantidade de adesinas na sua superfície, contudo a maior parte da adesão inicial ocorre provavelmente entre leveduras e células epiteliais, sendo a formação de hifas induzida após o primeiro contato com uma superfície celular hospedeira (THOMPSON et al. 2011, MOYES et al., 2015). Como consequência da capacidade das leveduras aderirem às superfícies, ocorre a formação de biofilme pelas células fúngicas.

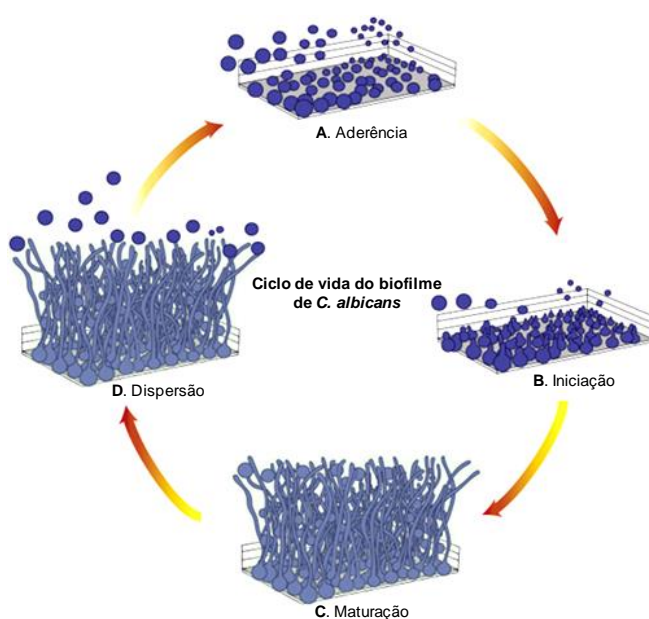
Os biofilmes consistem em comunidades microbianas estruturadas que estão ligadas a uma superfície e cercadas por uma matriz extracelular autoproduzida

(COSTERTON et al., 1995). *C. albicans* podem formar biofilmes em superfícies abióticas e bióticas. Dentre as superfícies abióticas colonizadas com maior frequência se encontram os dispositivos médicos como próteses, cateteres e sondas, já as superfícies das células mucosas são um substrato biótico mais comum para a formação de biofilmes de *Candida* (FANNING, MITCHELL, 2012).

A formação de biofilmes de *C. albicans* consiste basicamente em quatro estágios (**Figura 3**): fixação/aderência das células fúngicas em uma superfície (substrato); crescimento e proliferação dessas células de levedura formando uma fina camada; maturação do biofilme pelo desenvolvimento de pseudo-hifa e hifas, concomitantemente com produção de matriz extracelular; e, finalmente e, finalmente, a dispersão de células de levedura do biofilme maduro, possivelmente resultando em colonização de diferentes nichos dentro do hospedeiro (UPPULURI et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2011, KANEKO et al., 2013; HÖFS et. al., 2016; GULATI, NOBILE., 2016 ).

A estrutura complexa do biofilme e a organização deste em comunidade promove não somente a proteção contra os mecanismos de remoção como dificulta a ação dos antifúngicos (JUNQUEIRA et al., 2011).

**Figura. 3:** Ciclo de vida do biofilme de *C. albicans*. **A.** Aderência de células redondas de fermento a uma superfície. **B.** Iniciação de formação de biofilmes, onde células proliferam para formar uma camada basal de células aderidas. **C.** Maturação do biofilme, onde as camadas complexas de células polimórficas se desenvolvem e se tornam envoltas em uma matriz extracelular. **D.** Dispersão, onde as células de leveduras redondas deixam o maduro biofilme para semear novos sítios.



**Fonte:** Adaptado de GULATI; NOBILE., 2016.

E por fim, um dos outros fatores de virulência está a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, elas desempenham uma função essencial na destruição dos tecidos do hospedeiro por *Candida* spp. Estas enzimas são secretadas no local e auxiliam na adesão, penetração e invasão tecidual por degradar proteínas estruturais das membranas e mucosas. As proteinases, fosfolipases e hemolisinas são as enzimas com maior implicação no potencial patogênico das leveduras (SILVA et al. 2011).

Estruturalmente, as células do gênero *Candida* apresentam parede celular bem definida, composta de quitina, polissacarídeos (glucanas e mananas) e proteínas (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Contudo observa-se variações nas proporções destes compostos entre as diferentes espécies de *Candida*, por exemplo a parede celular de *C. albicans* é constituída de 60% de  $\beta$ -glucana e cerca de 40% de mananoproteínas e quitina (HUANG, 2012).

A espécie predominantemente relacionada aos quadros de candidíase clínica, sejam superficiais ou invasivos, é a *C. albicans*. Estima-se que frequência de isolamento dessa espécie chega a aproximadamente 40% em países da América Latina e de até 70% em alguns países da Europa nos casos de candidemia (PFALLER, DIEKEMA 2007; KUMAR et al. 2009; SILVA et al. 2012).

Embora a maioria dos isolamentos das infecções fúngicas por *Candida* correspondiam a *C. albicans*, desde a década de 80 observou-se uma mudança na epidemiologia destas infecções constatando-se um aumento de casos relacionados as espécies de *Candida não-albicans* (CNA) (SARDI et al., 2013; DEORUKHKAR, SAINI, 2015). Dentre estas as mais frequentes relatadas são *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e essa por sua vez estão principalmente relacionadas a casos de candidemia (DEORUKHKAR, SAINI., 2014; YAPAR, 2014; GEHRING et. al., 2016).

Dados na literatura demonstram que a prevalência de espécies de *Candida* variam de acordo com sua distribuição geográfica, ou seja, país a país e região a região (FALAGAS et. al., 2010). Na verdade, candidíase não é uma, são várias doenças, com cada espécie de *Candida* apresentando suas próprias características com relação ao tropismo aos tecidos, propensão de causar doenças invasivas, virulência e susceptibilidade a antifúngicos (MCCARTY; PAPPAS, 2015).

*C. albicans* ainda é a espécie mais comum em todo o mundo, isolada de diversos locais anatômicos em infecções sistêmicas. *C. glabrata* é mais observada na América do Norte do que na América Latina representando a segunda espécie em casos de candidemia nos Estados Unidos, em contrapartida, outros países têm notado um aumento dramático na incidência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER, DIEKEMA., 2007). *C. glabrata* apresenta alta prevalência em pacientes idosos e tem surgido como importante patógeno hospitalar, já *C. parapsilosis* apresenta elevada ocorrência em crianças e recém-nascidos prematuros, e ainda está associada à presença de cateter venoso central e uso de nutrição parenteral (PFALLER et.al., 2010; COLOMBO et al., 2013). *C. tropicalis* por sua vez é frequentemente isolado na Ásia - Pacífico e representa potencial agente oportunista quando o paciente apresenta neutropenia e quando há supressão da microbiota bacteriana devido ao uso de antibióticos e a danos na mucosa do trato gastrointestinal (COLOMBO et al., 2013).

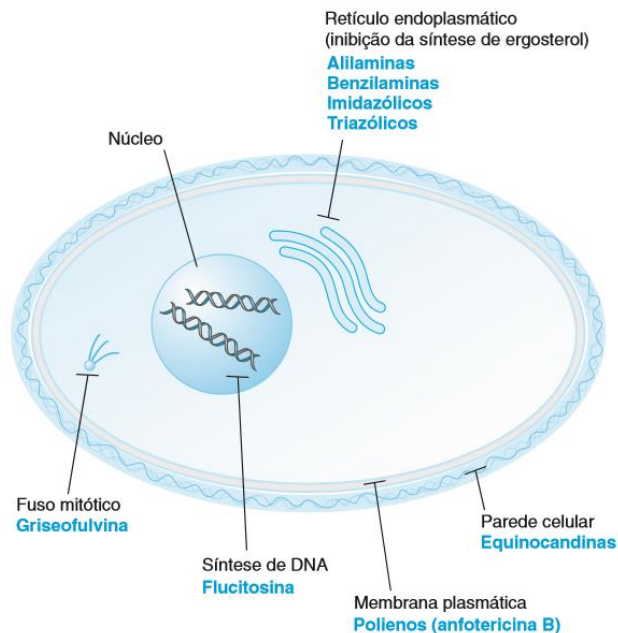
*C. krusei* é patógeno hospitalar ocasional, particularmente isolado de pacientes com doenças hematológicas e pacientes transplantados de medula óssea. Sua elevada ocorrência em pacientes neutropênicos com candidemia deve-se à exposição a fluconazol, pois esta espécie apresenta resistência intrínseca a este antifúngico. Dados na literatura demonstraram que a exposição a piperacilina-tazobactam e vancomicina leva mais frequentemente a infecções por *C. krusei* do que a exposição ao fluconazol, porque esses antimicrobianos promovem a colonização da pele e do sistema gastrointestinal, tornando o hospedeiro humano mais vulnerável a infecções de corrente sanguínea por *C. krusei* (LIN et.al., 2005; COLOMBO et al., 2013).

## 2.2 ATIVIDADE E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

É crescente a incidência de fungos resistentes a múltiplos medicamentos, o que tem dificultado o tratamento de doenças infecciosas humanas ou animais. A alta mortalidade associada a infecções fúngicas disseminadas é particularmente preocupante, dadas as opções de tratamento limitadas e a alta capacidade de adaptação de patógenos fúngicos para condições de estresse associadas à colonização de diferentes nichos de hospedeiro e exposição a drogas (KOTACZKOWSKA, KOTACZKOWSKI 2016).

As drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento da candidíase são limitadas. Os agentes terapêuticos atuais podem ser amplamente classificados em dois grupos: o primeiro, os antibióticos antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os polienos e as equinocandinas, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os azóis e as pirimidinas fluoradas (RANG et al., 2016). Os principais alvos moleculares da terapia antifúngica consistem em enzimas e outras moléculas envolvidas na síntese de DNA, na mitose, na síntese da membrana plasmática e na síntese da parede celular dos fungos (**Figura 4**). Os fármacos mais frequentemente empregados para tratamento das infecções causadas por *Candida* são o fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B (GUALCO et al. 2007; GOLAN., 2014).

**Figura 4:** Alvos celulares dos agentes antifúngicos.



Fonte: GOLAN., 2014

A anfotericina B faz parte do grupo dos poliênicos e é a droga de escolha contra várias espécies de *Candida* que se encontram em suas formas mais severas, como em casos de candidemia (COLOMBO et al., 2013). A anfoterina B atua ligando-se ao ergosterol formando poros o que resultará no aumento da permeabilidade de membrana levando a um desequilíbrio osmótico pela perda de íons intracelulares e consequentemente lise e morte das células que é o principal constituinte da membrana celular dos fungos. O ergosterol possui estrutura semelhante ao colesterol presente na célula humana, fato que desfavorece o tratamento das candidíases por

ocasionar recorrente prejuízo ao hospedeiro (CHANDRASEKAR, 2011., KOTACZKOWSKA, KOTACZKOWSKI, 2016., NETT, ANDES, 2016).

Os derivados azólicos, são classificados em imidazólicos (clotrimazol, cetoconazol, miconazol) e triazólicos (fluconazol, voriconazol, itraconazol) de acordo com a quantidade de átomos de nitrogênio presente na estrutura química de cada um, sendo que os imidazólicos possuem dois átomos de nitrogênio e, os triazólicos três átomos de nitrogênio em sua estrutura, o que confere a atividade farmacológica destes fármacos (SAHU et al., 2013).

O mecanismo de ação dos fármacos azólico tem como consequência a inibição da biossíntese do ergosterol presente na membrana fúngica. A ação ocorre pela inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, que associada ao citocromo P-450 é responsável por converter lanosterol em ergosterol. A diminuição do ergosterol e o acúmulo de esteróis metilados que são tóxicos para o microorganismo, desencadeará alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática, interferindo diretamente a captação de nutrientes, inibindo o crescimento dos fungos, e podendo acarretar necrose celular (FUENTEFRÍA et.al., 2016; SANGLARD, 2016).

As equinocandinas compõem a mais recente classe dos antifúngicos, são fungicidas rápidos contra *Candida* e atuam através da inibição não competitiva da  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase, enzima responsável pela biossíntese de glucana que é um componente essencial à parede celular fúngica. A inibição da  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase resulta em enfraquecimento da parede celular fúngica, quelatura da integridade celular, lise e morte celular. Micafungina, anidulafungina e caspofungina são representantes dessa classe, sendo o último o mais utilizado para terapia de candidíase (COLOMBO et al., 2013, BAILLY et al. 2016, NETT, ANDES 2016, KOTACZKOWSKA, KOTACZKOWSKI 2016)

Além dessas 3 principais classes ainda existem a flucitosina e a griseofulvina. A flucitosina é um agente antifúngico oral que tem seu limitado devido a seu limitado espectro antifúngico, suas toxicidades associadas e o rápido desenvolvimento de resistência. Este antifúngico penetra com facilidade na célula fúngica por intermédio da citocina aminase e em seguida é convertida em 5- fluororacil considerado um falso nucleotídeo e isto inibirá a enzima timidilato sintetase, que é o componente essencial do DNA (SEGURA et.al., 2017).

A griseofulvina é um antibiótico altamente tóxico por promover inibição mitótica em células eucarióticas humanas, seu mecanismo de ação acontece por meio da interação com os microtúbulos desfazendo o fuso mitótico, inibindo assim o processo de mitose e conseqüentemente a multiplicação da célula fúngica (SIDRIM, MOREIRA, 1999, SEGURA et.al., 2017).

A resistência antifúngica pode se desenvolver para qualquer uma das três classes principais de drogas que estão em uso na clínica contra infecções causadas por *Candida*. Essa resistência pode ser intrínseca / natural, presente sem exposição prévia ao antifúngico, ou adquirida, onde a resistência se desenvolve em um organismo previamente susceptível após um período de exposição ao agente (SILVA et al., 2011, SEGURA et.al., 2017). Diversos são os mecanismos responsáveis pela resistência aos medicamentos antifúngicos das espécies de *Candida* relatados na literatura.

Dentre os mecanismos de resistência aos azóis temos à indução de bombas de efluxo pelos genes *CDR* e *MDR* que promovem a exocitose do fármaco diminuindo assim sua concentração na enzima-alvo (lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase). Um outro mecanismo que promove resistência aos azóis são alterações na enzima-alvo ou sobre expressão do gene que a codifica (*ERG11*), através de mutações pontuais que ocorre no gene *ERG11*, o que evita a sua ligação aos derivados triazólicos aumentando sua resistência por reduzir a sensibilidade. Além desses mecanismos a *Candida* ainda possui a capacidade de produzir vias alternativas como forma de compensar a perda de ergosterol induzida pelos azóis, isto é observado quando ocorre uma mutação no gene *ERG3* que leva a um acúmulo de 14- $\alpha$ -metilfecosterol, ao invés de 14- $\alpha$ -metil-3,6-diol (produto tóxico). Todos esses mecanismos de resistência aos azóis podem coexistir simultaneamente, desenvolvendo-se nestes casos, elevados níveis de resistência (SANGUINETTI. et. al., 2015, VIEIRA, NASCIMENTO., 2017).

