



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ



Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

MARIANE ROBERTA RITTER

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Trichilia catigua*
CONTRA *Helicobacter pylori* E ESPÉCIES DE *Candida* DE
RELEVÂNCIA CLÍNICA**

MARINGÁ

2021

MARIANE ROBERTA RITTER

**Atividade antimicrobiana dos extratos de *Trichilia catigua* contra
Helicobacter pylori e espécies de *Candida* de relevância clínica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título em nível de doutorado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R614a

Ritter, Mariane Roberta

Atividade antimicrobiana dos extratos de *Trichilia catigua* contra *Helicobacter pylori* e espécies de *Candida* de relevância clínica / Mariane Roberta Ritter. – Maringá, PR, 2021. 98 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Plantas medicinais. 2. Microscopia eletrônica. 3. Cinchonainas. 4. Docking molecular. 5. PCR em tempo real. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 23.ed. 615.32

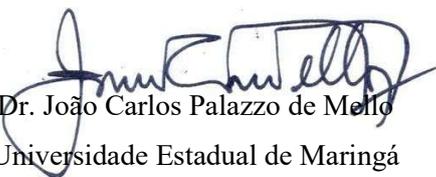
MARIANE ROBERTA RITTER

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DOS EXTRATOS DE
Trichilia catigua CONTRA *Helicobacter pylori* E ESPÉCIES DE *Candida*
DE RELEVÂNCIA CLÍNICA**

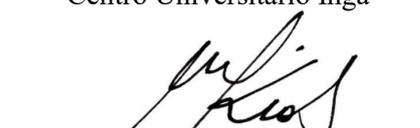
126ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo
Centro Universitário Ingá


Dra. Érika Seki Kioshima Cotica
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Renata Longhini
Secretaria Municipal de Saúde/Pref. Municipal de Maringá


Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde e oportunidades que tem colocado em meu caminho.

À minha família pelo apoio incondicional, especialmente minha vó Gloria e minha mãe Ana Maria que sempre foram minhas inspirações.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela oportunidade, paciência e ensinamento durante os últimos 7 anos. Exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, que sempre nos incentiva a alcançarmos nosso melhor. Serei eternamente grata por tudo. Muito obrigada!

À Regina Makimori, além de uma grande amiga, me ajudou muito com a parte microbiológica.

À Profa. Dra. Erika Seki Kioshima Cotica e Daniella Faria do laboratório de Micologia, que me receberam com muito carinho e compartilharam comigo o conhecimento e experiência na área.

Ao Prof. Dr. Flavio Vicente Seixas pela parceria nas análises *in silico*, que sem dúvida foram de grande importância para este trabalho.

Ao Prof Dr. Celso Vataru Nakamura por ceder o laboratório e estrutura para realização de análises microbiológicas, e à Danielle Lazarin Bidoia pelas microscopias.

Aos Profs. Drs. Rita de Cassia Ribeiro Gonçalves e Rodrigo Resende Kitagawa pela parceria com análises de *H. pylori*.

À toda equipe do laboratório Palafito: Ana Luiza, Ana Carolina, André, Augusto, Daniela, Danielly, Emilly, Fernanda, Larissa, Marcelo, Mariana, Naiara, Raquel, Sharize e Thalita. Pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e amizade durante minha estadia na pós-graduação.

À Helena Mesquita e Admir Arantes, da Pós-Graduação e Graduação, por sempre me ajudarem com muito carinho e bom humor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior – Capes, pela concessão de bolsa.

Também gostaria de deixar meu agradecimento aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Maringá, pelos ensinamentos durante as disciplinas que cursei. Cujas carreiras acadêmicas ficarão como exemplos e admiração em minha trajetória.

Obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha vida. Pessoas que tornaram meus dias mais leves e pessoas que dividiram seu conhecimento comigo. Gratidão eterna!

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o viajante se sentou na areia da praia e disse: ‘Não há mais o que ver’, sabia que não era assim. O fim duma viagem é apenas o começo doutra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na Primavera o que se vira no Verão, ver de dia o que se viu de noite, com sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para os repetir, e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomençar a viagem. Sempre. O viajante volta já”.

JOSÉ SARAMAGO, Viagem à Portugal

BIOGRAFIA



Mariane Roberta Ritter nasceu em 16 de abril de 1990, na cidade de Medianeira –PR. Em 2014 graduou-se em Farmácia generalista pela Faculdade Anglo Americano – Foz do Iguaçu, bolsista do Programa Universidade para Todos (PROUNI). No mesmo ano, iniciou o Mestrado na Universidade Estadual de Maringá (UEM) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos, com conclusão em 2016. Realizou suas atividades no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Atualmente, é doutoranda no mesmo laboratório (início em 2016). Também possui especialização em Biomedicina Estética com ênfase em procedimentos invasivos, pela Unicesumar, Maringá-PR (2020).

RITTER, M.R. 2021. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Trichilia catigua* contra *Helicobacter pylori* e espécies de *Candida* de relevância clínica. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 98p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), popularmente conhecida como catuaba, é utilizada tradicionalmente como estimulante sexual, tratamento para estresse, déficit de memória e antimicrobiano. A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que está presente na mucosa estomacal de mais de 50% da população mundial e está associada com o desenvolvimento de gastrite, úlceras e câncer gástrico. Infecções por leveduras do gênero *Candida* contabilizam mais de 400.000 casos anuais em todo o mundo, e mortalidade que se aproxima de 40% nas UTIs. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* e *in silico* dos extratos e substâncias isoladas de *T. catigua* contra *H. pylori* e leveduras do gênero *Candida* de importância clínica. Primeiramente o extrato bruto (EB) foi preparado a partir das cascas de *T. catigua*, e posteriormente particionado originando as frações aquosa (FAQ) e acetato de etila (FAE). Então a FAE foi caracterizada por eletroforese capilar e CLAE, com a quantificação dos marcadores fitoquímicos cinchonáinas Ia, Ib, IIb, epicatequina (Epi) e procianidina B2 (PB2). Após foi avaliada a citotoxicidade dos extratos e substâncias em linhagem HeLa, Vero e Macrófagos J774. A atividade contra *H. pylori* foi avaliada por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), inibição da enzima urease, sinergismo com claritromicina e amoxicilina, PCR em tempo real, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e simulações por *docking* molecular. A avaliação de atividade anti-*Candida* foi realizada com cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, por determinação de CIM, sinergismo das substâncias entre si e com anfotericina B e Caspofungina, e também *docking* molecular. Os extratos não apresentaram toxicidade para as linhagens celulares avaliadas. Em relação à atividade contra *H. pylori*, melhores resultados foram observados para FAE, com CIM₅₀ de 0,25 mg/mL com 42,34% de inibição da urease, também apresentando sinergismo com claritromicina. Em nível molecular, reduziram a expressão dos genes de virulência VacA e CagA. No MEV foi possível observar que a FAE converteu as células de *H. pylori* para forma de cocos não viáveis e reduziu formação de biofilme. As simulações por *docking* sugeriram que o sinergismo entre cinchonáina Ia e Epi podem causar interação na síntese de ácidos graxos essenciais. Na atividade contra cepas de *Candida*, melhores resultados foram observados para FAE e cinchonáinas contra *C. glabrata*, com CIM de 9,76 e 3,9 µg/mL, respectivamente. Na avaliação de sinergismo, cinchonáina Ib e Epi apresentaram atividade fortemente sinérgica entre si e com Caspofungina, que também foi sinérgica com FAE. A PB2 de forma isolada e em combinação com Epi, apresentou atividade fortemente sinérgica com Anfotericina B. As análises por *docking* apontaram que as substâncias de catuaba atuam na interferência de atividades metabólicas essenciais de *C. glabrata*. As compilações dos resultados indicam que a FAE e substâncias isoladas de *T. catigua* apresentam potencial para desenvolvimento de novas estratégias de tratamento contra *H. pylori* e *Candida* spp.

Palavras-chave: Plantas medicinais, cinchonáinas, PCR em tempo real, Microscopia Eletrônica, Docking molecular.

RITTER, M.R. 2021. Antimicrobial activity of *Trichilia catigua* extracts against *Helicobacter pylori* and *Candida* species of clinical relevance. Ph.D. Thesis, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 98p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), popularly known as catuaba, is traditionally used as a sexual stimulant, treatment for stress, memory deficit and antimicrobial agent. *Helicobacter pylori* is a bacterium that is present in the stomach mucosa of more than 50% of the world population and is associated with the development of gastritis, ulcers and gastric cancer. Yeast infections of the genus *Candida* account for more than 400,000 annual cases worldwide, and mortality that approaches 40% in ICUs. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* and *in silico* activity of extracts and isolated compounds from *T. catigua* against *H. pylori* and yeasts of the genus *Candida* of clinical importance. First, the crude extract (CE) was prepared from the barks of *T. catigua*, and later partitioned giving rise to the aqueous (AQF) and ethyl acetate fractions (EAF). Then the EAF was characterized by capillary electrophoresis and HPLC, with the quantification of the phytochemical markers cinchonain Ia, Ib, IIB, epicatechin (Epi) and procyanidin B2 (PB2). After that, the cytotoxicity of extracts and compounds was evaluated in HeLa, Vero and Macrophages J774 cell lines. The activity against *H. pylori* was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), inhibition of the urease enzyme, synergism with clarithromycin and amoxicillin, real-time PCR, scanning electron microscopy (SEM), and simulations by molecular docking. The evaluation of anti-*Candida* activity was performed with *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei* strains, by MIC determination, synergism of the compounds among themselves and with amphotericin B and Caspofungin, and also molecular docking. The extracts showed no toxicity for the cell lines evaluated. Regarding the activity against *H. pylori*, better results were observed for EAF, with MIC₅₀ of 0.25 mg/mL with 42.34% of urease inhibition, also showing synergism with clarithromycin. At the molecular level, they reduced the expression of the *VacA* and *CagA* virulence genes. In SEM, it was possible to observe that EAF converted the *H. pylori* cells to non-viable cocci and reduced biofilm formation. The docking simulations suggested that the synergism between cinchonain Ia and Epi may cause interaction in the synthesis of essential fatty acids. In the activity against *Candida* species, better results were observed for EAF and cinchonaines against *C. glabrata*, with MIC of 9.76 and 3.9 µg/mL, respectively. In the assessment of synergism, cinchonain Ib and Epi showed strongly synergistic activity with each other and with Caspofungin, which was also synergistic with EAF. PB2 isolated and in combination with Epi, showed strongly synergistic activity with Amphotericin B. The docking analysis showed that the catuaba compounds act in the interference of essential metabolic activities of *C. glabrata*. The compilations of the results indicate that the EAF and isolated compounds from *T. catigua* have potential to develop new strategies of treatment against *H. pylori* and *Candida* spp.

Keywords: Medicinal plants, cinchonain, Real time PCR, Electron Microscopy, Molecular Docking.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação dos marcadores fitoquímicos de <i>Trichilia catigua</i> por CLAE. Valores de concentração expressos em µg/mL relativos à solução de 500µg/mL de FAE.....	44
Tabela 2. Valores de CIM ₅₀ dos extratos de <i>Trichilia catigua</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> , e inibição da enzima urease.....	48
Tabela 3. Checkerboard dos extratos de <i>Trichilia catigua</i> e antimicrobianos padrão contra <i>Helicobacter pylori</i>	50
Tabela 4. Status das enzimas identificadas por “ <i>docking reverso</i> ” presentes em <i>Helicobacter pylori</i> segundo a base de dados Uniprot. As enzimas destacadas em negrito estão presentes em <i>H. pylori</i> e ausentes em humanos, o que sugere prováveis alvos dos taninos.....	55
Tabela 5. Scores médios encontrados com a varredura virtual dos taninos do extrato de catuaba (varredura virtual) e dos ligantes modelados (<i>redocking</i>) nas enzimas alvo deste estudo.....	57
Tabela 6. CIM (µg/mL) de extratos e substâncias isoladas de catuaba contra <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. krusei</i>	60
Tabela 7. Checkerboard das substâncias isoladas de catuaba contra <i>Candida glabrata</i>	62
Tabela 8. Checkerboard de Cinchonáina Ib e Epi com substâncias isoladas de catuaba contra <i>Candida glabrata</i>	63
Tabela 9. Checkerboard de FAE e substâncias isoladas de catuaba em associação com Anfotericina B contra <i>Candida glabrata</i>	64
Tabela 10. Checkerboard de FAE e substâncias isoladas de catuaba em associação com Caspofungina contra <i>Candida glabrata</i>	65
Tabela 11. Status das enzimas identificadas por <i>docking reverso</i> presentes no genoma de <i>Candida glabrata</i> e <i>Homo sapiens</i> , segundo a base de dados Uniprot.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e inflorescências de <i>Trichilia catigua</i> A. Juss. (Meliaceae). Fonte: Cláudio Roberto Novello (2008).	19
Figura 2. Estruturas químicas de substâncias isoladas de <i>Trichilia catigua</i>	20
Figura 3. Cromatograma de FAE de <i>Trichilia catigua</i> . 1 -PB2; 2 -Cinchonaína Iib; 3 -Epi; 4 -mistura de Cinchonaínas Ia e Ib.	43
Figura 4. Curvas de calibração de cinchonaínas Ia, Iib, epicatequina e Procianidina B2.	44
Figura 5. Eletroferograma da FAE de <i>Trichilia catigua</i> . 1 -Epi; 2 -PB2; 3 - Cinchonaína Ia; 4 - Cinchonaína Ib; 5 - Cinchonaína Iia; 6 - Cinchonaína Iib.	45
Figura 6. Citotoxicidade de FAE, Epi, PB2, Cinchonaínas Ia, Ib e Iib em linhagem HeLa, Vero e Macrófagos J774. Concentrações testadas 500 - 0,9 µg/mL para todas as substâncias isoladas	47
Figura 7. Resultado de expressão gênica por RTqPCR de <i>Helicobacter pylori</i> tratada com extratos de <i>Trichilia catigua</i>	51
Figura 8. MEV de <i>Helicobacter pylori</i> tratada com extratos de <i>Trichilia catigua</i> . A -Controle negativo; B - EB 1 mg/mL; C - FAE 0,25 mg/mL; D - FAQ 1 mg/mL.	53
Figura 9. Estruturas obtida por meio de <i>docking</i> dos ligantes avaliados na enzima <i>HpylorifabZ</i>	56
Figura 10. Estruturas obtida por meio de <i>docking</i> dos ligantes avaliados na enzima <i>HpylorifabG</i>	58
Figura 11. Estruturas obtidas por meio de <i>docking</i> dos ligantes avaliados na enzima <i>HpylorifabI</i>	59
Figura 12. Alterações morfológicas de <i>Candida glabrata</i> tratada com extratos e substâncias isoladas <i>Trichilia catigua</i> , nas concentrações correspondentes ao sub-CIM, por 24 h. (A-C) <i>C. glabrata</i> não tratada; (D-E) <i>C. glabrata</i> tratada com FAE; (F-G) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Ia; (H-I) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Ib; (J-K) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Iib; (L-M) <i>C. glabrata</i> tratada com Epi; (N-O) <i>C. glabrata</i> tratada com Pb2. Barra de escala = 10 µm (A), 5 µm (B, D, F, H, J, L), 4 µm (N), 2 µm (C, E, G, I, K, M, O).	67
Figura 13. Alterações estruturais de <i>Candida glabrata</i> tratada com extratos e substâncias isoladas <i>Trichilia catigua</i> , nas concentrações correspondentes ao sub-CIM, por 24 h. (A-B) <i>C. glabrata</i> não tratada; (C) <i>C. glabrata</i> tratada com FAE; (D) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Ia; (E) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Ib; (F) <i>C. glabrata</i> tratada com cinchonaína Iib; (G) <i>C. glabrata</i> tratada com Epi; (H) <i>C. glabrata</i> tratada com Pb2. Barra de escala = 200 nm (A-H).	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOX	Amoxicilina
BHI	Ágar Brain Heart Infusion
CagA	Proteína associada ao gene A
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CD	Ciclodextrina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLA	Claritromicina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EB	Extrato bruto
EC	Eletroforese capilar
Epi	Epicatequina
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
IL-8	Interleucina 8
kDA	Quilodalton
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Tampão ácido 3[N-morfolino] propanossulfônico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]
MTT	[3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]
Nf-kB	Fator nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	Ilha de patogenicidade
PBS	Tampão fosfato salino

PB2	Procianidina B2
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SDA	Ágar sabourand
SFB	Soro fetal bovino
SHP-2	SrC Homology Region 2-domain Phosphatase 2
TFA	Ácido trifluoroacético
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante A

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
'	Minuto
”	Segundo
°C	Grau Celsius
μA	Microampère
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
μmol/L	Micromol por litro
cm	Centímetro
g	Gramma
kV	Quilovolt
mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/g	Milimolar por grama
mmol/L	Milimolar por litro
ng	Nanograma
ng/μL	Nanograma por microlitro
nm	Nanometro
p.a.	Padrão analítico
pH	Potencial de hidrogênio
r ²	Coefficiente de determinação
s	Segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Trichilia Catigua</i> A. Juss.	19
2.2 <i>Helicobacter pylori</i>	21
2.2.1 Principais fatores de virulência da <i>Helicobacter pylori</i>	22
2.2.1.1 Urease	22
2.2.1.2 Proteína CagA	23
2.2.1.3 Toxina Vacuolizante A (VacA)	23
2.3 GÊNERO <i>Candida</i>	24
2.3.1 <i>Candida albicans</i>	26
2.3.2 <i>Candida tropicalis</i>	26
2.3.3 <i>Candida parapsilosis</i>	27
2.3.4 <i>Candida glabrata</i>	28
2.3.5 <i>Candida krusei</i>	29
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	32
4.2 SOLVENTES E REAGENTES	32
4.3 EQUIPAMENTOS	33
4.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS	34
4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	34
4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
4.5.2 Eletroforese Capilar (EC)	35
4.6 CITOTOXICIDADE	35
4.7 ATIVIDADE FRENTE A <i>Helicobacter pylori</i>	36
4.7.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	36
4.7.2 Inibição da enzima urease	36
4.7.3 Avaliação da atividade sinérgica (Chekerboard)	37
4.7.4 Quantificação de RNAm por PCR em tempo real	37
4.7.5 Microcopia eletrônica de varredura (MEV)	38
4.7.6 Docking Molecular	38
4.7.6.1 Preparação das estruturas	39
4.7.6.2 Docking e varredura virtual	39
4.8 ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES DE <i>Candida</i> DE RELEVÂNCIA CLÍNICA	40
4.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	40

4.8.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	40
4.8.3 Avaliação de sinergismo (Checkerboard)	41
4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
4.8.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	42
4.8.6 Análises de bioinformática	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	43
5.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	43
5.1.2 Eletroforese Capilar	45
5.2 CITOTOXICIDADE	46
5.3 ATIVIDADE CONTRA <i>H. pylori</i>	48
5.3.1 Avaliação da atividade sinérgica (Checkerboard)	50
5.3.2 PCR em tempo real (RTqPCR)	51
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
5.3.4 Docking Molecular	54
5.3.4.1 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima fabZ	56
5.3.4.2 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima fabG	57
5.3.4.3 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima fabI	58
5.4 ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES DE <i>Candida</i> DE RELEVÂNCIA CLÍNICA	60
5.4.1 Atividade sinérgica (<i>Checkerboard</i>)	62
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	66
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	68
5.4.4 Bioinformática	69
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE A	92

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são os mais antigos recursos empregados no tratamento de doenças não apenas pela utilização intrínseca, mas também por possuírem um importante papel na síntese de moléculas complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos atuais são derivados de produtos naturais, como plantas e micro-organismos. No caso de medicamentos oncológicos, esse número chega a 60% (Newman & Cragg, 2020).

Nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia tem aumentado consideravelmente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população global faz uso de terapias complementares em saúde, incluindo plantas medicinais, com maiores índices nas populações africanas e europeias (OMS, 2018). O Brasil possui a maior diversidade de plantas do mundo, contando com cerca de 55 mil espécies catalogadas, das quais estima-se que mais de 50% apresentem substâncias com potencial farmacológico. Portanto, o país oferece uma integrativa terapêutica bastante promissora à população para o tratamento de doenças através da fitoterapia (Alexandre *et al.*, 2008).

Em relação às plantas empregadas na medicina tradicional brasileira, destaca-se a *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), uma árvore amplamente distribuída por todo o território, popularmente conhecida como catuaba ou catiguá. As cascas da *T. catigua* são utilizadas para vários fins terapêuticos, como estimulante sexual, tratamento para estresse, déficit de memória e como antimicrobiano (Pizzolatti *et al.*, 2002). As pesquisas de produtos naturais com potencial antimicrobiano no Brasil tiveram início em 1948, com o isolamento dos primeiros componentes com essa atividade (Oliveira, 2004; Sartori, 2005). Entre as classes de compostos com atividade antimicrobiana conhecida, destacam-se: flavonoides, alcaloides, terpenos, triperpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas e saponinas (Verdi *et al.*, 2005).

Dentre os micro-organismos clinicamente importantes e de difícil tratamento, destaca-se a bactéria *Helicobacter pylori*, que está presente na mucosa estomacal de mais da metade da população mundial e está associada com o desenvolvimento de gastrite, úlceras e câncer gástrico. O tratamento consiste na associação de antimicrobianos por longo prazo, o que dificulta a adesão dos pacientes e também abre espaço ao desenvolvimento de cepas resistentes, fato já relatado na literatura (Hooi *et al.*, 2017).

No mesmo âmbito encontram-se as leveduras do gênero *Candida*, que contabilizam mais de 400.000 casos anuais em todo o mundo, com uma incidência de 0,24 a 34,3 pacientes para cada 1000 internações em UTI e mortalidade que se aproxima de 60%. Infecções por *Candida* vão desde quadros clínicos de menor gravidade, como candidíase vulvovaginal, até complicações sistêmicas mais severas com alto grau de risco, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A resistência a medicamentos é de grande preocupação, pois a disponibilidade de fármacos para o tratamento é bem menor quando comparado a infecções bacterianas (Blanco & Garcia, 2008; Miceli *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de análises *in silico* tem contribuído significativamente na avaliação de novos de tratamento dentro da farmacologia, bem como na investigação e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. As ferramentas permitem a realização de uma ampla gama de avaliações, como relação estrutura-atividade de uma substância, definição de farmacóforos e farmacocinética, dentre outros, possibilitando assim o planejamento e previsão dos efeitos nas células ou no organismo. As análises *in silico* também podem ser consideradas como modelos alternativos para redução do uso de animais nas pesquisas, implicando também em redução do impacto econômico (Meng *et al.*, 2011; Freires *et al.*, 2015).

O *docking* molecular consiste em simulações computacionais que preveem interações entre uma molécula e um alvo farmacológico, ou mesmo duas proteínas. As interações avaliadas, como eletrostáticas, forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, entre outras, gera um valor de *score*, indicando o potencial ou não de uma determinada substância se ligar a um alvo específico. Os estudos *in silico* também podem oferecer uma previsão de possível toxicidade e efeitos indesejáveis através de análises de homologia entre proteínas microbianas e humanas. Os alvos ideais são aqueles que são específicos para um determinado microrganismo, preferencialmente não estando presentes nas células humanas (Pagadala *et al.*, 2017).

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos extratos de catuaba contra *H. pylori* e leveduras do gênero *Candida* de importância clínica, por diferentes técnicas *in vitro* e *in silico*. Para as leveduras, também foram empregadas substâncias isoladas de *T. catigua*. As técnicas *in silico* utilizadas foram varredura por *docking* reverso e *docking* molecular convencional, para avaliar quais alvos moleculares dos micro-organismos teriam interação com os componentes dos extratos de *T. catigua*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trichilia catigua* A. Juss.

Trichilia catigua A. Juss. é uma árvore, pertencente a família *Meliaceae*, que cresce abundantemente em diversas regiões do Brasil. Popularmente conhecida como catuaba, catiguá, catiguá vermelho, catuama, pau-ervilha e catuaba-do-norte (Garcez *et al.*, 1997). As árvores da espécie podem ser encontradas em vários estados brasileiros, principalmente na região nordeste e sul. É empregada na medicina popular principalmente para tratamento de impotência sexual, estresse, fadiga e déficits de memória (Pizzolatti *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2009).

Do ponto de vista botânico, as árvores de *T. catigua* podem chegar até 10 m de altura, com galhos de coloração acinzentada. As folhas se apresentam em folhetos, com ápice perpendicular, oblongas ou elípticas, com até 7 cm de comprimento (Figura 1). As flores geralmente são amarelo-claro e os frutos são cápsulas arredondadas de coloração avermelhada, com no máximo duas sementes (Souza *et al.*, 2001; Lagos, 2006).



Figura 1. Folhas e inflorescências de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). Fonte: Cláudio Roberto Novello (2008).

As principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie são esteroides (Lagos, 2006; Matos, 2006), saponinas (Marques, 1998), heterosídeos (Lagos, 2006), flavolignanais (Beltrame *et al.*, 2006; Martinelli, 2010; Resende, 2007; Tang *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2011), limonoides (Matos, 2006; Matos *et al.*, 2009), flavonoides, taninos e mucilagem (Lagos, 2006; Nebo, 2008; Resende, 2007; Resende *et al.*, 2011; Silva, 2005; Tang *et al.*, 2007). Várias substâncias já foram isoladas e identificadas (Figura 2): Catiguanina A (**1**), Catiguanina B (**2**) (Tang *et al.*, 2007), Apocinina E (**3**), Cinchonainas Ia (**4**), Ib (**5**), Ic (**6**), Id (**7**), Iia (**8**) e Iib (**9**) (Beltrame *et al.*, 2006; Resende, 2007; Tang *et al.*, 2007; Martinelli, 2010; Viana, *et al.*, 2011), Procianidinas B2 (**10**), B4 (**11**) e C1 (**12**) (Resende, 2007), Catequina (**13**), Epicatequina (**14**), Ácido clorogênico (**15**), estigmasterol, β -sitosterol (Lagos, 2006) e 3- β -O- β -D-glucopiranosil sitosterol (Matos, 2006).

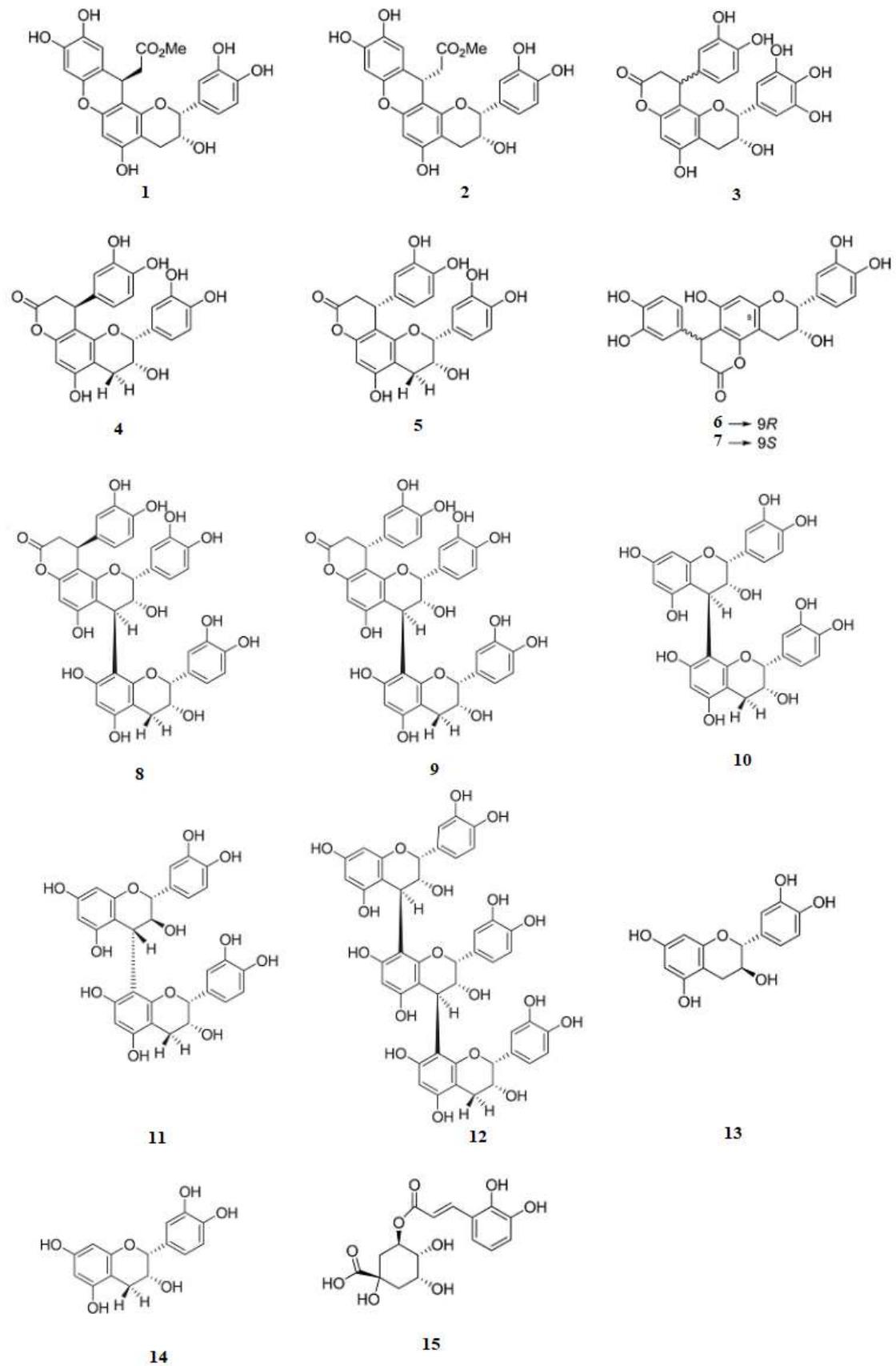


Figura 2. Estruturas químicas de substâncias isoladas de *Trichilia catigua*.