Há ocorrência de mutações pontuais adquiridas nos genes *FKS* que codificam a enzima 1,3- $\beta$ -D-glucanosintetase, em regiões denominadas “hot-spot” (HS), são responsáveis pela resistência às equinocandinas. Essas alterações levam a diminuição da sua sensibilidade, associado a valores elevados de CIM e conseqüente falha terapêutica. Mutações intrínsecas também podem ocorrer, em que a forma alterada da enzima não tem tanta afinidade para o fármaco. A indução de uma

resposta adaptativa ao stress constitui um outro mecanismo de resistência, isto é, em função da inibição da síntese de glucano, a parede celular tem a capacidade de produzir outros componentes (por exemplo, quitina) (BEYDA. et. al., 2012, VIEIRA, NASCIMENTO., 2017).

Os mecanismos de resistência envolvendo a classe dos polienos, onde destaca-se a anfotericina B, observa-se uma resistência adquirida que relacionada com mutações que ocorrem no gene *ERG3*, cujas enzimas que codifica participam na síntese de ergosterol. Estas mutações afetam a biossíntese deste componente, podendo ocorrer modificações nos lipídios de membrana e um decréscimo na quantidade sintetizada. Outras mutações podem ocorrer com outros genes envolvidos na síntese do ergosterol – *ERG2*, *ERG5*, *ERG6* ou *ERG11*, levando à diminuição da sua quantidade ou à síntese de outros esteróis, alterações estas responsáveis pela redução da afinidade do fármaco para o seu alvo celular (MORIO et. al., 2012, GONÇALVES et. al., 2016, VIEIRA, NASCIMENTO., 2017).

O número limitado de agentes antifúngicos como também a elevada toxicidade e o crescente aumento de espécies resistentes aos mesmos, representam um grande desafio clínico e terapêutico no que se diz a respeito ao tratamento para *Candida* spp tornando necessária a busca de novas estratégias que visem a disponibilidade de terapias mais eficazes e desenvolvimento de nova geração de potentes antifúngicos (ANDERSON, 2005; ZAITZ et al., 2010).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Diversos medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas são desenvolvidos a partir de produtos naturais, sejam de forma direta ou indireta, especialmente de plantas medicinais, que apresentam grande variedade de compostos com propriedades terapêuticas e são consideradas importante fonte na obtenção de novos medicamentos. O uso de plantas como matéria prima para fármacos é comum em muitos países e está bem estabelecido nos aspectos culturais e tradicionais de algumas nações (ASSOB et al., 2011; SATI., JOSHI, 2011; NEWMAN, CRAGG, 2016).

Dentre os compostos bioativos produzidos pelas plantas temos os óleos essenciais que são misturas complexas de baixo peso molecular e que há muito tempo

têm sido utilizado em diversas aplicações na medicina popular com a finalidade de prevenir e tratar diversas doenças humanas como câncer e doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e trombose. Além de atuarem como, antiviral, antioxidante, hipoglicemiante, analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico, anestésico local, antibacteriano e antifúngico (SYLVESTRE et al., 2006; EDRIS, 2007; BAKKALI et al., 2008; RAUT, KARUPPAYIL, 2014).

Diferentes modos de ação podem estar envolvidos nos mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem inibir micro-organismos, e em parte isto pode ser devido à sua hidrofobicidade (KALEMBA., KUNICKA, 2003; EDRIS, 2006).

Óleos essenciais geralmente são constituídos por várias moléculas ativas, podendo assim afetar múltiplos alvos em uma célula (CARSON E HAMMER, 2011). Seu principal alvo é a membrana citoplasmática a qual pode perder funções celulares importantes, tais como a homeostase iônica e o transporte de elétrons, ao sofrerem perturbações ou permeabilização (BAKKALI et al., 2008). Sendo assim os óleos essenciais podem exercer efeitos citotóxicos em células eucarióticas através da permeabilização das membranas sejam elas externas (membrana plasmática) ou interna (membranas mitocondriais) provocando a morte celular por necrose e apoptose (ARMSTRONG, 2006).

Este efeito citotóxico dos óleos essenciais é importante para aplicações quimioterapêuticas contra uma variedade de vírus, bactérias e fungos. Contudo, essa toxicidade em células eucarióticas também é responsável pelos efeitos colaterais indesejáveis em relação ao hospedeiro o que limita o seu uso medicinal (BURT, 2004; ROTA et al., 2004; HAMMER, CARSON, 2011). Desta forma é de extrema importância a busca de novos produtos que sejam menos tóxicos e mais eficazes.

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005). A avaliação da citotoxicidade de constituintes tem como vantagens a redução dos efeitos sistêmicos, da variabilidade entre experimentos, menor gasto de droga e tempo, redução dos testes em animais, além de permitir estudos em células humanas (SPIELMANN et al., 2008).

Além de modelos *in vitro*, modelos de previsão assistida por computador, as chamadas ferramentas de previsão, desempenham um papel essencial no repertório proposto de métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas teóricas de um composto. Por isso, essas ferramentas são usadas para estudar os compostos existentes e hipotéticas, que são rápidos, reprodutíveis e são normalmente baseados em biorreguladores humanos (ANGELO et al, 2006; SRINIVAS et al, 2014).

Neste contexto, destaca-se os estudos com modelos *in silico*, que estão sendo aplicados para a avaliação da toxicidade teórica de um composto no meio metabólico de mamíferos, e cuja a utilização dentro de um ambiente regulatório também tem sido incentivada pela legislação recente (MARCHANT, 2012; ANVISA, 2014).

Diante disso, é evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade farmacológica e a toxicológica, seja esta teórica ou não, de um determinado produto natural a fim de verificarmos sua aplicabilidade terapêutica.

#### 2.4 *Gaultheria procumbens*

Dentre as plantas ricas em óleos essenciais temos a *Gaultheria procumbens* (**Figura 5**). A *Gaultheria* é uma planta medicinal também conhecida como Wintergreen (traduzido como Verde do Inverno) e Chá-Montês, pertencente a família da Ericaceae (<http://www.medicinanatural.com.br>; 2018).

É um arbusto pequeno, de baixo crescimento e de folhas perenes, nativo do norte da América do Norte e amplamente cultivado por todo o Hemisfério Norte devido ao seu valor ornamental e medicinal (MICHEL. et. al., 2017).

**Figura 5:** Folhas, flores e frutos da *Gaultheria procumbens*



**Fonte:** <http://web03.brunn.de/brunn/en/EUR//Pflanzen/GAULTHERIA-procumbens-L>

As plantas do gênero *Gaultheria* foram estudadas pela primeira vez pelo seu caráter aromático, onde os óleos essenciais deste gênero eram geralmente obtidos por hidrodestilação e o seu constituinte majoritário do óleo essencial da *Gaultheria procumbens* é o salicilato de metila, um produto natural encontrado em diversas espécies de plantas (NIKOLIĆ. et. al., 2013).

Os órgãos de plantas mais comuns de *Gaultheria procumbens* são as folhas, tradicionalmente valorizadas como agentes anti-inflamatórios e analgésicos (LIU. et. al., 2013). No Brasil, ela é encontrada geralmente na forma de óleo essencial em casas especializadas e farmácias de manipulação, por sua ação anti-inflamatória e analgésica é recomendada para tratamento de dores musculares, tendinite, reumatismo (nos músculos e tendões, artrite, artrose) (GRUFFAT., 2015).

Dados na literatura demonstram que os extratos e compostos derivados de plantas *Gaultheria* exibem um amplo espectro de atividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, cobrindo propriedades antiinflamatórias, analgésicas, antioxidantes e antibacterianas (LIU. et. al., 2013). Estudos realizados com óleo essencial da *Gaultheria procumbens* demonstrou que este foi capaz de inibir a formação de do biofilme de *Streptococcus mutans* oral e *C. albicans* (NIKOLIĆ. et. al., 2013).

Entretanto estes estudos de atividade antifúngica de *Gaultheria procumbens* são limitados à determinação da concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima sobre uma única espécie de *Candida*, desta forma não há estudos em relação ao mecanismo pelo qual essa ação antifúngica ocorre ou sobre sua toxicidade.

*Objetivo*

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra cepas de *Candida*, bem como sua citotoxicidade e toxicidade teórica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra diferentes cepas de *candidas*.
- Investigar os possíveis modos de ação do OEGp com ênfase nos seus efeitos sobre a parede celular e a membrana plasmática fúngica;
- Avaliar o efeito da associação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* com anfotericina B;
- Testar a citotoxicidade do OEGp em hemácias humanas;
- Investigar as propriedades farmacológicas e toxicológicas teórica *in sílico* do constituinte majoritário do OEGp.

# *Material e Métodos*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POSICIONAMENTO ÉTICO

Para realização deste ensaio foi levado em consideração os aspectos legais e éticos da pesquisa envolvendo humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Francisco Mascarenhas/ Faculdades Integradas da Patos, com o CEP 58704-000, aprovou esta pesquisa, Protocolo de N°2.373.249.

### 4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DA SUBSTÂNCIA TESTE

O óleo essencial de *Gaultheria procumbens* foi adquirido na Empresa Herbia<sup>®</sup>, sendo extraído por destilação a vapor das folhas. Esse produto teve seus parâmetros de qualidade (coloração, pureza, odor, densidade a 20 °C e índice de refração a 20 °C) descritos em um boletim técnico enviado pela empresa. A emulsão do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento da execução dos ensaios, dissolvendo-as primeiramente em DMSO e em seguida em Tween 80 em uma proporção de até 10% e 2%, respectivamente, utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada, seguindo o protocolo de ALLEGRINI et al. (1973).

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DO COMPONENTE MAJORITÁRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Gaultheria procumbens*

A quantificação do componente majoritário do OEGp foi realizado através de um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo CG17-A, com sistema equipado com um injetor automático e Detector de Ionização de Chama (DIC). A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class 5000. A fase móvel foi composta de nitrogênio e bombeada na vazão de 20 mL/min. com split 1:10.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar DB-1 (30m x 0,25mm; 0,25µm). A temperatura do forno da coluna foi programada para passar de uma temperatura inicial de 70°C a 280 a 5°C/mim. A temperatura do injetor e do detector foram 250 e 280°C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 42 minutos e o volume de injeção foi de 1,0µL (Boer et al., 2013).

O OEGp e padrão (salicilato de metila) foram injetados na concentração de 2 µL/mL.

Este experimento foi realizado em colaboração com o prof. Dr. Fabio Santos de Souza do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, Campus I.

#### 4.4 ANÁLISE *IN VITRO*

##### 4.4.1 Meios de Cultura

Para a manutenção das linhagens e ensaios da atividade antifúngica, eram utilizados o Ágar Sabouraud Dextrose – ASD, Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO LABORATORIES/ USA/FRANCE) e RPMI 1640-L-glutamina (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), preparados conforme as instruções do fabricante.

##### 4.4.2 Cepas Fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas as seguintes cepas de *Candida*:

- ***Candida albicans***: C a ATCC 76485, C a LM – 05, C a LM – 09, C a LM – 12, C a LM – 62, C a LM – 106, C a LM – 108 e C a LM – 111;
- ***Candida tropicalis***: C. t. ATCC 13803, C. t. LM – 04, C. t. LM – 20 e C. t. LM – 64;
- ***Candida krusei***: C. K. ATCC- 6258, C. K. LM – 08, C. K. LM – 13 e C. K. LM – 656;
- ***Candida glabrata***: C. g. LM – L6, C. g. LM – 17, C. g. LM – 116 e C. g. LM – 302;
- ***Candida parapsilosis***: C. p. ATCC 22019, C. p. LM – 02, C. p. LM – 04, C. p. LM – 09 e C. p. LM – 14.

Todas as cepas fazem parte da MICOTECA Laboratório de Pesquisas em atividade antibacteriana e antifúngica de produtos naturais e/ou sintéticos bioativos/ do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose a uma temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ágar Sabouraud dextrose incubados a 35 °C.

#### **4.4.3 Preparado do Inóculo**

Para preparação do inóculo, culturas de *Candida* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  /24-48 horas. Colônias desta cultura foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) (CLEELAND., SQUIRES, 1991; HADACEK., GREGER, 2000).

#### **4.4 4 Antifúngico**

O antifúngico utilizado na execução dos testes foi a Anfotericina B adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP).

#### **4.4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos descritos por Cleeland., Squires (1991) e Hadacek., Greger (2000).

A determinação da CIM do óleo essencial de *G. procumbens*, bem como da anfotericina B sobre cepas de *Candida* foram realizados através da técnica da microdiluição em RPMI. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640-L-glutamina sem bicarbonato duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas ensaiadas. E também controle de sensibilidade destas cepas frente à ação de um antifúngico

considerado padrão na utilização clínica (Anfotericina B). As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 - 48 horas para ser realizada a leitura. A CIM é definida como a menor concentração do produto testado capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios.

A atividade biológica dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade forte/ótima; 600-1500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade moderada; > acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$  = baixa atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

#### **4.4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Após leitura da CIM, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades onde for observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram subcultivadas em 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 contidos em novas placas de cultura de células. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios (NCUBE, AFOLAYAN; OKOH., 2008).

#### **4.4.7 Atividade Antifúngica *In Vitro* com Alvos Específicos**

Após a leitura e interpretação dos resultados obtidas por meio das técnicas demonstradas anteriormente, foram escolhidas duas cepas de *Candida*, uma padrão (ATCC 76485) e uma clínica (*C. albicans* LM – 62), para a continuidade deste trabalho.

##### **4.4.7.1 Ação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* na parede celular fúngica**

Para investigar a ação do produto na parede celular fúngica foi realizado ensaio com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Caso o produto atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele

provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio comparou as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M.

A determinação da CIM do óleo essencial de *G. procumbens*, na presença do sorbitol (0,8M), foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U" (ALAMAR®) e em duplicata, semelhante ao item 4.4.5. Em uma colona de duas placas distintas, foram adicionado em todos os 12 poços 100 µL do meio líquido CSD sem sorbitol (PM = 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Posteriormente, 100 µL da solução óleo essencial de *G. procumbens*, na concentração de 1024 µg/mL, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da colona da placa a qual foi determinado. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois obteve-se uma concentração de 512 até 1 µg/mL do óleo essencial de *G. procumbens*. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades de ambas as placas, onde cada colona da placa refere-se a uma cepa fúngica (FROST et al., 1995).

Foi realizado um controle de micro-organismos colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo RPMI e sorbitol (0,8 M) também duplamente concentrados, e 10 µL do inóculo de cada espécie. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas para ser realizada a leitura (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).