Atualmente o extrato das cascas de *T. catigua* é encontrado comercialmente em associação com extratos de *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) e *Croton heliotropiifolius* Kunth (Marapuama), no medicamento fitoterápico Catuama[®], do laboratório Catarinense. O mesmo é indicado para tratamento de astenias físicas e mentais.

Do ponto de vista farmacológico, o extrato bruto e fração acetato de etila apresentaram atividade afrodisíaca por avaliação de relaxamento de corpos cavernosos em coelhos (Antunes *et al.*, 2001); antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas (Pizzolatti *et al.*, 2002b; Ritter *et al.*, 2016); tripanocida contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Pizzolatti *et al.*, 2002b); anti-inflamatório (Barbosa *et al.*, 2004; Vicentini *et al.*, 2018); antioxidante (Resende *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Chassot *et al.*, 2011; Lonni *et al.*, 2011), antiviral contra Poliovírus tipo 1, Herpes simplex e Herpesvirus bovino (Faccin-Galhardi *et al.*, 2008; Bernardi *et al.*, 2010; Espada *et al.*, 2015), analgésica (Viana *et al.*, 2011), antidepressiva (Bonassoli *et al.*, 2012), neuroprotetora (Truiti *et al.*, 2015), antidiabética (Gomes *et al.*, 2017; Panizzon *et al.*, 2019), antiamnésica (Godinho *et al.*, 2018) e imunomodulatória (Fernandes *et al.*, 2019).

2.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é um bacilo Gram negativo microaerófilo, que está presente na mucosa gástrica de mais da metade da população mundial. No Brasil, essa estimativa chega a 70% da população (Hooi *et al.*, 2017). A bactéria é perfeitamente adaptada ao ambiente estomacal, provoca gastrite e está relacionada ao desenvolvimento de úlceras, adenocarcinoma gástrico e linfoma do tecido linfóide associado a mucosa. Foi isolado pela primeira vez em seres humanos em 1982 por Barry Marshall e Robin Warren, que ganharam o prêmio Nobel em 2005, pela descoberta da associação da bactéria a distúrbios gástricos (Warren & Marshall, 1983; The Nobel Prize, 2005).

A infecção é geralmente adquirida na infância por contaminação fecal-oral, oral-oral ou gastro-oral. Quando ingerida, a bactéria coloniza a camada mucosa que cobre as células epiteliais do estômago, induzindo uma vigorosa resposta imune do hospedeiro. Isso gera um processo inflamatório crônico que resulta em danos gástricos associados a distúrbios digestivos. Os mecanismos pelos quais a infecção por *H. pylori* leva à lesão da mucosa gástrica incluem os efeitos diretos de fatores de virulência produzidos pela bactéria, desenvolvimento de processo inflamatório, estresse oxidativo e indução de apoptose em células estomacais. A patogenicidade está relacionada a grande variedade genotípica dos respectivos genes de virulência (Lima & Rabenhorst, 2009; Abadi, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o patógeno como cancerígeno de Classe I para o câncer gástrico, com base nos resultados de estudos epidemiológicos (Konturek *et al.*, 2009). A maioria dos indivíduos infectados não apresentam sintomas, sendo que apenas 3% desses desenvolvem neoplasias, indicando que outros fatores como a disposição genética e a cepa bacteriana, estão relacionados ao desenvolvimento de câncer gástrico (Wen & Moss, 2009).

O câncer de estômago é uma das neoplasias malignas mais comuns no mundo. Em 2020, estima-se que mais de um milhão de novos casos de câncer e 769.000 mortes ocorram globalmente, tornando o câncer de estômago o quinto diagnóstico de câncer mais comum e a quarta principal causa de morte por câncer (Sung *et al.*, 2021).

A terapia tripla (amoxicilina, claritromicina e um inibidor da bomba de prótons) ou a terapia quadrupla (amoxicilina, claritromicina, inibidor da bomba de prótons e bismuto) tem sido recomendada como tratamento. No entanto, este tratamento pode falhar, principalmente a resistência da *H. pylori* a um dos antibióticos utilizados, o longo tempo de tratamento e as reações adversas causadas pelos medicamentos, o que dificulta a adesão dos pacientes (Megraud, 2004; Malfertheiner, 2008).

2.2.1 Principais fatores de virulência da *Helicobacter pylori*

2.2.1.1 Urease

Apesar da concentração de H^+ , várias espécies bacterianas são capazes de transitar no estômago humano, contudo, somente a *H. pylori* é capaz de colonizar a mucosa gástrica. Para isso, a bactéria produz a enzima urease (uréia amidohidrolase) que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato, que por sua vez se decompõe em ácido carbônico e outra molécula de amônia. O ácido carbônico é composto por dióxido de carbono (CO_2) e água. No espaço periplasmático, o CO_2 é convertido em bicarbonato e H^+ , mantendo o pH próximo a 6,1. Desta forma, a amônia e CO_2 tamponam o citosol e periplasma, produzindo um efeito citopático sobre as células epiteliais e neutralizando o meio gástrico, gerando um microambiente favorável ao desenvolvimento da bactéria (Marcus *et al.*, 2005).

A modificação do pH gástrico é um fator que permite a sobrevivência da bactéria no estômago, contribuindo assim para a colonização e persistência da infecção, devido esta bactéria ser sensível a meios ácidos (Trabulsi & Alterthum, 2008). A urease é considerada um fator de virulência pois cepas mutantes de *H. pylori* urease-negativa não são capazes de colonizar o estômago humano (Weeks *et al.*, 2000).

A *H. pylori* produz grandes quantidades de urease, chegando até 10 a 15% da síntese total de proteínas da bactéria (Bauerfeind *et al.*, 1997). A enzima é encontrada tanto no citoplasma quanto aderida a membrana bacteriana e é composta de seis subunidades UreA e seis UreB, dispostas em um anel duplo de 13 nm de diâmetro. Os genes UreA e UreB codificam unidades estruturais da enzima, e os genes acessórios UreE, UreF, UreG e UreH são responsáveis pela produção da metaloenzima cataliticamente ativa. O gene UreI tem papel na ativação da urease citoplasmática e colonização gástrica (Scott *et al.*, 2000, Abadi, 2017).

O papel da urease não é limitado apenas à sobrevivência de *H. pylori*, pois a produção de amônia danifica o epitélio gástrico, e o CO_2 protege a bactéria da ação dos fagócitos (Kuwahara *et al.*, 2000; Wroblewski *et al.*, 2009). Recentemente, foi relatado que a urease também pode favorecer o desenvolvimento do câncer gástrico e metástases, devido à estimulação de angiogênese (Olivera-Severo

et al., 2017). Por fim também pode se ligar ao complexo de histocompatibilidade classe II das células estomacais, induzindo a apoptose. Outra característica importante, é que a urease é um dos principais antígenos reconhecidos na resposta imune ao *H. pylori* (Del Giudice *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Proteína CagA

CagA (proteína associada ao gene A) é uma proteína de 120 a 145 kDa que está presente na porção terminal da ilha de patogenicidade (PAI), que é um locus horizontalmente adquirido, de cerca de 30 genes, que codificam o sistema de secreção tipo IV, responsável por transporte de proteínas bacterianas. É considerada um potencial marcador de inflamação (Schaechter *et al.*, 2002). Foi o primeiro fator de virulência de *H. pylori* descrito relacionado a úlceras (Trabulsi & Alterthum, 2008).

As cepas de *H. pylori* são divididas em CagA⁺ e CagA⁻, sendo que as positivas são mais virulentas. A produção de CagA está relacionada com o grau de inflamação e o dano na mucosa gástrica. As amostras positivas apresentam níveis mais elevados de interleucina-8 (IL-8), pela ativação do fator nuclear Kappa B (Nf-kB). Os níveis elevados de IL-8, bem como demais citocinas pró inflamatórias, como COX-2, 5-LOX e quimiocinas, podem explicar a ligação entre amostras CagA⁺ e a ulceração (Schaechter *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2005). O processo inflamatório decorrente gera gastrite superficial, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma (Judd *et al.*, 2004).

Após a adesão da bactéria às células gástricas, o sistema de secreção IV insere a CagA na célula epitelial, sendo então fosforilada pela tirosina. A CagA fosforilada pode causar alterações morfológicas nas células, devido a desorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto (Asahi *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico é um processo que requer alterações na expressão de oncogenes e genes supressores de tumor nas células epiteliais, processo que pode levar vários anos. As células gástricas são continuamente expostas à injeção de CagA por *H. pylori*, e tal exposição prolongada causa desregulação de SHP-2 (*Src Homology region 2-domain Phosphatase 2*), gerando sinais desregulados para o crescimento celular. Alterações na SHP-2 são fatores comuns encontrados em vários processos de malignidade humana (Tartaglia *et al.*, 2003; Bentires-Alj *et al.*, 2004). A proteína CagA também causa perturbação das junções intercelulares, alterando a arquitetura epitelial normal (Hatakeyama & Higashi, 2005).

2.2.1.3 Toxina Vacuolizante A (VacA)

A citotoxina vacuolizante A (VacA) é o segundo fator de virulência mais importante de *H. pylori*, está diretamente relacionado com inflamação e ulceração gástrica. É secretada pela bactéria e inserida nas células epiteliais por endocitose, então gera a indução de vacúolos citoplasmáticos, dano mitocondrial interrupção das funções endossomais e lisossomais, liberação de citocromo C, expressão de COX 2, interferência na apresentação de antígenos, inibição da ativação de linfócitos T e apoptose

(Basso *et al.*, 2008). Em modelo animal, a administração oral de VacA resultou em desenvolvimento de gastrite e úlceras em camundongos (Fujikawa *et al.*, 2003).

O gene VacA está presente em todas as cepas de *H. pylori*, contudo é polimórfico, apresentando três regiões principais: região do sinal (S), região intermediária (i) e região média (m), sendo cada uma dessas subdividida em dois alelos. As cepas tipo S1m1 são altamente toxigênicas, as S1m2 são intermediárias e as S2m2 não são tóxicas, e as cepas i1 são consideradas vacuolizantes e as i2 não-vacuolizantes (Atherton *et al.*, 1995; Rhead *et al.*, 2007). VacA está presente somente em *H. pylori* e *H. ceterum* dentro do gênero *Helicobacter*. *H. ceterum* é uma bactéria isolada de conteúdo fecal e estomacal de mamíferos marinhos e também está associada a gastrite nessas espécies (Kersulyte *et al.*, 2013).

A infecção por *H. pylori* leva ao desenvolvimento de anticorpos para VacA, contudo, tais respostas humorais não resultam na eliminação da infecção em seres humanos. No entanto, essa toxina tem sido utilizada como componente de vacinas, fornecendo proteção contra infecções subsequentes por *H. pylori* em modelos animais (Ghiara *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2004; Malfertheiner *et al.*, 2008).

2.3 GÊNERO *Candida*

Pertencentes a família Candidaceae, as leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos eucarióticos que possuem parede celular composta por quitina e membrana plasmática fosfolipídica com predomínio do ergosterol. A nutrição é feita a partir de fontes de carbono absorvidas do ambiente (Aguiar, 2007). Podem ser encontradas em plantas, no solo, ambientes aquáticos e animais. Mais de 200 espécies do gênero já foram relatadas, sendo que cerca de 20 são considerados agentes patogênicos em humanos. Dentre estas, 5 são consideradas responsáveis por mais de 95% das infecções, sendo elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Ha *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010).

Morfologicamente são classificadas como leveduras, podendo apresentar formas filamentosas. Fazem parte da microbiota do ser humano, sendo encontradas principalmente na mucosa oral, gastrointestinal e vaginal (Shao *et al.*, 2007). A relação comensal é mantida devido aos outros micro-organismos presentes na microbiota comensal, integridade da barreira epitelial e imunidade inata. Podem se tornar patogênicas causando infecções superficiais e até mesmo condições graves (Calderone & Clancy, 2012).

A patogenicidade é atribuída aos fatores de virulência como adesão, formação de biofilme, tubo germinativo e a produção de enzimas hidrolíticas que danificam os tecidos, como proteinases, fosfolipases e hemolisinas (Silva *et al.*, 2011). As proteinases estão associadas a degradação de uma grande variedade de proteínas do hospedeiro, como as relacionadas ao sistema imune, sistema complemento e citocinas (Naglik *et al.*, 2003). Já as fosfolipases catalisam a hidrólise de fosfolipídeos, e a secreção dessa induz a lesão tecidual por dano aos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro (Vinita & Mamatha, 2011). As adesinas presentes na parede celular permitem a adesão das

leveduras à receptores de fibrinogênio, fibronectina e laminina das células epiteliais (Yang, 2004). As espécies de *Candida* também podem aderir e formar biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres, conferindo proteção às leveduras, sendo também relacionadas com a resistência a antifúngicos (Chandra *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas em infecções associadas a *Candida* apresentam grande diversidade de quadros, como cutâneas, mucosas e invasivas ou sistêmicas. A candidíase cutânea normalmente apresenta lesões superficiais na pele e seus anexos. A candidíase mucosa gera infecções orofaríngeas, esofágicas e vulvovaginais. Já a forma sistêmica, também conhecida como candidemia, pode atingir a corrente sanguínea e demais sistemas do organismo, como cardíaco, respiratório e até mesmo o sistema nervoso central (Jemal *et al.*, 2011). Os fatores de risco envolvendo as candidemias se dividem em três categorias: fatores que promovem a colonização de *Candida*, supressão da resposta imune e fornecimento de uma rota direta de infecção, como em pacientes cateterizados (Ortega *et al.*, 2011).

A candidíase invasiva representa um sério problema de saúde pública e está associada a altas taxas de mortalidade (40 a 85% dependendo da espécie de *Candida*) e tempo prolongado de internação hospitalar, em média 21 dias, gerando altos custos. A resistência a medicamentos é de grande preocupação, pois a disponibilidade de fármacos para o tratamento é bem menor quando comparada a infecções bacterianas (Strollo *et al.*, 2016).

O quadro global de candidemias foi recentemente expandido com a identificação da espécie *C. auris*, originalmente reconhecida em 2009, que apresenta resistência intrínseca a múltiplos antifúngicos. A espécie já foi relatada em vários países, incluindo Coréia do Sul, África do Sul, Quênia, Índia, Paquistão, Colômbia, Venezuela, Reino Unido e EUA (Borman *et al.*, 2016). Em dezembro de 2020, foi identificada pela primeira vez no Brasil, em pacientes hospitalizados que faziam tratamento para COVID-19, na cidade de Salvador, Bahia. As espécies isoladas eram filogeneticamente relacionadas a cepa do sul da Ásia, tipo molecular com maior incidência global (Almeida Jr. *et al.*, 2021).

As espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são de particular importância no Brasil, pois a frequência de isolamento de ambas são bem próximas, variando de acordo com a região do país. Ambas são consideradas como as segundas espécies mais frequentemente isoladas, sendo que em algumas regiões chegam a ultrapassar a *C. albicans*, fungo de maior prevalência (Rota, 2009).

Poucas opções estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. A anfotericina B foi introduzida em 1955 como um antifúngico pioneiro e ainda é considerada uma das terapias mais eficazes. Outros agentes incluem azóis (fluconazol e itraconazol, ravuconazol, posaconazol e voriconazol) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina). Com exceção das equinocandinas que atuam na parede celular, as outras drogas têm como alvo o ergosterol da membrana celular. Contudo, a semelhança do ergosterol ao colesterol humano implica na ocorrência de diversas reações adversas importantes (Kyriakidis *et al.*, 2017).

Considerando a variação intrínseca quanto à suscetibilidade às drogas entre diferentes espécies de *Candida* e o aumento da resistência adquirida em vários isolados clínicos, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para implantação de novas estratégias de tratamento para infecções associadas a gênero *Candida*.

2.3.1 *Candida albicans*

A *C. albicans* é um fungo dimórfico, que cresce como levedura à 30,0 °C e na forma filamentosa ou hifas à 37,0 °C. São geralmente encontradas na epiderme sob a forma de leveduras enquanto que as hifas são relacionadas a formas patogênicas na derme, e nos órgãos sistêmicos existem predominantemente como hifas. É a espécie de maior prevalência associada a infecções fúngicas (Gow *et al.*, 2012).

É um fungo oportunista que faz parte da microbiota do ser humano, pode permanecer no trato gastrointestinal por longos períodos de tempo na forma não patogênica. No entanto, alterações no sistema imune e na microbiota do hospedeiro podem causar aumento da proliferação, levando ao desenvolvimento de infecções (Ruiz-Sanchez *et al.*, 2002).

É a espécie mais encontrada no trato genital feminino, presente em cerca de 25% das mulheres sadias e assintomáticas. A candidíase vulvovaginal é causada por essa espécie em 70 a 90% dos casos, dos quais cerca de 5% apresentam recorrência. A Candidíase vulvovaginal recorrente também é secundária a outros fatores, como terapia hormonal, diabetes e imunodepressão (Cardona-Castro *et al.*, 2002; Shinobu *et al.*, 2007). Apesar da frequência e morbidade associadas, infecções superficiais por *C. albicans* não são letais (Pfaller & Diekema, 2010).

Possui um amplo repertório de fatores de virulência para a sobrevivência e crescimento, para estabelecer a infecção e driblar o sistema imune do hospedeiro, incluindo secreção de aspartil proteinases, adesinas, aglutininas, fosfolipases e capacidade de formação de biofilme, o que também contribui para resistência a antifúngicos e recorrência da infecção (Colombo *et al.*, 2013; Gulati & Nobile, 2016).

C. albicans é a espécie de maior prevalência do gênero *Candida*, ao contrário de outras espécies, ela está amplamente distribuída nos mais diversos habitats da natureza (Vale *et al.*, 2010; Barbedo & Sgarbi, 2010). É naturalmente sensível a todos os antifúngicos, contudo, existem casos de resistência à azólicos devido a exposição prolongada dos pacientes aos medicamentos (Magee & Magee, 2005; Tiraboschi *et al.*, 2007).

2.3.2 *Candida tropicalis*

A *C. tropicalis* é uma levedura ascomiceta diploide que coloniza vários locais anatomicamente distintos como pele, trato gastrointestinal, geniturinário e também respiratório. Se apresenta na forma de blastoconídeos, hifas e pseudohifas, com células de 4 a 8 µm (Biasoli *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2003; Oksuz *et al.*, 2007).

É uma das três espécies de *Candida*-não-*C. albicans* mais comumente isoladas. Estudos epidemiológicos realizados em 12 unidades de saúde do Brasil apontaram como a segunda mais frequente, sendo responsável por 33 a 48% dos casos de candidemias, especialmente em pacientes cateterizados, que fizeram uso de antibióticos de amplo espectro ou com câncer (Miranda *et al.*, 2009; Pahwa *et al.*, 2014). Em determinadas regiões, as candidemias provocadas por essa espécie são mais frequentes que as causadas por *C. albicans* (Vallabhaneni *et al.*, 2016).

Essa espécie tem a habilidade rápida de desenvolver resistência ao fluconazol, sendo que o aumento do uso desse medicamento é considerado como um dos responsáveis pelo crescente, e preocupante, aumento de candidemias causadas por *C. tropicalis* (Yang *et al.*, 2004; Giri & Kindo, 2012). Vários fatores de virulência são responsáveis pelas infecções, entre eles a habilidade de aderência e formação de biofilme em dispositivos médicos e a produção de proteinases (Negri *et al.*, 2011; Deorukhar *et al.*, 2014). Apresenta maior taxa de mortalidade que *C. albicans* em pacientes com complicações hematológicas malignas e infecções disseminadas. *C. tropicalis* é frequentemente sensível a derivados poliênicos, porém em geral é resistente a 5-fluorocitosina (Zaugg *et al.*, 2001; Roilides *et al.*, 2003; Vandeputte *et al.*, 2005).

2.3.3 *Candida parapsilosis*

A espécie *C. parapsilosis*, da mesma forma que as anteriormente citadas, também é comensal ao ser humano, sendo mais frequentemente isolada das mãos e trato gastrointestinal. A presença desse fungo nas mãos contribui para infecções horizontais, principalmente em unidades de terapia intensiva de neonatos (Bonassoli *et al.*, 2005; Hernandez-Castro *et al.*, 2010).

As infecções causadas por *C. parapsilosis* correspondem a um terço das infecções por *Candida* em neonatos, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10%. As razões para a predileção dessa espécie em neonatos não são claras, mas a formação de biofilme e adesão a materiais hospitalares, bem como a presença nas mãos dos profissionais de saúde podem ser determinantes (Pammi *et al.*, 2014).

C. parapsilosis é comumente encontrado no solo, água e plantas. É um importante patógeno nosocomial associado a cateteres, causando fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, geralmente associadas a procedimentos invasivos. É mais frequente em infecções sistêmicas, principalmente em neonatos, transplantados, cateterizados, pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. A espécie é capaz de produzir biofilme, morfologicamente diferente de *C. albicans*. A *C. parapsilosis* pode ser dividida em três complexo de espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Essa divisão é feita com base em análise de DNA, morfologia, habilidade produção de biofilme, dentre outros fatores. São sensíveis a anfotericina B e derivados azólicos (Logue *et al.*, 2005; Gullu *et al.*, 2008; Kocsubé *et al.*, 2007).

Foi isolada pela primeira vez em 1928, sendo nomeada *Monilia parapsilosis*, para distingui-la do isolado mais comum, *Monilia psilosis*, com nomenclatura posteriormente atualizada para *C. albicans* (Ashford, 1928; Weems, 1992).

As células de *C. parapsilosis* exibem formas ovais, redondas ou cilíndricas. Não forma hifas verdadeiras, sendo encontrada em forma leveduriforme ou como pseudohifa, cuja formação está ligada a um conjunto específico de aminoácidos, particularmente a citrulina, que causa mudanças significativas na morfologia celular e da colônia. É tipicamente comensal da pele humana, e sua patogenicidade é limitada pelo tegumento intacto (Kim *et al.*, 2006; Laffey & Butler, 2005).

2.3.4 *Candida glabrata*

C. glabrata não é dimórfica como as outras espécies de *Candida*, não forma pseudohifas sendo encontrado principalmente na forma de blastoconídeos. Historicamente, esta espécie foi originalmente classificada no gênero *Torulopsis*, somente em 1978 foi inserida no gênero *Candida*, devido a associação com infecções humanas. As células possuem de 1 a 4 µm, visivelmente menores que *C. albicans*. Uma característica genética distintiva principal de *C. glabrata* é que ela tem um genoma haploide, em contraste com o genoma diploide de *C. albicans* e várias outras espécies (Fidel-Junior *et al.*, 1999).

Em indivíduos sadios, *C. glabrata* é considerada saprófita e não patogênica, contudo, nos últimos anos tem emergido como agente infeccioso, principalmente em ambientes hospitalares. Possui alta mortalidade quando comparada a outras espécies de *Candida*, chegando a 50% em pacientes com câncer e pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Mesmo com alta taxa de mortalidade em humanos, *C. glabrata* apresenta baixa virulência em modelos animais (Barchiesi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

A ocorrência maior é verificada em pacientes idosos, apresentando menor sensibilidade ao fluconazol, especialmente em pacientes com exposição prolongada ao medicamento, e estudos também demonstram baixa sensibilidade a anfotericina B. Depois de *C. albicans*, é a segunda espécie mais frequente em candidíases vulvovaginais, representando cerca de 5 a 15% dos casos (Ray *et al.*, 2007).

A espécie apresenta menor produção de biofilme em meios de cultura quando comparado às outras espécies de *Candida*, contudo, é capaz de produzir biofilme em superfícies de silicone e cateteres de látex (Silva *et al.*, 2010). Os biofilmes se apresentam como estruturas compactas em multicamadas, com matrizes compostas de proteínas e carboidratos (Silva *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2014).

A menor sensibilidade aos azólicos geralmente é associada ao uso profilático em pacientes hospitalizados. O mecanismo é associado à ocorrência de mutações de ganho de função (GOF) e hiperatividade resultante do fator de transcrição Pdr1, responsável pela regulação positiva das bombas de efluxo (Shapiro *et al.*, 2011; Wiederhold, 2017; Pais *et al.*, 2019).

A espécie apresenta um genoma plástico e mutável, tolerando alto grau de rearranjos genômicos, o que contribui para a rápida aquisição de resistência, além disso, secreta fosfolipases, lipases e

hemolisinas, contribuindo para a baixa resposta terapêutica e recorrência grave das infecções (Rodrigues *et al.*, 2014; Negri *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, foi verificado um aumento na incidência de *C. glabrata* multirresistente (MDR). Há relatos de *C. glabrata* resistente a equinocandinas na microflora oral após 7 dias tratamento de candidemia com administração de micafungina e anidulafungina. Dependendo da área geográfica, 3 a 15% dos isolados possuem resistência a uma ou mais equinocandinas, de forma alarmante, reduzindo ainda mais as opções de tratamento (Arendrup *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2015).

A susceptibilidade diminuída às equinocandinas está associada a mutações em regiões específicas das proteínas Fks, que podem reduzir a afinidade das equinocandinas pela 1,3- β -D-glucano sintase (Katiyar *et al.*, 2006; Alexander *et al.*, 2013, Pais *et al.*, 2019).

As opções de tratamento para infecções por *Candida* MDR são limitadas. A taxa de falha clínica é alta em casos de *C. glabrata* MDR com elevado CIM para equinocandinas e resistentes ao fluconazol. A terapia sugerida nesses casos é a anfotericina B lipossomal associada a pesquisa de focos de infecção, remoção de cateteres e dispositivos médicos e fortalecimento da imunidade do paciente. Contudo, o desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias de tratamento é de grande importância (Spampinato & Leonardi, 2013).

2.3.5 *Candida krusei*

Candida krusei é um patógeno oportunista, encontrado na forma de leveduras e pseudohifas. A prevalência de infecções por essa espécie é mais alta entre os pacientes leucêmicos e neutropênicos. É a única espécie de levedura patogenicamente importante que também participa da fermentação de frutas e produtos lácteos. Apesar de apresenta potencial em aplicações biotecnológicas, sua utilização é limitada devido a riscos de contaminação (Yadav *et al.*, 2012). É responsável por 2 a 5% das infecções por *Candida* em todo o mundo, principalmente em pacientes oncológicos submetidos a profilaxia com fluconazol (Abi-Said *et al.*, 1999).

C. krusei é reconhecida como um patógeno resistente a um amplo espectro de antifúngicos, principalmente devido à resistência ao fluconazol e baixa sensibilidade para anfotericina B e 5-fluorocitosina. *C. krusei* multirresistente é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente imunocomprometidos. A taxa de mortalidade é de 30 a 60%. Tratamentos à base de voriconazol e equinocandinas apresentam bons resultados, contudo, já existem relatos de cepas resistentes (Hakki *et al.*, 2006; Voset *et al.*, 2006; Pfaller & Diekema, 2008).

As infecções por *C. krusei* em pacientes imunocomprometidos podem causar fungemia, endoftalmite, artrite e endocardite (Lewis *et al.*, 2009). A formação de pseudohifas é uma característica que pode contribuir para a sua virulência. Em relação a *C. albicans*, *C. krusei* se apresenta menos virulenta em termos de aderência a células epiteliais, próteses, potencial proteolítico e produção de fosfolipases (Horn *et al.*, 2009).

C. krusei apresenta características estruturais e metabólicas diferentes das outras espécies do gênero, exibindo diferentes padrões de resposta do organismo do hospedeiro (Samaranayake & Samaranayake, 1994). Possui características mais hidrofóbicas, o que pode facilitar a colonização em dispositivos médicos como cateteres. A espécie não produz enzimas hidrolíticas (Samaranayake *et al.*, 1994). Esses atributos sugerem que a virulência de *C. krusei* está mais relacionada com o estado geral de imunidade do hospedeiro do que as características do fungo em si (García-Rodas *et al.*, 2011).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação dos possíveis mecanismos de ação dos extratos e substâncias isoladas de *Trichilia catigua* contra *Helicobacter pylori* e espécies de *Candida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção do extrato bruto e frações semipurificadas de *T. catigua*, e caracterização química da fração acetato de etila por eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinação da citotoxicidade da fração acetato de etila e substâncias isoladas de *T. catigua* em linhagem de células Vero, HeLa e Macrófagos;
- Avaliação dos extratos contra *H. pylori* por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), inibição da enzima urease, sinergismo com antimicrobianos de referência, PCR em tempo real e microscopia eletrônica de varredura;
- Simulação *in silico* da ligação das principais substâncias presentes nos extratos de *T. catigua* em sítios de ligação de *H. pylori* por Docking Molecular;
- Avaliação dos extratos e substâncias isoladas de *T. catigua* contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM);
- Avaliação da atividade sinérgica da fração acetato de etila, substâncias isoladas entre si e com antifúngicos de referência contra *C. glabrata*;
- Determinação de alterações morfológicas e estruturais de *C. glabrata* tratada com as substâncias avaliadas, por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Simulação *in silico* da ligação das substâncias isoladas de *T. catigua* em sítios de ligação de *C. glabrata* por Docking Molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As cascas de *T. catigua* foram coletadas em maio 2011, pelo Sr. José Maria Monteiro, na cidade de Caetité, estado da Bahia, Brasil (14°05'35.2"S; 42°34'20.2"W, h=916 m). Uma exsicata está depositada sob o número 19.434 no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM). A coleta do material vegetal foi registrada no sistema IBAMA-SISBIO N. 11995-6, em 13 de maio de 2016, código de autenticação 48926652, e também no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, N. A8B4204, sob responsabilidade do professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

As cascas foram fragmentadas com o auxílio de tesoura de poda manual e secas à temperatura ambiente. Após essa etapa, foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar aquecido à 40 °C durante 24 h e em seguida foram cominuídas em moinhos de martelos (modelo ASN6, tigre).