#### 4.4.7.2 Ação do óleo essencial de *G. procumbens* na membrana celular

##### ❖ Ensaio de ligação ao ergosterol

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando a ruptura da membrana celular fúngica e perda de conteúdo intracelular. Para determinar se o óleo essencial de *G. procumbens* se liga a esteróis da membrana fúngica, a CIM foi determinada na presença e na ausência do ergosterol. Se a atividade do óleo essencial de *G. procumbens* for causada pela ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impedirá a ligação com o ergosterol da membrana fúngica e como consequência, a CIM tende a aumentar na presença do ergosterol exógeno em relação ao ensaio controle. Caso a CIM permaneça inalterada

na presença de diferentes concentrações exógenas de ergosterol, sugere-se que este composto não age ligando-se ao ergosterol da membrana. Da mesma forma, pode-se observar se este comportamento é específico para o ergosterol ou se ele acontece semelhantemente com colesterol.

O ergosterol foi preparado no momento da execução do teste, onde primeiramente foi pulverizado (com auxílio de cadinho de porcelana e um pistilo previamente esterilizados) e dissolvidos em DMSO (não mais que 10% do volume final) e Tween 80 a 1%, de acordo com o volume e concentração desejada. A emulsão formada foi então homogeneizada, aquecida para aumentar a solubilidade e diluída com o meio de cultura líquido. A determinação da CIM do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra cepas de *C. a* ATCC 76485 e *C. a* LM – 62, foram realizadas por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” semelhante ao protocolo descrito no item 4.4.5. O meio de cultura RPMI-1640 foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol. Por fim, foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cuja interação com ergosterol já é conhecida, para servir como uma droga controle. As placas foram seladas e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-48 horas para ser realizada a leitura (ESCALANTE et al., 2008; LUNDE; KUBO, 2000).

#### 4.4.8 Avaliação da interferência do óleo essencial de *G. procumbens* sobre a resistência aos antifúngicos licenciados

Para avaliar se o óleo essencial de *G. procumbens* modularia a ação da anfotericina B frente à cepas de *C. a* ATCC 76485 e *C. a* LM 62 a CIM deste antifúngico foram determinadas, pela técnica de microdiluição, na ausência e na presença do óleo essencial de *G. procumbens* em concentrações sub-inibitórias (CIM/8). Os valores de CIM do antifúngico forma incubadas durante 24 horas a 35 - 37 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (COUTINHO et. al., 2008; ELIOPOULOS, MOELLERING, 1991).

## 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO EM ERITRÓCITOS HUMANOS

### 4.5.1 Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos Humanos

Foi investigada a citotoxicidade do óleo essencial de *G. procumbens* sobre células sanguíneas dos tipos A, B e O. Para tanto, uma amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% (RANGEL et al., 1997).

Foi adicionado a 2 mL da suspensão de eritrócitos diferentes concentrações do óleo essencial de *G. procumbens* até um volume final de 2,5 ml. As amostras foram, então, incubadas por 1 hora à  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante (100 rpm), foram realizados controles negativo (uma suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos- 0 % de hemólise) e positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1%- 100 % de hemólise), decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 4.6 ENSAIOS *IN SILICO*

### 4.6.1 *Pass Online*

Para análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do composto em estudo foi utilizado o software *Pass online*. Todas as informações químicas necessárias sobre a molécula do salicilato de metila (fitoconstituente marjoritário do *Gaultheria procumbens*) foram obtidas do programa *Chemdraw*.

A previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online é um software projetado para avaliação do potencial biológico de uma molécula orgânica, de forma geral, sobre o organismo humano, por meio de previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura do composto. O *Pass online* dá várias facetas da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

#### 4.6.2 Análise Teórica da Toxicidade e dos Parâmetros Farmacocinéticos

Para o estudo dos parâmetros farmacológicos e toxicológicos teórico deste composto, foi realizada a avaliação *in silico* dos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade). Para isto foi utilizado uma ferramenta conhecida como admetSAR, a qual permite relacionar alguns parâmetros com a absorção, toxicidade e metabolização. Esses parâmetros são permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do citocromo, se são inibidores de transporte renal de cátions, o estudo teórico sobre o efeito carcinogênico, o teste de AMES e a toxicidade oral aguda (LIPINSKI et al., 2001; CONEJO, 2016).

A classificação da toxicidade aguda foi baseada nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que divide os compostos de acordo com a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ). A categoria I contém os compostos com valores de  $DL_{50}$  inferior ou igual a 50 mg/kg, a Categoria II contém compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 50 mg/kg e inferior a 500 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg e a Categoria IV consiste de compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 5000 mg/kg. O programa foi acessado em: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) e analisados empregando o teste t de Student para análise de duas colunas. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism® versão 6.0.

# *Resultados e Discussão*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre espécies do gênero *Candida*

Será submetido a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

ISSN: 1983-084X

Qualis: B2

## **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre espécies do gênero *Candida***

**Kívia Sales de Assis\*<sup>1</sup>, Daniele de Figueredo Silva<sup>1</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>2</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de micologia, Departamento de ciências farmacêuticas, Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brasil.

<sup>2</sup> Unidade acadêmica Ciências biológicas, Centro de saúde e tecnologia rural, Universidade federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

\* Endereço: Rua João Batista Fernandes, 123, Apt. 803 A. Aeroclubes, João Pessoa, Paraíba, 58036-820, Brasil. Tel.: 55(083) 98816.2010. E-mail: kivia.sales@gmail.com.

### **RESUMO**

A incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* (candidíase ou candidose) aumentou consideravelmente ao longo das últimas três décadas, principalmente devido ao maior número de pacientes imunocomprometidos. A *Candida albicans* ainda é a principal causa da candidíase no entanto, as espécies de *Candida* não-*albicans* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, agora são frequentemente identificadas como agentes patogênicos humanos. Desde a antiguidade, a medicina popular se beneficiaram do uso de derivados de plantas, como óleos essenciais, para combater diferentes doenças, dentre elas as infecções fúngicas, sendo assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria Procumbens* frente a diferentes espécies de *Candida* por meio de técnicas de microdiluição, avaliando-se a concentração inibitória mínima – CIM e concentração fungicida mínima – CFM. Os resultados obtidos revelaram que óleo essencial de *G. Procumbens* possui atividade antifúngica frente as cepas clínicas de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* em contrapartida para *C. glabrata* não foi observado esse efeito. Esse estudo reforça o conceito de que os óleos essenciais ou alguns de seus constituintes podem ser úteis no manejo clínico de infecções fúngicas, contudo estudos adicionais são necessários.

Palavras-chave: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Gaultheria procumbens*.

## INTRODUÇÃO

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíase e são consideradas doenças oportunistas com características superficiais e sistêmicas. Embora a maioria dos isolamentos das infecções fúngicas por *Cândida* correspondam a *C. albicans*, desde a década de 80 observa-se uma mudança na epidemiologia destas infecções constatando-se um aumento de casos relacionados as espécies de *candidas não-albicans* (Deorukhkar & Saini, 2015; Sardi et al., 2013). Dentre as candida não-albicans as mais frequentes relatadas são *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (Deorukhkar et.al., 2014; Yapar, 2014; Gehring et. al., 2016).

Diversos são os fatores implicados no aumento das doenças fúngicas, mas geralmente, são significativamente aceitos que o uso crescente e generalizado de certas práticas médicas, tais como terapias imunossupressoras, procedimentos cirúrgicos invasivos e uso de antimicrobianos de amplo espectro estejam envolvidos (Kojic & Darouiche, 2004; Silva et.al., 2012).

A crescente incidência de fungos resistentes a múltiplos medicamentos tem dificultado o tratamento dessas doenças infecciosas, a alta mortalidade associada a infecções fúngicas disseminadas é particularmente preocupante, dada a opções de tratamento limitadas e a alta capacidade de adaptação de patógenos fúngicos (Kotackowska & Kotackowski, 2016). Desta forma, torna-se necessária a busca de novas estratégias que visem a disponibilidade de terapias mais eficazes e desenvolvimento de nova geração de potentes antifúngicos (Anderson, 2005; Zaitz et al., 2010).

As plantas medicinais e em especial os óleos essenciais têm sido fonte preferencial de moléculas ativas, eles são metabólitos secundário das plantas e um dos produtos naturais mais promissores no que se diz a respeito de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e têm conhecida atividade antimicrobiana, desde a antiguidade (Kalemba.& Kunicka, 2003; Matasyoh et. al., 2007; Hu et. al., 2007; Saad et al., 2010).

Diversos são os estudos que relatam a atividade antifúngica de óleos essenciais e dentre as plantas ricas em óleo essencial temos a *Gaultheria procumbens*, conhecida como Wintergreen (traduzido como Verde do Inverno) e Chá-

Montês, pertencente a família da Ericaceae (<http://www.medicinanatural.com.br>; 2018).

É um arbusto pequeno, de baixo crescimento e de folhas perenes, nativo do norte da América do Norte e amplamente cultivado devido ao seu valor ornamental e medicinal. Os órgãos de plantas mais comuns de *G. procumbens* são as folhas, tradicionalmente valorizadas como agentes anti-inflamatórios e analgésicos (Liu. et. al., 2013; Michel. et. al., 2017). Contudo pouco se sabe da ação desse dessa planta sobre agentes fúngicos.

Tendo em vista o atual aumento da incidência de candidíase relacionada a espécies de *candidas não-albicans* e o surgimento de cepas resistentes tornando essencial a busca de novos agentes antifúngicos, o objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *G. procumbens* contra cepas de *Candida não-albicans*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de *G. procumbens* foi adquirido na Empresa Herbia<sup>®</sup>, sendo extraído por destilação a vapor das folhas. A emulsão do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento da execução dos ensaios, dissolvendo-as primeiramente em DMSO e em seguida em Tween 80 em uma proporção de até 10% e 2%, respectivamente, utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada, seguindo o protocolo de Allegrini et al. (1973).

### 2.2 Microrganismos

***Candida tropicalis***: C. t. ATCC 13803, C. t. LM – 04, C. t. LM – 20 e C. t. LM – 64; ***Candida krusei***: C. K. ATCC- 6258, C. K. LM – 08, C. K. LM – 13 e C. K. LM – 656; ***Candida glabrata***: C. g. LM – L6, C. g. LM – 17, C. g. LM – 116 e C. g. LM – 302; ***Candida parapsilosis***: C. p. ATCC 22019, C. p. LM – 02, C. p. LM – 04, C. p. LM – 09 e C. p. LM – 14.

Todas as cepas de micro-organismos foram provenientes da MICOTECA do laboratório de micologia, Laboratório de Pesquisas: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências

Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

### 2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos descritos por Cleeland & Squires (1991) e Hadacek & Greger (2000).

A determinação da CIM do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, sobre cepas de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram realizados através da técnica da microdiluição em RPMI 1640 em placa para cultura de células contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640-L-glutamina sem bicarbonato duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies de *cândida albicans* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas ensaiadas (RPMI 1640 + leveduras). E também controle de sensibilidade destas cepas frente à ação de um antifúngico considerado padrão na utilização clínica (RPMI 1640 + inóculo + anfotericina B 100 µL). A CIM é definida como a menor concentração do produto testado capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios.

### 2.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde for observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram subcultivadas em 100 µL de RPMI 1640 contidos em novas placas de cultura de células. As placas foram incubadas a 35° C por 24-48

horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios (NCUBE et. al., 2008).

### 3 RESULTADOS

Os resultados dos ensaios da avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, sobre cepas de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* encontram-se a seguir.

Para *C. parapsilosis* todas as cepas clínicas testadas foram sensíveis ao óleo essencial de *Gaultheria procumbens* apresentando uma CIM e CFM (**Tabela 1**) de 8 µg/mL, respectivamente.

**TABELA 1-** Resultados da avaliação da CIM e CFM (µg/mL) do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (OEGp) sobre cepas de *C. parapsilosis*

Cepas fúngicas	OEGp		Razão CFM/CIM	Anfotericina B (100µg)	Controle da levedura
	CIM	CFM			
<b>C. p. ATCC 22019</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. p. LM - 02</b>	8	8	1	-	+
<b>C. p. LM - 04</b>	8	8	1	-	+
<b>C. p. LM - 09</b>	8	8	1	-	+
<b>C. p. LM - 14</b>	8	8	1	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (R) Resistente; (NI) Não identificado

Semelhante a *C. parapsilosis*, todas as cepas clínicas de *C. krusei* testadas foram sensíveis para o óleo essencial de *G. procumbens* apresentando tanto a CIM e a CFM (**Tabela 2**) variando entre 64 a 128 µg/mL.

**TABELA 2-** Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de *G. procumbens* sobre cepas de *C. krusei*.

Cepas fúngicas	OEGp		Razão CFM/CIM	Anfotericina B (100 $\mu\text{g}$ )	Controle da levedura
	CIM	CFM			
<b>C. k. ATCC 6258</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. k. LM - 08</b>	64	64	1	-	+
<b>C. k. LM - 13</b>	128	128	1	-	+
<b>C. k. LM - 656</b>	64	64	1	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (R) Resistente; (NI) Não identificado

Já para *C. tropicalis* o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* não demonstrou ação antifúngica para a maioria das cepas testadas (*C. t.* ATCC 13803, *C. t.* LM – 04, *C. t.* LM – 20), com exceção da *C. t.* LM – 64 que apresentou tanto uma CIM quanto uma CFM de 32  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. (**Tabela 3**)

**TABELA 3-** Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre cepas de *C. tropicalis*

Cepas fúngicas	OEGp		Razão CFM/CIM	Anfotericina B (100 $\mu\text{g}$ )	Controle da levedura
	CIM	CFM			
<b>C. t. ATCC 13803</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. t. LM - 04</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. t. LM - 20</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. t. LM - 64</b>	32	32	1	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (R) Resistente; (NI) Não identificado

Todas as cepas de *C. glabrata* que foram testadas demonstram insensibilidade para óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (**Tabela 4**)

**TABELA 4-** Resultados da avaliação da CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre cepas de *C. glabrata*

Cepas fúngicas	OEGp		Razão CFM/CIM	Anfotericina B (100 $\mu\text{g}$ )	Controle da levedura
	CIM	CFM			
<b>C. g. LM - L6</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. g. LM - 17</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. g. LM - 116</b>	R	NI	-	-	+
<b>C. g. LM - 302</b>	R	NI	-	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (R) Resistente; (NI) Não identificado

#### 4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que demonstra a ação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* frente a diferentes tipos de candida. Analisando estes resultados observa-se que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* foi capaz de promover atividade antifúngica contra cepas clínicas de *C. parapsilosis* e *C. krusei*, em contrapartida para *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram insensíveis com exceção da C. t. LM – 64.

Através da análise dos resultados obtidos, observa-se que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* teve seu valor de CIM<sub>50</sub> estabelecido em 8  $\mu\text{g/mL}$ , para cepas de *C. parapsilosis* e de 64  $\mu\text{g/mL}$  para cepas de *C. krusei*. Sendo assim, pode-se afirmar que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* apresentou atividade antimicrobiana considerada ótima, em concordância com Sartoratto et al. (2004), que afirmam que os compostos que possuem CIM variando de 50 a 500  $\mu\text{g/mL}$  podem ser considerados de atividade antimicrobiana ótima, bem como, em concordância com Holetz et al. (2002), que atribuem atividade ótima a compostos que apresentem CIM menor que 100  $\mu\text{g/mL}$ . E de acordo com Hafidh et al., (2011) essa atividade antifúngica é de natureza fungicida, pois a relação CFM/CIM está compreendida entre 1:1 a 2:1.

Diversos são os mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem atuar promovendo sua ação antifúngica. De acordo com Freiesleben & Jager (2014), os

agentes antifúngicos podem desativar o fungo, interrompendo a estrutura e a função das membranas ou organelas de células fúngicas e / ou inibindo a síntese de materiais nucleares ou proteínas.

Além dessas ações eles os óleos essenciais podem promover sua ação antifúngica por inibir bomba de efluxo, por atuar na membrana das mitocôndrias fúngicas, inibir o desenvolvimento do biofilme e inibir a síntese/produção de micotoxinas, entre outros (Nazzaro et. al., 2017).

Sendo assim, estudos adicionais são necessários para conseguir elucidar o mecanismo pelo qual o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* que promove sua atividade antifúngica frente a essas espécies de *candida*.

## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sustentam o conceito de que os óleos essenciais ou alguns de seus constituintes podem ser úteis no manejo clínico de infecções fúngicas e que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* possui atividade antifúngica frente as espécies *C. parapsilosis* e *C. krusei*, contudo são necessários estudos adicionais.

## Referências

Allegrini, M., Siméon, M., Maillos, H., Boiloot, A. Èmulsions et applications en microbiologie. **Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, p. 73-86, 1973.

Anderson, J.B. Evolution of antifungal drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nature**, v. 3, n. 7, p. 545-556, 2005.

Cleeland R & Squires, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

Deorukhkar, S, C.; Saini, S.& Mathew, S. Non-albicans Candida infection: an emerging threat. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, 2014.

Deorukhkar, S. C., & Saini, S. Non albicans Candida species: A review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Pravara Medical Review**, v. 7, n. 3, p. 7-15, 2015.

Freisesleben, S.H.& Jager, A.K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism—a review. **Medicinal and Aromatic Plant Science**, 3, 1–6, 2014.

Gehring, G. M., Carrilho, C. M. M., Pelisson, M., Perugini, M., & Tano, Z. N. Candidemia: Revisão Bibliográfica. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 4, 2016.

Hadacek, F. & Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000. Hammer et al. (1999)

Hafidh, R.R.; Abdulmir, A.S.; Vern, L. S.; Bakar, F.A.; Abas, F.; Jahanshiri, F.; Sekawi, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96–106. 2011

Holetz, F.B.; Pessini, G.L. Sanches, D.A.G.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

Hu, Y.; Zhang, J.; Kong, W.; Zhao, G. & Yang, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa L.*) on *Aspergillus flavus*. **Food chemistry**. v.220, p. 1–8, 2007.

Kalemba, D. & Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. 10, 813–829, 2003.

Kojic EM & Darouiche RO. Candida infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**. 17: 255–267, 2004.

Kołaczkowska A & Kołaczkowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v 71(6): 143850, 2016.

Liu, W.R.; Qiao, W.L.; Liu, Z.Z.; Wang, X.H.; Jiang, R.; Li, S.Y.; Shi, R.B. & She, G.M. *Gaultheria*: Phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, 18, 12071–12108, 2013.

Matasyoh, J.C.; Kiplimo, J.J.; Karubiu, N.M. & Hailstorks, T.P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphoratus*. **Food chemistry**. v. 101, n. 3, p. 1183–1187, 2007.

Michel, P., Owczarek, A., Matczak, M., Kosno, M., Szymański, P., Mikiciuk-Olasik, E., & Olszewska, M.A. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens L.*) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxigenase Inhibitory Activity. **Molecules**, 22(3), 412, 2017.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Feo, V.D. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

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, 2008.

Saad, A.; Fadli, M.; Bouaziz, M.; Benharref, A.; Mezrioui, N.-E.; Hassani, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057–1060, 2010.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., & Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

Yapar, Nur. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 10, p. 95, 2014.

Zaitz, C. Zaitz C, Campbell I, Marques S.A, Ruiz L.R.B & Framil V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, . 432p. 2010.

**5.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre *Candida albicans***

Será submetido a The Brazilian Journal of Infectious Diseases

ISSN: 1678-4391

Qualis: B1

## **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre *Candida albicans***

**Kívia Sales de Assis\*<sup>1</sup>, Daniele de Figueredo Silva<sup>1</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>2</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de micologia, Departamento de ciências farmacêuticas, Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brasil.

<sup>2</sup> Unidade acadêmica Ciências biológicas, Centro de saúde e tecnologia rural, Universidade federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

\* Endereço: Rua João Batista Fernandes, 123, Apt. 803 A. Aeroclubes, João Pessoa, Paraíba, 58036-820, Brasil. Tel.: 55(083) 98816.2010. E-mail: kivia.sales@gmail.com.

### **RESUMO**

A *candidíase* é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*. Atualmente, os tratamentos convencionais das infecções fúngicas não são totalmente eficazes em virtude do surgimento de cepas resistentes e dos problemas relacionados à segurança e toxicidade dos fármacos antifúngicos comercialmente disponíveis o que leva a busca por novos antifúngicos, mais eficazes e menos tóxicos. Neste contexto, compostos antifúngicos de origem natural, tais como os óleos essenciais, vem recebendo bastante atenção. Dentre as plantas ricas em óleos essenciais temos a *Gaultheria procumbens*, tradicionalmente valorizada como agente anti-inflamatórios e analgésicos contudo pouco são os estudos sobre a ação fúngica deste óleo. sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *G. procumbens* e sobre o gênero *Candida albicans* por meio de técnicas de microdiluição, avaliando-se a concentração inibitória mínima – CIM, a concentração fungicida mínima – CFM, o efeito na parede celular e na membrana plasmática bem como o efeito de associação deste óleo com a anfotericina B. Os resultados obtidos revelaram que óleo essencial de *G. procumbens* possui uma ação antifúngica de forma independente de parede celular ou de membrana plasmática e que seu efeito foi potencializado quando associado a anfotericina B.

**Palavras chaves:** *Gaultheria procumbens*, atividade antifúngica, *Candida albicans*.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, as infecções por *Candida* têm aumentado não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença, levando a um alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (GEHRING et.al., 2016). A espécie predominantemente relacionada aos quadros de candidíase clínica, sejam superficiais ou invasivos, é a *Candida albicans*. Estima-se que a frequência de isolamento dessa espécie chega a aproximadamente 40% em países da América Latina e de até 70% em alguns países da Europa nos casos de candidemia (KUMAR et al. 2009; PFALLER, DIEKEMA 2007; SILVA et al. 2012).

Por mais que a terapêutica das micoses tenha evoluído, melhorando não só sua eficácia e espectro de ação mas também sua tolerância, manejo e tempo de tratamento, o uso excessivo destes fármacos tem propiciado o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes (ZAITZ et al., 2010; FREIRE et al., 2016). Além disso, algumas drogas, como a anfotericina B, são muito tóxicos, dificultando o seu tempo de uso terapêutico (SANGLARD; ODDS, 2002).

Desta forma é necessário o desenvolvimento de novas terapias, novos fármacos antifúngicos que apresentem eficácia e baixo custo, dentre as possibilidades, os produtos naturais e seus derivados têm sido reconhecidos por muitos anos como fontes de agentes terapêuticos e de diversidade estrutural (LAHLOU, 2013, ORHAN et al. 2010; BOSTROM et al. 2012; ANEJA et al. 2016).

Dentre os compostos bioativos produzidos pelas plantas temos os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e geralmente odoríferas, originados do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, devido a sua principal característica que é a volatilidade; óleos etéreos devido à solubilidade em solventes orgânicos apolares como éter; ou essências devido ao aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais (SIMÕES., SPITZER, 2004). A *Gaultheria procumbens* é umas das plantas ricas em óleos essenciais, ela é um arbusto pequeno, de baixo crescimento e de folhas perenes, nativo do norte da América do Norte e amplamente cultivado por todo o Hemisfério Norte devido ao seu valor ornamental e medicinal. Os órgãos de plantas mais comuns de *G. procumbens* são as folhas, tradicionalmente

valorizadas como agentes anti-inflamatórios e analgésicos (LIU. et. al., 2013; MICHEL. et. al., 2017).

Diante da importância clínica e da alta incidência da candidíase bem como o surgimento de cepas resistentes, a busca por novos agentes antifúngicos mais eficazes, menos tóxicos, se faz necessário, neste contexto os produtos derivados de plantas medicinais são excelentes alternativas para esse propósito. Desta forma o objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica do óleo essencial de *G. procumbens* sobre o gênero *Candida albicans*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do óleo essencial**

O óleo essencial de *G. procumbens* foi adquirido na Empresa Herbia<sup>®</sup>, sendo extraído por destilação a vapor das folhas. A emulsão do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento da execução dos ensaios, dissolvendo-as primeiramente em DMSO e em seguida em Tween 80 em uma proporção de até 10% e 2%, respectivamente, utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada, seguindo o protocolo de ALLEGRI et al. (1973).

### **2.2 Microrganismos**

*Candida albicans*: C a ATCC 76485, C a LM – 05, C a LM – 09, C a LM – 12, C a LM – 62, C a LM – 106, C a LM – 108 e C a LM – 111). Todas as cepas de microorganismos foram provenientes da MICOTECA do laboratório de micologia, Laboratório de Pesquisas: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

### **2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos descritos por CLEELAND., SQUIRES (1991) e HADACEK., GREGER (2000).

A determinação da CIM do óleo essencial de *G. procumbens*, sobre cepas de *Candida albicans* foram realizados através da técnica da microdiluição em RPMI 1640 em placa para cultura de células contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos

100 µL de RPMI 1640-L-glutamina sem bicarbonato duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies de *candida albicans* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas ensaiadas (RPMI 1640 + leveduras). E também controle de sensibilidade destas cepas frente à ação de um antifúngico considerado padrão na utilização clínica (RPMI 1640 + inóculo + anfotericina B 100 µL). A CIM é definida como a menor concentração do produto testado capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios.

#### 2.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde for observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram subcultivadas em 100 µL de RPMI 1640 contidos em novas placas de cultura de células. As placas foram incubadas a 35° C por 24-48 horas. A CFM é considerada como a menor concentração em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios (NCUBE, AFOLAYAN, OKOH., 2008).

A relação CFM / CIM foi calculada para determinar se a substância tinha uma atividade fungistática ( $MFC / MIC \geq 4$ ) ou fungicida ( $MFC / MIC < 4$ ) (SIDDIQUI, et al, 2013).

#### 2.5 Efeitos do ensaio de sorbitol

Após a leitura e interpretação dos resultados obtidas por meio das técnicas demonstradas anteriormente, foram escolhidas duas cepas de *Candida*, uma padrão (ATCC 76485) e uma clínica (*C. albicans* LM – 62), para a continuidade deste trabalho.

O ensaio foi realizado utilizando meio na presença e na ausência do sorbitol (controle), para avaliar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antifúngica do óleo essencial de *G. procumbens* na parede celular *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM – 62. O sorbitol foi adicionado ao meio de cultura numa concentração final de 0,8 M. O ensaio foi realizado por método de microdiluição em placas de 96 poços em a -Ull (Alamar, Diadema, SP, Brasil) (CLEELAND., SQUIRES,1991, HADACEK., GREGER, 2000). As placas foram seladas assepticamente, incubadas a 35 °C, e as leituras foram realizadas após 24 - 48 horas. O ensaio foi realizado em duplicado e expresso como a média geométrica dos resultados.

## 2.6 Ensaio de ligação ao ergosterol

Para avaliar se o produto se liga a esteróis de membrana fúngica, realizamos um experimento de acordo com o método descrito por ESCALANTE et al. (2008), com algumas modificações. O ergosterol foi preparado como descrito por LEITE et al. (2014). A CIM do óleo essencial de *G. procumbens*, contra *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM – 62, foi determinada pelo uso de técnicas de microdiluição de caldo (CLEELAND., SQUIRES,1991; HADACEK., GREGER, 2000), na presença e ausência de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) adicionado ao meio de ensaio, em diferentes linhas na mesma microplaca. Resumidamente, uma solução do óleo essencial de *G. procumbens* foi diluída em série duas vezes com RPMI-1640 (volume = 100 µL) contendo ergosterol adicionado a uma concentração de 400 µg / mL. Uma suspensão de fermento em volume de 10 µL (0,5 McFarland) foi adicionado a cada poço. O mesmo procedimento foi realizado para a anfotericina B, cuja interação com a membrana ergosterol já é conhecida, que serviu como droga de controle. As placas foram seladas e incubadas a 35°C por 24 - 48 horas para ser realizada a leitura (ESCALANTE et al., 2008; LUNDE; KUBO, 2000). O ensaio foi realizado em duplicado e a média geométrica dos valores foi calculada.

## 2.7 Avaliação da interferência do óleo essencial de *G. procumbens* sobre a resistência aos antifúngicos licenciados

Para avaliar se o óleo essencial de *G. procumbens* modularia a ação da anfotericina B frente à cepas de *C.albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* 62 a CIM deste antifúngico foram determinadas, pela técnica de microdiluição, na ausência e na presença do óleo essencial de *G. procumbens* em concentrações sub-inibitórias (CIM/8). Os valores de CIM do antifúngico foram incubadas durante 24 horas a 35 - 37 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (COUTINHO et. al., 2009; ELIOPOULOS, MOELLERING, 1991).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antifúngica para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e a CFM (Concentração Fungicida Mínima) do óleo essencial de *G. procumbens* frente as 8 cepas de *Candida albicans* estão demonstradas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *G. procumbens* (OEGp) sobre cepas de *C. albicans*. Os valores de CIM e CFM foram expressos em µg / mL.

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) crescimento de leveduras; (R) Resistente.

Cepas fúngicas	OEGp		Razão CFM/CIM	Anfotericina B (100µg)	Controle da levedura
	CIM	CFM			
<b>C a ATCC 76485</b>	4	4	1	-	+
<b>C a LM - 05</b>	R	-	-	-	+
<b>C a LM - 09</b>	R	-	-	-	+
<b>C a LM - 12</b>	R	-	-	-	+
<b>C a LM - 62</b>	4	4	1	-	+
<b>C a LM - 106</b>	4	4	1	-	+
<b>C a LM - 108</b>	4	4	1	-	+
<b>C a LM - 111</b>	8	8	1	-	+

Ao analisar os resultados obtidos na Tabela 1, observa-se que o óleo essencial *G. procumbens* foi capaz de inibir o crescimento de 5 das 8 cepas submetidas aos ensaios biológicos, com a CIM variando entre 8 - 4 µg / mL em contra partida, 3 cepas demonstraram-se resistente mesmo na concentração máxima testada (1024 µg / mL). Todas as cepas fúngicas foram capazes de crescer em RPMI 1640 sem adição do óleo essencial, o que caracteriza sua viabilidade (controle de micro-organismo).