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes que foram empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Merck®, Sigma®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila;
- Acetona;
- Acetonitrila grau HPLC;
- Ácido trifluoroacético (TFA);
- Ágar Brain Heart Infusion (BHI);
- Ágar Columbia - Merck Millipore;
- Ágar Sabourand Dextrose (SDA) – Difco;
- Água RNase out – Invitrogen;
- Água ultrapura;
- Amoxicilina;
- Anfotericina B;
- Caspofungina;
- Claritromicina;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Enzima SuperScript III – Invitrogen;
- Etanol;
- Kit Fast Start Essential DNA Green Master – Roche;
- Kit TRIzol™ Plus RNA Purification – Thermo Fischer;
- Meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – Gibco;
- Meio Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI);

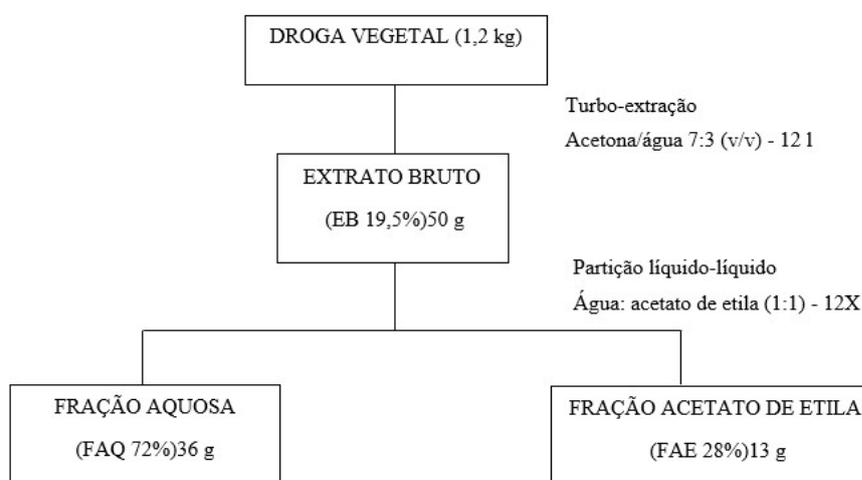
- Metanol grau HPLC;
- MTS [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazio];
- MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo];
- Poli-L-lisina;
- Sangue de carneiro;
- Solução fixadora (glutaldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M);
- Solução salina 0,9%;
- Solução tripsina 25%;
- Soro fetal bovino (SFB);
- Tampão ácido-3-[N-morfolino] propanossulfônico (MOPS);
- Tampão borato 80 mMol;
- Tampão fosfato salino (PBS);
- Urease (Jack bean Urease);
- Ureia 100 mMol;
- Vermelho de fenol 0,002%;
- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

4.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Marte®, modelo AY220;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo;
- Eletroforese Capilar Beckman P/ACEMDQ equipado com um detector UV-Vis;
- Evaporador rotatório Buchi® R- 114;
- Leitor de microplacas BioTek Epoch 2;
- Liofilizador Christ® Alpha 1-4;
- Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200;
- Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu SS-550;
- NanoDrop Thermo Fischer;
- Ponto crítico Baltec CDP 030;
- Sputter Coater Baltec SDC 050;
- Termociclador em Tempo Real CFX 96 Real Time system Bio-Rad;
- Termociclador Veriti Thermal cycler Applied Biosystems;
- Ultra-Turrax UTC115KT (Turboextrator).

4.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS

As cascas da catuaba pulverizadas foram submetidas à turboextração com 12 L de acetona:água (7:3 v/v) durante 15 min. O extrato produzido foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizado fornecendo o extrato bruto (EB). Em seguida, o EB (50 g) foi dissolvido em água (500 ml) e particionado com acetato de etila (1:1 v/v, 12 vezes), obtendo-se assim a fração acetato de etila (FAE) e a fração aquosa (FAQ). As frações orgânica e aquosa foram concentradas, congeladas e liofilizadas. O fluoxograma 1 apresenta o esquema de preparação dos extratos, bem como os respectivos rendimentos.



Fluoxograma 1. Esquema de preparação de extratos a partir das cascas de *Trichilia catigua*.

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A caracterização química foi realizada para FAE. Os padrões utilizados para confirmação dos picos em eletroforese capilar, e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência foram isolados de *T. catigua* e apresentam teor de pureza >87% (Resende *et al.*, 2011).

4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As corridas foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Longhini e colaboradores (2013), em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Thermo, equipado com arranjo de diodos (PDA) (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas e degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), amostrador (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) com loop de 10 μ L. O controle e aquisição dos dados foi realizado no software Chromquest 4.1. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna PFP(2) 100 Å (250 \times 4.6 mm, 5 μ m), e uma pré coluna de mesma marca.

As fases móveis empregadas consistiram em Fase A: metanol:acetonitrila (75:25 v/v) com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). Fase B: água ultrapura com 0,05% de TFA. As fases móveis foram previamente degaseificadas em banho ultrassônico. As corridas foram realizadas de acordo com

o gradiente: 0 min – 30% fase A; 36 min – 40% fase A; 38 min – 30% fase A, por 40 min com fluxo de 0,4 mL/min. A detecção foi realizada em 280 nm.

Para a quantificação de substâncias majoritárias, curvas de calibração foram construídas para Epicatequina (Epi), Procianidina B2 (PB2), Cinchonina Ia e Iib. As corridas cromatográficas foram realizadas em triplicata.

Os padrões foram preparados em metanol 20% nas concentrações de 10, 20, 40, 70, 100 e 120 µg/mL. A FAE de catuaba foi preparada da mesma forma, na concentração de 500 µg/mL. Todas as amostras foram centrifugadas e filtradas em membrana Millipore 0,45 µm antes de serem injetadas no equipamento.

4.5.2 Eletroforese Capilar (EC)

O método foi realizado para a FAE de acordo com Sereia e colaboradores (2017), com modificações. Foi empregado um sistema capilar eletroforético Beckman P/ACE MDQ equipado com detector UV-Vis. O processamento de dados foi conduzido em software Beckman 32 Karat versão 8.0. Utilizou-se capilar Beckman Coulter de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno com comprimento de 50/60, 2 cm (comprimento efetivo/comprimento total). As seguintes condições foram aplicadas: tampão borato 80 mMol pH 8,8 com adição de 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina na concentração de 10 mMol/L; gradiente de voltagem 30 kv 0-6 min, 10 kv 6-7min, 30 kv 7-12 min; temperatura ambiente a 25°C; as amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 0,5 psi por 5 s, detecção a 214 nm.

A amostra foi preparada a 1 mg/mL em metanol 20% e eluídas em cartucho de extração em fase sólida (Strata C18-E, Phenomenex). Todas as amostras e soluções tampão foram filtradas em membrana Millipore 0,45 µm. Para confirmação dos picos, foram utilizados padrões externos de Epicatequina (Epi), Procianidina B2 (PB2) e Cinchoninas Ia, Ib, Iia e Iib.

4.6 CITOTOXICIDADE

A técnica teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da FAE e substâncias isoladas de catuaba. As linhagens celulares avaliadas foram HeLa, Vero e macrófagos. Onde as duas primeiras linhagens foram cultivadas em garrafas contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), já os macrófagos J774 foram cultivados em meio RPMI suplementado 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. Todas as garrafas com as culturas celulares foram incubadas durante 24 h a 37,0 °C 5,0% CO₂. Posteriormente as células HeLa e Vero foram desagregadas com solução de Tripsina-EDTA 25% (Gibco) e a linhagem J774 com Cell Scraper. A suspensão células das 3 linhagens foi ajustada para 2x10⁵ células/mL e adicionadas em placas de 96 poços. As placas foram incubadas nas mesmas condições por 24 h. A metodologia foi realizada de acordo com Capoci e colaboradores (2019) com modificações.

Concentrações decrescentes de FAE e das substâncias isoladas testadas (Cinchonaína Ia, Ib, IIb, Epi e PB2) foram preparadas na concentração inicial de 500 µg/mL, em meio DMEM com 10% de SFB e 0,5% de DMSO para HeLa e Vero, e meio RPMI para J774. O sobrenadante das placas contendo as células foi descartado e as mesmas lavadas com PBS, posteriormente foi adicionado 200 µL de cada concentração de tratamento nos poços e as placas novamente incubadas a 37,0 °C 5,0% CO₂ por 24 h. Após essa etapa, as células foram novamente lavadas com PBS e o ensaio de citotoxicidade foi realizado com base na redução de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] (Sigma). O MTS foi adicionado e as placas foram incubadas por 3 h. Então o sobrenadante foi transferido para nova placa lido a 492 nm em espectrofotômetro (Epoch 2, BioTek). A viabilidade celular foi dada em porcentagem, sendo consideradas viáveis quando apresenta viabilidade celular acima de 80%.

4.7 ATIVIDADE FRENTE A *Helicobacter pylori*

Todos os ensaios foram realizados com *H. pylori* ATCC 43629, cultivada inicialmente em ágar Columbia (Merck Millipore) suplementado com 5% de sangue de carneiro e incubadas por 72 h à 37,0 °C em atmosfera contendo 10,0% de CO₂. Posteriormente foram transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck Millipore), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich), e incubadas nas mesmas condições.

4.7.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada por microdiluição de acordo com o CLSI (M45- A2, 2011) com modificações. Os extratos foram preparados à concentração inicial de 2000 µg/mL, solubilizados em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e BHI suplementado com SFB. Em placas de 96 poços (uma para cada extrato a ser testado), 100 µL de caldo BHI suplementado foi adicionado em cada poço, sendo em seguida adicionados 100 µL dos extratos preparados, obtendo-se desta forma uma concentração inicial de 1000 µg/mL. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas obtendo-se desta forma um gradiente de concentração decrescente de ordem 2. As colunas 11 e 12 da placa foram utilizadas como controle de crescimento bacteriano normal (contendo somente o meio de cultura e a suspensão bacteriana). A todos os poços foram adicionados 100 µL da suspensão de micro-organismos padronizada na escala 0,5 de McFarland, e em seguida as placas foram incubadas a 37,0 °C em microaerofilia (10,0% de CO₂) durante 72 h. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença da absorvância dos poços tratados com o controle de crescimento positivo a 620 nm em leitor de microplacas. O experimento também foi realizado da mesma forma para os antimicrobianos Claritromicina (CLA) e Amoxicilina (AMOX) (Sigma-Aldrich), com concentração inicial de 10 µg/mL.

4.7.2 Inibição da enzima urease

A avaliação de inibição da enzima urease foi realizada de acordo com a produção de amônia pela conversão de uréia catalisada pela urease, de acordo com Tanaka e colaboradores (2004), com

modificações. Uma alíquota de 25 µL de enzima urease padrão (4 U) (Jack bean urease, Sigma) foi dissolvida em tampão PBS (100 mMol pH 6,8) juntamente com 25 µL de EB, FAE e FAQ em diferentes concentrações (concentrações decrescentes a partir de 1000 µg/mL), e incubadas a 37,0 °C por 2 h. Então foi adicionado 200 µL de ureia (100 mMol) e 25 µL de vermelho de fenol (0,002%). A cinética da reação foi avaliada em leitor de microplacas a 540 nm no tempo de 0 à 40 min, com intervalo de 10 min entre cada leitura.

4.7.3 Avaliação da atividade sinérgica (Chekcerboard)

A avaliação da atividade sinérgica foi realizada com os extratos em combinação com os antimicrobianos CLA e AMOX, de acordo com o Endo e colaboradores (2010), em placa de 96 poços (uma placa para cada combinação) nas mesmas condições descritas para o CIM. A concentração final foi de 2000 à 31,25 µg/mL para os extratos; 0,156 à 10 µg/mL para CLA e 0,009 à 0,6 µg/mL para AMOX. As placas foram montadas da forma em que todas as concentrações dos extratos e dos antimicrobianos combinassem entre si, sendo que foram adicionados 100 µL dos tratamentos e 100 µL do inóculo de *H. pylori* na escala 0,5 de Mc Farland. A primeira e última linhas da placa corresponderam ao MIC extratos e antibióticos isoladamente. As placas foram incubadas por 72 h e posteriormente lidas em leitor de microplacas a 492 nm.

A concentração inibitória fracionada (FIC) foi definida como a soma do CIM dos tratamentos combinados, dividido pelo CIM dos antibióticos ou extratos sozinhos.

4.7.4 Quantificação de RNAm por PCR em tempo real

A bactéria foi previamente cultivada nas mesmas condições para a determinação do CIM (ítem 4.7.1). O tratamento com os extratos de catuaba foi realizado em placa de 24 poços, com suspensão bacteriana equivalente a 10^6 células, em caldo BHI suplementado com 10% de SFB. A concentração dos extratos foi ajustada para 15 µg/mL, para que não houvesse interferência no ciclo de replicação da bactéria, e a placa foi incubada a 37,0 °C 10,0% de CO₂ por 4 h. Após a incubação, o conteúdo das placas foi transferido para tubos e centrifugado a 45 G por 5 min para sedimentação celular. O RNA total foi extraído com o kit TRIzol™ Plus RNA Prufication (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA extraído e purificado por determinada em NanoDrop (ThermoFisher Scientific) e a qualidade e integridade do RNA foram verificados por eletroforese em gel de agarose de acordo com Aranda e colaboradores (2012). A síntese do DNA complementar (cDNA) e reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) foram conduzidas de acordo com Sereia *et al.* (2019), com modificações.

A síntese do cDNA de cada amostra foi realizada em triplicata no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com 50 ng do RNA total diluído para volume final de 16 µL, contendo os random primers (100 pmol) e dNTPs (0,5mM). Esse primeiro mix da reação foi incubada por 10 min a 65,0 °C. Posteriormente as amostras foram submetidas a choque térmico com gelo e 4 µL do segundo

mix foi adicionado [1,3 µL de água tratada com DEPC; 2 µL de tampão 10X; 0,6 µL de cloreto de magnésio 50 mM; 0,05 µL de água RNase out (Invitrogen); 0,05 µL de enzima SuperScripy III (Invitrogen)]. A solução final resultante foi incubada a 37,0 °C por 50 min para síntese do DNA complementar (cDNA) e etapa final de inativação enzimática a 70,0 °C por 15 min.

As reações de qPCR também foram realizadas em triplicata no equipamento CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando 5 µL de FastStart Essential DNA Green Master (Roche), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/µL) e 5 µL do cDNA total (50 ng/µL) sintetizado anteriormente. As condições de reação foram: pré-incubação a 50,0 °C por 2 min; desnaturação inicial a 95,0 °C por 5 min; seguido por 45 ciclos de 20 s a 95,0 °C, 30 s a 58,0 °C e 20 s a 75,0 °C. As análises da curva de melting foram de 50,0 a 98,0 °C, realizadas ao final da reação com 5 s de leitura a cada 0,5 °C. O software CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) foi utilizado para coleta dos dados e a eficiência da reação foi calculada pelo software Lin-RegPCR (Ruijter, 2009; Ruijter, 2010). Os primers utilizados foram descritos por Chowdhury (2013) e o gene de referência empregado foi o 16S. Os genes alvo amplificados foram CagA, VacA e UreA, que são genes responsáveis por fatores de virulência importantes de *H. pylori*.

As análises estatísticas da expressão do gene de referência e os genes alvo foram realizadas no programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool/Qiagen), com correção de eficiência e comparação de cada tratamento com o controle (Pfaffl *et al*, 2002).

4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Primeiramente a *H. pylori* foi tratada com os extratos da mesma forma como realizado para a determinação do CIM. As concentrações utilizadas foram 250 µg/mL para FAE e 100 µg/mL para EB e FAQ, e as amostras incubadas por 48 h.

Após o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e centrifugado a 700 G por 2 min para a sedimentação celular. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado aos tubos 1 mL da solução fixadora (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilado de sódio 0,1M pH 7,2) por 2 h. Depois da etapa de fixação, cerca de 100 µL de cada amostra foi depositada em lamínula previamente tratada com Poli-L-lisina. As amostras foram então desidratadas em escala alcoólica, submetidas a secagem em ponto crítico de CO₂ (Baltec CPD 030), cobertas com ouro (Baltec SDC 050) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Shimadzu SS-550).

4.7.6 Docking Molecular

Uma vez que a estrutura dos principais componentes do extrato de *T. catigua* já foram descritos (Resende, 2007), o objetivo das análises de bioinformática neste trabalho foi a identificação dos prováveis alvos metabólicos destes componentes em *H. pylori*, por meio de simulações de bioquímica computacional como docking reverso e docking convencional.

As substâncias selecionadas para avaliação foram as cinchonáinas Ia, IIa, Ib, IIb, epicatequina e procianidina B2. As estruturas foram obtidas da base de dados PubChem (Kim *et al.*, 2016) ou Zinc15 (Sterling & Irwin, 2015). Então foram submetidas ao servidor SEA predictions (Keiser *et al.*, 2007) para identificação dos prováveis alvos metabólicos que foram selecionados com os seguintes critérios: ser um alvo presente em *H. pylori* e ausente em humanos, ter valores de MaxTX e P-value significativos.

4.7.6.1 Preparação das estruturas

As estruturas tridimensionais da fabZ de *H. pylori* (*HpylorifabZ*) complexada ao ligante 2-chloro-5-(5- $\{e\}$ -[(2z)-3-(2-methoxyethyl)-4-oxo-2-(phenylimino)-1,3-thiazolidin-5-ylidene]methyl}-2-furyl)benzoic acid (ligante SCB) (Zhang *et al.*, 2008), (pdbid: 2glm); a estrutura da fabG (*HpylorifabG*) ligada ao cofator NAD (pdbid: 4iin) e a estrutura da fabI (*HpylorifabI*) ligada ao cofator NAD e ao inibidor Triclosan (ligante TCL) (pdbid: 2pd3) foram obtidas do Protein Data Bank.

Na estrutura da *HpylorifabG*, os resíduos 191 a 202, que formam um *loop* que compõe parte da região do sítio ativo, estavam ausentes. Então, esta região foi modelada na presença do ligante *Acetoacetyl-Coenzima A* (CAA), tendo a estrutura da fabG de *Bacillus sp* (pdbid: 4nbu) como molde, por meio do programa Modeller-9.23 (Eswar *et al.*, 2006).

Para otimizar as interações das proteínas *HpylorifabG* e *HpylorifabZ* com os ligantes, as estruturas foram minimizadas por simulações de dinâmica molecular, por meio do programa Namd2 (Phillips *et al.*, 2005), onde o processo foi realizado em passos. No primeiro passo, as estruturas, na forma de unidade biológica, foram virtualmente imersas em uma caixa periódica contendo água TIP3 e quantidade suficiente de contra íons Na⁺ ou Cl⁻ para neutralização das cargas do sistema. Em seguida as coordenadas espaciais dos ligantes foram fixadas no espaço e os demais átomos minimizados por 20.000 passos de gradiente conjugado (GC). No segundo passo, todos os átomos foram novamente minimizados por 10.000 passos de GC. No terceiro passo, as coordenadas das proteínas e ligantes foram fixadas no espaço e as águas e sais submetidas a 60 ps de dinâmica molecular de equilíbrio (MD). No quarto e último passo, todos os átomos dos sistemas foram novamente minimizados por 30.000 passos de GC. As estruturas originadas após este último passo foram utilizadas nas simulações de varredura virtual. A estrutura da *HpylorifabI* não precisou ser minimizada.

4.7.6.2 Docking e varredura virtual

As estruturas finais minimizadas ou não, foram validadas por meio de *redocking* dos ligantes. Para a *HpylorifabZ* foi utilizado o programa Autodock (Morris *et al.*, 2009) com caixa de busca com dimensões de 50, 45 e 40 nos eixos *x*, *y* e *z*, centrada no ligante SCP, número de corridas = 20 e energia média. Para a *HpylorifabG* foi utilizado o programa Vina com caixa de busca de dimensões 25, 20 e 25 nos eixos *x*, *y* e *z*, centrada no ligante CAA e exhaustiveness = 10. Para a *HpylorifabI* também foi utilizado o programa Vina com caixa de busca de dimensões 15, 15 e 15 nos eixos *x*, *y* e *z*, centrada no ligante TCL. Todas as simulações foram realizadas em quadruplicata e rodaram na interface gráfica

Pyrx (Trott *et al.*,2010). As estruturas foram consideradas validadas quando o rmsd obtido com o *redocking* foi menor 2,0 Å e dentro de um cluster de conformações semelhantes. Para verificar a possibilidade de outros sítios de ligação, foi realizado um “*docking cego*” onde toda a unidade biológica das enzimas alvo estava dentro da caixa de busca.

Em seguida, a biblioteca com os taninos utilizada no *docking* reverso foi varrida utilizando o protocolo acima descrito. As simulações de varredura foram realizadas em quadruplicata. Para que uma molécula da biblioteca fosse considerada como ligante mais provável era necessário ter: **a)** o melhor score em todas as simulações e; **b)** a pose de melhor score deve pertencer a um cluster de conformações próximas.

4.8 ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES DE *Candida* DE RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os ensaios foram realizados com *C. albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. krusei* (ATCC 6258). As leveduras foram inicialmente subcultivadas placas com ágar Sabourand Dextrose (SDA) (Difco) e incubadas a 35,0 °C por 24 h.

4.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação de CIM foi realizada para as 5 espécies de *Candida*, de acordo com a técnica padrão CLSI M27-A3 (2008), por microdiluição em caldo utilizando o meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich), pH 7,0, tamponado com 0,165 M de tampão ácido-3-[N-morfolino] propanossulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de meio RPMI em cada poço, seguida da adição de 100 µL de meio RPMI acrescido dos tratamentos na concentração inicial de 5000 µg/mL para EB, FAE e FAQ, e 500 µg/mL para as substâncias isoladas cinchonáinas Ia, Ib, Iib, Epi e PB2. Os extratos e substâncias testadas foram preparados em meio RPMI com 0,5% de DMSO. Foi realizada diluição seriada (ordem 2), homogeneizando e transferindo 100 µL para o poço seguinte e, assim, sucessivamente até o último poço.

As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer, e as suspensões foram padronizadas em solução salina 0,9% foram diluídas 1:50 em RPMI e 100 µL destes foram adicionados a cada poço, resultando em inóculo na ordem de 2 a 3x10³ UFC/mL. As placas de 96 poços foram incubadas a 37,0 °C durante 24 h. Após a incubação, as placas foram lidas a 405 nm.

Como controle positivo de inibição, também foi determinado o CIM dos antifúngicos Caspofungina e Anfotericina B (Sigma-Aldrich).

4.8.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Para a avaliação do CFM, foram utilizados os tratamentos realizados para determinação do CIM, onde todas as concentrações testadas dos extratos e substâncias isoladas foram aplicadas em forma de

spots (3 µL) em placa de ágar SDA, e incubadas a 37,0 °C durante 24 h, para avaliação do crescimento fúngico.

4.8.3 Avaliação de sinergismo (Checkerboard)

As análises realizadas tiveram por objetivo combinar a substâncias isoladas entre si e com os antifúngicos padrão, a fim de determinar quais complexos fitoquímicos são mais fortemente ativos contra *C. glabrata*.

A técnica consistiu na mesma realizada para *H. pylori* (sessão 4.7.3), com algumas modificações. O inóculo foi padronizado da mesma forma como descrito para o CIM das espécies de *Candida*, e as substâncias foram preparadas na concentração inicial de 15,62 µg/mL para cinchonáinas Ia, Ib e IIb e 31,25 µg/mL para Epi e PB2. O meio de cultura utilizado foi RPMI tamponado e as placas foram incubadas a 37,0 °C por 24 h, com posterior leitura em 405 nm. As combinações testadas foram: cinchonáina Ia x Ib; Ia x IIb; Ia x Epi; Ia x PB2; Ib x IIb; Ib x Epi; Ib x PB2; IIb x Epi; IIb x PB2; Epi x PB2.

O experimento foi repetido empregando a mistura que obteve o melhor resultado, combinada novamente com as substâncias isoladas, com o objetivo de avaliar o possível sinergismo entre 3 substâncias isoladas. Após as etapas descritas, a atividade sinérgica de FAE, substâncias isoladas e melhores misturas foi realizada com os antifúngicos Caspofungina e Anfotericina B.

A atividade sinérgica foi determinada por meio de concentração inibitória fracionada (FIC), onde os seguintes valores foram considerados: FIC <0.5 atividade fortemente sinérgica, FIC < 1 atividade sinérgica, FIC = 1 efeito aditivo, FIC > 1 sem efeito e FIC > 2 antagonista (Mor *et al.*,2015).

4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV foi realizado para *C. glabrata* cultivada da mesma forma como descrita para a determinação de CIM. As leveduras foram tratadas com FAE (4,88 µg/mL), cinchonáinas Ia (1,95 µg/mL) Ib (1,95 µg/mL), IIb (1,95 µg/mL), Epi (3,9 µg/mL) e Pb2 (3,9 µg/mL), durante 24h. As concentrações dos tratamentos empregadas para as análises microscópicas foram as referenciadas ao sub-CIM, ou seja, a concentração anterior a que foi determinada como inibitória mínima.

Após 24 h de tratamento, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 2 min para a sedimentação celular, com descarte do sobrenadante e posteriormente lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Então o tampão foi descartado e as lâminas foram preparadas com 10 µL da solução celular e 10 µL de fixador (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M pH 7,2), então adicionadas em lâmina de vidro revestida com poli-L-lisina. Depois de 30 min foram adicionados 500 µL de fixador sobre as lâminas por 4 h, seguido de pós fixação em OsO4 1% por

1 h. As amostras foram secas em gradiente de etanol e ponto crítico com CO₂, então metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de duplo-feixe FEI Scios.

4.8.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise das alterações estruturais por MET, as amostras foram preparadas, tratadas e fixadas da mesma forma descrita no item anterior, para MEV.

Após a fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% a temperatura ambiente, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 95 e 100%), incluídas em resina Spurr e polimerizadas em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo, depositados em grade de cobre, contrastados com acetato de uranila durante 20 min, e citrato de chumbo por 10 min, e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400.

4.8.6 Análises de bioinformática

Para determinação de possíveis mecanismos de ação e interação entre as substâncias de *T. catigua* e *C. glabrata*, foram realizadas simulações de bioinformática, com objetivo de avaliar a probabilidade de ligação entre as substâncias e os sítios ativos presentes na levedura.

As substâncias avaliadas foram as mesmas empregadas nas demais análises realizadas nesse trabalho (cinchonina Ia, Ib, IIb, Epicatequina e PB2). As estruturas 1D, 2D e 3D destes compostos foram obtidas das bases de dados Zinc15 (Sterling & Irwin, 2015) ou PubChem (Kim *et al.*, 2016) nos formatos *.smiles e *.sdf. Em seguida as estruturas foram submetidas ao servidor SEA predictions (Keiser *et al.*, 2007) para identificação dos alvos biológicos mais prováveis em leveduras.

O servidor SEA compara a estrutura da molécula alvo (query) com um banco de dados que contém as informações experimentais já relatadas na literatura de todos os ligantes que se ligam a uma dada proteína/enzima. O programa comparou a semelhança significativa das substâncias de catuaba e dos ligantes presentes em *C. glabrata*. O item avaliado foi o valor de MaxTC (quanto maior, maior será a probabilidade de interação).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O perfil de FAE de catuaba obtido por CLAE pode ser observado na figura 3, onde foi possível a identificação dos picos referentes às substâncias avaliadas Epi, PB2, cinchonaínas IIb, Ia e Ib.

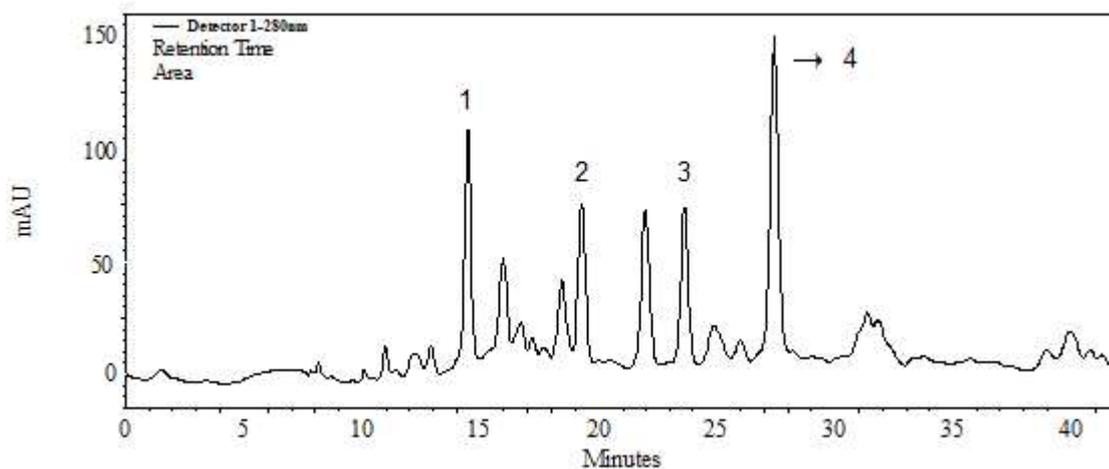


Figura 3. Cromatograma de FAE de *Trichilia catigua*. 1-PB2; 2-Cinchonaína IIb; 3-Epi; 4-mistura de Cinchonaínas Ia e Ib.