Dados na literatura interpretam e consideram os produtos testados com atividade biológica ativa ou inativa de acordo com seguintes critérios: < abaixo de 500 µg/mL = atividade forte/ótima; 600-1500 µg/mL = atividade moderada; > acima de 1500 µg/mL = baixa atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004).

Desta forma pode-se considerar que o óleo essencial *G. procumbens* possui uma atividade ótima frente as 5 cepas de *C. albicans* (C a ATCC 76485, C a LM – 62, C a LM – 106, C a LM – 108 e C a LM – 111). Na análise comparativa da CIM e CFM (Tabela 1) observa-se que, todas as outras cepas ensaiadas (5/8) apresentaram valores de CFM iguais aos valores da CIM.

Avaliar a natureza do efeito antifúngico da substância é extremamente importante, no tocante à inibição ou morte do micro-organismo testado. Para tanto, utiliza-se a razão CFM/CIM, para fungos. Desta forma ao analisar os resultados obtidos dessa razão observa-se que para todas as 5 cepas as quais o óleo essencial de *G. procumbens* exerceu ação antifúngica, essa razão (CFM/CIM) foi igual a 1, demonstrando que a natureza do seu efeito antifúngico é fungicida. Este dado se torna importante, pois a atividade fungicida é considerada clinicamente mais importante que a fungistática, visto que o uso profilático de drogas fungistáticas tem sido associado a um aumento da frequência de resistência inata ou adquirida em isolados clínicos (MONK; GOFFEAU, 2008)

Poucos são os relatórios disponíveis de atividade antimicrobiana do óleo essencial *G. procumbens*. Estudos realizados por NIKOLIC, et. al., (2013), registraram um valor de CIM 1,25-5,00 mg / mL e de CFM de 5,0-10,0 mg / mL para o óleo essencial *Gaultheria procumbens* demonstrando assim uma atividade biológica moderada. Em contra partida HAMMER et al. (1999) ao analisar a atividade

antimicrobiana de diferentes óleos essenciais, incluindo o de *Gaultheria procumbens* relatou ótima atividade contra *C. albicans* com um valor de CIM de 0,25 mg / mL.

Diversos são os fatores que podem contribuir para diferenças no potencial antimicrobiano dos óleos essenciais como por exemplo diferenças nas técnicas analíticas, os diferentes meios de cultura utilizados nos testes, a volatilidade e baixa solubilidade da maioria dos óleos essenciais, particularmente com os métodos que dependem da difusão ou diluição da substância em um meio microbiológico. Além de diferenças na composição relacionadas com a variedade, práticas agrônômicas, processamento, pureza do material utilizado para extração, a eficiência no processo extrativo, assim como as diferentes formas de extração, uma vez que esses fatores influenciam nas concentrações de ingredientes ativos (ZAIKA, 1988; MANN, MARKHAM, 1998; DELAQUIS et al., 2002; SCOTT, 1998).

A continuação desse estudo se deu apenas com a cepa clínica LM-62, que apresentou CFM de 4 µg/mL (igual a CIM), e a cepa ATCC 76485, que apresentou CFM de 4 µg/mL (também igual a CIM) foram selecionadas como representativas para os testes seguintes.

Sabendo-se que a parede celular e a membrana celular nos fungos (com enfoque no ergosterol, lipídeo não encontrado em células humanas) são importantes alvos farmacológicos dos fármacos antifúngicos, buscou-se inicialmente avaliar se o efeito antifúngico observado no óleo essencial de *Gaultheria procumbens* seria por atuação sobre a parede celular, para isto foi realizado o ensaio com sorbitol (protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos) (FROST et al., 1995). Quando a substância em análise atua sobre a parede celular, esta causa uma morte fúngica na ausência de um estabilizador, no entanto na presença deste suporte osmótico ocorre a preservação dos micro-organismos permitindo o seu crescimento, o que é evidenciado pelo aumento do valor da CIM em meio com sorbitol em comparação com valor da CIM no meio sem o sorbitol (ESCALANTE et al., 2008).

Os ensaios de sorbitol realizados nesta pesquisa demonstraram que o óleo essencial de *G. procumbens* não exerce seu efeito antifúngico por meio da parede celular, pois não houve diferença entre a CIM na presença e na ausência do sorbitol (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Efeito do óleo essencial de *G. procumbens* sobre as cepas *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM- 62 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.

Concentrações do OEGp (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 76485		<i>C. albicans</i> LM-62	
	Ausência do sorbitol	Presença do sorbitol	Ausência do sorbitol	Presença do sorbitol
512	-	-	-	-
256	-	-	-	-
128	-	-	-	-
64	-	-	-	-
32	-	-	-	-
16	-	-	-	-
8	-	-	-	-
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
1	+	+	+	+

O segundo alvo farmacológico investigado sobre o mecanismo de ação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* foi à membrana plasmática, componente imprescindível para a manutenção da viabilidade fúngica. Para isto realizou-se ensaios de interação do óleo essencial de *G. procumbens* com o ergosterol.

Caso a atividade antifúngica se de pela ligação do óleo essencial ao esterol, o ergosterol exógeno presente no meio impedirá a ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, visto que este estará mais disponível, permitindo assim o crescimento do fungo no meio e sendo necessária uma maior quantidade de óleo essencial de *G. procumbens* para eliminar a levedura, ocasionando então o aumento da CIM (ESCALANTE et al., 2008).

Resultado semelhante ao ensaio de sorbitol foram encontrados ao investigarmos a participação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre a membrana plasmática fúngica, não houve diferença dos valores da CIM tanto na presença quanto na ausência do esterol exógeno demonstrando assim ausência de qualquer atividade antifúngica do óleo essencial de *G. procumbens* mediada por uma possível ligação com o ergosterol (**Tabela 3**).

Este é o primeiro estudo a demonstrar a ação do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* na parede celular e na membrana plasmática de *Candida albicans* sob

teste de sorbitol e ergosterol, respectivamente, o que dificulta a comparação com outras investigações.

**Tabela 3** - Efeito dos óleo essencial de *G. procumbens* (OEGp) sobre as cepas *C. albicans* ATCC 76485 e *C. albicans* LM- 62 na ausência e presença de na ausência e presença de ergosterol 400µg/mL.

Concentrações do OEGp (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 76485		<i>C. albicans</i> LM-62	
	Ausência do ergosterol	Presença do ergosterol	Ausência do ergosterol	Presença do ergosterol
512	-	-	-	-
256	-	-	-	-
128	-	-	-	-
64	-	-	-	-
32	-	-	-	-
16	-	-	-	-
8	-	-	-	-
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
1	+	+	+	+

Diversos são os mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem atuar promovendo sua ação antifúngica como inibição da bomba de efluxo, a ação sobre a membrana das mitocôndrias fúngicas, atuando na inibição do desenvolvimento do biofilme e inibindo a síntese/produção de micotoxinas, entre outros (NAZZARO et. al., 2017). Desta forma, estudos adicionais são necessários para conseguir elucidar o mecanismo de ação utilizado pelo óleo essencial de *G. procumbens* que promove sua ação antifúngica.

Os óleos essenciais de maneira geral possuem um papel fundamental, tanto como substâncias ativas quanto como aditivos, suas propriedades farmacológicas podem servir de ponte entre seus usos tradicionais e sua utilização racional em práticas complementares, sendo assim, a avaliação dos possíveis efeitos sinérgicos entre os óleos essenciais e / ou seus componentes majoritários e as moléculas sintéticas são áreas importantes a serem investigadas (NAZZARO et. al., 2017). Visto isto buscou-se investigar se o óleo essencial de *G. procumbens* modularia a ação da anfotericina B.

Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Modulação da ação do antifúngico na sua CIM pelo óleo essencial de *Gaultheria procumbens* na CIM/8 frente cepas de *C. albicans*.

Micro-organismo	Anfotericina B CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Sozinho	Associado ao OEGp (CIM/8)
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	0,5	0,5
<i>C. albicans</i> LM- 62	2	0,5

Nestas condições observa-se que os valores encontrados foram de 0,5 para os dois tipos de candidas estudados, sendo assim, de acordo com LEWIS et al., 2002, podemos dizer que óleo essencial de *Gaultheria procumbens* ao se associar com a anfotericina B promove um efeito sinérgico. Esse resultado é bastante significativo pois uma das dificuldades para o tratamento da *candidíase* é o aumento da prevalência de isolados multirresistente de *Candida* e das alternativas para essa situação é o uso de terapia antifúngica combinada no qual mais de um antifúngico é utilizado a fim de se obter um efeito sinérgico, que por sua vez reduz a dose destes antifúngicos e o aparecimento de reações adversas, além de uma maior eficácia na eliminação do patógeno (SOUSA, 2015).

#### 4 CONCLUSÃO

Este estudo representa um avanço na nossa compreensão da atividade antifúngica do óleo essencial *G. procumbens*. Demonstrando que o óleo essencial *G. procumbens* possui atividade antifúngica frente a 5 cepas de *C. albicans* (C a ATCC 76485, C a LM – 62, C a LM – 106, C a LM – 108 e C a LM – 111) de natureza fungicida. Seu mecanismo de ação não envolve efeito sobre a parede celular bem como na membrana plasmática. E demonstrou ser um produto bastante promissor visto que promoveu um efeito sinérgico ao ser associado a anfotericina B (um antifúngico clínico conhecido).

## Referências

ALLEGRINI, M., SIMÉON, M., MAILLOS, H., BOILOOT, A. Èmulsions et applications en microbiologie. *Trav Soc Pharm Montp*, v. 33, p. 73-86, 1973.

ANEJA B, IRFAN M, KAPIL C, JAIRAJPURI MA, MAGUIRE R, KAVANAGH K, RIZVI MM, MANZOOR N, AZAM A, ABID M. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: in vitro and in vivo studies. *Org Biomol Chem* 14(45):10599-10619, 2016.

BOSTROM J, HOGNER A, LLIN A, WELLNER E, PLOWRIGHT AT. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* 55(5): 1817-30, 2012.

CLEELAND R, SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections, in *Antibiotics in Laboratory Medicine*, V. Lorian, Ed., pp. 739–786, Lippincott Williams &Wilkins, Baltimore, Md, USA, 3rd edition, 1991.

COUTINHO MAS, MUZITANO MF, COSTA SS. Flavonóides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. *Rev Virt Quím* 3(1): 241-256, 2009.

DELAQUIS, P. J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, v. 74, n. 1, p. 101-109, 2002.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations, In: *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Willians & Wikins, 1991, p. 434–441.

Escalante A, Gattuso M, Pérez, P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*. 2008; 71(10): 1720–1725.

FREIRE, J. C. P., NÓBREGA, M. T. C., DE OLIVEIRA-JÚNIOR, J. K., FREIRE, S. C. P., RIBEIRO, E. D., DE OLIVEIRA LIMA, E. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. *Archives Of Health Investigation*, 5(6), 2016.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *Journal of Antibiotics*, v.48, n.4, p.306-310, 1995. GEHRING et.al., 2016

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000. Hammer et al. (1999)

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Anil Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HOLETZ, F. B; PESSINI, G. L; SANCHES, N. R; CORTEZ, D. A. G; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, Oct. 2002.

KUMAR VG, LATHA R, VEDHAGIRI K, SATHIAMOORTHY T, JAYARANI G, SASIKALA R, SELVIN J NATARAJASEENIVASAN K. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *J Mycol Med* 19: 3–10, 2009

LAHLOU, MOUHSEN. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm*, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evid Based Complement and Alternat Med*. 2014, Article ID378280, 9 pages

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEK M. E. Comparison of E-test, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 345–351, 2002.

LIU, W.R.; QIAO, W.L.; LIU, Z.Z.; WANG, X.H.; JIANG, R.; LI, S.Y.; SHI, R.B.; SHE, G.M. *Gaultheria*: Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, 18, 12071–12108, 2013.

LUNDE, C. S; KUBO, I. Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v.44, n.7, p.1943-1953, Jul. 2000.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology*, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

MICHEL, P., OWCZAREK, A., MATCZAK, M., KOSNO, M., SZYMAŃSKI, P., MIKICIUK-OLASIK, E., & OLSZEWSKA, M. A. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxygenase Inhibitory Activity. *Molecules*, 22(3), 412, 2017.

MONK, BRIAN C.; GOFFEAU, Andre. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science*, v. 321, n. 5887, p. 367-369, 2008.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., FEO, V. D. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

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, 2008.

NIKOLIĆ, M., MARKOVIĆ, T., MOJOVIĆ, M., PEJIN, B., SAVIĆ, A., PERIĆ, T., SOKOVIĆ, M. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial crops and products*, v. 49, p. 561-567, 2013.

Orhan DD, Ozçelik B, Ozgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res* 165(6): 496-504, 2010.

PFALLER M.A., DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163, 2007.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SARTORATTO A, MACHADO ALM, DELARMELENA C, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT, REHDER VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*; 35: 275 – 280, 2004.

SCOTT, L. A review of plants used in the treatment of Liver Disease: Part-I. *Alternative Medicine Review*. v. 3, n. 6, p. 410-421, 1998.

SIDDIQUI, Z. N., FAROOQ, F., MUSTHAFA, T. M., AHMAD, A., KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J. Saudi Chem. Soc*, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

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 Microbiol Rev* 36(2): 288-305, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC. Cap. 18, p. 467-495, 2004.

SOUSA, J. P. Atividade antifúngica do citral e timol sobre *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. 2015. 144f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos) – Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

ZAICA, L. A. Spices and herbs: their antimicrobial activity and it's determination. *Journal of Food Safety*. v. 9, n. 2, p. 97– 118, 1988.

ZAITZ, C. ZAITZ C, CAMPBELL I, MARQUES SA, RUIZ LRB, FRAMIL VMS. *Compêndio de Micologia Médica*. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 432p. 2010.

**5.3 Análise citotóxica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* e farmacológica e toxicológica do seu constituinte majoritário *in silico***

Será submetido a International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

ISSN: 0975-1491

Qualis: B2

## **Análise citotóxica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* e farmacológica e toxicológica do seu constituinte majoritário *in sílico***

**Kívia Sales de Assis\*<sup>1</sup>, Daniele de Figueredo Silva<sup>1</sup>, Fabricio Havy Dantas de Andrade<sup>2</sup>, Fabio Santos de Souza<sup>2</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>3</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de micologia, Departamento de ciências farmacêuticas, Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, 58059-900 PB, Brasil

<sup>3</sup> Unidade acadêmica Ciências biológicas, Centro de saúde e tecnologia rural, Universidade federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

\* Endereço: Rua João Batista Fernandes, 123, Apt. 803 A. Aeroclub, João Pessoa, Paraíba, 58036-820, Brasil. Tel.: 55(083) 8816.2010. E-mail: kivia.sales@gmail.com.