As curvas de calibração construídas para as substâncias Epi, PB2, cinchonaínas Ia e IIb, estão listadas na figura 4, onde resultados de coeficiente de determinação acima de 0,99 foram considerados lineares de acordo com a RDC n°166 (Ministério da Saúde, 2017), e satisfatórios para a quantificação dos padrões, observados na tabela 1. Os estereoisômeros cinchonaína Ia e Ib apresentam coeluição na metodologia empregada, portanto foi realizada curva de calibração somente com a Ia para quantificação relativa do pico.

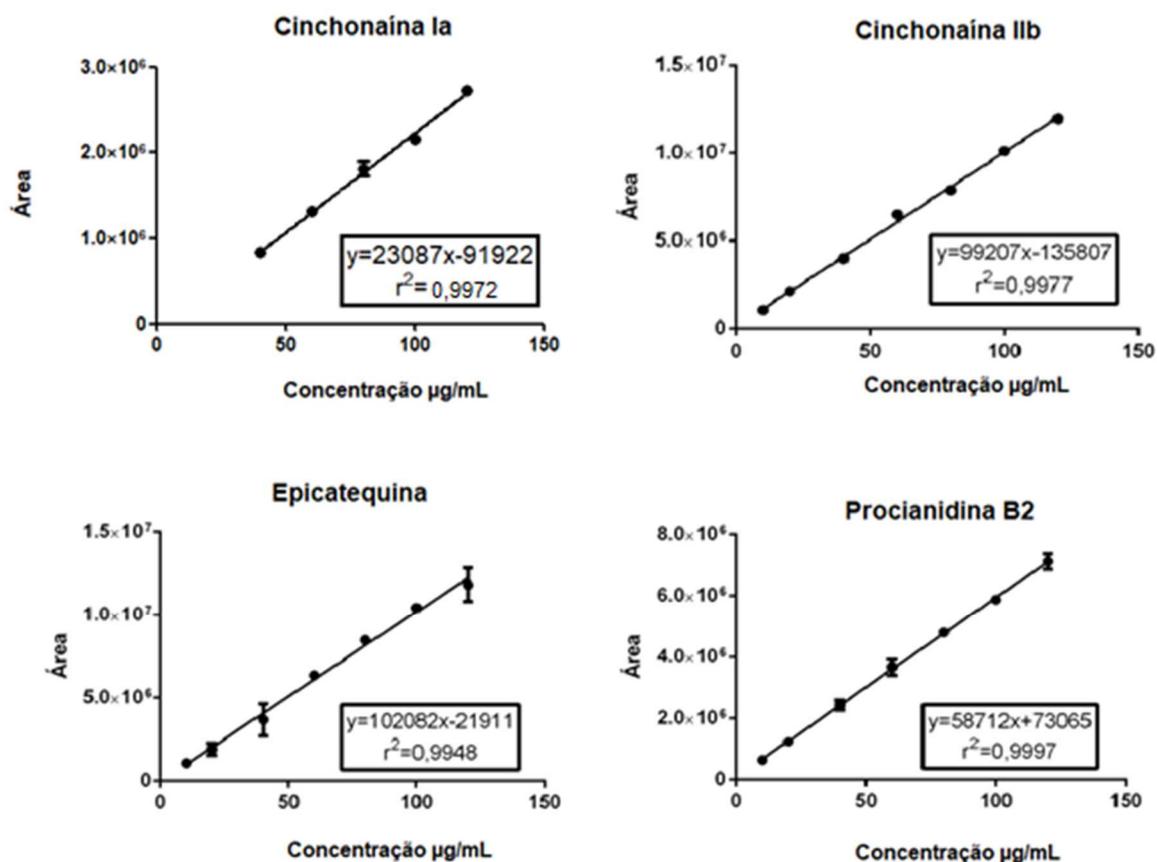


Figura 4. Curvas de calibração de cinchoninas Ia, Ib, epicatequina e Procianidina B2.

Tabela 1. Quantificação dos marcadores fitoquímicos de *Trichilia catigua* por CLAE. Valores de concentração expressos em µg/mL relativos à solução de 500µg/mL de FAE.

Substância	Concentração (µg/mL)	Concentração em %
Procianidina B2	49,23	9,84
Cinchonina Ib	25,56	5,11
Epicatequina	23,6	4,67
Mistura de Cinchoninas Ia e Ib	204,14*	40,82*

*Valores expressos em concentração relativa de cinchonina Ia.

A qualidade e a disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos, fato que não é observado em relação aos sintéticos. Assim, alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos, na pureza e mesmo nas características fenotípicas, ressaltam a importância da caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica (Resende, 2007). Outra questão que deve ser levada em consideração, são as diversas plantas comercializadas com o nome de “catuaba”, mas que não necessariamente possuem a classificação e nomenclatura corretas. Portanto, avaliação do controle de qualidade por métodos

cromatográficos que possibilitem uma rápida comprovação da presença de marcadores fitoquímicos, se faz necessária (Longhini *et al.*, 2017).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível realizar a caracterização química da FAE de *T. catigua* por CLAE, com a quantificação dos marcadores fitoquímicos e determinação do *fingerprint* cromatográfico, que se apresentou semelhante ao desenvolvido por Longhini e colaboradores (2013), com extrato de *T. catigua* de mesma procedência.

5.1.2 Eletroforese Capilar

A figura 5 mostra o eletroferograma da FAE a 1 mg/mL. Os compostos identificados, flavan-3-ol substituídos com fenilpropanoides, correspondem aos marcadores fitoquímicos da espécie vegetal, presentes em maiores quantidades na fração. Estes compostos pertencem ao grupo de taninos condensados e possuem propriedades antioxidantes notáveis (Resende, 2011).

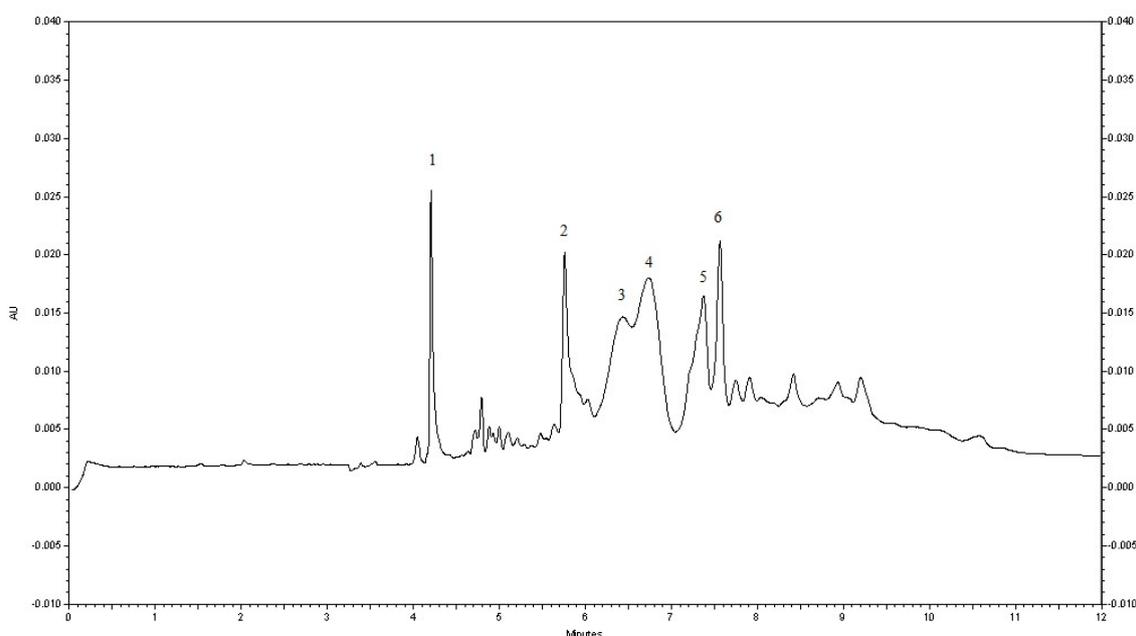


Figura 5. Eletroferograma da FAE de *Trichilia catigua*. 1-Epi; 2-PB2; 3- Cinchonaína Ia; 4- Cinchonaína Ib; 5- Cinchonaína IIa; 6- Cinchonaína IIb.

O perfil encontrado é muito similar ao previamente desenvolvido e validado por Sereia e colaboradores (2017), mostrando separação parcial dos diastereoisômeros cinchonaínas Ia e Ib (rt = 6-7 min). Comparando com as figuras 3 e 5, a EC apresenta uma série de vantagens quando comparada ao CLAE, principalmente o tempo de corrida (40 min no CLAE e 12 min em EC) e a possibilidade de utilização de seletores quirais que permitem a separação parcial de substâncias com as mesmas características físico-químicas. Outra vantagem de EC é que o método não emprega solventes orgânicos, sendo uma técnica menos prejudicial ao meio ambiente e aos analistas.

A EC tem se mostrado uma excelente ferramenta para controle de qualidade de extratos vegetais, principalmente pela alta eficiência, resolução, seletividade, menor tempo de análise, consumo reduzido de reagentes, menor volume de amostra e menor custo.

De acordo com as análises cromatográficas realizadas por EC e CLAE (item 5.1.1), os extratos utilizados neste trabalho se encontravam em parâmetros adequados para a realização das análises microbiológicas.

5.2 CITOTOXICIDADE

Os resultados encontrados de citotoxicidade de FAE, Epi, PB2, Cinchonáínas Ia, Ib e IIb podem ser observados na figura 6 para as linhagens HeLa, Vero e Macrófagos J774.

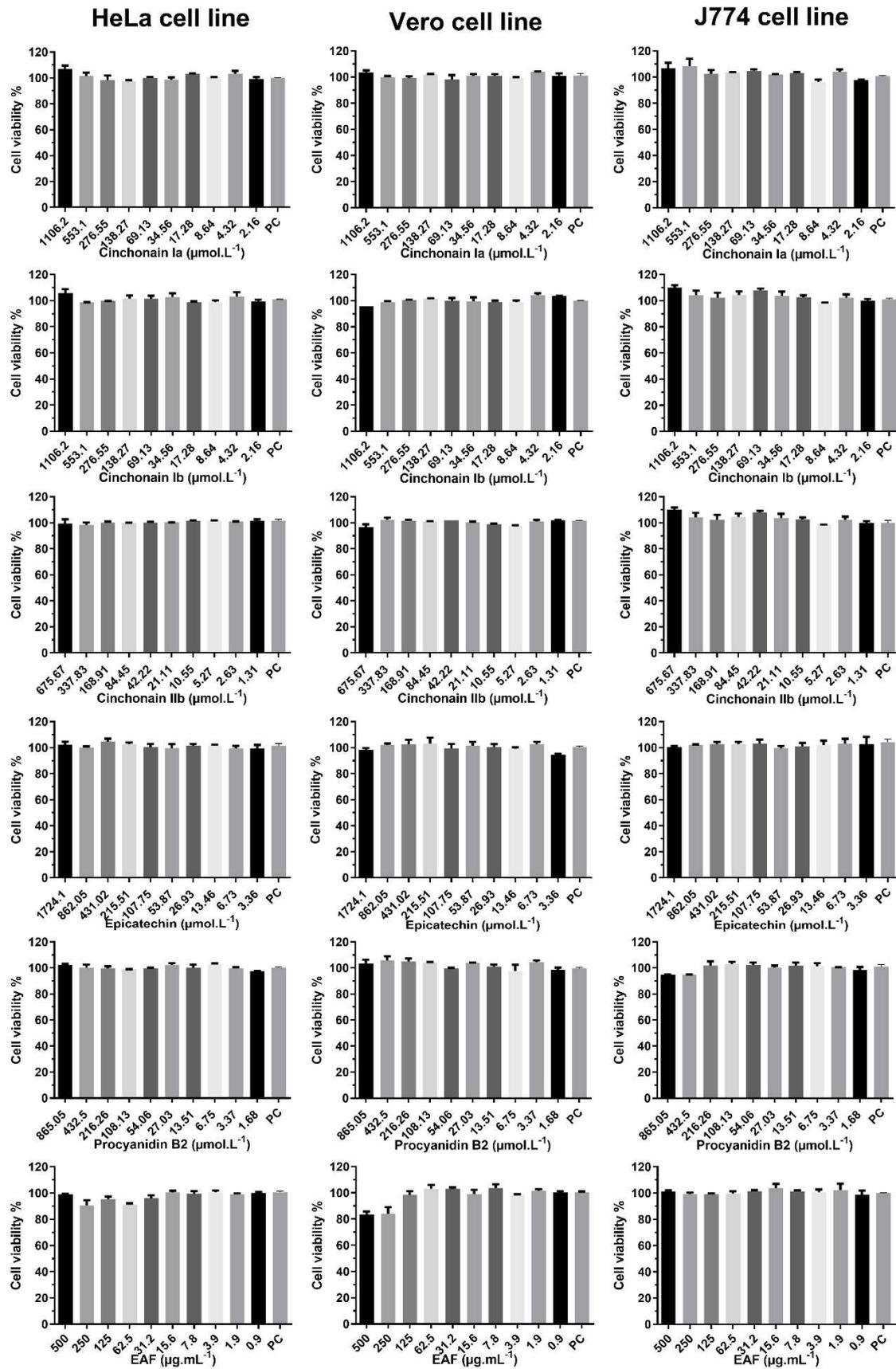


Figura 6. Citotoxicidade de FAE, Epi, PB2, Cinchonainas Ia, Ib e IIb em linhagem HeLa, Vero e Macrófagos J774. Concentrações testadas 500 - 0,9 $\mu\text{g/mL}$ para todas as substâncias isoladas. *Valores

convertidos para μmol . PC: Controle positivo de crescimento celular, correspondente a células não submetidas aos tratamentos com as substâncias avaliadas.

De acordo com os resultados obtidos, a FAE e as substâncias isoladas de *T. catigua* não foram tóxicas para as linhagens avaliadas nas concentrações testadas.

Ming e colaboradores (2002) também não encontraram toxicidade de cinchonaínas Ia, Ib e PB2 extraídas de *Iryanthera megistophylla* para linhagem Vero. Outros estudos realizados com cinchonaínas Ia também não demonstraram toxicidade para linhagens não cancerígenas de mamíferos (Vero e LLC-PK11) e células tumorais humanas do fígado, melanoma maligno, carcinoma do ovário, carcinoma da mama, carcinoma de células escamosas e leucemia promielocítica (HepG2, SK-MEL, SK-OV3, BT-549, KB a 13,51-22,12 μM e HL-60 a 16,89–27,65 μM , respectivamente) (Tabanca *et al.*, 2007). Já Satoh e colaboradores (2000) encontraram toxicidade para cinchonaínas Ia e Ib em linhagem celular de leucemia (L1210) com CC_{50} de 5,5 $\mu\text{g/mL}$. A PB2 não foi tóxica para linhagem de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) (Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2011), mesma linhagem avaliada por Chen e colaboradores (2016) para Epi, que também não foi tóxica para carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma de mama (HepG2 e MCF-7).

5.3 ATIVIDADE CONTRA *H. pylori*

Os resultados de CIM_{50} dos extratos de *T. catigua* contra *H. pylori* e inibição da enzima urease podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de CIM_{50} dos extratos de *Trichilia catigua* contra *Helicobacter pylori*, e inibição da enzima urease.

Amostra	CIM_{50} (mg/mL)	Inibição da urease a 1 mg/mL (%)*
EB	1	44,60
FAE	0,25	42,34
FAQ	<1	25,83
Amoxicilina	$3,7 \cdot 10^{-5}$	-
Claritromicina	$2,5 \cdot 10^{-3}$	-
Ácido Bórico	-	71,56

* Tempo de 20 min.

Conforme observado, a FAE apresentou melhores resultados, com CIM de 0,25 mg/mL e redução de 42,34% da viabilidade da enzima urease. O EB, embora não tenha apresentado resultados expressivos de CIM, apresentou redução de 44,60% da urease nas mesmas condições.

De acordo com trabalho publicado anteriormente por nosso grupo com extratos da mesma origem, as frações de catuaba apresentam alta concentração de polifenóis e capacidade antioxidante

(Resende *et al.*, 2011; Ritter *et al.*, 2019). Segundo dados da literatura, os polifenóis apresentam potencial terapêutico contra *H. pylori* também pela inibição da chiquimato desidrogenase, prevenindo a adesão e vacuolização no tecido gástrico, além de bloquear alterações na morfologia das células estomacais. A alta capacidade antioxidante desses compostos protege contra o dano oxidativo associado e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), reduz a resposta inflamatória no tecido gástrico, suprimindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-8 e sinalização celular inflamatória (MAPK), também modulando transdução intracelular e vias de transcrição (TLR4) (Brown *et al.*, 2009).

Outra vantagem dos extratos de catuaba está relacionada ao alto teor de taninos. Essa classe de metabólitos secundários vegetais apresenta atividade antiulcerogênica devido à capacidade de precipitação de microproteínas no local da úlcera, desenvolvendo um filme protetor sobre a lesão, promovendo resistência à ação de enzimas proteolíticas associadas a *H. pylori*, permitindo a cicatrização do epitélio (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Cerca de 10 a 15% do peso da bactéria corresponde à urease. É uma metaloenzima dependente de níquel (Ni) e produzida em grandes quantidades, pois *H. pylori* é sensível em meio ácido, portanto, a urease causa hidrólise da ureia, produzindo amônia, que neutraliza o pH gástrico gerando um microambiente neutro. Assim, a urease é considerada essencial para a sobrevivência e patogênese de *H. pylori* (Ha *et al.*, 2001).

O mecanismo pelo qual os extratos de catuaba inibem a enzima urease provavelmente está relacionado à capacidade dos taninos de quelar íons metálicos, especificamente o Ni⁺, que faz parte do sítio ativo da urease. Essa teoria pode ser corroborada pelo trabalho de Kunnambath e Thirumalaisamy (2015), que encontraram uma forte adsorção de Ni⁺ por taninos extraídos de *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile, e Xiao e colaboradores (2013), que concluíram que a presença de dois grupos orto-hidroxila no anel aromático e um grupo cetônico da molécula dos polifenóis, pode ser responsável pela atividade inibitória e coordenada com o Ni⁺ da enzima.

A capacidade de inibir a urease por interação com íons Ni⁺ é o principal mecanismo de ação do ácido acetohidroxâmico (Lithostat®) (AHA), que é o único inibidor de urease aprovado pelo FDA, que apresenta excelentes resultados como coadjuvante no tratamento de infecções urinárias crônicas. No entanto, não é recomendado para o tratamento de *H. pylori* devido a um grande número de efeitos colaterais graves (Hameed *et al.*, 2019). O potencial de sequestrar íons metálicos é uma característica comum observada entre AHA e compostos polifenólicos. Estudos comprobatórios se fazem necessários, contudo, os extratos de catuaba têm potencial como inibidores da urease, provavelmente por meio da interação com os íons Ni⁺ da enzima, sem causar efeitos colaterais importantes devido a ausência de toxicidade em modelos de culturas celulares, discutido no item 5.2.

5.3.1 Avaliação da atividade sinérgica (Checkerboard)

De acordo com os resultados obtidos, em associação com AMOX, a CIM dos extratos diminuiu para a metade e a CIM do fármaco se manteve o mesmo, já a CLA diminuiu a CIM dos extratos para $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL e a CIM do fármaco para $6,2 \times 10^{-4}$ mg/mL. O valor da concentração inibitória fracionada (FIC) pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Checkerboard dos extratos de *Trichilia catigua* e antimicrobianos padrão contra *Helicobacter pylori*.

Extrato x Amoxicilina	Concentração Inibitória Fracionada (FIC)	Resultado*
EB	0,74	Parcialmente sinérgico
FAE	0,99	Parcialmente sinérgico
FAQ	0,74	Parcialmente sinérgico
Extrato x Claritromicina	Concentração Inibitória Fracionada (FIC)	Resultado
EB	0,251	Sinérgico
FAE	0,132	Sinérgico
FAQ	0,251	Sinérgico

* Referência: FIC $\leq 0,5$ sinérgico; FIC $>0,5$ à <1 parcialmente sinérgico; FIC = 1 aditivo; FIC >1 à <4 indiferente; e ≥ 4 antagonista (Rossetti *et al.*, 2006)

Todos os extratos testados apresentaram atividade parcialmente sinérgica à amoxicilina e sinérgica à claritromicina, com melhores resultados observados para FAE, que apresentou melhor valor de FIC com a claritromicina, indicando que a fração acetato de etila, em associação, foi capaz de diminuir o valor de CIM do fármaco em quatro vezes quando comparado com resultados isolados.

A CLA exerce sua ação antibacteriana através de sua ligação às subunidades ribossômicas 50S dos agentes patogênicos sensíveis, suprimindo a síntese proteica (National Center for Biotechnology Information, 2019), e a AMOX inibe as ligações cruzadas do peptidoglicano da parede celular (GlaxoSmithKline, 2016).

De acordo com os resultados obtidos, o mecanismo pelo qual os extratos de *T. catigua* exercem efeitos combinatórios com os antimicrobianos avaliados, provavelmente está relacionado a uma desestabilização do peptidoglicano da parede celular, mecanismo semelhante ao AMOX, uma vez que os extratos apresentaram caráter aditivo ou parcialmente sinérgico. Em tese, compostos que atuam no mesmo receptor tendem a ter efeitos aditivos ou antagônicos, pela competição do mesmo alvo de ação, não ocasionando redução da dose individual do medicamento.

O princípio de que os extratos causam danos à parede celular também pode ser reforçado quando os resultados são comparados aos observados para associação com CLA. O efeito sinérgico ocorre justamente porque os extratos não possuem mecanismo de ação semelhante, porém, os danos gerados na parede celular podem levar à formação de poros, facilitando a permeação e aumentando a potência da claritromicina.

Outra vantagem relacionada aos inibidores de bombas de efluxo derivados de produtos naturais em combinação com antimicrobianos comerciais, é a possibilidade de reversão da resistência adquirida e o surgimento de novas cepas resistentes, por meio da inibição de alvos modificados na via metabólica (Marquez *et al.*,2005).

Além do aumento da eficácia dos antimicrobianos comerciais e diminuição das taxas de resistência, a redução da dosagem efetiva ocasionada pela associação aos extratos de catuaba pode minimizar a incidência de reações adversas a medicamentos, como problemas gastrointestinais, dores de cabeça e alterações cutâneas, facilitando a adesão e continuidade do tratamento pelos pacientes.

5.3.2 PCR em tempo real (RTqPCR)

Apesar da análise estatística apenas evidenciar um decréscimo significativo da expressão gênica do *VacA* para EB (variação de -2,59 vezes) e *CagA* para FAE (variação de -1,64 vezes) em relação ao controle, todos os extratos mostram uma tendência a diminuir a expressão do alvo genes na condição testada (figura 7).

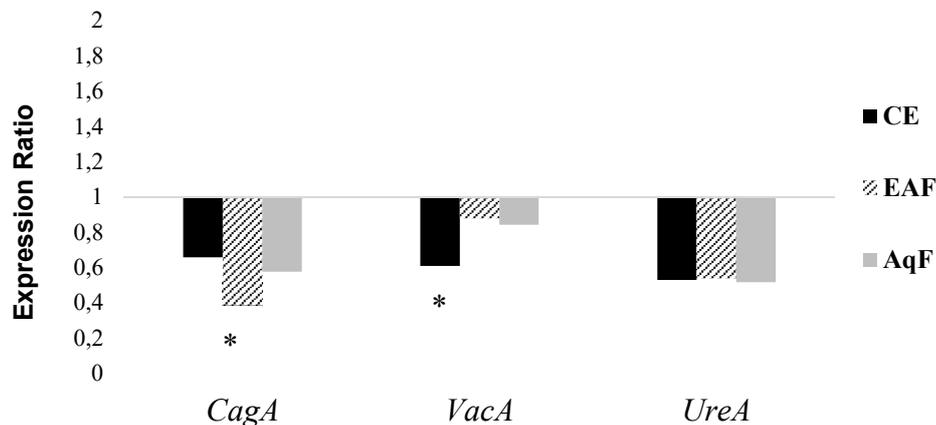


Figura 7. Resultado de expressão gênica por RTqPCR de *Helicobacter pylori* tratada com extratos de *Trichilia catigua*.

RTqPCR é uma variação do PCR convencional, que consiste na amplificação do RNA mensageiro em DNA complementar (cDNA). Através do cDNA, são formadas fitas duplas de DNA. É a técnica mais utilizada para detecção de genes correspondentes a fatores de virulência de microorganismos patogênicos devido à alta especificidade e sensibilidade (Rosseti *et al.*,2006).

O gene CagA (gene A associado à citotoxina) é um dos genes relacionados à virulência de *H. pylori*, que produz a proteína CagA. A proteína é injetada na célula gástrica, induzindo alterações na fosforilação da tirosina e nas vias de sinalização, resultando em alterações morfológicas nas células do hospedeiro. Também atua como antígeno, induzindo a expressão de IL-8 e IL-1 β . Este gene está associado a formas de gastrite, úlceras, lesões pré-cancerosas e câncer gástrico (Hatakeyama, 2004).

VacA (gene A vacuolizante da citotoxina A) é o segundo fator de virulência mais importante, pois além da vacuolização, interrompe as funções endossômicas e lisossomais das células, induzindo a formação de canais de membrana, podendo levar a apoptose. É um fator de virulência de grande importância na patogênese do câncer gástrico, diretamente envolvido na inflamação e ulceração gástrica. A ligação de VacA a receptores de células epiteliais induz a formação de vacúolos citoplasmáticos, dano mitocondrial, liberação de citocromo C, inibição da ativação de linfócitos e interferência na apresentação de antígenos (Basso *et al.*, 2008).

A inibição do VacA por extratos ricos em polifenóis também foi observada por Tombola (2003) e Ruggiero (2006) em ensaios *in vivo* com chá verde e vinho. O mecanismo de ação ainda não está claro, mas os autores não atribuíram as interações moleculares específicas à atividade redox dos polifenóis, em oposição à atividade antimicrobiana direta.

A urease é uma enzima de alto peso molecular, formada estruturalmente pelos genes UreA e UreB e UreE, UreF, UreG e UreH, que codificam proteínas acessórias importantes (Ladeira *et al.*, 2003). Como pode ser visto na Figura 7, todos os extratos diminuíram a expressão de UreA, uma proteína necessária para a estruturação. Portanto, nessas condições de tratamento, a produção da enzima pela bactéria seria minimizada, dificultando a sobrevivência no ambiente estomacal, uma vez que *H. pylori* não é acidófila. Esses resultados corroboram a inibição da urease encontrada neste trabalho (discutida na seção 5.3).

A combinação de CagA e VacA resulta em um maior grau de virulência da bactéria. EB e FAE causaram diminuição da expressão desses genes, e aliada aos resultados de inibição da urease observados, os extratos de *T. catigua*, mesmo em baixas concentrações, são capazes de tornar *H. pylori* menos virulenta e até mesmo dificultar a sobrevivência da mesma no ambiente ácido estomacal.

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV de *H. pylori* tratada com os extratos de catuaba podem ser vistas na figura 8.