### **RESUMO**

Recentemente, os óleos essenciais de plantas, bem como compostos derivados desses óleos tem atraído um interesse crescente por suas propriedades biológicas, contudo além dessas plantas apresentarem seus efeitos farmacológicos elas também podem apresentar efeitos citotóxicos. Neste estudo buscou-se avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* em hemácias humanas utilizando metodologia *in vitro*, bem como investigar as propriedades farmacológicas e toxicológicas teóricas *in sílico* do seu constituinte majoritário, o salicilato de metila. Ao analisar os resultados observa-se que o OEGp possui como componente majoritário, o salicilato de metila e que foi capaz de promover uma baixa citotoxicidade para tipos sanguíneos A e de baixa a moderada para a maioria das concentrações testadas no tipos sanguíneos (B e O). Com relação ao estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas teóricas do constituinte majoritário do OEGp, o salicilato de metila, utilizou-se uma metodologia *in sílico* através de uma ferramentas computacional o *Pass online* e o admetSAR, o que demonstrou de forma teórica ser um composto que possui vários possíveis efeitos biológicos sobre o corpo humano, bem como boa biodisponibilidade e baixo risco de toxicidade.

Palavras-chave: *Gaultheria procumbens*, salicilato de metila, citotóxico.

## 1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais e / ou seus constituintes individuais desempenham um papel importante como potenciais agentes terapêuticos. A principal vantagem é a sua natureza lipofílica, que permite que os compostos penetrem facilmente na membrana plasmática, além da capacidade de curar doenças fúngicas oportunistas. (Marković et al., 2016). Porém essa mesma vantagem permite com que eles possam exercer efeitos citotóxicos em células eucarióticas através da permeabilização das membranas sejam elas externas (membrana plasmática) ou interna (membranas mitocondriais) provocando a morte celular por necrose e apoptose (Armstrong, 2006).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* (Schreier et al., 1997; Aparicio et al., 2005). A avaliação da citotoxicidade de constituintes tem como vantagens a redução dos efeitos sistêmicos, da variabilidade entre experimentos, menor gasto de droga e tempo, redução dos testes em animais, além de permitir estudos em células humanas (Spielmann et al., 2008).

Além de modelos *in vitro*, modelos de previsão assistida por computador, as chamadas ferramentas de previsão, desempenham um papel essencial no repertório proposto de métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto. Por isso, essas ferramentas são usadas para estudar os compostos existentes e hipotéticas, que são rápidos, reprodutíveis e são normalmente baseados em biorreguladores humanos (Angelo et al, 2006; Srinivas et al, 2014).

Diante disso, é evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade farmacológica *versus* toxicológica de um determinado produto natural afim de verificarmos sua aplicabilidade terapêutica. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* em hemácias humanas utilizando metodologia *in vitro*, bem como investigar as propriedades farmacológicas e toxicológicas teóricas *in silico* do seu constituinte majoritário, o salicilato de metila.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (OEGP) foi adquirido na Empresa Herbia<sup>®</sup>, sendo extraído por destilação a vapor das folhas e apresentando em sua composição o salicilato de metila (99,50%) e o alpha-terpineno (0,50%). A emulsão do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento da execução dos ensaios, dissolvendo-as primeiramente em DMSO e em seguida em Tween 80 em uma proporção de até 10% e 2%, respectivamente, utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada, seguindo o protocolo de Allegrini et al. (1973).

### 2.2 Quantificação do componente majoritário do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*

Afim de comprovar que o componente majoritário deste óleo essencial de *Gaultheria procumbens* era o salicilato de metila, foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo CG17-A, com sistema equipado com um injetor automático e Detector de Ionização de Chama (DIC). A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class 5000. A fase móvel foi composta de nitrogênio e bombeada na vazão de 20 mL/min. com split 1:10.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar DB-1 (30m x 0,25mm; 0,25 $\mu$ m). A temperatura do forno da coluna foi programada para passar de uma temperatura inicial de 70°C a 280 a 5°C/mim. A temperatura do injetor e do detector foram 250 e 280°C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 42 minutos e o volume de injeção foi de 1,0 $\mu$ L (Boer et al., 2013).

O OEGp e padrão (salicilato de metila) foram injetados na concentração de 2  $\mu$ L/mL.

### 2.3 Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* sobre eritrócitos humanos

Para realização deste ensaio foi levado em consideração os aspectos legais e éticos da pesquisa envolvendo humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa da

Fundação Francisco Mascarenhas/ Faculdades Integradas da Patos, com o CEP 58704-000, aprovou esta pesquisa, Protocolo de N°2.373.249.

Após obtenção das células sanguíneas dos tipos A, B e O. uma amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% (Rangel et al., 1997).

Adicionou-se diferentes concentrações do OEGp em 2 mL da suspensão de eritrócitos até um volume final de 2,5 ml. As amostras foram, então, incubadas por 1 hora à  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante (100 rpm), foram realizados controles negativo (uma suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos- 0 % de hemólise) e positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1%- 100 % de hemólise), decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Rangel et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.4 Estudos *in silico*

### ***Pass online***

Para análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do composto em estudo foi utilizado o software *Pass online*. Todas as informações químicas necessárias sobre a molécula do salicilato de metila (fitoconstituente majoritário do *Gaultheria procumbens*) foram obtidas do programa *Chemdraw*.

A previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online é, de maneira geral, um software projetado para avaliação do potencial biológico de uma molécula orgânica sobre o organismo humano, através de previsões simultâneas de múltiplos tipos de atividades biológicas com base na estrutura do composto. O *Pass online* fornece diversas ações biológicas de um composto, estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos através do índices de Pa (probabilidade " de ser ativo") ou inativos pelo índice Pi (probabilidade "de ser inativo") (Srinivas et al., 2014).

## **admetSAR**

Para o estudo dos parâmetros farmacológicos e toxicológicos teórico deste composto, foi realizada a avaliação *in silico* dos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade). Para isto foi utilizado uma ferramenta conhecida como admetSAR, a qual permite relacionar alguns parâmetros com a absorção, toxicidade e metabolização. Esses parâmetros são permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do citocromo, se são inibidores de transporte renal de cátions, o estudo teórico sobre o efeito carcinogênico, o teste de AMES e a toxicidade oral aguda (Lipinski et al., 2001; Conejo, 2016).

A classificação da toxicidade aguda foi baseada nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que divide os compostos de acordo com a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>). A categoria I contém os compostos com valores de DL<sub>50</sub> inferior ou igual a 50 mg/kg, a Categoria II contém compostos com DL<sub>50</sub> valores superiores a 50 mg/kg e inferior a 500 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com DL<sub>50</sub> valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg e a Categoria IV consiste de compostos com DL<sub>50</sub> valores superiores a 5000 mg/kg. O programa foi acessado em: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>.

### **2.5 Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados empregando o teste t de Student para análise de duas colunas. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism® versão 6.0.

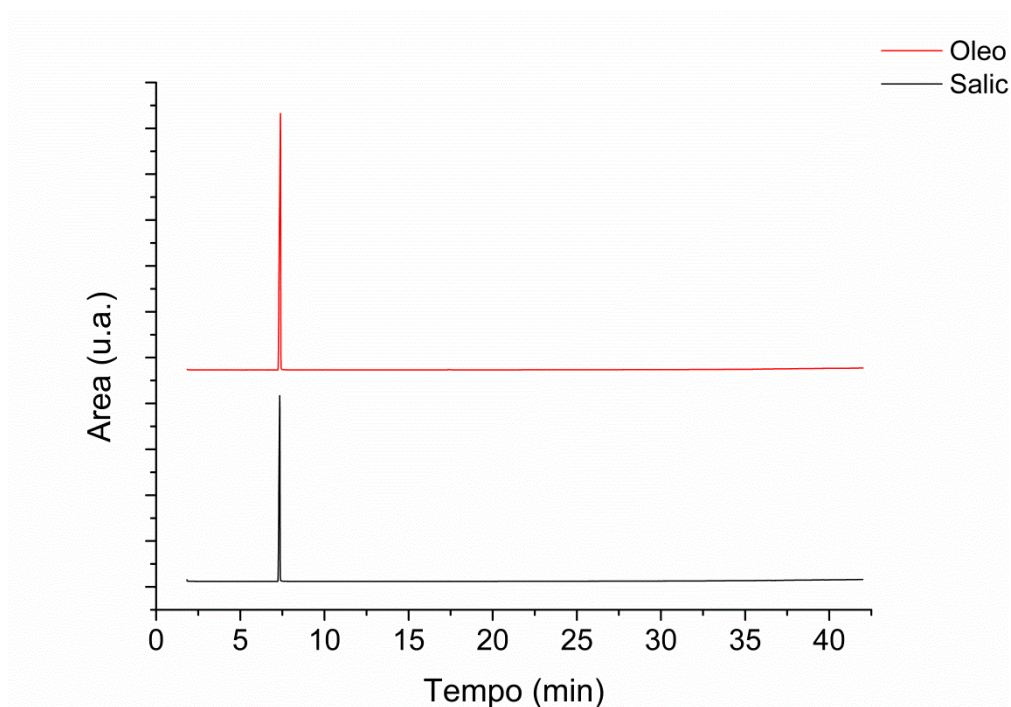
## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O resultado obtido pela análise química da GC do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* está apresentado na Figura 1. Identificou-se que o componente majoritário do OEGp é o salicilato de metilo, onde observa-se que o pico da substância padrão (salicilato de metila) se dá no tempo de retenção de 7,34 min. De forma semelhante observa-se um pico na amostra do OEGp no mesmo tempo e de área equivalentes (162918 u.a.). Essas descobertas estão de acordo com estudos prévios

do perfil químico do óleo essencial de Wintergreen (Clark, 1999) e com o estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* L. (Nikolić, et.al.2013).

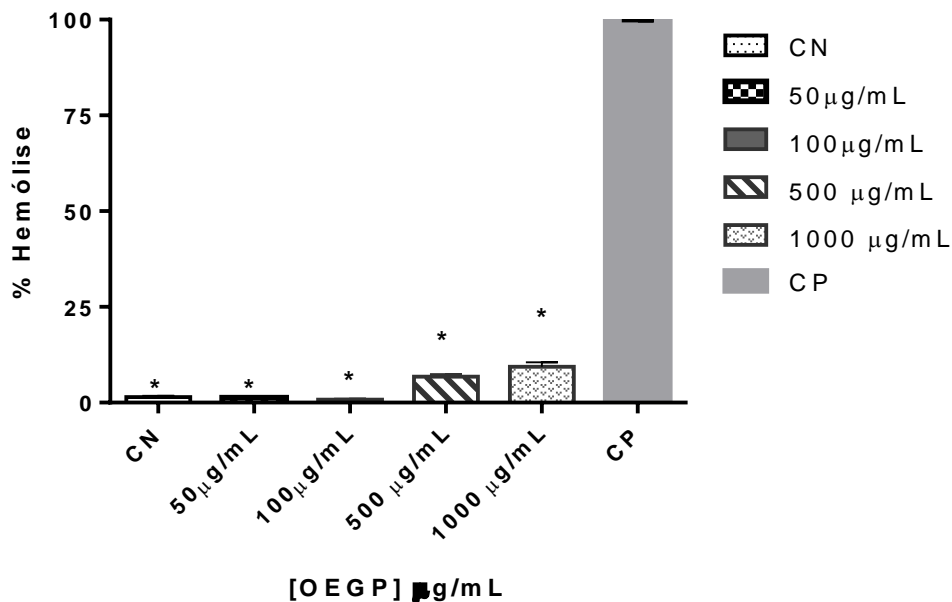
O salicilato de metila de fórmula molecular  $C_8 H_8 O_3$  , é um éster presente nos óleos essenciais de gaultéria (*Gaultheria procumbens*), meadowsweet (*Spiraea alba*), bétula doce (*Betula lenta*) e outros. É utilizado, dentre outros fins, como aromatizante para vários tipos de produtos (de balas e doces a pesticidas organofosforados), como analgésico em diversas pomadas e sprays e até como isca para atrair os machos de algumas espécies de abelhas (<http://www.oleosessenciais.org/salicilato-de-metila/>, 2018).

**Figura 1-** Cromatograma obtido do OEGp mostrando seu componente majoritário, o salicilato de metila

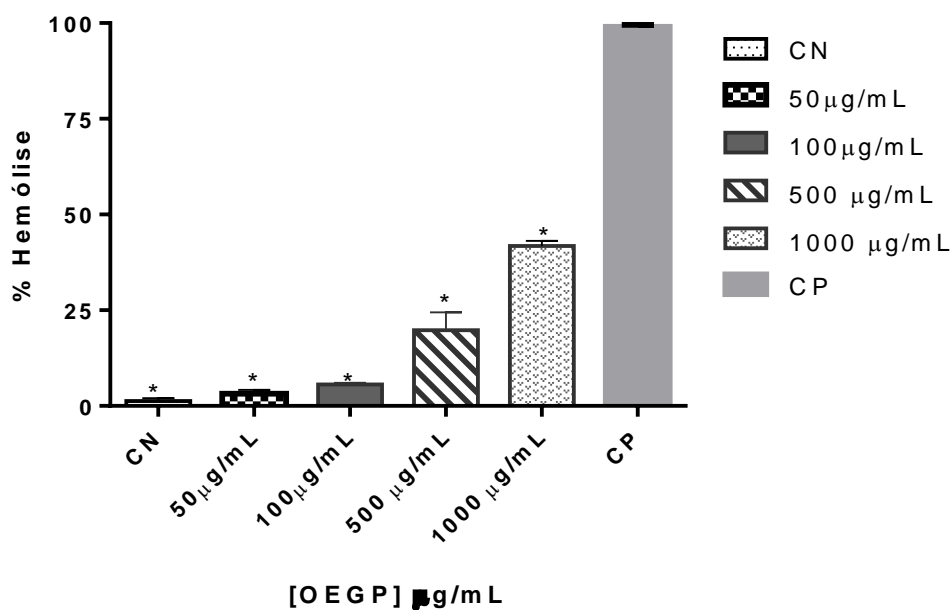


Conhecendo a importância dos testes toxicológicos para garantir a segurança do uso de um produto natural, buscou-se avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, realizando para isto, o teste de hemólise com eritrócitos humanos sorotipo A, B e O (**Figura 2, 3 e 4**).