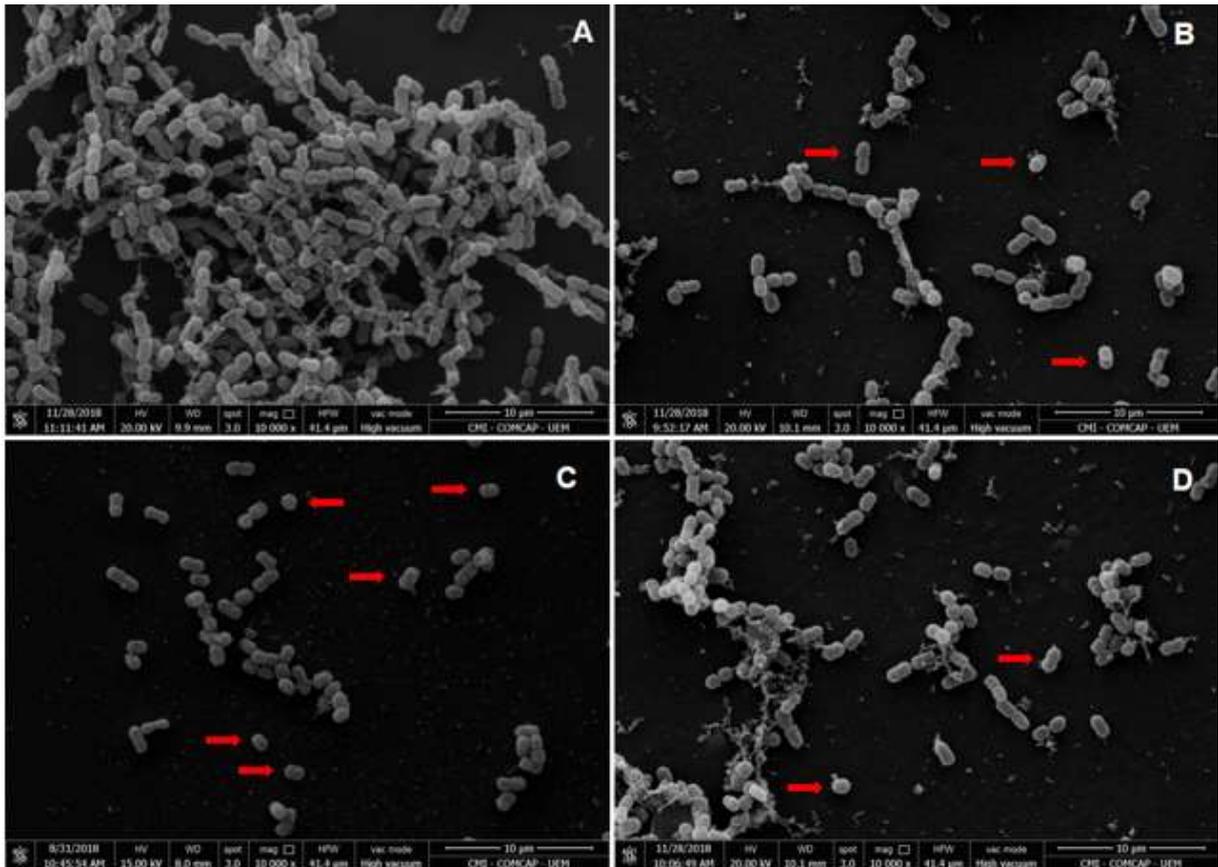


Figura 8. MEV de *Helicobacter pylori* tratada com extratos de *Trichilia catigua*. **A**-Controle negativo; **B**- EB 1 mg/mL; **C**- FAE 0,25 mg/mL; **D**- FAQ 1 mg/mL. As setas indicam as principais alterações morfológicas.

Quando comparados com o controle (A), melhores resultados podem ser observados com a FAE (C), onde as células apresentam morfologia cocoide densa, característica de processo de morte, interrupção da divisão celular, formação de vesículas de lise e redução nas estruturas formadas por matriz celular, com arquitetura tridimensional compatíveis com características de biofilme. A forma cocoide também pode ser observada no controle, devido a características da bactéria de converter a morfologia com a incubação longa (72 h).

A *H. pylori* pode existir em três formas distintas: espiral, formas cocoides viáveis e em processo de morte. A forma espiralada é a mais comum causadora de infecção no estômago humano, entretanto, a bactéria tem a capacidade de converter sua forma para cocoide em situações de estresse. A forma cocoide não é cultivável e é menos virulenta, com menor produção de urease e adesão (Young *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2003).

A infecção por *H. pylori* é geralmente tratada com múltiplos esquemas terapêuticos, devido à natureza de resistência da bactéria. Mesmo com o tratamento, cerca de 10 à 20% dos pacientes apresentam reincidência (Kearney, 2001). Segundo Lewis (2001), um dos fatores que promovem a resistência a antimicrobianos é a formação de biofilme insolúvel em água. A formação de biofilme é

verificada em cepas urease positivas, são estruturas complexas, caracterizadas por células inseridas em matriz polimérica, composta de carboidratos, proteínas e DNA.

A formação de biofilme é comum a bactérias capazes de sobreviver em ambientes desfavoráveis a células planctônicas. Em resposta ao *quorum sensing*, as células bacterianas aderem a superfícies formando microcolônias com expansão lateral e vertical (morfologia tridimensional). São formados canais para permitir a permeação de nutrientes para as camadas inferiores (Cole *et al.*, 2004).

A redução na formação de biofilme e variação da morfologia observada no tratamento com FAE pode ser decorrente da capacidade dos polifenóis em precipitar proteínas, redução da expressão gênica e atividade da urease, visto que a formação de biofilme parece estar relacionada com a produção desta enzima, resultados compatíveis com os demais experimentos realizados nesse trabalho.

A formação de vesículas de lise observadas no MEV, sugere danos internos a camada de peptidoglicano, mecanismo similar a AMOX. Essa hipótese também pode ser observada nos resultados da avaliação de atividade sinérgica, discutida no item 5.3.1.

5.3.4 Docking Molecular

Na identificação de alvos metabólicos por meio de *docking* reverso, o servidor SEA *predictions* compara a estrutura da molécula avaliada (*query*) com um banco de dados que contém as informações experimentais já relatadas na literatura, de todos os ligantes que se ligam a uma dada proteína/enzima. Ou seja, se a molécula avaliada (*query*) tiver semelhança significativa (MaxTX, *P*-value) com um ligante de uma dada enzima “X”, é possível que a molécula avaliada também possa se ligar a essa enzima. O MaxTC = 1.00 significa que a molécula *query* é um inibidor já descrito na literatura. Portanto, quanto maior o MaxTC score, maior probabilidade da molécula *query* se assemelhar a um ligante da enzima “X”. O *P*-value indica a probabilidade do resultado apresentado ser falso-positivo, portanto, quanto menor este valor, melhor.

As tabelas S1-S6 (apêndice) listam a estrutura das principais substâncias presentes no extrato de *T. catigua* que foram avaliadas (Epi, PB2, cinchoninas Ia, Ib e IIb) e as proteínas identificadas com probabilidade significativa de serem alvos destas substâncias. A compilação destes resultados é mostrada na tabela 4. As enzimas fabG (E.C. 1.1.1.100), fabZ (E.C. 4.2.1.59) e fabI (E.C. 1.3.1.9) atenderam aos critérios de seleção descritos na metodologia, estando presentes em *H. pylori* e ausentes em humanos, o que as qualificam como prováveis alvos dos taninos do extrato de *T. catigua*.

Tabela 4. Status das enzimas identificadas por “*docking reverso*” presentes em *Helicobacter pylori* segundo a base de dados Uniprot. As enzimas destacadas em negrito estão presentes em *H. pylori* e ausentes em humanos, o que sugere prováveis alvos dos taninos.

Enzima alvo	<i>H. pylori</i> status (uniprot id)	<i>H. sapiens</i> status (uniprot id)
fabG	Putativo (q9zls0)	-
fabZ	Confirmado (o25928)	-
pgd	Putativo (j0h186)	Confirmado (p52209)
arginase	Putativo (b6jp31)	Confirmado (p05089)
recA	Confirmado (p42445)	Proteínas com domínio RecA (várias)
top1	Confirmado (p55991)	Confirmado (p11387)
fabI	Confirmado (o24990)	-

As enzimas fabG, fabZ e fabI fazem parte do sistema de biossíntese de ácidos graxos essenciais (FAS II) que está presente em quase todas as bactérias, inclusive em *H. pylori*. Esse sistema é muito diferente do sistema FAS I presente em humanos (Figura S1, apêndice), tornando-o um alvo específico para o desenvolvimento de fármacos de ação antibacteriana (Wright & Reynolds, 2007). A inibição de enzimas deste sistema provocaria um efeito deletério significativo em bactérias, mas não em humanos. Já os alvos pgd, arginase, recA e top1 não foram adequados, pois estão presentes na espécie humana.

O *docking reverso* sugeriu as três enzimas do sistema FAS II como prováveis alvos, com base na semelhança das moléculas do extrato de catuaba com os ligantes já descritos na literatura para estas enzimas. Contudo, somente a avaliação por *docking* convencional das moléculas do extrato nas proteínas alvo, poderia dar uma sugestão mais detalhada do modo de interação entre eles, além de estimar qual das moléculas teria um melhor score nesta interação, de modo a indicar qual seria o componente do extrato mais provável de se ligar a enzima alvo. Uma vez que a pesquisa com *H. pylori* tem interesse da indústria farmacêutica e da ciência básica, as estruturas das três enzimas alvo já foram determinadas por difração de raios-X e estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), o que permite realizar a avaliação por *docking* convencional.

Na estrutura da *HpylorifabI*, a simulação de redocking mostrou excelente sobreposição do ligante, indicando que não eram necessários passos de minimização de energia para maximizar a interação com o ligante, sendo esta utilizada na forma como foi obtida do PDB. Nas estruturas da *HpylorifabZ* e *HpylorifabG*, a recuperação da pose do ligante não foi observada de início, sendo necessário passos adicionais de modelagem e minimização para maximizar as interações das proteínas

com os ligantes de referência, de modo a deixar as estruturas numa conformação do sítio ativo cataliticamente favorável.

5.3.4.1 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima fabZ

A enzima fabZ está envolvida na biossíntese de ácidos graxos insaturados, onde catalisa a desidratação de beta-hidroxiacil-ACPs (Panizzon *et al.*, 2019). Na estrutura da *HpylorifabZ* (pdbid: 2glm), o ligante SCB está inserido em um único sítio localizado entre as cadeias A e B. A simulação de redocking forneceu um score médio de -8.6 ± 0.39 para o inibidor de referência SCB (Figura 9A). Nenhum dos taninos avaliados apresentou score melhor que o SCB, o que sugere menor probabilidade de ligação. Dos ligantes avaliados na Tabela 5, a cinchonaína Ia (Zinc5838202) foi a única que apresentou reprodutibilidade nas melhores poses, em todas as simulações, o que sugere estabilidade na interação com a proteína (Figura 9B).

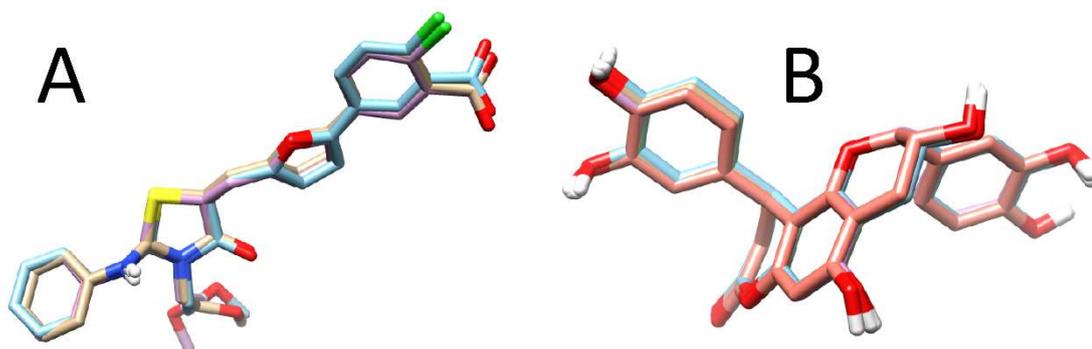


Figura 9. Estruturas obtidas por meio de *docking* dos ligantes avaliados na enzima *HpylorifabZ*. (A) cluster de conformações obtida com o *redocking* do ligante de referência SCB no mesmo ligante modelado (azul). (B) cluster de conformações obtidas com o *docking* do ligante cinchonaína Ia (Zinc5838202). A boa sobreposição das estruturas em todas as simulações sugere um mecanismo de interação confiável.

Tabela 5. Scores médios encontrados com a varredura virtual dos taninos do extrato de catuaba (varredura virtual) e dos ligantes modelados (*redocking*) nas enzimas alvo deste estudo. Quanto menor o valor, maior o score. Os valores entre parênteses se referem ao desvio padrão. Os valores em negrito se referem ao ligante mais bem ranqueado e mais provável de se ligar para cada enzima.

Ligante	fabZ	fabG	fabI
SCB (Zinc252593789)	-8.6 (0.39)	-	-
CAA (Cid46936566)	-	-9.6 (0.09)	-
TCL (Cid5564)	-	-	-8.2 (0.05)
Cinchonaina Ia (Zinc5838202)	-7.7 (0.47)	-10.3 (0.40)	+4.2 (0.06)*
Cinchonaina IIa (Cid11765545)	-7.6 (0.32)	-5.5 (0.00)	+17.1 (0.09)*
Cinchonaina Ib (Zinc4098611)	-7.3 (0.06)	-7.6 (0.25)	-4.0 (0.75)
Procianidina B2 (Cid122738)	-6.4 (0.59)	-7.8 (0.72)	-1.7 (0.46)
Epicatequina (Cid182232)	-7.8 (0.21)	-8.6 (0.00)	-8.8 (0.00)
Cinchonaina IIb (Cid21676385)	-5.1 (0.32)	-4.6 (0.05)	+11.9 (0.05)*

5.3.4.2 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima *fabG*

A *fabG* catalisa a redução dependente de NADPH de substratos beta-cetoacil-ACP em produtos beta-hidroxiacil-ACP, o primeiro passo redutor do ciclo de alongamento da biossíntese de ácidos graxos (Panizzon *et al.*, 2019). Na estrutura da *HpylorifabG* (pdbid: 4iin) não havia ligante no sítio ativo, por essa razão, o *loop* formado pelos resíduos 191 a 202 que compõe o sítio catalítico era flexível, o que provavelmente impediu a formação de um padrão cristalino para que a difração de raios-X pudesse determinar, com precisão, a posição dos átomos desta região. Por isso foi necessário modelar esta região na presença do ligante CAA, para que a enzima se encontrasse numa conformação cataliticamente favorável. Após os ciclos de minimização, a estrutura da *HpylorifabG* na presença do ligante CAA e do substrato NAD foi validada com sucesso nas simulações de *redocking*, exibindo um score de $-9,6 \pm 0,09$ (Figura 10A). Somente a cinchonaina Ia (Zinc5838202) apresentou melhor score em relação ao ligante de referência CAA (Tabela 5). A reprodutibilidade na recuperação das poses de melhor score encontradas em todas as simulações (Figura 10B), aliada ao alto valor de score encontrado, sugere que a cinchonaina Ia (Zinc5838202) seja o componente do extrato de *T. catigua* com maior efeito inibitório sobre a *HpylorifabG*.

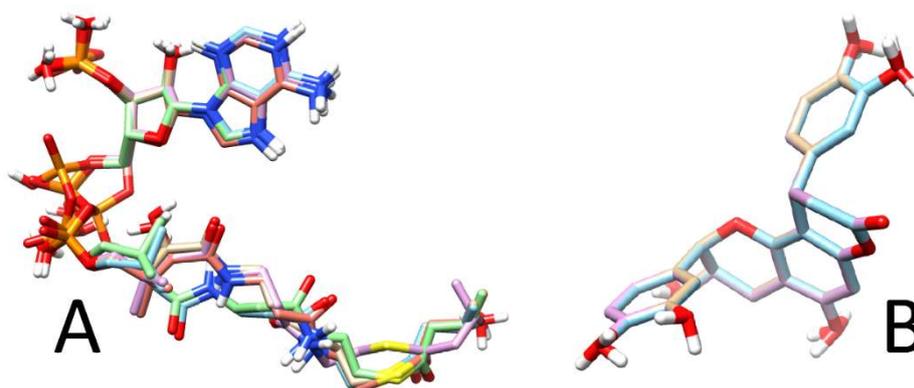


Figura 10. Estruturas obtida por meio de *docking* dos ligantes avaliados na enzima *HpylorifabG*. (A) cluster de conformações obtida com o *redocking* do ligante de referência CAA, no mesmo ligante modelado (azul). (B) cluster de conformações obtidas com o *docking* do ligante Cinchonain Ia (Zinc5838202). A boa sobreposição das estruturas em todas as simulações sugere um mecanismo de interação confiável, porém, devido ao grande número de ligações rotacionáveis é esperado a oscilação obtida no *docking* do ligante CAA.

5.3.4.3 Varredura virtual dos componentes do extrato de catuaba na enzima *fabI*

A *fabI* catalisa a redução de uma ligação dupla de carbonos em uma fração enoil que está covalentemente ligada a uma proteína transportadora de acila (ACP). Também está envolvida no ciclo de alongamento de ácidos graxos utilizados no metabolismo lipídico (Panizzon *et al.*, 2019). Na estrutura da *HpylorifabI* (pdbid: 2pd3), o ligante TCL está inserido em um único sítio localizado em cada uma das quatro cadeias que compõe a unidade biológica da proteína (homotetrâmero). Portanto, somente a cadeia A foi utilizada nas simulações. A simulação de *redocking* forneceu um score médio de $-8,2 \pm 0,05$ para o inibidor de referência TCL (Figura 11A). Dos ligantes avaliados, somente a epicatequina (Cid182232) forneceu um score melhor que o TCL, e excelente reprodutibilidade dos resultados (Figura 11B). A cinchonaína Ib e PB2 apresentaram scores pouco significativos, indicando baixa probabilidade de ligação. Já a cinchonaínas Ia, IIa e IIb apresentaram scores proibitivos, indicando que não se ligariam a *HpylorifabI* (Tabela 5). Este resultado está de acordo com o sugerido pelo *docking* reverso (tabelas S1-S6, apêndice) o qual indicou que, apenas a *fabI* poderia ser o alvo da Epi.

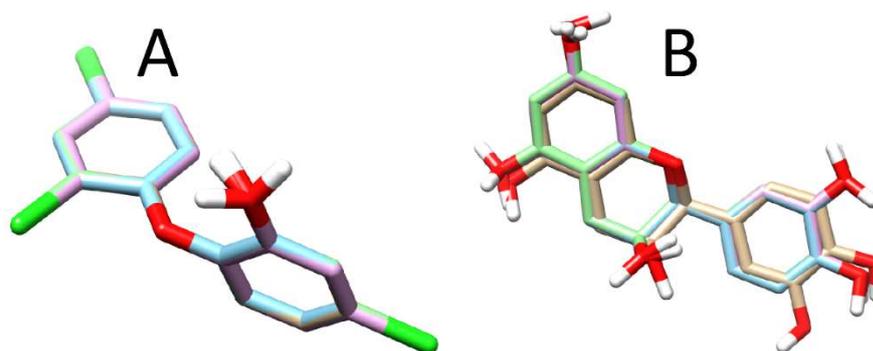


Figura 11. Estruturas obtidas por meio de *docking* dos ligantes avaliados na enzima *HpylorifabI*. (A) cluster de conformações obtida com o redocking do ligante de referência TCL no mesmo ligante cristalográfico (azul). (B) cluster de conformações obtidas com o *docking* do ligante epicatequina (Cid182232). A boa sobreposição das estruturas em todas as simulações sugere um mecanismo de interação confiável.

A capacidade da Epi em se ligar a algumas enzimas já é conhecida. Há descrições de sua interação com a prostaglandina G/H sintase (ciclooxigenase) de carneiros (*Ovis aries*) (Szewczuk & Penning, 2004), beta-secretase humana (Jeon, *et al.*, 2003) e a ácido graxo sintase humana (fasN) (Jiang *et al.*, 2010). Apesar da interação comprovada com estas duas enzimas humanas, a inibição delas não causa efeitos deletérios no organismo, o que foi comprovado pela ausência de citotoxicidade do extrato avaliado em cultura de células de mamíferos (figura 7).

As simulações de bioquímica computacional, por meio de *docking* reverso, sugerem que as enzimas fabG, fabI e fabZ, necessárias para a biossíntese de ácidos graxos essenciais em bactérias, poderiam ser inibidas pelos componentes do extrato de *T. catigua*. A cinchonaína Ia é o composto com maior capacidade inibidora das enzimas *HpylorifabG* e *HpylorifabZ*, enquanto a Epi apresentou maior capacidade inibitória da enzima *HpylorifabI*. Portanto, um dos mecanismos de ação dos extratos de catuaba sobre *H. pylori* é devida ao efeito sinérgico da cinchonaína Ia e Epi sobre as enzimas do sistema FAS II.

A afinidade dos taninos pelas enzimas do complexo FAS II também foi observada no trabalho de Trevisan e colaboradores (2020), que observaram a afinidade de ligação de substâncias de *Stryphnodendron adstringens* nas enzimas FabG, FabZ, e FabI de *Staphylococcus aureus*, utilizando mesmas técnicas de avaliação *in silico* que as realizadas nesse trabalho.

Os genes FAS II estão relacionados também a produção de β -hidroxi-ácidos graxos, que compõem a estrutura central do lipídio A dos lipopolissacarídeos da membrana externa de microrganismos Gram negativos (Parsons & Rock, 2011). Com os dados observados, concluiu-se que os extratos de *T. catigua*, principalmente a FAE, apresentam resultados promissores contra *H. pylori*. Em baixas concentrações, a FAE, além de apresentar atividade sinérgica com os antimicrobianos padrão utilizados no tratamento, não apresentou toxicidade às células do estômago, e foi capaz de reduzir a

expressão gênica de fatores de virulência e formação de biofilme, o que possivelmente dificultaria ou impediria a sobrevivência da bactéria no ambiente estomacal.

5.4 ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES DE *Candida* DE RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os resultados de CIM obtidos dos extratos e substâncias isoladas de *T. catigua* podem ser observados na tabela 6.

A FAE apresentou excelentes resultados para todas as cepas testadas, principalmente para *C. glabrata* e *C. krusei*, com valor de CIM de 9,76 e 19,53 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dentre as substâncias isoladas testadas, os melhores resultados foram observados para os estereoisômeros cinchonaínas Ia e Ib, com CIM de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata* e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *C. krusei*.

Tabela 6. CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extratos e substâncias isoladas de catuaba contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
EB	1250	1250	2500	2500	39,06
FAE	78	39	78	9,76	19,53
FAQ	5000	2500	5000	>5000	39,06
Epi	500	250	≥ 500	7,81	125
PB2	≥ 500	250	≥ 500	7,81	250
Cinchonaína Ia	125	31,25	125	3,9	31,25
Cinchonaína Ib	125	62,5	500	3,9	31,25
Cinchonaína IIb	125	62,5	250	3,9	62,5
Anfotericina B	0,06	0,125	0,5	0,125	0,125
Caspofungina	0,0625	1	0,125	0,25	1

Em relação a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), somente a FAE apresentou atividade fungicida para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. Krusei*, na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$, os demais extratos e substâncias testadas apresentaram atividade fungistática.

Extratos de *Trihçilia emetica* apresentaram atividade antifúngica, com melhores resultados observados para o extrato hexânico das folhas, com CIM de 800 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* e 100 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata* (Motsei *et al.*, 2003; Shai *et al.*, 2008; Kolaczowski *et al.*, 2010). Já o extrato metanólico das folhas da espécie *Trichilia priedreana* apresentou CIM de 3,125 mg/mL para *C. albicans* (Arotupin *et al.*, 2008). Em comparação com este trabalho, é possível verificar que a diferença dos resultados encontrados pode estar relacionada à parte do vegetal utilizada para a produção de extratos,

tendo em vista que os autores utilizaram folhas e as análises realizadas neste trabalho foram com os extratos obtidos das cascas.

Várias pesquisas já foram realizadas no âmbito de atividade antimicrobiana de compostos fenólicos. Vários autores associam o mecanismo de ação principalmente devido a capacidade antioxidante e da ligação irreversível dos taninos a proteínas, afetando a atividade enzimática e permeabilidade celular, especificamente na interferência de absorção de nutrientes e síntese de ácidos nucleicos (Tiwari *et al.*, 2009). Shan e colaboradores (2008) levantaram a hipótese de que polifenóis presentes em extratos vegetais se ligam e penetram na bicamada fosfolipídica, levando a inibição de força motriz, cadeia respiratória e inibição de processos oxidativos de substratos, causando perda de metabólitos, inibição de transporte ativo, síntese de proteínas, DNA e RNA, levando a lesão ou morte celular.

As substâncias isoladas testadas correspondem aos marcadores fitoquímicos de *T. catigua*, sendo as substâncias de maior concentração dentro da FAE, como pode ser visto nos cromatogramas (seção 5.1). Dentre elas, os melhores resultados de inibição foram observados para cinchonáina Ia. Segundo Verstraeten e colaboradores (2005), dímeros do tipo A, devido ao tipo de ligação, apresentam uma rigidez molecular maior que os tipo B, possuindo, teoricamente, maior capacidade de penetração em bicamadas fosfolipídicas, em vista disso, os autores supõem que a atividade antimicrobiana de dímeros de epicatequina é devido a modulação de fluidez de membrana, afetando inúmeros processos celulares que influenciam na funcionalidade de enzimas associadas, mecanismos de transporte e interação com receptores.

Os valores de CIM das cinchonáinas Ia e Ib para *C. albicans*, foram semelhantes aos encontrados por Ming e colaboradores (2002), que obtiveram CIM de 150 µg/mL com cinchonáinas isoladas de *Iryanthera megistophylla*. Já Xu e colaboradores (2013), encontraram CIM de 70 µg/mL para cinchonáina Ia. Os autores sugeriram que atividade antifúngica é influenciada pela estereoquímica de C2 e C3. Em relação a Epi, valores semelhantes de CIM foram encontrados por Teodoro e colaboradores (2015) para *C. krusei* e *C. glabrata*, já Sachikonye & Mukanganyama (2016) encontraram melhor atividade para *C. albicans*, com CIM de 213 µg/mL. Vários fatores podem estar relacionados com a divergência de resultados, como a porcentagem de pureza das amostras testadas e perfil de susceptibilidade *in vitro* das cepas fúngicas.

A atividade antifúngica das substâncias isoladas observada parece estar diretamente relacionada com o grupamento fenil-propanoide superior da unidade de flavan-3-ol, não apresentando diferenças significativas em relação a estereoquímica. As substâncias testadas apresentam notáveis atividades antioxidantes, comparáveis com vitamina C e trolox, e o padrão de inibição das cepas testadas aparenta seguir o mesmo padrão de atividade antioxidante *in vitro* determinada por Resende e colaboradores (2011), onde as cinchonáinas apresentaram melhores resultados que Epi e PB2.

Em um estudo realizado com polifenóis de alto peso molecular e ligações do tipo B, provenientes de *Stryphnodendron adstringens*, foi verificado que os compostos reduziram a hidrofobicidade da parede celular de *C. albicans*, causando alterações estruturais e nas propriedades de adesão (Nakamura *et al.*, 2006). Possivelmente, o alvo dos polifenóis são as manoproteínas presentes na parede celular de *Candida* spp., tais interações de taninos e proteínas têm sido atribuídas à presença de prolina (Chauhan *et al.*, 2002).

De uma forma geral, todas os tratamentos testados apresentaram resultados mais expressivos para *C. glabrata*, portanto, levando em consideração a importância clínica desse patógeno e sua rápida capacidade de desenvolvimento de resistência à antifúngicos, foi a espécie de *Candida* escolhida para a continuidade do trabalho.

5.4.1 Atividade sinérgica (*Checkerboard*)

De acordo com os resultados de CIM das substâncias isoladas de *T. catigua*, em comparação com a FAE, não é possível determinar que a atividade antifúngica da fração se deve somente a uma substância isoladamente, sendo provável efeito da associação destas, formando complexos fitoquímicos. Portanto foi realizada a determinação da atividade sinérgica das substâncias isoladas entre si, onde os resultados podem ser verificados na tabela 7.

Tabela 7. *Checkerboard* das substâncias isoladas de catuaba contra *Candida glabrata*.

<i>C. glabrata</i>		
Combinação	Concentração inibitória mínima fracionada (FIC)	Resultado
Cinchonaína Ia x Epi	0,56	Sinérgico
Cinchonaína Ia x PB2	0,62	Sinérgico
Cinchonaína Ib x Cinchonaína Ia	0,56	Sinérgico
Cinchonaína Ib x Cinchonaína IIb	0,53	Sinérgico
Cinchonaína Ib x Epi	0,37	Fortemente Sinérgico
Cinchonaína Ib x PB2	0,5	Sinérgico
Cinchonaína IIb x Cinchonaína Ia	0,56	Sinérgico
Cinchonaína IIb x Epi	0,62	Sinérgico
Cinchonaína IIb x PB2	0,75	Sinérgico
Epi x PB2	0,56	Sinérgico

FIC < 0.5 fortemente sinérgico; FIC < 1 sinérgico; FIC = 1 efeito aditivo; 1 < FIC < 2 sem efeito; FIC > 2 antagonista (Mor *et al.*, 2015).

Segundo resultados obtidos, todas as substâncias foram sinérgicas entre si, indicando que a associação destas faz com que o valor de CIM de ambas seja menor em combinação do que de forma isolada. Os melhores resultados foram observados para a combinação de cinchonaína Ib e Epi, com valor de FIC de 0,37, indicando atividade fortemente sinérgica. Em vista disso, a mistura de cinchonaína Ib e

Epi foi novamente submetida a avaliação sinérgica com os demais isolados, com o objetivo de verificar se a potência seria melhorada com a associação de três substâncias. Os resultados constam na tabela 8.

Tabela 8. *Checkerboard* de Cinchonaína Ib e Epi com substâncias isoladas de catuaba contra *Candida glabrata*.

<i>C. glabrata</i>		
Combinação	Concentração inibitória mínima fracionada (FIC)	Resultado
Cinch Ib e Epi x Cinch Ia	1	Aditivo
Cinch Ib e Epi x Cinch IIb	0,625	Sinérgico
Cinch Ib e Epi x PB2	1	Aditivo

FIC < 0.5 fortemente sinérgico; FIC < 1 sinérgico; FIC = 1 efeito aditivo; 1 < FIC < 2 sem efeito; FIC > 2 antagonista (Mor *et al*, 2015).

A combinação de cinchonina Ib e Epi apresentou sinergismo somente com cinchonaína IIb, com FIC de 0,625. De acordo com os resultados, pode ser observado que a conformação química do tipo B parece ter mais relação com o sinergismo, diferentemente do que é observado de forma isolada, no qual a cinchonaína Ia apresentou melhores resultados.

Por fim foi realizada a avaliação de atividade sinérgica de FAE, substâncias isoladas e melhores combinações com os antifúngicos anfotericina B e caspofungina, os resultados podem ser verificados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. *Checkerboard* de FAE e substâncias isoladas de catuaba em associação com Anfotericina B contra *Candida glabrata*.

<i>C. glabrata</i>		
Combinação	Concentração inibitória mínima fracionada (FIC)	Resultado
Cinch Ia x Anfotericina B	0,75	Sinérgico
Cinch Ib x Anfotericina B	1,25	Sem efeito
Cinch IIb x Anfotericina B	0,5	Sinérgico
Epi x Anfotericina B	0,5	Sinérgico
PB2 x Anfotericina B	0,37	Fortemente Sinérgico
Cinch Ib+ Cinch IIb x Anfotericina B	0,53	Sinérgico
Epi + Pb2 x Anfotericina B	0,37	Fortemente Sinérgico
Cinch Ib + Pb2 x Anfotericina B	0,75	Sinérgico
Chinch IIb + Cinch Ia x Anfotericina B	0,75	Sinérgico
Cinch Ib + Epi x Anfotericina B	0,5	Sinérgico
Epi + Cinch Ib + Cinch IIb x Anfotericina B	0,5	Sinérgico
FAE x Anfotericina B	1	Aditivo

FIC < 0.5 fortemente sinérgico; FIC < 1 sinérgico; FIC = 1 efeito aditivo; 1 < FIC < 2 sem efeito; FIC > 2 antagonista (Mor et al, 2015).

Em relação a atividade sinérgica com anfotericina B, somente a cinchonina Ib não apresentou efeito, e os melhores resultados foram observados para a associação com PB2 isoladamente e em combinação com Epi. Resultados interessantes quando se leva em consideração o valor do CIM das substâncias sozinhas, pois Epi e PB2 não apresentaram resultados tão expressivos quanto as cinchoninas. Portanto sugere-se que a atividade sinérgica com a anfotericina B não está relacionada com a unidade fenil-propanoide, como proposto para a atividade das substâncias de forma isolada, sendo provavelmente resultado do maior poder redutor da PB2, pois a mesma apresenta maior número de hidroxilas livres, e possivelmente a hidroxila presente em C7 da unidade flavan-3-ol, característica em comum da PB2 e Epi.

Tabela 10. *Checkerboard* de FAE e substâncias isoladas de catuaba em associação com Caspofungina contra *Candida glabrata*.

<i>C. glabrata</i>		
Combinação	Concentração inibitória mínima fracionada (FIC)	Resultado
Cinch Ia x Caspofungina	0,75	Sinérgico
Cinch Ib x Caspofungina	2	Sem efeito
Cinch IIb x Caspofungina	1	Aditivo
Epi x Caspofungina	1	Aditivo
PB2 x Caspofungina	1	Aditivo
Cinch Ib+ Cinch IIb x Caspofungina	2	Sem efeito
Epi + PB2 x Caspofungina	2	Sem efeito
Cinch Ib + PB2 x Caspofungina	0,53	Sinérgico
Chinch IIb + Cinch Ia x Caspofungina	2	Sem efeito
Cinch Ib + Epi x Caspofungina	0,62	Sinérgico
Epi + Cinch Ib + Cinch IIb x Caspofungina	2	Sem efeito
FAE x Caspofungina	0,53	Sinérgico

FIC < 0.5 fortemente sinérgico; FIC < 1 sinérgico; FIC = 1 efeito aditivo; 1 < FIC < 2 sem efeito; FIC >2 antagonista (Mor *et al.*, 2015).

Resultados diferentes foram observados na avaliação sinérgica com a equinocandina caspofungina, no qual somente cinchonáina Ia, combinação de cinchonáina Ib e Epi, cinchonáina Ib e PB2 e FAE foram sinérgicas. Cinchonáina IIb, PB2 e Epi foram aditivas e as demais combinações não apresentaram efeito. Os resultados, da mesma forma que os dados observados para anfotericina B, sugerem que PB2 e Epi aparentam estar relacionados a atividades sinérgicas.

A anfotericina B faz parte da classe dos antifúngicos poliênicos, é considerada a droga com maior espectro de ação em casos de infecções fúngicas sistêmicas. Tem ação fungicida pela interação com ergosterol, formando poros na membrana celular fúngica, causando vazamento e perda do conteúdo citoplasmático. A resistência a esse medicamento não é comum, porém existem diversos relatos de cepas resistentes, ou que apresentam elevados valores de CIM (Pfaller & Diekema, 2007). A resistência geralmente se dá através de mutações dos genes ERG3, ERG 11 e ERG6, responsáveis pela biossíntese de ergosterol (Vandeputte *et al.*, 2007). Contudo, a anfotericina B apresenta alta nefrotoxicidade, podendo causar necrose tubular aguda, vasoconstrição e redução da filtração glomerular, levando a falência renal (Bates *et al.*, 2001).

A classe das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) é a mais nova classe de antifúngicos. São lipopetídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos

ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Tem como alvo a parede celular dos fungos, inibindo a β -1,3-D-glucana sintase. Por serem seletivas a componentes fúngicos, não possuem efeitos colaterais importantes como a anfotericina B, e são efetivas para todas as espécies de *Candida* (Bayegan *et al.*, 2010; Kucharínová *et al.*, 2010). Os casos de desenvolvimento de resistência também são poucos, porém são decorrentes da substituição de aminoácidos nas regiões Fks1p e Fks2p em *C. glabrata* (Katiyar *et al.*, 2006; Cleary *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008; Garcia-Effron *et al.*, 2010).

Produtos derivados de fontes naturais são sempre uma importante fonte de novas terapêuticas. A escassez de doenças infecciosas em plantas silvestres fornece indícios da eficácia antimicrobiana dos metabólitos secundários. A terapia combinada é uma estratégia interessante pois os complexos fitoquímicos podem atuar como modificadores de resistência a múltiplos fármacos. Dados da literatura demonstram que a anfotericina B, mesmo em baixas concentrações, é capaz de aumentar a permeabilidade de catequina pela membrana fúngica, aumentando a eficácia da mesma (Hirasawa & Takada, 2004). Atividade sinérgica de anfotericina B também foi observada para extrato de semente de uva em *C. albicans* (Han, 2007).

A combinação de drogas é uma estratégia válida na busca de novas terapêuticas, com capacidade de redução da dosagem de medicamentos, conseqüentemente diminuindo a toxicidade e aumentando a potência de ação, é uma abordagem clínica adotada há muito tempo. A prática de abranger dois ou mais alvos de ação com a combinação de drogas é consistente com a filosofia de que uma doença é resultado sistemático de múltiplos fatores, além de que a estratégia multialvo pode retardar o processo de desenvolvimento de resistência (Cui *et al.*, 2015).

Mais estudos relacionados a determinação de mecanismo de ação envolvidos tanto na atividade isolada como sinérgica dos compostos avaliados se fazem necessários, contudo, levando em consideração os crescentes índices de infecções graves por leveduras do gênero *Candida*, perfil de susceptibilidade e rápido desenvolvimento de resistência de *C. glabrata*, os resultados observados sugerem que a FAE e substâncias isoladas de *T. catigua* apresentam potencial para desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotos correspondentes ao MEV de *C. glabrata* tratada com a FAE e substâncias isoladas de *T. catigua* podem ser observadas na figura 12.

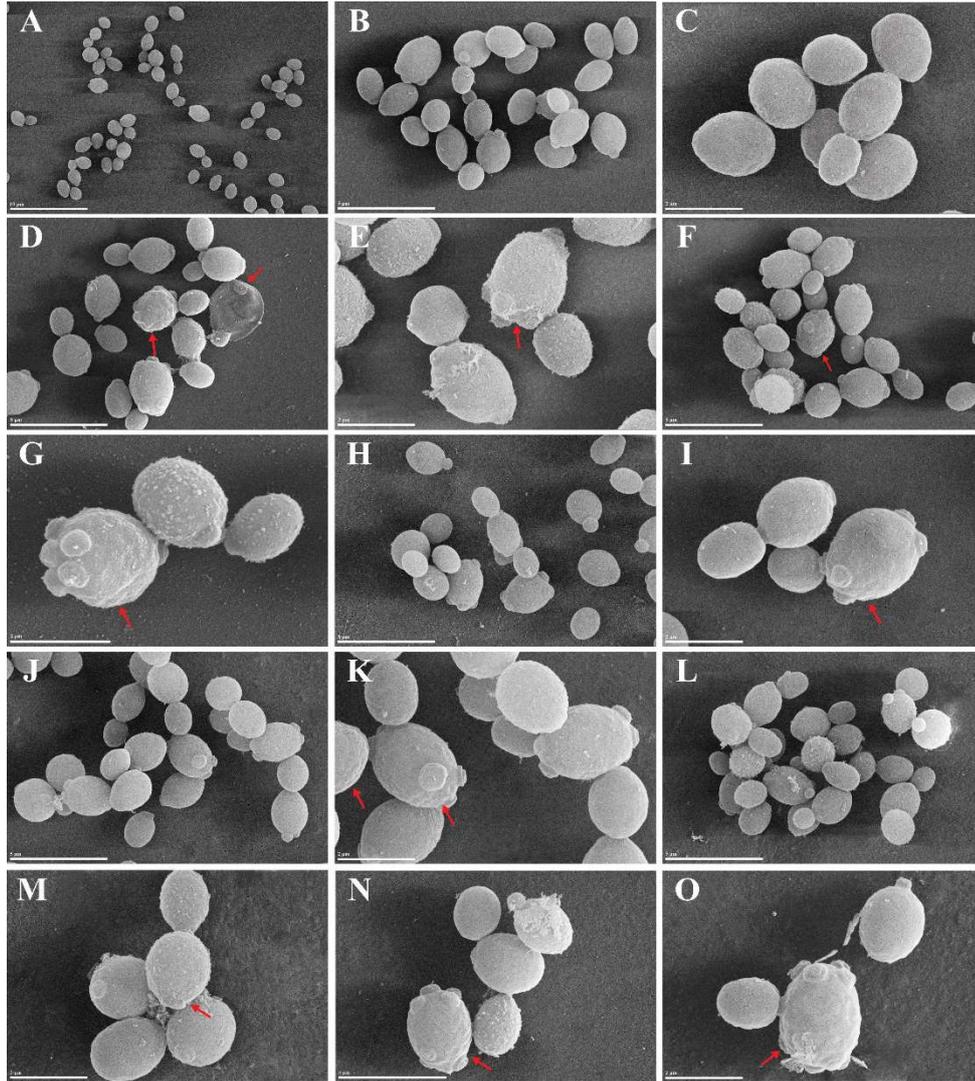


Figura 12. Alterações morfológicas de *Candida glabrata* tratada com extratos e substâncias isoladas *Trichilia catigua*, nas concentrações correspondentes ao sub-CIM, por 24 h. (A-C) *C. glabrata* não tratada; (D-E) *C. glabrata* tratada com FAE; (F-G) *C. glabrata* tratada com cinchonina Ia; (H-I) *C. glabrata* tratada com cinchonina Ib; (J-K) *C. glabrata* tratada com cinchonina IIb; (L-M) *C. glabrata* tratada com Epi; (N-O) *C. glabrata* tratada com Pb2. Barra de escala = 10 µm (A), 5 µm (B, D, F, H, J, L), 4 µm (N), 2 µm (C, E, G, I, K, M, O). As setas indicam rugosidades e alterações morfológicas.

As células não tratadas (controles A-C), apresentaram textura lisa e contornos regulares, compatíveis com a morfologia normal de *C. glabrata*. Todos os tratamentos avaliados apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle. As principais alterações observadas foram rugosidades na membrana, com vesículas indicativas de processo de morte celular, bem como cicatrizes que sugerem interrupção no processo de brotamento. Alterações morfológicas mais expressivas foram observadas para as leveduras tratadas com Epi (L-M) e PB2 (N-O).

5.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A figura 13 apresenta os dados obtidos na avaliação de alterações estruturais de *C. glabrata* tratada com FAE e substâncias isoladas de *T. catigua*.

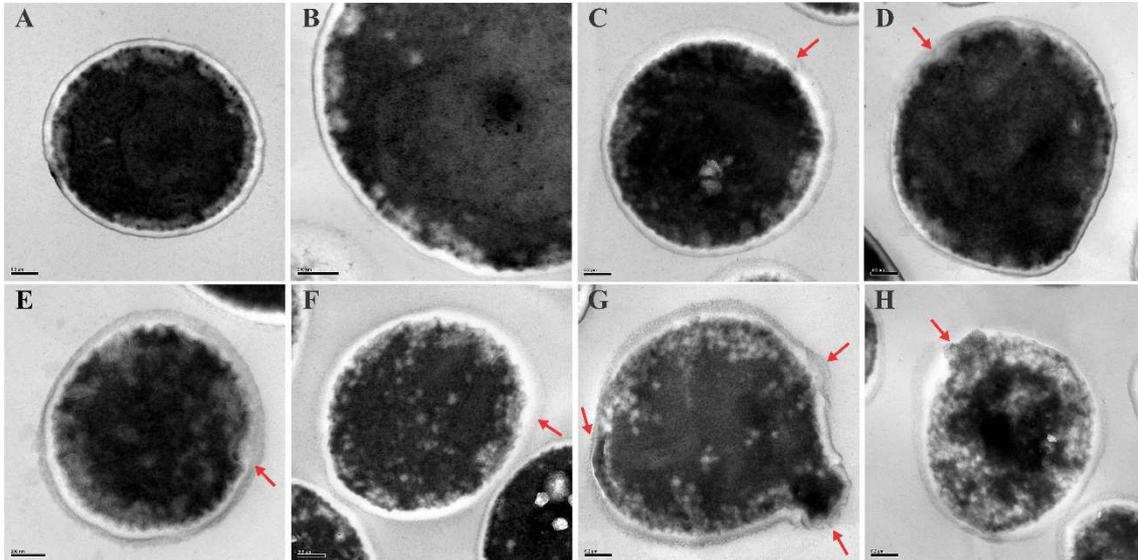


Figura 13. Alterações estruturais de *Candida glabrata* tratada com extratos e substâncias isoladas *Trichilia catigua*, nas concentrações correspondentes ao sub-CIM, por 24 h. (A-B) *C. glabrata* não tratada; (C) *C. glabrata* tratada com FAE; (D) *C. glabrata* tratada com cinchonina Ia; (E) *C. glabrata* tratada com cinchonina Ib; (F) *C. glabrata* tratada com cinchonina IIb; (G) *C. glabrata* tratada com Epi; (H) *C. glabrata* tratada com Pb2. Barra de escala = 200 nm (A-H). As setas indicam alterações estruturais de membrana.

No controle (A-B), observa-se a estrutura celular de *C. glabrata* com contornos regulares e membrana com traços bem delimitados e parede celular de espessura homogênea. Em todos os tratamentos podem ser observadas alterações expressivas na parede celular, com comprometimento da integridade das membranas. As células tratadas com cinchoninas Ia e Ib (D e E) apresentam danos e início de invaginações na parede celular, já as tratadas com cinchonina IIb praticamente não apresentam delimitação da membrana externa, e descoloração no citoplasma.

Resultados mais expressivos podem ser observados para Epi (G) e PB2 (H), onde houve rompimento da membrana com extravasamento de material celular, bem como regiões de pontilhados densos esbranquiçados, que sugerem a formação de vacúolos citoplasmáticos.

A parede celular fornece estabilidade, rigidez e resistência a estresses ambientais, desempenhando um papel crucial na patogenicidade e virulência das leveduras (Radhakrishnan *et al.*, 2018). Portanto, as alterações causadas pelas substâncias isoladas de catuaba podem resultar em desordens na integridade celular e fluidez da membrana.

De forma geral, como descrito no ítem 5.4.1, Epi e PB2, embora não apresentem resultados de inibição expressivos isoladamente em comparação às demais substâncias avaliadas, apresentaram bons resultados em atividade sinérgica com os antifúngicos anfotericina B e caspogungina. De acordo com o observado nas micrografias (figuras 12 e 13), ambas as substâncias apresentaram alterações morfológicas e estruturais de parede celular mais expressivas que as demais. Portanto, tal atividade sinérgica pode estar relacionada aos danos de membrana, como formação de poros, afinamento e alteração de fluidez, fazendo com que os antifúngicos consigam penetrar mais efetivamente nas células, apresentando maior potência com menores concentrações.

5.4.4 Bioinformática

De acordo com a avaliação feita pelo servidor SEA e com base nos valores de P-value e MaxTC fornecidos, todos os alvos listados nas tabelas S1-S6 (apêndice) têm probabilidade significativa de interagir com as substâncias avaliadas, como já discutido no ítem 5.3.4. As enzimas listadas na tabela 11 são alvos identificados pelo servidor SEA que estão presentes em *C. glabrata* e na espécie humana.

Tabela 11. Status das enzimas identificadas por docking reverso presentes no genoma de *Candida glabrata* e *Homo sapiens*, segundo a base de dados Uniprot.

Enzima alvo	<i>C. glabrata</i>	<i>H. sapiens</i>
zwf1	Putativo	-
pgd	Putativo	Confirmado
Arginase	Putativo	Confirmado
recA	Putativo	Proteínas com domínio recA
top1	Confirmado	Confirmado

As leveduras são organismos eucariotos, portanto, dividem muitos alvos em comum com os seres humanos, o que torna difícil o desenvolvimento de fármacos seletivos para os alvos fúngicos sem apresentar toxicidade para células humanas.

Na avaliação realizada neste trabalho, a enzima zwf1, chamada de glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (GFD), (EC:1.1.1.49) embora com status putativo, está presente em *C. glabrata* (Uniprot id: Q6FP06) e ausente em humanos. Isso a torna um alvo em potencial para as substâncias isoladas e extratos de *T. catigua*, o que pode justificar o efeito deletério observado nos experimentos de inibição e atividade sinérgica realizados com as leveduras (sessões 5.4 e 5.4.1) e ausência de toxicidade em células de mamíferos (sessão 5.2.2).

A enzima GFD de *C. glabrata* possui 48,58% de identidade com a enzima homóloga de humanos, cuja estrutura cristalográfica foi resolvida e está depositada no PDB sob o identificador 5ukw. Mesmo com as limitações das simulações realizadas, a diferença na identidade entre as duas estruturas

pode ser suficiente para justificar uma eventual ligação seletiva dos taninos do extrato de *T. catigua* na enzima de *C. glabrata*.

A GFD catalisa a etapa de limitação da velocidade da via oxidativa da pentose-fosfato, na qual a glicose-6-fosfato é convertida em ribulose-5-fosfato com redução simultânea duas unidades de NADP⁺ em NADPH, além de representar uma rota para a dissimilação de carboidratos além da glicólise (figura S3, apêndice). A principal função dessa enzima é fornecer energia redutora e fosfatos de pentose (figura S2, apêndice) para a síntese de ácidos graxos e ácidos nucleicos, porém, também participa da produção de glutatona reduzida, importante agente envolvido na inativação de radicais livres na célula (figura S4, apêndice) (Nelson *et al.*, 2005).

O metabolismo celular, que atende as demandas energéticas e biossintéticas dos organismos vivos, está estritamente ligado às operações de transferência de elétrons e reações redox. A manutenção da homeostase redox tem um impacto significativo não apenas no metabolismo celular, mas também em muitos outros processos, incluindo respostas ao estresse, sinalização intracelular, proteção de tióis proteicos, reações redox, bem como a remoção de xenobióticos (Kwolek-Mirek *et al.*, 2019).

Como um cofator redox, o NADPH desempenha um papel importante no metabolismo celular. É essencial para muitas etapas enzimáticas na biossíntese de macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A demanda celular de NADPH aumenta especialmente na fase de proliferação, devido a demanda na síntese de nucleotídeos para replicação do DNA (Kwolek-Mirek *et al.*, 2019).

Alterações da homeostase redox podem causar distúrbios significativos no perfil de replicação das células. Essa influência nos processos biossintéticos parece ser particularmente importante para células de leveduras em processo de brotamento, onde produtos de reações anabólicas são usados para manter a fisiologia adequada da célula-mãe. Consequentemente, distúrbios no metabolismo prejudicam a formação de botões de brotamento, diminuindo a capacidade de reprodução das leveduras na fase exponencial (Castegna *et al.*, 2010; Bilinski & Zadrag-Tecza, 2017).

A interrupção da principal rota celular de produção de NADPH força as células a restaurar a produção por vias alternativas para que a homeostase redox seja mantida para condução de processos celulares fundamentais, não tendo efeito direto sobre a vida celular. O objetivo dessas alternâncias é manter o equilíbrio redox necessário para conduzir processos celulares fundamentais. Embora essas mudanças não tenham efeito sobre a vida celular, elas levam a várias modificações no metabolismo que influenciam diretamente no potencial reprodutivo (Kwolek-Mirek *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação atribuído a redução da atividade metabólica causada por taninos, também foi observada nos trabalhos de Scalbert (1991) e Tasdemir e colaboradores (2006). A inibição da síntese de NADPH da via pentose fosfato, pela ligação das substâncias de *T. catigua* avaliadas à enzima zwf1,

justificaria o efeito fungistático observado na sessão 5.4, pois o déficit metabólico gerado inviabilizaria o processo reprodutivo de *C. glabrata*.

A hipótese também é compatível com os resultados observados na avaliação de sinergismo com anfotericina B e caspofungina (sessão 5.4.1), pois a ação combinatória sinérgica sugere que as substâncias apresentam, de forma geral, alvos farmacológicos distintos dos empregados pelos antifúngicos, e a diminuição da atividade metabólica deixaria as leveduras mais suscetíveis a ação dos medicamentos devido a redução da remoção de produtos de oxidação intracelular gerados e interferência no efluxo das drogas. As análises realizadas apresentaram como limitação a ausência da estrutura cristalográfica determinada de GFD de *C. glabrata*, não sendo possível a realização dos estudos de *docking* para a confirmação da hipótese.

6 CONCLUSÃO

Por meio das técnicas cromatográficas realizadas, foi possível determinar os *fingerprints* cromatográficos, bem como quantificar os marcadores fitoquímicos de FAE de *T. catigua*. A fração produzida apresentou perfil cromatográfico semelhante a extratos de mesma procedência descritos na literatura, bem como ausência de citotoxicidade para as linhagens celulares testadas.

Em relação a atividade antimicrobiana contra *H. pylori*, a FAE demonstrou redução da expressão gênica dos principais fatores de virulência, sinergismo com claritromicina e redução nas estruturas característica de biofilme. Os dados de *docking* reverso sugeriram que a atividade das substâncias avaliadas se deve ao efeito sinérgico de cinchonaína Ia e Epi, na interferência do sistema FAS II, potencialmente inibindo a síntese de ácidos graxos essenciais.

Em avaliação contra leveduras do gênero *Candida*, a FAE e cinchonaínas apresentaram excelentes resultados, especialmente contra *C. glabrata* e *C. krusei*. Os melhores resultados contra *C. glabrata* foram observados para a ação sinérgica de cinchonaína Ib e Epi, e FAE com Caspofungina. A PB2 de forma isolada e em combinação com Epi, apresentou atividade fortemente sinérgica com Anfotericina B, o que poderia diminuir a dosagem do medicamento na prática clínica, reduzindo os índices de nefrotoxicidade e desenvolvimento de resistência pela espécie fúngica. Ambas as substâncias apresentaram alterações morfológicas e estruturais mais expressivas em células de *C. glabrata*. As análises de bioinformática sugeriram que as substâncias analisadas apresentam afinidade e possível efeito inibitório na enzima *zwf1*, interferindo diretamente na atividade metabólica das leveduras, por interrupção na síntese de NADPH.

Em vista do problema de saúde pública relacionado a *H. pylori* e a leveduras patogênicas do gênero *Candida*, bem como a baixa disponibilidade atual de medicamentos para o combate às infecções, a FAE e substâncias isoladas de *T. catigua* apresentam excelente potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI, A.T.B. Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World J Gastroenterol.* v.23(16), p.2870-2882, 2017.
- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.* v.24, p.1122–1128, 1997.
- AGUIAR, Michelle Maria Gonçalves Barão de. Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral. 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- ALEXANDER, B.D.; JOHNSON, M.D.; PFEIFFER, C.D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; PERLIN, D.S.; PFALLER, M.A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin. Infect. Dis.* v.56(12), p.1724-32, 2013.
- ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Rev. Bras. de Farmacog.* v18, p.117-126, 2008.
- ALMEIDA-JR, J.N.; FRANCISCO, E.C.; HAGEN, F.; BRANDÃO, I.B.; PEREIRA, F.M.; DIAS, P.H.P.; COSTA, M.M.M.; JORDÃO, R.T.S.; GROOT, T.; COLOMBO, A.L. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *J. Fungi*, v.7, p. 220, 2021.
- ARENDRUP, M.C.; DZAJIC, E.; JENSEN, R.H.; JOHANSEN, H.K.; KJAELDGAARD, P.; KNUDSEN, J.D.; KRISTENSEN, L.; LEITZ, C.; LEMMING, L.E.; NIELSEN, L.; OLESEN, B.; ROSENVINGE, F.S.; RØDER, B.L.; SCHØNHEYDER, H.C. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin. Microbiol. Infect.* v.19, p.343–353, 2013.
- ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytother. Res.* v.15, p.416-421, 2001.
- ARANDA, P.S.; LAJOIE, D.M.; JORCYK, C.L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* v.33, p.366–369, 2012.
- AROTUPIN, D.J.; AWOJOBI, K.O.; GABRIEL-AJOBIEWE, R.A.O. Antimicrobial Activity of *Trichilia priedreana* Leaves Against Selected Pathogenic Organisms. *Trends in Applied Sciences Research.* v.3(1), p. 90-96, 2008.
- ASAHI, M.; AZUMA, T.; ITO, S.; ITO, Y.; SUTO, H.; NAGAI, Y.; TSUBOKAWA, M.; TOHYAMA, Y.; MAEDA, S.; OMATA, M.; SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. *Helicobacter*

- pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* v.191, p.593–602, 2000.
- ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.8, p.507–538, 1928.
- ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M., JR.; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* v.270, p.17771–17777, 1995.
- ATHERTON, J. Clinical Relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Gene Polymorphisms. *Gastroenterol.* v.135(1). p.91-99, 2008.
- BARCHIEESI, F.; SPREGNINI, E.; TOMASSETTI, S.; ARZENI, D.; GINNINI, D.; SCALISE, G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents.* v.49(12), p.4989-4992, 2005.
- BARBOSA, N.R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. *Phytother Res.* v.18, p.942-944, 2004.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. *DST-J. Bras. Doenças Sex. Transm., Rio de Janeiro*, v.22(1), p. 22-38, 2010.
- BASU, S.; GUGNANI, H.; JOSHI, S.; GUPTA, N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Rev. Ibero. de Micol.* v.20(4), p.137–140, 2003.
- BATES, D.W.; SU, L.; YU, D.T.; CHERTOW, G.M.; SEGER, D.L.; GOMES, D.R.; DASBACH, E.J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin. Infect. Dis.* v.32(5), p.686-93, 2001.
- BAUERFEIND, P.; GARNER, R.; DUNN, B.E.; MOBLEY, H.L.T. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut.* v.40, p.25–30, 1997.
- BAYEGAN, S.; MAJOROS, L.; KARDOS, L.; KEMÉNY-BEKE, A.; MISZTI, C.; KOVACS, R.; GESZTELYI, R. *In vivo* studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth *in vitro* in the presence of high concentration of caspofungin. *J. Microbiol.* v.48, p.170–173, 2010.
- BELTRAME, F.L.; RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F.A.P.; CORTEZ, D.A.G.; CASS, Q.B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *J. Chromatogr. A.* v.1119, p.257-263, 2006.
- BENTIRES-ALJ, M.; PAEZ, J.G.; DAVID, F.S.; KEILHACK, H.; HALMOS, B.; NAOKI, K.; MARIS, J.M.; RICHARDSON, A.; BARDELLI, A.; SUGARBAKER, D.J.; RICHARDS, W.G.; DU, J.; GIRARD, L.; MINNA, J.D.; LOH, M.L.; FISHER, D.E.;

- VELCULESCU, V.E.; VOGELSTEIN, B.; MEYERSON, M.; SELLERS, W.R.; NEEL, B.G. Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* v.64, p.8816–8820, 2004.
- BERNARDI, A.L.S.; FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCÃO, V.P.; NOZAWA, C.M.; MELLO, J.C.P.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. Effects of the *Trichilia catigua* (catuaba/catigua) inhibit Bovine herpesvirus-1 replication in cell culture. *Virus Rev. Res.* v.15, p.112-113, 2010.
- BIASOLI, M.S.; TOSELLO, M.E.; BOTTAI, H.; CUESTA, C.; MAGARÓ, H.M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses.* v.45, p.465–469, 2002.
- BLANCO, J.L.; GARCIA, M. Immune response to fungal infections. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* v.125(1-2), p.47-70, 2008.
- BILINSKI, T.; ZADRAG-TECZA, R. Yeast aging: reproduction strategies determine the longevity of budding and fission yeasts. In: Shefferson R, Owen JR, Salguero-Gómez R, eds. *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*. Cambridge: Cambridge University Press, p.362-380, 2017.
- BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J. of Hosp. Infect.* v.59, p.159–162, 2005.
- BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J. Ethnopharmacol.* v.143, p.179-187, 2012.
- BORMAN, A.M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E.M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere.* v.1(4), e00189-16, 2016.
- BRANDT, S.; KWOK, T.; HARTIG, R.; KONIG, W.; BACKERT, S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.102, p.9300–9035, 2005.
- BROWN, J.C.; HUANG, G.; HALEY-ZITLIN, V.; JIANG, X. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.75, p.848–852, 2009.
- CALDERONE, R.A.; CLANCY, C.J. *Candida* and Candidiasis. 2nd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2012.
- CAPOCI, I.R.G.; SAKITA, K.M.; FARIA, D.R.; RODRIGUES-VENDRAMINI, F.A.V.; ARITA, G.S.; OLIVEIRA, A.G.; FELIPE, M.S.; MAIGRET, B.; BONFIM-MENDONÇA, P.S.; KIOSHIMA, E.S.; SVIDZINSKI, T.I.E. Two new 1,3,4-oxadiazoles with effective antifungal activity against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* v.10 article 2130, 2019.
- CARDONA-CASTRO, N.; REVANKAR, S.G.; ORTIZ, P.; CUERVO, C.; KIRKPATRICK, W.R.; MCATEE, R.K.; PATTERSON, T.F. Proteinase detection, DNA typing and

- antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from Colombian women with vulvovaginal candidiasis. *Rev. Iberoam. Micol* v.19, p.89-94, 2002.
- CASTEGNA, A.; SCARCIA, P.; AGRIMI, G.; PALMIERI, L.; ROTTENSTEINER, H.; SPERA, I.; GERMINARIO, L.; PALMIERI, F. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J of Biol Chem*. v.285(23), p 17359–17370, 2010.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; LEIDICH, S.D.; FADDOUL, F.F.; HOYER, L.L.; DOUGLAS, L.J.; GHANNOUM, M.A. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* v.80, p.903-908, 2001.
- CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J. Ethnopharmacol.* v.137, p.1143-1148, 2011.
- CHAUHAN, N.; LI, D.; SINGH, P.; CALDERONE, R.; KRUPPA, M. The cell wall of *Candida* spp.; ASM Press: Washington, DC, 2002.
- CHOWDHURY, R.; CHOWDHURY, R. Host Cell Contact Induces Fur-dependent Expression of Virulence Factors CagA and VacA in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. v.19, p.17–25, 2013.
- CHEN, M.; ZHENGANG, Z.; YU, S. Cytotoxicity and apoptotic effects of polyphenols from sugar beet molasses on colon carcinoma cells *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* v.17(7), p.993, 2016.
- CLEARY, J.D.; GARCIA-EFFRON, G.; CHAPMAN, S.W.; PERLIN, D.S. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to a FKS1 mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.52, p.2263-2265, 2008.
- CLSI, Norma M45-A2: Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline - second edition. v.30(18), 2011.
- CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- COLE, S.P.; HARWOOD, J.; LEE, R.; SHE, R.; GUINEY, D. Characterization of Monospecies Biofilm Formation by *Helicobacter pylori*. *J. of Bacteriol.* p. 3124–3132, 2004.
- COLOMBO, A.L., CORTES, J.A., ZURITA, J., GUZMAN-BLANCO, M., ALVARADO MATUTE, T., QUEIROZ-TELLES, F., SANTOLAYA, M.E., TIRABOSCHI, I.N., ECHEVARRÍA, J., SIFUENTES, J., THOMPSON-MOYA, L., NUCCI, M. Latin America Invasive Mycosis Network. Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Latin America Invasive Mycosis Network. *Rev Iberoam Micol.* v.30, p.150-157, 2013.