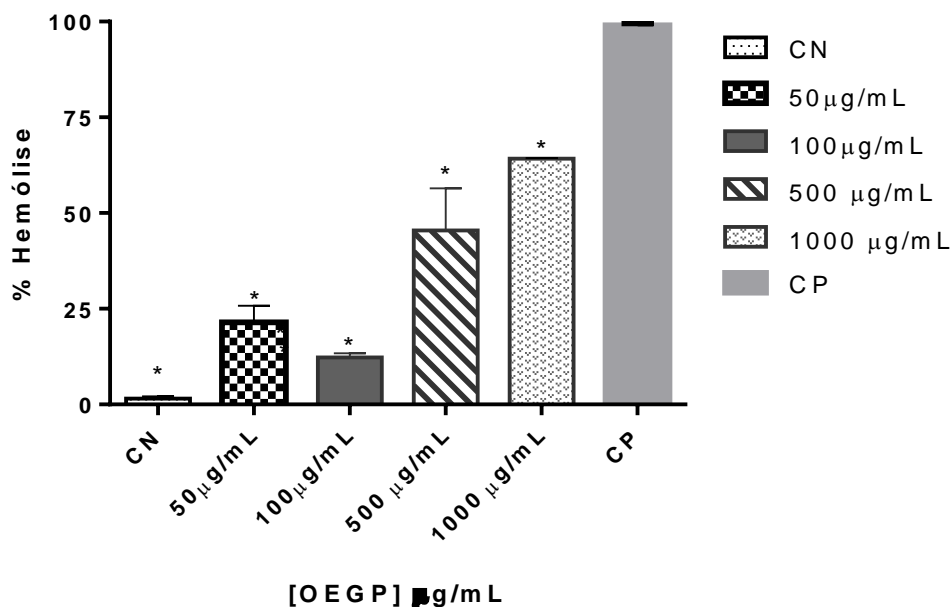
**Figura 2-** Efeito hemolítico do OEGp contra eritrócitos sorotipo A. \* p <0,05 versus teste de controle positivo.



**Figura 3-** Efeito hemolítico do OEGp contra eritrócitos sorotipo B. \* p <0,05 versus teste de controle positivo.



**Figura4** Efeito hemolítico do OEGp contra eritrócitos sorotipo O \* p <0,05 versus teste de controle positivo.



De acordo com os parâmetros estabelecidos por Rangel e colaboradores (1997), o percentual de hemólise será considerado como baixo quando estiver situado entre 0 e 40%, moderado quando entre 40 e 80% e alto quando estiver acima de 80%. Nessa perspectiva, enfatiza-se a ausência de citotoxicidade para o tipo sanguíneo A. Para o tipo sanguíneo B e O observa-se baixa citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL e para o B também na concentração de 500 µg/mL.

Os modelos *in silico* (estudo computacional) vem sendo empregados nos estágios iniciais de pesquisas e desenvolvimento de moléculas para análise de potencial atividade terapêutica. Esses modelos devem ser associados aos estudos *in vitro* e *in vivo* visando diminuir recursos financeiros e trabalhistas, bem como o tempo e os esforços humanos, além de reduzir significativamente as experiências com animais (Freires, et.al., 2017)

Considerando que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* apresentou de baixa a moderada citotoxicidade para a maioria das concentrações testadas e cogitando a capacidade deste de ser um candidato promissor ao desenvolvimento de novos fármacos, aplicou-se a análise *in silico*, sobre seu constituinte majoritário, o salicilato de metila, para prever o espectro de atividade biológica, a biodisponibilidade oral teórica e os riscos toxicológicos teóricos.

A análise das possibilidades da atividade do salicilato de metila através da ferramenta *PASS online* revelou que os valores de Pa foram maiores do que Pi para todas as atividades analisadas (**Tabela 1**). Sugerindo que este possui uma grande atividade antisséptico, seguida de uma atividade antifúngica, antiparasitária, antituberculose, antimicobacteriana, anti-helmíntica, antibacteriana, antiviral e antiprotozoário.

**Tabela 1:** Atividades previstas do salicilato de metila > através da ferramenta *PASS online*.

Pa	Pi	Atividade
0,328	0,050	Antibacteriana
0,430	0,044	Antifúngica
0,333	0,028	Anti-helmíntica
0,780	0,004	Antisséptico
0,429	0,025	Antiparasitária
0,389	0,034	Antituberculosa
0,377	0,046	Antimicobacteriana
0,162	0,155	Antiprotozoário
0,219	0,081	Antiviral

Pa (probabilidade de ser ativo): verde e Pi (probabilidade de ser inativo): rosa

Aproximadamente metade das razões que levam a falhas no desenvolvimento de uma droga pode ser associada ao perfil farmacocinético e parâmetros toxicológicos. Portanto, a determinação do perfil farmacocinético (ADME) juntamente com a toxicidade (ADMET) irá auxiliar na definição da biodisponibilidade e efeitos tóxicos da molécula, de forma a contribuir para a diminuição do tempo e dos custos no desenvolvimento de novas drogas (Hansch et al., 2004).

É amplamente relevante o estudo das propriedades de ADME, que se referem aos processos farmacocinéticos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E), para os compostos candidatos a fármaco nos estágios iniciais dos processos de descoberta (Moda, 2007). O estudo dessas propriedades foi realizado através da ferramenta admetSAR e está apresentado no **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Propriedades ADMET, calculadas no software admetSAR, para o componente majoritário do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, o salicilato de metila.

<b>ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO</b>	
<b>Modelos avaliados</b>	<b>Salicilato de metila</b>
Barreira hematoencefalica	BBB+
Absorção de intestino humano	HIA+
Permeabilidade Caco-2	Caco+
Transporte renal de catiões orgânicos	NI
P-glicoproteína	NI
<b>METABOLISMO</b>	
<b>CYP4502C9</b>	NI, NS
<b>CYP4502D6</b>	NI, NS
<b>CYP4502C19</b>	NI
<b>CYP4503A4</b>	NI, NS
<b>Promiscuidade Inibitória do CYP</b>	Baixa
<b>TOXICIDADE</b>	
<b>Toxicidade AMES</b>	NT
<b>Carcinogênico</b>	NC
<b>Toxicidade oral aguda</b>	III

+ (permeia); NI – não inibe; NS – não substrato; S – substrato; I – inibe; NT – não tóxico; NC – não carcinogênico.

O coeficiente de partição sangue-cérebro (log BB, do inglês Blood-Brain Barrier Partition) é um parâmetro que avalia a penetração na barreira hematoencefálica (Romero e Romero, 2014). No sistema nervoso central as células capilares não têm poros e possuem pouca atividade transcitótica. Os fármacos para atravessarem a barreira hematoencefálica têm que se difundir transcelularmente, ou seja, penetrar as membranas luminal e basal do endotélio (Ballabh; Braun; Nedergaard, 2014).

No estudo realizado observou-se que o salicilato de metila foi classificado como absorção positiva para o modelo barreira sangue-cérebro. Após a administração, o fármaco deve se dissolver e ser solubilizado no trato gastrointestinal para poder ser absorvido através da membrana intestinal. A absorção ocorre por dois mecanismos principais: o mecanismo transcelular, que é a simples difusão passiva através das membranas celulares, e o mecanismo paracelular, é a passagem entre as células intestinais. No entanto, a absorção pode ocorrer também por transporte ativo, em que necessita de energia e é mediado por transportadores (Moda, 2009). Observou-se que o salicilato de metila foi classificado com absorção positiva para os modelos de absorção no intestino humano e permeabilidade em Caco-2.

Nos rins, a secreção de substâncias estruturalmente diferentes, incluindo muitos fármacos, é uma etapa fundamental à defesa do organismo contra substâncias estranhas (Moda, 2007). O rim é o principal órgão excretor de fármacos e seus metabólitos, possuindo sistemas de transporte de alta capacidade para eliminar rapidamente grandes quantidades de compostos exógenos. Os mecanismos celulares de transporte renal envolvem um sistema de transporte para ânions orgânicos, um sistema de transporte para cátions orgânicos e um transportador de múltiplas drogas ou glicoproteína P (Giacomini et al., 2011).

Para o modelo estudado, transporte renal de cátions orgânicos, observou-se que o salicilato de metila foi classificado como não inibidor deste sistema. O organismo realiza diversos mecanismos para eliminar xenobióticos, incluindo, os fármacos. A excreção se refere aos processos que o organismo utiliza para eliminar um fármaco, sendo a urina a principal via. O metabolismo de fármacos ocorre em duas fases: a primeira fase engloba reações que são catalisadas através das enzimas do citocromo P450 oxidase (identificada como CYP ou CYP450). Neste processo, os metabólitos formados podem ser inativos ou apresentar toxicidade maior em comparação ao

fármaco original. Na segunda fase ocorrem reações, onde os produtos formados na fase 1 se ligam covalentemente com substâncias como a glutatona, ácidos glicurônico, sulfato ou aminoácidos, formando conjugados hidrossolúveis que são eliminados preferencialmente pela urina, ou excretados pela bile e eliminados nas fezes (Moda, 2009).

A CYP é usada de forma genérica para enzimas oxidativas, do citocromo. Elas são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos. Estas são: CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C18, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1 e CYP 3A4. A CYP3A4 é a forma mais abundante no fígado, sendo responsável pela metabolização de 50% dos fármacos. As diferentes isoformas do CYP também estão presentes em outros órgãos do corpo, como pulmão, rins e na parede intestinal (Moda, 2009). Quanto maior a interação com essas enzimas do citocromo, menor a eficiência do fármaco, pois a dose do princípio ativo deverá ser maior para que tenha fármacos livre para agir (Tang et al., 2011).

Entre as enzimas do citocromo avaliadas pelo admetSAR, observou-se que salicilato de metila, foi classificado como não - substrato para todas. (Meunier; De Visser; Shaik, 2004). A atuação como inibidor de enzimas do citocromo P 450 pode contribuir para a diminuição da metabolização de xenobióticos. Portanto, a inibição dessas proteínas não é vantajosa para o organismo, pois essas estão atuando na defesa do organismo contra agentes químicos (Albuquerque, 2015; Cheng et al., 2011). A ferramenta classificou o salicilato de metila com baixa promiscuidade inibitória de enzimas do citocromo. A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos que divide os compostos de acordo com a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ). A categoria I contém os compostos com valores de  $DL_{50}$  inferior ou igual a 50 mg/kg, a Categoria II contém compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 50 mg/kg e inferior a 500 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg e a Categoria IV consiste de compostos com  $DL_{50}$  valores superiores a 5000 mg/kg.

Para os parâmetros de toxicidade teórica foi possível observar que o composto avaliado não apresentou toxicidade pelo teste AMES, não foi classificado como carcinogênico e a categoria de toxicidade teórica oral aguda para o salicilato foi de III. De acordo com a empresa Merck S/A (2015) a Toxicidade oral aguda em humanos é de 506 mg/kg, valor concordante com a categoria III calculada pela

ferramenta admetSAR. A partir dos resultados obtidos na ferramenta admetSAR é possível inferir que o composto apresenta boa biodisponibilidade, não apresenta toxicidade e não é carcinogênico, além de apresentar baixa promiscuidade inibitória de enzimas do citocromo, ressaltando que esses dados foram obtidos de forma teórica sendo necessário estudos adicionais.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* promoveu uma baixa citotoxicidade para o tipo sanguíneo A e de baixa a moderada para a maioria das concentrações testadas no diferentes tipos sanguíneos (B e O). Com relação ao estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas teóricas do constituinte majoritário do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, o salicilato de metila, utilizando uma metodologia *in silico* através de uma ferramentas computacional o *Pass online* e o admetSAR, observou-se que de forma teórica demonstrou ser um composto que possui vários possíveis efeitos biológicos sobre o corpo humano, bem como boa biodisponibilidade e baixo risco de toxicidade.

## REFERÊNCIAS

- Allegrini, M., Siméon, M., Maillos, H., Boiloot, A. Émulsions et applications en microbiologie. *Trav Soc Pharm Montpellier*, 1973, (33), 73-86.
- Angelo V, Max D, Markus AL. The Challenge of Predicting Drug Toxicity *in silico*. *Bas. Clin. Phar. Tox.* 2006; 99: 195–208.
- Aparicio, R. M.; García-Celma, M. J.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *J Pharm Biomed Anal*, 2005. (39), 1063-1067,.
- Armstrong, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*. 2006, 28.(3): 253-260
- Ballabh, P; Braun, A; Nedergaard, M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 2014.v. 16, n. 1, p. 1-13
- Böer, T. M., Procópio, J. V. V., do Nascimento, T. G., & Macêdo, R. O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2013. v. 73, p. 18– 23.

- Clark, G. S. Methyl salicylate, or oil of wintergreen. *Perfum. Flavor*, 1999; 24, 05-11.
- Conejo, H.J.F. Síntese e estudo in silico de derivados de naproxeno com potencial atividade anti-inflamatória. 2016. 69 f. Completion of Course Work (in Chemistry) – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão.
- Freires, I. A., Sardi, J. D. C. O., De Castro, R. D., & Rosalen, P. L. Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden?. *Pharm. Res.* 2017., 34(4), 681-686.
- Giacomini, K.; Matson, P.; Kido, Y. Profiling of a Prescription Drug Library for Potential Renal Drug–Drug Interactions Mediated by the Organic Cation Transporter 2. *J. Med. Chem.*, v.54, n.13, p. 4548-4558, 2011
- Hansch, C.; Leo, A.; Mekapati, S.B.; Kurup, A. Bioorg. QSAR an ADME. *J. Med. Chem*, v. 12, p. 3391-3400, 2004.
- Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, (46), 1-3, p.3-26.
- Marković, T., Nikolić, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Emerald, M., Radanović, D., & Soković, M. Essential oils for the prevention and treatment of human opportunistic fungal diseases. In: Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization. *Amer chem society*, 2016. 247-277.
- Meunier, B.; De Visser, S.P.; Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Review.*, 2004.v. 104, n. 9, p. 3947 - 3980
- Moda, Tiago Luiz. Desenvolvimento de Modelos In Silico de Propriedades de ADME Para a Triagem de Novos Candidatos a Fármacos. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Nikolić, M., Marković, T., Mojović, M., Pejin, B., Savić, A., Perić, T., Soković, M. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial crops and products*, 2013, v. 49, p. 561-567.
- Rangel M, Malpezzi ELA, Susini SMM, Freitas JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. 1997; 35, 305-309.
- Romero, A. L.; Romero, R.B. Inibição de Cicloxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. *UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde*, 2014.v.16, n.4, p. 307-316.

Schreier H, Gagné L, Bock T, Erdos GW, Druzgala P, Conary JT, Muller BW. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1997; (72): 215-223.

Spielmann, H.; Grune, B.; Liebsch, M.; Seiler, A.; Vogel, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). *Exp Toxicol Pathol*, 2008, (60),225-233.

Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. *Int. Inv. J. Biochem. Bioinform*. 2014; 2(3):20-29.

Srinivas, N.; Sandeep, K.S.; Anusha, Y.; Devendra, B.N. *In Vitro* Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An *In Silico* Approach. International Invention . *Biochem. Bioinform*, 2014. v. 2, n. 3, p. 20-29.

Tang, Yun et al. Insights into Molecular Basis of Cytochrome P450 Inhibitory Promiscuity of Compounds. *J. Chem. Inf. Comput. Sci*, 2011. v.51, n.10, p. 2482-2495.

Salicilato de metila. Acessado em 01 de fevereiro de 2018 as 9:34 <http://www.oleosessenciais.org/salicilato-de-metila/>.