- CUI, J.; BIAO, R.; YAOJUN, T.; HUANQIN, D.; LIXIN, Z. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virul.* v.6(4), p.362-371, 2015.
- DEL GIUDICE, G., COVACCI, A., TELFORD, J.L. MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu. Rev. Immunol.* v.19, p.523–563, 2001.
- DEORUKHKAR, S.C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Intern. J. of Microbiol.* v.2014, p.1–6, 2014.
- ENDO, E.H.; CORTEZ, D.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res. in Microbiol.* v.161, p.534-540, 2010.
- ESPADA, S.F.; FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCAO, V.P.; BERNARDI, A.L.; LOPES, N.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P, LINHARES, R.E.; NOZAWA, C. Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for Herpesvirus and Poliovirus. *Current Pharm. Biotechnol.* v.16, p.724-732, 2015.
- ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M.A.; MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller, *Curr Protoc Bioinforma.* Chapter 5, 2006.
- FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCÃO, V.P.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.C.; RAMOS, A.P.D.; 2008. Antiviral activity of crude extract and the aqueous and acetate fractions from *Trichilia catigua* against poliovirus. In: XIX National Meeting of Virology, III Mercosur Meeting of Virology, Caxambu, Brasil, 2008.
- FERNANDES, E.V.; RAMOS, A.C.; SANTOS, A.H.; LONGHINI, R.; GERARDIN, D.C.C.; VENANCIO, E.J. Effects of maternal exposure to extract of *Trichilia catigua* on antibody production in the offspring of Wistar rats. *Nat Prod Res.* v.33(5), p.763-766, 2019.
- FIDEL-JR, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* v.12(1), p.80-96, 1999.
- FONSECA, E.; SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ALVES, C.T.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Effects of fluconazole on *Candida glabrata* biofilms and its relationship with ABC transporter gene expression. *Biofouling.* v.30, p.447–457, 2014.
- FREIRES, I.A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* v.20, p.7329-7358, 2015.

- FUJIKAWA, A.; SHIRASAKA, D.; YAMAMOTO, S.; OTA, H.; YAHIRO, K.; FUKADA, M.; SHINTANI, T.; WADA, A.; AOYAMA, N.; HIRAYAMA, T.; FUKAMACHI, H.; NODA, M. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptortype Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat. Genet.* v.33, p.375–381, 2003.
- GOMES, R.M.; PAULO, L.F.; PANIZZON, C.P.B.; NEVES, C.Q.; CORDEIRO, B.C.; ZANONI, J.N.; FRANCISCO, F.A.; PIOVAN, S.; FREITAS-MATHIAS, P.C.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, J.C.; PEDRINO, G.R.; SILVA-REIS, A.A.; CECCHINI, A.L.; NATALI, M.R.M. Anti-Diabetic Effects of the Ethyl-Acetate Fraction of *Trichilia catigua* in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem.* v.42(3), p.1087-1097, 2017.
- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; TSUTSUMI, M.T.; ROQUE, N.F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochem.* v.45, p.141-148, 1997.
- GARCIA-EFFRON, G.; CHUA, D.J.; TOMADA, J.R.; DIPERSIO, J.; PERLIN, D.A.; GHANNOUM, M.; BONILLA, H. Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.54, p.2225–2227, 2010.
- GARCÍA-RODAS, R.; GONZÁLEZ-CAMACHO, F.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. The Interaction between *Candida krusei* and Murine Macrophages Results in Multiple Outcomes, Including Intracellular Survival and Escape from Killing. *Infect. and immun.* v.79(6), p.2136–2144, 2011.
- GODINHO, J.; OLIVEIRA, R.M.W.; SA-NAKANISHI, A.B.; BACARIN, C.C.; HUZITA, C.H.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; PREVIDELLI, I.S.; RIBEIRO, M.H.D.M.; MILANI, H. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats. *Behav. Brain Res.* v.337, p.173-182, 2018.
- GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian Journal of Medical Microbiology.* v.30 (3), p.270–278, 2012.
- GHIARA, P.; ROSSI, M.; MARCHETTI, M.; DI TOMMASO, A.; VINDIGNI, C.; CIAMPOLINI, F.; COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DE MAGISTRIS, M.T.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect. Immun.* v.65, p.4996–5002, 1997.
- GLAXOSMITHKLINE, 2016. Prescribing information AM:L30. Amoxil®. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050760s11,050761s11,050754s12,050542s25lbl.pdf. Acesso em 05/06/2019.
- GOW, N.A.R.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A.J.P.; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Rev. Microbiol.* v.10, p.112–122, 2012.

- GULATI, M., NOBILE, C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms, *Microbes Infect.* 18, 310-321, 2016.
- GULLU, A.U.; AKCAR, M.; ARNAZ, A.; KIZILAY, M. *Candida parapsilosis* tricuspid native valve endocarditis: 3-year follow-up after surgical treatment. *ICVTS.* v.7, p.513-514, 2008.
- HA, N.C.; OH, S.T.; SUNG, J.Y.; CHA, K.A.; LEE, M.H.; OH, B.H. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.* v.8(6), p.505-509, 2001.
- HA, J.F.; ITALIANO, C.M.; HEATH, C.H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F.M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. *Burns.* v.37, p.181-195, 2010.
- HAKKI, M.; STAAB, J.F.; MARR, K.A. Emergence of *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob. Agents. Ch.* v.50(7) p.2522-2524, 2006.
- HAMEED, A.; AL-RASHIDA, M.; UROOS, M.; QAZI, S.U.; NAZ, S.; KHAN, K.M. A patent update on therapeutic applications of urease inhibitors (2012–2018). *Expert Opin on Therap Pat.* v.29(3), p.181-189, 2019.
- HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomed.* v.14, p.733-738, 2007.
- HATAKEYAMA, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer.* v.4, p.688–694, 2004.
- HATAKEYAMA, M.; HIGASHI, H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* v.96(12), p.835-843, 2005.
- HERNANDEZ-CASTRO, R.; ARROYO-ESCALANTE, S.; CARRILLO-CASAS, E.M. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *J. of Euro. Ped.* v.169, p.783–787, 2010.
- HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans* *J. Antimicrob. Chemother.* v.53, p.225-229, 2004.
- HOOI, J.K.Y.; LAI, W.Y.; NG, W.K.; SUEN, M.M.Y.; UNDERWOOD, F.; TANYINGOH, D.; MALFERTHEINER, P.; GRAHAM, D.Y.; WONG, V.W.S.; WU, J.C.Y.; CHAN, F.K.L.; SUNG, J.J.Y.; KAPLAN, G.G.; NG, S.C. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol.* v.153, p.420–429, 2017.
- HORN, D.L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E.J.; FISHMAN, J.A.; STEINBACH, W.J.; OLYAEI, A.J.; MARR, K.A.; PFALLER, M.A.; CHANG, C.H.; WEBSTER, K.M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* v.48, p.1695–1703, 2009.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* v.61(2), p.69-90, 2011.

- JENSEN, R.H.; JOHANSEN, H.K.; SØES, L.M.; LEMMING, L.E.; ROSENVINGE, F.S.; NIELSEN, L.; OLESEN, B.; KRISTENSEN, L.; DZAJIC, E.; ASTVAD, K.M.T.; ARENDRUP, M.C. Posttreatment antifungal resistance among colonizing *Candida* isolates in candidemia patients: results from a systematic multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* v.60, p.1500–508, 2016.
- JEON, S.Y.; BAE, K.; SEONG, Y.H. K.; SONG, K.S. Green tea catechins as a BACE1 (β -Secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v.13, p.3905–3908, 2003.
- JIANG, H.Z.; QUAN, X.F.; TIAN, W.X.; HU, J.M.; WANG, P.C.; HUANG, S.Z.; CHENG, Z.Q.; LIANG, W.J.; ZHOU, J.; MA, X.F.; ZHAO, Y.Z. Fatty acid synthase inhibitors of phenolic constituents isolated from *Garcinia mangostana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v.20, p.6045–6047, 2010.
- JUDD, L.M.; ALDERMAN, B.M.; HOWLETT, M.; SHULKES, A.; DOW, C.; MOVERLEY, J.; GRAIL, D.; JENKINS, B.J.; ERNST, M.; GIRAUD, A.S.; Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterol.* v.126, p.196–207, 2004.
- KATIYAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agentes. Chemother.* v.50, p.2892-2894, 2006.
- KEARNEY, D.J. Retreatment of *Helicobacter pylori* infection after initial treatment failure. *J. Gastroenterol.* v.96, p.1335–1339, 2001.
- KEISER, M.J.; ROTH, B.L.; ARMBRUSTER, B.N.; ERNSBERGER, P.; IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol.* v.25, p.197–206, 2007.
- KERSULYTE, D.; ROSSI, M.; BERG, D.E. Sequence divergence and conservation in genomes of *Helicobacter cetorum* strains from a dolphin and a whale. *PLoS ONE.* v.8, e83177, 2013.
- KIM, S.K.; EL BISSATI, K.; BEN MAMOUN, C. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiol.* v.152, p.2885–2894, 2006.
- KIM, S.; THIESSEN, P.A.; BOLTON, E.E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B.A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* v.44, p;1202-1213, 2016.
- KOCSUBÉ, S.; TÓTH, M.; VÁGVÖLGYI, C.; DÓCZI, I.; PESTI, M.; PÓCSI, I.; SZABÓ, J.; VARGA, J. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J. Med. Microbiol.* v.56, p.190-195, 2007.
- KOLACZKOWSKI, M.; KOLACZKOWSKA, A.; SODRA, K.; RAMALHETE, C.; MICHALAK, K.; MULHOVO, S.; FERREIRA S. Substrate and modulators of the multidrug transporter

- Cdr1p of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. *Mycoses*. v.53(4), p.305-310, 2010.
- KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis. *J. of Physiol and Pharmacol*. v.60(3), p.3–21, 2009.
- KUCHARÍNOVÁ, S.; TOURNU, H.; HOLTAPPELS, M.; VAN DIJCK, P.; LAGROU, K. *In vivo* efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated candidiasis. *Antimicrob. Agents. Ch*. v.54, p.4474–4475, 2010.
- KUNNAMBATH, P.M.; THIRUMALAISAMY, S. Characterization and utilization of tannin extract for the selective adsorption of Ni (II) ions from water. *J Chem*. v.2015, article ID 498359, 9 p.,
- KUWAHARA, H.; MIYAMOTO, Y.; AKAIKE, T.; KUBOTA, T.; SAWA, T.; OKAMOTO, S.; MAEDA, H. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxydinitrite via carbon dioxide production. *Infect. Immun*. v.68, p.4378–4383, 2000.
- KWOLEK-MIREK, M.; MASLANKA, R.; MOLON, M. Disorders in NADPH generation via pentose phosphate pathway influence the reproductive potential of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast due to changes in redox status. *J Cell Biochem*. v.120, p.8521- 8533, 2019.
- KYRIAKIDIS, I.; TRAGIANNIDIS, A.; MUNCHEN, S.; GROLL, A.H. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opin Drug Saf*. v.16(2), p. 149-165, 2017.
- LADEIRA, M.S.P; SALVADORI, D.M.F; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. v.39(4), p.335-342, 2003.
- LAFHEY, S.F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiol*. v.151, p.1073–1081, 2005.
- LAGOS, J.B. 2006. Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. Dissertação de mestrado. Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 117p.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. v.45, p.999–1007, 2001.
- LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr. Med. Res. Opin*. v.25, p.1732–1740, 2009
- LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *J. Dent. Res*. v.86(3), p.204-215, 2007.
- LIMA, V.P.; RABENHORST, S.H.B. Genes associados a virulência de *Helicobacter pylori*. *Rev. Bra. de Cancerol*. v.55(4), p.389-396, 2009.
- LOGUE, M.E.; WONG, S.; WOLF, K.H.; BETLER, G. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL1 allele at its mating type locus. *Eukar. Cell*. v.4(6), p.1009-1017, 2005.
- LONNI, A.A.S.G.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal Chim. Acta*. v.719, p.57-60, 2012.

- LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M.L.; SILVA-JUNIOR, W.V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N.P.; MELLO, J.C.P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Sep. Sci.* v.36, p.1247–1254, 2013.
- LONGHINI, R.; LONNI, A.A.S.G.; SEREIA, A.L.; KRZYZANIAK, L.M.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. *Rev. Bras.Farmacog.* v.27(2), p.254-27, 2017.
- MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* v.22, p.187-193, 2005.
- MALFERTHEINER, P.; SCHULTZE, V.; ROSENKRANZ, B.; KAUFMANN, S.H.; ULRICH, T.; NOVICKI, D.; NORELLI, F.; CONTORNI, M.; PEPPOLONI, S.; BERTI, D.; TORNESE, D.; GANJU, J.; PALLA, E.; RAPPUOLI, R.; SCHARSCHMIDT, B.F.; DEL GIUDICE, G. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: A phase I study. *Gastroenterol.* v.135, p.787–795, 2008.
- MARCUS, E.A.; MOSHFEGH, A.P.; SACHS, G.; SCOTT, D.R. The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J. Bacteriol.* v.187, p.729–738, 2005.
- MARQUES, L.C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal Catuaba. *Rev. Racine.* v.8, p.8-11, 1998.
- MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N.J.; GENET, J.P.; SANTOS, A.F.; DE ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochem.* V.66, p. 1804-1811, 2005.
- MARTINELLI, F.R., 2010. Cinchonáinas – método cromatográfico e produção de padrões para controle de qualidade de extratos polares de catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss.). Dissertação de mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 139 p.
- MATOS, A. P. Busca de compostos inseticidas: estudo das espécies do gênero *Trichilia* (Meliaceae). 2006. 194f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Carlos, São Carlos.
- MATOS, A.P.; NEBO, L.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA-SILVA, M.F.G.F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catiguá* (Meliaceae). *Quim. Nova.* v.32, p.1553-1556, 2009.
- MÉGRAUD, F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* v.53(9), p.1374–1384, 2004.
- MENG, X.Y.; ZHANG, H.X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* v.7, p.146-157, 2011.

- MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infect. Dis.* v.11(2), p.142-151, 2011.
- MING, L.C.; CORREA-JUNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina State – Brazil. *Acta Hortic.* v.569, p.91-94, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- MIRANDA, L.N.; VANDERHEIJDEN, I.M.; COSTA, S.F.; SOUSA, A.P.; SIENRA, R.A.; GOBARA, S.; SANTOS, C.R.; LOBO, R.D.; PESSOA, V.P.; LEVIN, A.S. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J. of Hosp. Infect.* v.72, p.9–16, 2009.
- MOTSEI, L.; LINDSEYJVAN, K.; STADEN, L.; JÄGER, A.K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J. of Ethnopharmacol.* v.86(2-3), p.235-241, 2003.
- MOR, V.; RELLA, A.; FARNOUD, A.M.; SINGH, A.; MUNSHI, M.; BRYAN, A.; NASEEM, S.; KONOPKA, J.B.; OJIMA, I.; BULLESBACH, E.; ASHBAUGH, A.; LINKE, M.J.; CUSHION, M.; COLLINS, M.; ANANTHULA, H.K.; SALLANS, L.; DESAI, P.B.; WIEDERHOLD, N.P.; FOTHERGILL, A.W.; KIRKPATRICK, W.R.; PATTERSON, T.; WONG, L.H.; SINHA, S.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; FLAHERTY, P.; PAN, X.; CESAR, G.V.; TAVARES, P.M.; FRASES, S.; MIRANDA, K.; RODRIGUES, M.L.; LUBERTO, C.; NIMRICHTER, L.; DEL POETA, M. Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *MBio.* v.6(3), e00647, 2015.
- MORRIS, G.M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M.F.; BELEW, R.K.; GOODSELL, D.S.; OLSON, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* v.30, p.2785–2791, 2009.
- NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v.67, p.400–428, 2003.
- NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; ISHIDA, K. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* v.58, p.942–949, 2006.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Clarithromycin, CID=84029, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clarithromycin> (acesso em junho/2019).
- NEBO, L., 2008. Atividade inseticida de espécies de *Trichilia* frente à lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 180p.

- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SVIDZINSKI, T.; OLIVEIRA, R. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. *Med. Micol.* v.49, p.739–47, 2011.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v.31, p.1399–1412, 2012.
- NEGRI, M.; SALCI, T.P.; SHINOBU-MESQUITA, C.S.; CAPOCI, I.R.; SVIDZINSKI, T.I.; KIOSHIMA, E.S. Early state research on antifungal natural products. *Molecules.* v.19(3), p.2925-2956, 2014.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth; 2005.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* v.83(3), p.770-803, 2020.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* v.51, p.561-570, 2010.
- ODENBREIT, S.; PÜLS, J.; SEDLMAIER, B.; GERLAND, E.; FISCHER, W.; HAAS R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* v.287, p.1497–1500, 2000.
- OLIVEIRA, M.L.M. Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.e do óleo fixo de *Caryocar coreacium* Wittm. Sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação de Mestrado. Fortaleza.Universidade federal do Ceará, 2004. 113p.
- OLIVERA-SEVERO, D.; UBERTI, A.F.; MARQUES, M.S.; PINTO, M.T.; GOMEZ-LAZARO, M.; FIGUEIREDO, C.; LEITE, M.; CARLINI, C.R. A New Role for *Helicobacter pylori* Urease: Contributions to Angiogenesis. *Front. Microbiol.* v.8, p.1883, 2017.
- OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Japan. J of infec. diseas.* v.60 (5), p.280–283, 2007.
- OMS, 2018. WHO global report on tradicional and complementary medicine. Disponível em: <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf> (acesso em 05/2021).
- ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J., PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J. of Hosp. Infect.* v.77 (2), p.157-161, 2011.

- PAHWA, N.; KUMAR, R.; NIRKHIWALE, S.; BANDI, A. Species distribution and drug susceptibility of *Candida* in clinical isolates from a tertiary care centre at Indore. *Ind. J. of Med. Microbiol.* v.32(1), p.44–48, 2014.
- PAIS, P.; GALOCHA, M.; VIANA, R.; CAVALHEIRO, M.; PEREIRA, D.; TEIXEIRA, M.C. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microb Cell.* v.6(3), p.142-159, 2019.
- PAGADALA, N.S., SYED, K., & TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews.* v.9, p.91–102, 2017.
- PAMMI, M.; HOLLAND, L.; BUTLER, G.; GACSER, A.; BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ped. Infec. Dis. J.* v.32, p.206-216, 2013.
- PANIZZON, C.P.B.; MIRANDA, M.H.; RAMALHO, F.V.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P.; ZANONI, J.N. Ethyl Acetate Fraction from *Trichilia catigua* Confers Partial Neuroprotection in components of the Enteric Innervation of the Jejunum in Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem.* v.53(1), p.76-86, 2019.
- PARSONS, J.B.; ROCK, C.O. Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery?. *Cur.Opin. in Microbiol.* v.14, p.544–549, 2011.
- PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* v.30 (9), e36. PMID: 11972351, 2002.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* v.20(1), p.133-63, 2007.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* v.46, p.515–521, 2008.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Rev. in Microbiol.* v.36, p.1-53, 2010.
- PHILLIPS, J.C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R.D.; KALE, L.; SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* v.26, p.1781–1802, 2005.
- PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H; GRISAR, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomed.* v.9, p.422-426, 2002a.
- PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A.J.; SMÂNIA, E.F.A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeit. der Naturfor.* v.57, p.483–488, 2002b.

- RADHAKRISHNAN, V.S.; MUDIAM, M.K.R.; KUMAR, M.; DWIVED, S.P.; SINGH, S.P.; PRASAD, T. Silver nanoparticles induced alterations in multiple cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *Int J Nanomedicine*. v.13, p. 2647–2663, 2018.
- RAY, D.; GOSWAMI, R.; BANERJEE, U.; DADHWAL, V.; GOSWAMI, D.; MANDAL, P.; SREENIVAS, V.; KOCHUPILLAI, N. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diab. Care*. v.30(2), p.312-317, 2007.
- RESENDE, F.O., 2007. *Trichilia catigua*: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro. Dissertação de mestrado. Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 167p.
- RESENDE, F.O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J.C.P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *J Braz Chem Soc*. v.22, p.2087-2093, 2011.
- RHEAD, J.L.; LETLEY, D.P.; MOHAMMADI, M.; HUSSEIN, N.; MOHAGHEGHI, M.A.; ESHAGH HOSSEINI, M.; ATHERTON, J.C. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterol*. v.133, p.926–936, 2007.
- RITTER, M. R. 2016. Avaliação do potencial antimicrobiano in vitro de *Trichilia catigua* e caracterização química da fração oligomérica aquosa. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 102p.
- RITTER, M.R.; OLIVEIRA, M.T.; MAKIMORI, R.Y.; SEREIA, A.L.; SIMIONATO, A.S.; CHIERRITO, D.; ANDRADE, G.F.; OLIVEIRA, A.G.; SILVA, D.B.; NOVELLO, C.R.; MEDEIROS, D.C.; DIAS-FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Dimeric glycosylated flavan-3-ol and antimicrobial *in vitro* evaluation of *Trichilia catigua* extracts. *Nat. Prod. Res*. v.9, p.1-8, 2019.
- RODRIGUES, C.F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. v.33, p.673–688, 2014.
- RODRÍGUEZ-RAMIRO, I.; RAMOS, S.; BRAVO, L.; GOYA, L.; MARTÍN, M.A. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *The J. of Nut. Biochem*. v.22(12) p.1186-1194, 2011.
- ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; KREMENOPOULOS, G.; WALSH, T.J. *Candida tropicalis* is a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J. Clin. Microbiol*. v.41(2), p.735-741, 2003.

- ROSSI, G.; RUGGIERO, P.; PEPPOLONI, S.; PANCOTTO, L.; FORTUNA, D.; LAURETTI L VOLPINI, G.; MANCIANTI, S.; CORAZZA, M.; TACCINI, E.; DI PISA, F.; RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: Safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect. Immun.* v.72, p.3252–3259, 2004.
- ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.D.M.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular. 1ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2006.
- ROTA, J. F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.
- RUGGIERO, P.; TOMBOLA, F.; ROSSI, G.; PANCOTTO, L.; LAURETTI, L.; DEL GIUDICE, G.; ZORATTI, M. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* v.50, p.2550–2552, 2006.
- RUIJTER, J.M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W.M.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M.J.; MOORMAN, A.F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* v.37, e45, 2009.
- RUIJTER, J.M.; PFAFFL, M.W.; ZHAO, S. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods.* v.59, p.32–46, 2013.
- RUIZ-SANCHEZ, D.; CALDERON-ROMERO, L.; SANCHEZ-VEJA, J.T; TAY, J. Intestinal candidiasis: A clinical report and comments about this opportunistic pathology. *Mycopathol.* v.156, p.9–11, 2002.
- SACHIKONYE, M.; MUKANGANYAMA, S. Antifungal and Drug Efflux Inhibitory Activity of Selected Flavonoids Against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *J. of Biol. Act. Prod. from Nat.* v.6(3), 2016.
- SAITO, N.; KONISHI, K.; SATO, F.; KATO, M.; TAKEDA, H.; SUGIYAMA, T.; ASAKA, M. Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J Infect.* v.46, p.49–55, 2003.
- SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* v.41, p.295–310, 1994.
- SAMARANAYAKE, Y.H.; WU, P.C.; SAMARANAYAKE, L.P.; SO, M.; YUEN, K.Y. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J. Med. Microbiol.* v.41, p.250–258, 1994.
- SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Dissertação de Mestrado. Santa Catarina. Universidade do Vale do Itajaí. 2005, 81p.

- SATOH, M.; YBSHIOSATOH, A.; FUJIMOTO Y. Cytotoxic Constituents from *Eirythroaylum catuaba* Isolation and Cytotoxic activities of Cinchonain. *Nat. med.* v.54(2), p.97-100, 2000.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* v.30, p.3875-3883, 1991.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, B.I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismo das doenças infecciosas*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 642p.
- SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; WEEKS, D.L.; LEE, A.; MELCHERS, K.; SACHS, G. Expression of the *Helicobacter pylori* ureI Gene Is Required for Acidic pH Activation of Cytoplasmic Urease. *Infect. and immun.* v.68(2), p.470–477, 2000.
- SEREIA, A.L.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Capillary electrophoresis as tool for diastereomeric separation in a *Trichilia catigua* fraction. *Phytochem. Anal.* v.28, p.144–150, 2017.
- SEREIA, A.L.; OLIVEIRA, M.T.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L.L.M.; RIBEIRO, F.M.; ISOLANI, R.G.; MEDEIROS, D.C.; CHIERRITO, D.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; ZIELINSKI, A.A.F.; NOVELLO, C.R.; NAKAMURA, C.V.; MANTOVANI, M.S.; MELLO, J.C.P. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLoS ONE.* v.14(2), e0212089, 2019.
- SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; MASOKO, P.; ELOFF, J.N. Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. *South Afr. J. of Bot.* v.74(4), p.677-684, 2008.
- SHAN, B.; CAI, Y.Z.; BROOKS, J.D.; CORKE, H. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chem.* v.109, p.530–537, 2008.
- SHAO, L. C.; SHENG, C. Q.; ZHANG, W. N. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yao Xue Xue Bao.* v.42, p. 1129–1136, 2007.
- SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.75(2), p.213–67, 2011.
- SHINOBU, C.S.; OGATTA, S.F.Y.; BIZERRA, F.; FURLANETO, L.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vagina secretion. *Braz. J. Microbiol.* v.38, p.467-471, 2007.
- SILVA, A.J. Estudo botânico e químico da catuaba (*Erythroxylaceae* catuaba do Norte): PARTE III – Estudo químico da catuaba. *Rev. Bras. Farmacogn.* v.15, p.77-81, 2005.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J. Med. Microbiol.* v.59, p.747–754, 2010.

- 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 Microbiol. Rev.* v.36, p. 288–305, 2011.
- SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURAO, K.S.M.; SILVERIO, A. Morphology and Anatomy of the Flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Braz. arch. biol. technol.* v.44(4), p.383-393, 2001.
- STEIN, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl Acad. Sci.* v.97, p.1263–1268, 2000.
- STERLING, T.; IRWIN, J.J. ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* v.55, p.2324–2337, 2015.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L, LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* v.4, 2021.
- SZEWCZUK, L.M.; PENNING, T.M. Mechanism-Based Inactivation of COX-1 by Red Wine m - Hydroquinones: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Nat. Prod.* v.67, p.1777–1782, 2004.
- STROLLO, S.; LIONAKIS, M.S.; ADJEMIAN, J.; STEINER, C.A.; PREVOTS, D.R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002–2012. *Emerg Infect Dis.* v.23(1), p.7-13, 2016.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Molecular fingerprints to identify *Candida* species. *Biomed Res Int.* Article ID 923742, 10p., 2013.
- TABANCA, N.; PAWAR, R.S.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J.; KHAN, S.I.; JOSHI, V.; WEDGE, D.E.; KHAN, I.A. Flavan-3-ol phenylpropanoid conjugates from *Anemopaegma arvense* and their antioxidant activities. *Planta Med.* v.73, p.1107-1111, 2007.
- TANAKA, T.; KAWASE, M.; TANI, S. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. *Bioorg. and Med. Chem.* v.12(2), p.501–505, 2004.
- TANG, W.; HIOKI H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J. of Nat. Prod.* v.70, p.2010–2013, 2007.
- TARTAGLIA, M.; NIEMEYER, C.M.; FRAGALE, A.; SONG, X.; BUECHNER, J.; JUNG, A.; HÄHLEN, K.; HASLE, H.; LICHT, J.D.; GELB, B.D. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* v.34, p.148–50, 2003.

- TASDEMIR, D., LACK, G., BRUN, R., RÜEDI, P., SCAPOZZA, L. AND PEROZZO, R. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J Med Chem.* v.49(11), p.3345-3353, 2006.
- TEODORO, G.R.; BRIGHENTI, F.L.; DELBEM, A.C.B.; KHOURI, S.; GONTIJO, A.V.L.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J.; KOGA-ITO, C.Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. *Fut. Microbiol.* v.10(6), p.917-927, 2015.
- THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2005. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 1Dec 2015.
- Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html.
- THOMPSON, G.R.; WIEDERHOLD, N.P.; VALLOR, A.C.; VILLAREAL, N.C.; LEWIS, J. S.; PATTERSON, T.F. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infections. *Antimicrob. Agents. Chemother.* v.52, p.3783-3785, 2008.
- TIRABOSCHI, I.N.; CARNOVALE, S.; BENETUCCI, A.; FERNÁNDEZ, N.; KURLAT, I.; FOCCOLI, M.; LASALA, M.B. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología. *Ver. Iberoam. Micol.* v.24, p.263-267, 2007.
- TIWARI, B.K.; VALDRAMIDIS, V.P.; O' DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food. Chem.* v.57(14), p.5987-6000, 2009.
- TOMBOLA, F.; CAMPELLO, S.; DE LUCA, L.; RUGGIERO, P.; DEL GIUDICE, G.; PAPINI, E.; ZORATTI, M. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* v.543, p.184-189, 2003.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.
- TREVISAN, D.; DA SILVA, P.; FARIAS, A.; CAMPANERUT-SÁ, P.; RIBEIRO, T.; FARIA, D.; DE MENDONÇA, P.; DE MELLO, J.; SEIXAS, F.; MIKCHA, J. Antibacterial activity of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) against *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in silico* studies. *Lett. Appl. Microbiol.* v.71, p.259-271, 2020.
- TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* v.31, p.455-461, 2010.
- TRUITI, M.T.; SOARES, L.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction protects against cognitive impairments and hippocampal cell death induced by bilateral common carotid occlusion in mice. *J. Ethnopharmacol.* v.172, p.232-237, 2015.
- VALLABHANENI, S.; MODY, R.K.; WALKER, T.; CHILLER, T. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* v.30(1), p.1-11, 2016.

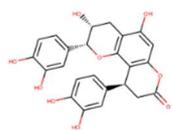
- VALE, G.C.; RENDE, J.C.; OKURA, M.H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. *NewsLab*. v.17(1), p. 202-222, 2010.
- VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agentes*. Ch. v.49(11), p.4608-4615, 2005.
- VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGÈS, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob. Agents*. Ch. v.51, p.982-990, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.M.; PEREIRA, E.C.; CHAVES, E.M.C.; LOBATO, R.F.G.; BARBOSA-FILHO, J.M.; PATROCÍNIO, M.C.A. Pharmacologic study of some plant species from the Brazilian Northeast: *Calotropis procera*, *Agave sisalana*, *Solanum paludosum*, *Dioscorea cayenensis* and *Crotalaria retusa*. In: Varela A., Jasiah Ibañez J., editors. *Medicinal Plants: Classification, Biosynthesis and Pharmacology*. Vol. 4. Nova Science Publishers, Inc.; Hauppauge, NY, USA. p.189-202, 2009.
- VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*. v.28, p.85-94, 2005.
- VERSTRAETEN, S.V.; HAMMERSTONE, J.F.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J. Agric. Food. Chem*. v.53(12), p.5041-8, 2005.
- VIANA, A.F.; MACIEL, I.S.; MOTTA, E.M.; LEAL, P.C, PIANOWSKI L.; CAMPOS M.M.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evi. based Comp. and Alt. Med*. v.2011, 2009.
- VICENTINI, F.A.; BARBOSA, M.M.C.; Fortunato, M.C.; Amado, C.A.B.; Comar, J.F.; Longhini, R.; Mello, J.C.P.; Natali, M.R.M. Treatment with *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats. *Biomed Pharmacother*. v.107, p.194-202, 2018.
- VINITHA, M.; MAMATHA, B. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *J. of Global Infect. Dis*. v.3(1), p.4-8, 2011.
- VOS, M.C.; ENDTZ, H.P.; HORST-KREFT, D.; DOORDUIJN, J.; LUGTENBURG, E.; VERBRUGH, H.A.; LÖWENBERG, B.; DE MARIE, S.; VAN PELT, C.; VAN BELKUM, A. *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. *J. Clin. Microbiol*. v.44(3), p.1111-1114, 2006.
- WARREN, J.R., MARSHALL, B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. v.11273-1275, 1983.

- WEEKS, D.L.; ESKANDARI, S.; SCOTT, D.R.; SACHS, G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. v.287, 482–485, 2000.
- WEN, S.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *The Cancer Letter*. v.282(1), p.1-8, 2009.
- WEEMS, J.J. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* v.14, p.756–766, 1992.
- WIEDERHOLD, N. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* v.10, p.249–259, 2017.
- WRIGHT, H.T.; REYNOLDS, K.A. Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis. *Curr. Opin. Microbiol.* v.10, p.447–453, 2007.
- WROBLEWSKI, L.E.; SHEN, L.; OGDEN, S.; ROMERO-GALLO, J.; LAPIERRE, L.A.; ISRAEL, D.A.; TURNER, J.R.; PEEK, R.M.; JR. *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterol.* v.136, p.236–246, 2009.
- XIAO, Z.P.; PENG, Z.Y.; DONG, J.J.; DENG, R.C.; WANG, X.D.; OUYANG, H.; YANG, P.; HE, J.; WANG, Y.F.; ZHU, M.; PENG, X.C.; PENG, W.X.; ZHU, H.L. Synthesis, molecular docking and kinetic properties of β -hydroxy- β -phenylpropionylhydroxamic acids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Eur J Med Chem.* v.68, p.212-221, 2013.
- XU, S.; MING-YING, S.; GUANG-XUE, L.; FENG, X.U.; XUAN, W.; CHENG-CHAO, S.; SHAO-QING, C. Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and Their Antimicrobial Activity. *Mol.* v.18(5), p.5265-5287, 2013.
- YADAV, J.S.; BEZAWADA, J.; YAN, S.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. *Candida krusei*: Biotechnological potentials and concerns about its safety. *Can. J. of Microbiol.* v.58, p.937–952, 2012.
- YANG, Y.L.; HO, Y.A.; CHENG, H.H.; HO, M.; LO, H.J. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* v.25, p.60–64, 2004.
- YOUNG, K.A.; AKYON, Y.; RAMPTON, D.S.; BARTON, S.G.; ALLAKER, R.P.; HARDIE, J.M.; FELDMAN, R.A. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* from gastric juice: the potential for transmission. *J. Med. Microbiol.* v.49, p.343–347, 2000.
- ZAUGG, C.; ZEPELIN, M.B.V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* v.69(1), p.405-412, 2001.
- ZHANG, L.; LIU, W.; HU, T.; DU, L.; LUO, C.; CHEN, K.; SHEN, X.; JIANG, H. Structural basis for catalytic and inhibitory mechanisms of beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ)., *J. Biol. Chem.* v.283, p.5370–5379, 2008.

APÊNDICE A

As tabelas S1-S6 listam a estrutura das substâncias de *T. catigua* avaliadas neste trabalho e as proteínas identificadas com significativa probabilidade de serem alvos farmacológicos, por *docking* molecular.

Tabela S1. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Cinchonina Ia, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.



ZINC5838202

Cinchonina Ia

O=C1C[C@@H](c2ccc(O)c(O)c2)c2c(cc(O)c3c2O[C@H](c2ccc(O)c(O)c2)[C@H](O)C3)O1

Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1- 5.106e-56	0.36
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	7.318e-50	0.50
O96394_LEIAM+5		Arginase	4.398e-41	0.53
FUT4_HUMAN+5	FUT4	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	1.678e-30	0.29
Q8I2S7_PLAF7+5		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	1.678e-30	0.29
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1.142e-29	0.36
Q965D6_PLAFA+5	fabG	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase	4.241e-28	0.36
Q965D7_PLAFA+5	fabZ	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	9.923e-27	0.36
T2R31_HUMAN+5	TAS2R31	Taste receptor type 2 member 31	1.992e-25	0.30
ARP19_RAT+5	Arpp19	cAMP-regulated phosphoprotein 19	1.816e-20	0.30
SIAT6_HUMAN+5	ST3GAL3	CMP-N-acetylneuraminate-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase	7.123e-20	0.29
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	2.22e-16	0.50

Tabela S2. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Cinchonaina IIa, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.

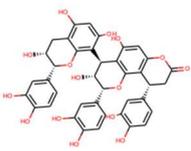
Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
 <p>CID11765545 Cinchonaina IIa</p> <p>O1[C@@H]([C@H](O)[C@H](c2c1c1[C@H](CC(=O)Oc1cc2O)c1cc(O)c(O)cc1)c1c2O[C@@H]([C@H](O)Cc2c(O)cc1O)c1cc(O)c(O)cc1)c1cc(O)c(O)cc1</p>				
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	6.19e-48	0.48
O96394_LEIAM+5		Arginase	2.428e-36	0.45
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.854e-29	0.34
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	8.882e-16	0.34
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	9.992e-16	0.48

Tabela S3. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Cinchonain Ib, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.

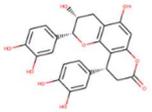
Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
 <p>ZINC000004098611 Cinchonain Ib</p> <p>O=C1C[C@H](c2ccc(O)c(O)c2)c2c(cc(O)c3c2O[C@H](c2ccc(O)c(O)c2)[C@H](O)C3)O1</p>				
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	5.106e-56	0.36
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	7.318e-50	0.50
O96394_LEIAM+5		Arginase	4.398e-41	0.53
FUT4_HUMAN+5	FUT4	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	1.678e-30	0.29
Q8I2S7_PLAF7+5		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	1.678e-30	0.29
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1.142e-29	0.36
Q965D6_PLAFA+5	fabG	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase	4.241e-28	0.36
Q965D7_PLAFA+5	fabZ	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	9.923e-27	0.36
T2R31_HUMAN+5	TAS2R31	Taste receptor type 2 member 31	1.992e-25	0.30
ARP19_RAT+5	Arpp19	cAMP-regulated phosphoprotein 19	1.816e-20	0.30
SIAT6_HUMAN+5	ST3GAL3	CMP-N-acetylneuraminic acid-6-sialyltransferase	7.123e-20	0.29
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	2.22e-16	0.50

Tabela S4. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Procianidina B2, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.

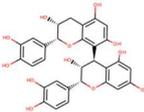
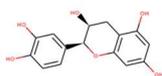
Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
				
CID122738 Procianidina B2 <chem>O1[C@@H]([C@H](O)[C@@H](c2c3O[C@@H]([C@H](O)Cc3c(O)cc2O)c2cc(O)c(O)cc2)c2c1cc(O)cc2O)c1cc(O)c(O)cc1</chem>				
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	2.938e-70	0.46
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	5.442e-63	0.63
O96394_LEIAM+5		Arginase	1.338e-48	0.67
FUT4_HUMAN+5	FUT4	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	7.47e-38	0.36
Q8I2S7_PLAF7+5		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	7.47e-38	0.36
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	4.029e-37	0.46
Q965D6_PLAFA+5	fabG	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase	3.79e-35	0.46
Q965D7_PLAFA+5	fabZ	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	1.995e-33	0.46
SIAT6_HUMAN+5	ST3GAL3	CMP-N-acetylneuraminate-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase	1.366e-24	0.36
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.7e-20	0.63
KLK2_HUMAN+5	KLK2	Kallikrein-2	1.11e-16	0.49

Tabela S5. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Epicatequina, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.



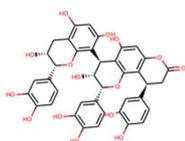
CID182232
Epicatequina

O1[C@H]([C@@H](O)Cc2c1cc(O)cc2O)c1cc(O)c(O)cc1

Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
O96394_LEIAM+5		Arginase	1.121e-66	1.00
CAH3_HUMAN+5	CA3	Carbonic anhydrase 3	7.082e-12	1.00
CAH4_HUMAN+5	CA4	Carbonic anhydrase 4	8.41e-10	1.00
CAH15_MOUSE+5	Ca15	Carbonic anhydrase 15	6.593e-09	1.00
PGH1_SHEEP+5	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1	1.312e-08	1.00
CAH7_HUMAN+5	CA7	Carbonic anhydrase 7	2.766e-08	1.00
PPBI_MOUSE+5	Iap	Intestinal-type alkaline phosphatase	3.369e-08	1.00
NOS3_BOVIN+5	NOS3	Nitric oxide synthase, endothelial	6.839e-08	1.00
CAH6_HUMAN+5	CA6	Carbonic anhydrase 6	2.503e-06	1.00
CAH5B_HUMAN+5	CA5B	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	1.168e-05	1.00
Q8I2J3_PLAF7+5		M18 aspartyl aminopeptidase	2.832e-05	1.00
CAH5A_HUMAN+5	CA5A	Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial	3.392e-05	1.00
PPBT_HUMAN+5	ALPL	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	0.0015	1.00
CAH12_HUMAN+5	CA12	Carbonic anhydrase 12	0.006252	1.00
RECA_MYCTU+5	recA	Protein RecA	0.3938	1.00
CAH9_HUMAN+5	CA9	Carbonic anhydrase 9	0.8573	1.00
CAH1_HUMAN+5	CA1	Carbonic anhydrase 1	0.9137	1.00
CAH2_HUMAN+5	CA2	Carbonic anhydrase 2	0.9402	1.00
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.675e-91	0.60
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	7.061e-56	0.56
Q965D6_PLAFA+5	fabG	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase	1.042e-51	0.60
FUT4_HUMAN+5	FUT4	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	2.743e-49	0.47

Q8I2S7_PLAF7+5		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	2.743e-49	0.47
Q965D7_PLAFA+5	fabZ	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	3.683e-49	0.60
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	3.071e-48	0.60
SIAT6_HUMAN+5	ST3GAL3	CMP-N-acetylneuraminate-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase	6.278e-32	0.47
TOP1_RAT+5	Top1	DNA topoisomerase 1	1.461e-30	0.29
MMP2_RAT+5	Mmp2	72 kDa type IV collagenase	7.262e-30	0.28
T2R31_HUMAN+5	TAS2R31	Taste receptor type 2 member 31	6.188e-27	0.31
ARP19_RAT+5	Arpp19	cAMP-regulated phosphoprotein 19	6.566e-21	0.30
Q965D5_PLAFA+5	fabI	Enoyl-acyl-carrier protein reductase	2.06e-19	0.74
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	3.089e-18	0.56
FUT7_HUMAN+5	FUT7	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 7	4.102e-18	0.47

Tabela S6. Lista de proteínas identificadas como prováveis alvos do ligante Cinchonaina IIb, com a respectiva estrutura química, fórmula smiles e código de acesso a base de dados. As enzimas listadas em negrito foram selecionadas em comum, portanto, seriam alvos inibidos pela maioria dos taninos avaliados neste estudo.



CID21676385
Cinchonaina IIb

O1[C@@H]([C@H](O)[C@H](c2c1c1[C@@@H](CC(=O)Oc1cc2O)c1cc(O)c(O)cc1)c1c2O[C@@@H]([C@H](O)Cc2c(O)cc1O)c1cc(O)c(O)cc1)c1cc(O)c(O)cc1

Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
PLGF_HUMAN+5	PGF	Placenta growth factor	6.19e-48	0.48
O96394_LEIAM+5		Arginase	2.428e-36	0.45
G6PD_YEAST+5	ZWF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.854e-29	0.34
6PGD_HUMAN+5	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	8.882e-16	0.34
VEGFA_HUMAN+5	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	9.992e-16	0.48

FATTY ACID BIOSYNTHESIS

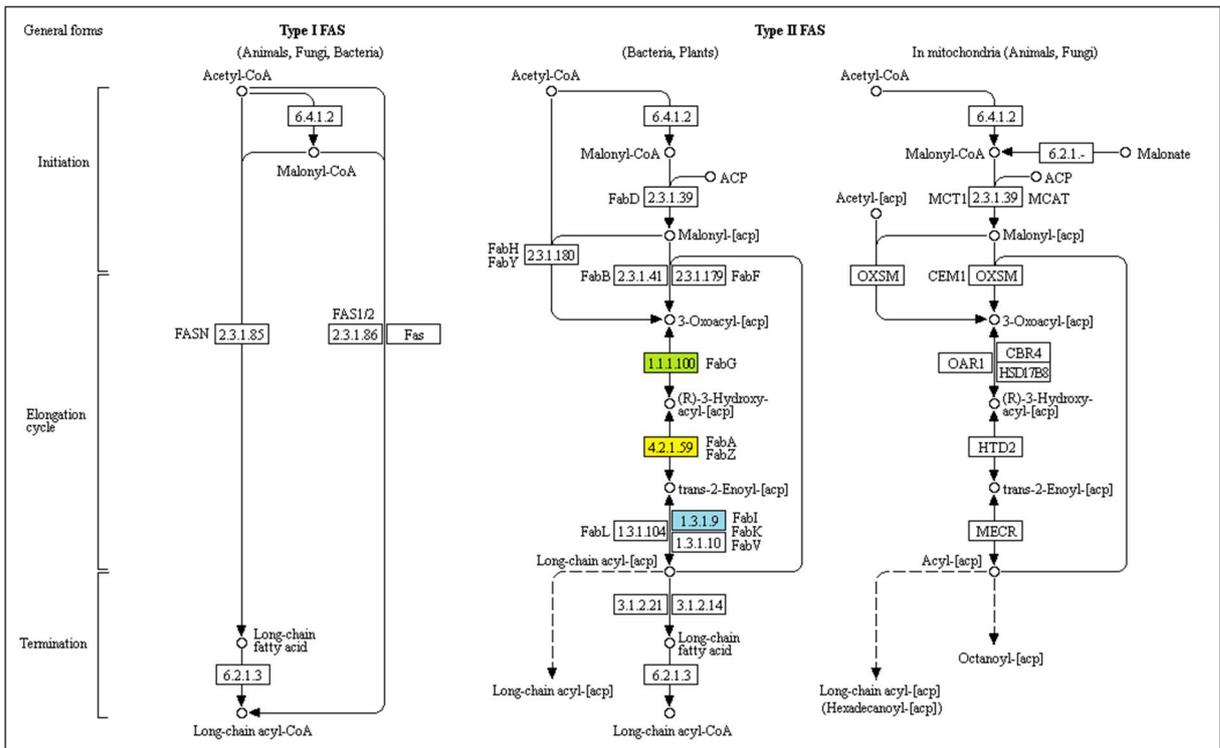


Figura S1. Comparação entre sistemas FAS I (animais) e FAS II (bactérias), destacando as enzimas fabG, fabZ and fabI. Fonte: KEGG map ec00061 (adaptado).

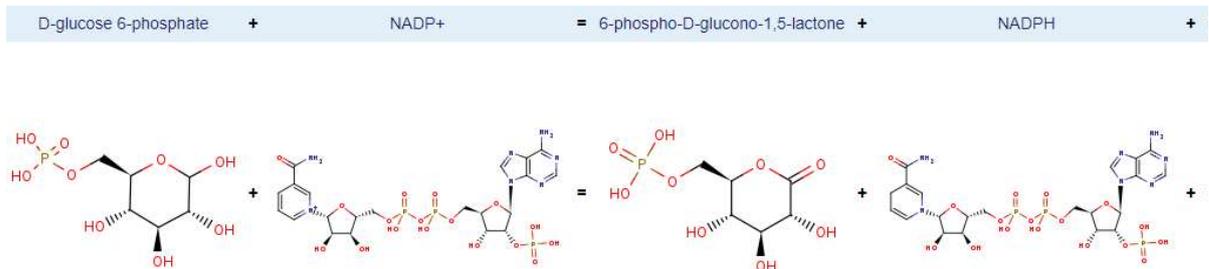


Figura S2. Esquema da reação catalisada pela enzima Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC:1.1.1.49). Fonte: Brenda enzymes.

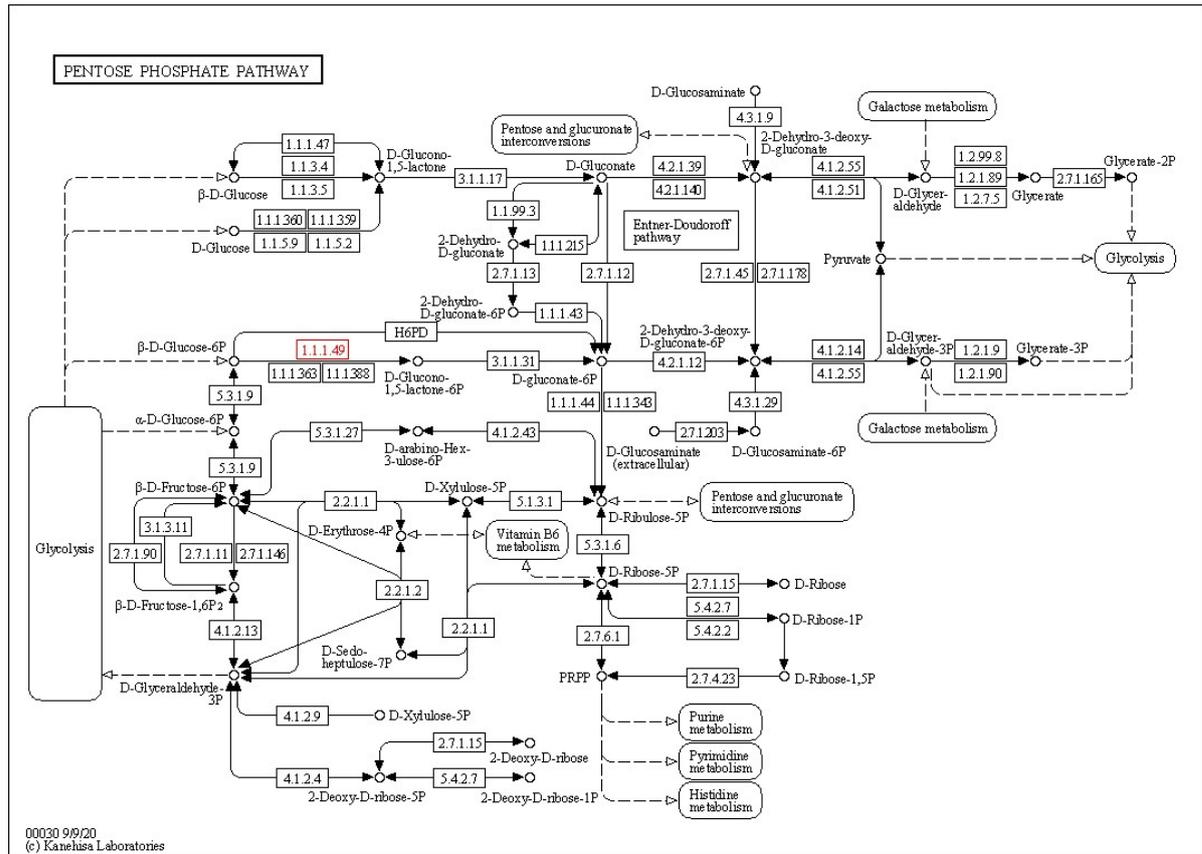


Figura S3. Papel da enzima Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC:1.1.1.49) na via da pentose fosfato. Fonte: KEGG mapa 00030.

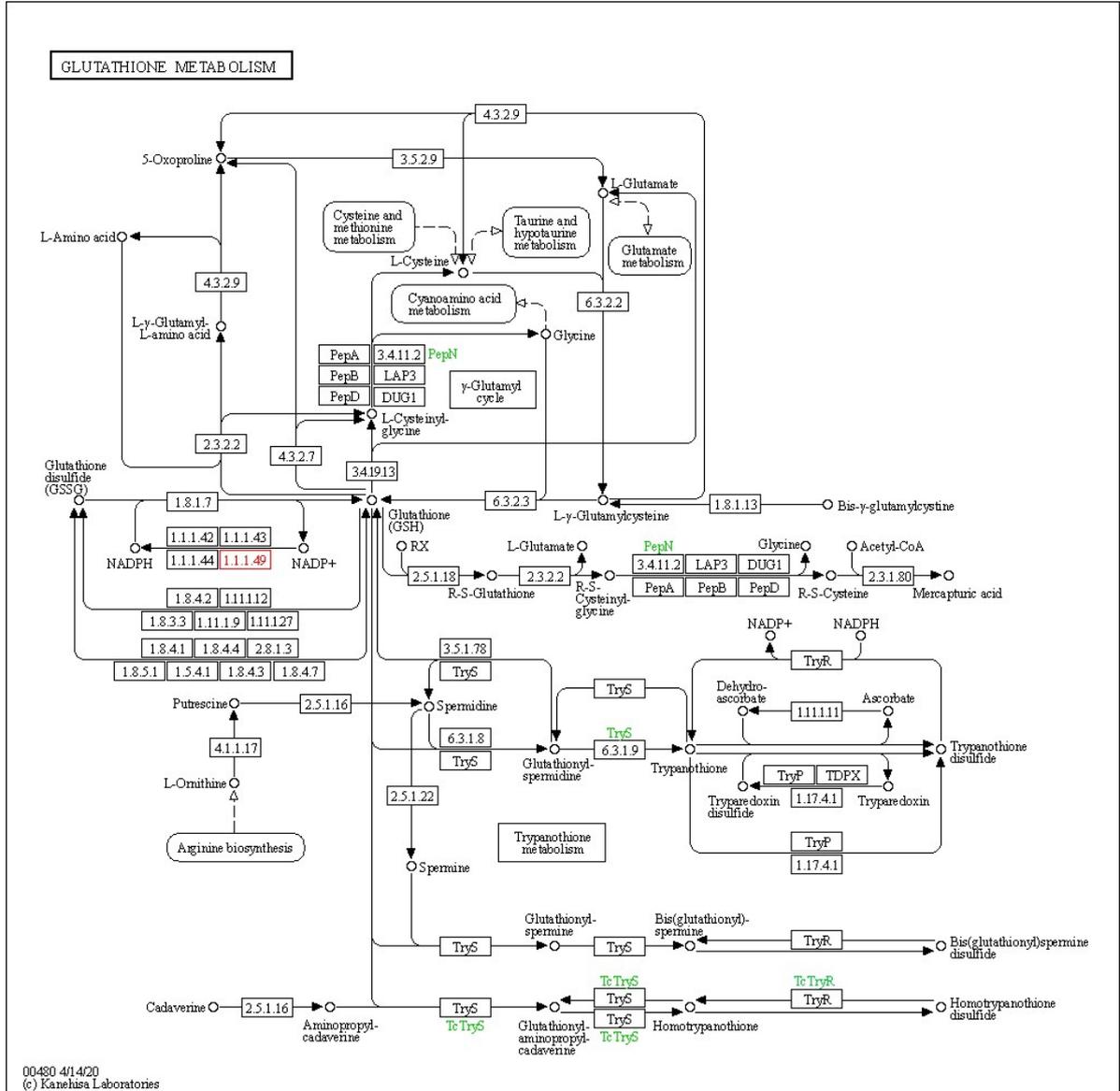


Figura S4. Papel da enzima Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC:1.1.1.49) no metabolismo da glutationa. Fonte: KEGG mapa 00030.