*Conclusão*

---

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- ❖ O óleo essencial de *Gaultheria procumbens* apresenta uma potente atividade antifúngica *in vitro* contra diversas cepas de *Candida*, em especial contra cepas de *C. albicans*;
- ❖ E que essa atividade antifúngica é de natureza fungicida;
- ❖ Quando associado à anfotericina B (antifúngico utilizado clinicamente), o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* promove um efeito predominantemente modulador, frente às cepas de *C. albicans* testadas;
- ❖ O óleo essencial de *Gaultheria procumbens* promoveu uma baixa citotoxicidade para o tipo sanguíneo A e de baixa a moderada para a maioria das concentrações testadas no diferentes tipos sanguíneos (B e O)
- ❖ O estudo *in silico* do constituinte majoritário do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, o salicilato de metila, demonstrou de forma teórica ser um composto que possui vários possíveis efeitos biológicos sobre o corpo humano, bem como boa biodisponibilidade e baixo risco de toxicidade.

## Referências

ALLEGRIANI, M., SIMÉON, M., MAILLOS, H., BOILOOT, A. Émulsions et applications en microbiologie. **Trav Soc Pharm Montp**, v. 33, p. 73-86, 1973.

ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nature**, v. 3, n. 7, p. 545-556, 2005.

ANEJA B, IRFAN M, KAPIL C, JAIRAJPURI MA, MAGUIRE R, KAVANAGH K, RIZVI MM, MANZOOR N, AZAM A, ABID M. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: in vitro and in vivo studies. **Org Biomol Chem** 14(45):10599-10619, 2016.

ANGELO V, MAX D, MARKUS AL. The Challenge of Predicting Drug Toxicity *in silico*. **Bas. Clin. Phar. Tox.**; 99: 195–208. 2006

APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **J Pharm Biomed Anal**, (39), 1063-1067,. 2005.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **Bioessays**., 28.(3): 253-260, 2006.

BALLABH, P; BRAUN, A; NEDERGAARD, M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol. Dis**, v. 16, n. 1, p. 1-13, jun. 2014

BÖER, T. M., PROCÓPIO, J. V. V., DO NASCIMENTO, T. G., & MACÊDO, R. O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v. 73, p. 18– 23, 2013.

BOSTROM J, HOGNER A, LLIN A, WELLNER E, PLOWRIGHT AT. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. **J Med Chem** 55(5): 1817-30, 2012.

CLEELAND R, SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antib. in lab. med.**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CONEJO, H.J.F. Síntese e estudo in silico de derivados de naproxeno com potencial atividade anti-inflamatória.. 69 f. Completion of Course Work (in Chemistry) – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. 2016

COUTINHO MAS, MUZITANO MF, COSTA SS. Flavonóides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Rev Virt Quím** 3(1): 241-256, 2009.

DELAQUIS, P. J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int J Food Microbiol.**, v. 74, n. 1, p. 101-109, 2002.

DEORUKHKAR, S, C.; SAINI, S.& MATHEW, S. Non-albicans *Candida* infection: an emerging threat. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2014, 2014.

DEORUKHKAR, S. C., & SAINI, S. Non albicans Candida species: A review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Pravara Med. Rev.**, v. 7, n. 3, p. 7-15, 2015.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations, **In: Antib. in lab. med.** Baltimore: Willians & Wikins, 1991, p. 434–441.

ESCALANTE A, GATTUSO M, PÉREZ, P, ZACCHINO S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J Nat Prod.** 2008; 71(10): 1720–1725.

FREIRE, J. C. P., NÓBREGA, M. T. C., DE OLIVEIRA-JÚNIOR, J. K., FREIRE, S. C. P., RIBEIRO, E. D., DE OLIVEIRA LIMA, E. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de Candida: uma revisão de literatura. **Arch. Health Invest. Published**, 5(6), 2016.

FREISESLEBEN, S.H.& JAGER, A.K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism—a review. **Medicinal and Aromatic Plant Science**, 3, 1–6, 2014.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J. Antimicrob.**, v.48, n.4, p.306-310, 1995. GEHRING et.al., 2016

GEHRING, G. M., CARRILHO, C. M. M., PELISSON, M., PERUGINI, M., & TANO, Z. N. Candidemia: Revisão Bibliográfica. **Am J Infect Control**, v. 4, n. 4, 2016.

GIACOMINI, K.; MATSON, P.; KIDO, Y. Profiling of a Prescription Drug Library for Potential Renal Drug–Drug Interactions Mediated by the Organic Cation Transporter 2. **J. Med. Chem**, v.54, n.13, p. 4548-4558, 2011

HADACEK, F.& GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochem Anal**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S.B.; KURUP, A. Bioorg. QSAR an ADME. **J. Med. Chem**, v. 12, p. 3391-3400, 2004.

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Anil Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HOLETZ, F. B; PESSINI, G. L; SANCHES, N. R; CORTEZ, D. A. G; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, Oct. 2002.

HU, Y.; ZHANG, J.; KONG, W.; ZHAO, G.& YANG, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxicogenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa L.*) on *Aspergillus flavus*. **Food Chem.** 220, 1–8, 2007.

KALEMBA, D.& KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr. Med. Chem.** 10, 813–829, 2003.

KOJIC EM & DAROUICHE RO. Candida infections of medical devices. **Clin Microbiol Rev.** 17: 255–267, 2004.

KOŁACZKOWSKA A; KOŁACZKOWSKI M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans Candida species. **J. Antimicrob. Chemother.** v 71(6): 143850, 2016.

KUMAR VG, LATHA R, VEDHAGIRI K, SATHIAMOORTHY T, JAYARANI G, SASIKALA R, SELVIN J NATARAJASEENIVASAN K. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of Candida spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. **J Mycol Med** 19: 3–10, 2009

LAHLOU, MOUHSEN. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacol Pharm**, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

LEITE MCA, BEZERRA APB, SOUSA JP, GUERRA FQS, LIMA EO. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against Candida albicans. **Evid Based Complement and Alternat Med.** 2014, Article ID378280, 9 pages

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEY M. E. Comparison of E-test, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against Candida species. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, (46), 1-3, p.3-26. 2001

LIU, W.R.; QIAO, W.L.; LIU, Z.Z.; WANG, X.H.; JIANG, R.; LI, S.Y.; SHI, R.B. & SHE, G.M. Gaultheria: Phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, 18, 12071–12108, 2013.

LIU, W.R.; QIAO, W.L.; LIU, Z.Z.; WANG, X.H.; JIANG, R.; LI, S.Y.; SHI, R.B.; SHE, G.M. Gaultheria: Phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, 18, 12071–12108, 2013.

LUNDE, C. S; KUBO, I. Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of Saccharomyces cerevisiae. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.44, n.7, p.1943-1953, Jul. 2000.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **J Appl Microbiol**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

MARKOVIĆ, T., NIKOLIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., ĆIRIĆ, A., EMERALD, M., RADANOVIĆ, D., & SOKOVIĆ, M. Essential oils for the prevention and treatment of human opportunistic fungal diseases. In: Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization. **Amer chem society**, 2016. 247-277.

MATASYOH, J.C.; KIPLIMO, J.J.; KARUBIU, N.M. & HAILSTORKS, T.P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphoratus*. **Food Chem.** v. 101, n. 3, p. 1183–1187, 2007.

MEDICINA NATURAL. Acessado em 30 de janeiro de 2018 as 7:50. <http://www.medicinanatural.com.br/plantas-medicinais-gualteria/>

MEUNIER, B.; DE VISSER, S.P.; SHAIK, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 9, p. 3947-3980, sep. 2004.

MICHEL, P., OWCZAREK, A., MATCZAK, M., KOSNO, M., SZYMAŃSKI, P., MIKICIUK-OLASIK, E., & OLSZEWSKA, M.A. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxygenase Inhibitory Activity. **Molecules**, 22(3), 412, 2017.

MICHEL, P., OWCZAREK, A., MATCZAK, M., KOSNO, M., SZYMAŃSKI, P., MIKICIUK-OLASIK, E., & OLSZEWSKA, M. A. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxygenase Inhibitory Activity. **Molecules**, 22(3), 412, 2017.

MODA, TIAGO LUIZ. **Desenvolvimento de Modelos In Silico de Propriedades de ADME Para a Triagem de Novos Candidatos a Fármacos.** 82 f. Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.

MONK, BRIAN C.; GOFFEAU, Andre. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 367-369, 2008.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., FEO, V. D. Essential Oils and Antifungal. **Activity.Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

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. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 12, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NIKOLIĆ, M., MARKOVIĆ, T., MOJOVIĆ, M., PEJIN, B., SAVIĆ, A., PERIĆ, T., SOKOVIĆ, M. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. **Ind Crops Prod.**, v. 49, p. 561-567, 2013.

ORHAN DD, OZÇELIK B, OZGEN S, ERGUN F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiol Res** 165(6): 496-504, 2010.

PFALLER M.A., DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev** 20: 133-163, 2007.

RANGEL M, MALPEZZI ELA, SUSINI SMM, FREITAS JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. 1997; 35, 305-309.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R.B. Inibição de Cicloxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.16, n.4, p. 307-316, Jun. 2014.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; Hassani, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**. v. 17, n. 13, p. 1057–1060, 2010.

SALICILATO DE METILA. Acessado em 01 de fevereiro de 2018 as 9:34 <http://www.oleosessenciais.org/salicilato-de-metila/>.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis.**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SARDI, J. C. O., SCORZONI, L., BERNARDI, T., FUSCO-ALMEIDA, A. M., & GIANNINI, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol.**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARTORATTO A, MACHADO ALM, DELARMELENA C, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT, REHDER VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**; 35: 275 – 280, 2004.

SCHREIER H, GAGNÉ L, BOCK T, ERDOS GW, DRUZGALA P, CONARY JT, MULLER BW. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharm Acta Helv.** 1997; (72): 215-223.

SCOTT, L. A review of plants used in the treatment of Liver Disease: Part-I. **Altern Med Rev.** v. 3, n. 6, p. 410-421, 1998.

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 Microbiol Rev** 36(2): 288-305, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC. Cap. 18, p. 467-495, 2004.

SOUSA, J. P. **Atividade antifúngica do citral e timol sobre *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis***. 2015. 144f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos) – Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for

alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Exp Toxicol Pathol**, 2008, (60),225-233.

SRINIVAS, N.; SANDEEP, K.S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B.N. *In Vitro* Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An *In Silico* Approach. *International Invention J Biosci Biochem*, v. 2, n. 3, p. 20-29, 2014.

TANG, YUN et al. Insights into Molecular Basis of Cytochrome P450 Inhibitory Promiscuity of Compounds. **J. Chem. Inf. Model** , v.51, n.10, p. 2482-2495, 2011.

YAPAR, NUR. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 10, p. 95, 2014.

ZAICA, L. A. Spices and herbs: their antimicrobial activity and it's determination. **J. Food Saf.** v. 9, n. 2, p. 97– 118, 1988.

ZAITZ, C. ZAITZ C, CAMPBELL I, MARQUES S.A, RUIZ L.R.B & FRAMIL V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 432p. 2010.

# **ANEXO**



COMITÉ DE ÉTICA  
EM PESQUISA  
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

FUNDAÇÃO FRANCISCO  
MASCARENHAS/FACULDADES  
INTEGRADAS DE PATOS-FIP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

**Pesquisador:** CASSIO ILAN SOARES MEDEIROS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 76271917.8.0000.5181

**Instituição Proponente:** CENTRO EDUCACIONAL DE ENSINO SUPERIOR DE PATOS LTDA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.373.249

#### Apresentação do Projeto:

De acordo com o proponente: "ESTUDO QUANTITATIVO E QUALITATIVO DE EXTRATOS E FASES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS, BEM COMO DE COMPOSTOS ISOLADOS DE ORIGEM NATURAL E SINTÉTICO. NESTE ESTUDO, SERÁ REALIZADOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ENSAIOS TOXICOLÓGICOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS. TAMBÉM SERÁ AVALIADO A ATIVIDADE MUTAGÊNICA EX-VIVO EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL".

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as atividades antioxidantes e hemolíticas dos compostos bioativos estudados.

Objetivo Secundário:

•Verificar a capacidade antioxidante desses compostos bioativos;•Avaliar a atividade hemolítica desses compostos bioativos em eritrócitos humanos oriundos de sangue dos tipos A, B e O. •Avaliar a atividade genotóxica desses compostos bioativos frente a células da cavidade oral.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentam-se de acordo com os termos previstos pelas RESOLUÇÕES 466/2012 e 510/2016.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifica-se direcionamento metodológico adequado à realização de um trabalho com relevância

**Endereço:** Rua Horácio Nóbrega S/N

**Bairro:** Belo Horizonte

**CEP:** 58.704-000

**UF:** PB

**Município:** PATOS

**Telefone:** (83)3421-7300

**Fax:** (83)3421-4047

**E-mail:** cep@fiponline.edu.br



COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA  
INSTITUÇÕES INTEGRADAS DE PATOS

FUNDAÇÃO FRANCISCO  
MASCARENHAS/FACULDADES  
INTEGRADAS DE PATOS-FIP



Continuação do Parecer: 2.373.249

acadêmica, científica e social.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentam-se de acordo com os termos previstos pela NORMA OPERACIONAL 001/2013.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Cumpridas as pendências lançadas no parecer anterior, nos posicionamos de maneira Favorável à realização do trabalho.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Com base nos parâmetros estabelecidos pela RESOLUÇÃO 466/2012 do CNS/MS regulamentando os aspectos relacionados a ÉTICA ENVOLVENDO ESTUDOS COM/EM SERES HUMANOS, o Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas de Patos considera que o protocolo em questão está devidamente APROVADO para sua execução.

Este documento tem validade de CERTIDÃO DE APROVAÇÃO para coleta dos dados propostos ao estudo. Destacamos que a CERTIDÃO PARA PUBLICAÇÃO só será emitida após a apresentação do RELATÓRIO FINAL do estudo proposto.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	07/11/2017 18:25:07	Flaubert Paiva	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.doc	07/11/2017 18:23:38	Flaubert Paiva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_985408.pdf	01/11/2017 22:36:45		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/11/2017 22:36:12	CASSIO ILAN SOARES MEDEIROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_toxicidade_Versao_final.docx	01/11/2017 22:35:43	CASSIO ILAN SOARES MEDEIROS	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	11/09/2017 20:58:31	CASSIO ILAN SOARES	Aceito

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N

Bairro: Belo Horizonte

CEP: 58.704-000

UF: PB

Município: PATOS

Telefone: (83)3421-7300

Fax: (83)3421-4047

E-mail: cep@fiponline.edu.br



COMITÉ DE ÉTICA  
EM PESQUISA  
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

FUNDAÇÃO FRANCISCO  
MASCARENHAS/FACULDADES  
INTEGRADAS DE PATOS-FIP



Continuação do Parecer: 2.373.249


**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PATOS, 09 de Novembro de 2017

  
Assinado por:  
Flaubert Paiva  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Horácio Nóbrega S/N

**Bairro:** Belo Horizonte

**CEP:** 58.704-000

**UF:** PB

**Município:** PATOS

**Telefone:** (83)3421-7300

**Fax:** (83)3421-4047

**E-mail:** cep@fiponline.edu.br