

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORENE COELHO SILVA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA
AMARYLLIDACEAE, *CRINUM AMERICANUM* L. E *HABRANTHUS IRWINIANUS*
RAVENNA, SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

BRASÍLIA

2022

Lorene Coelho Silva

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA
AMARYLLIDACEAE, *CRINUM AMERICANUM* L. E *HABRANTHUS IRWINIANUS*
RAVENNA, SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yris Maria Fonseca Bazzo

Co-orientadora: Dr^a. Amabel Fernandes Correia

BRASÍLIA

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SS586a Silva, Lorene Coelho
Atividade antifúngica de extratos de plantas da família Amaryllidaceae, *Crinum americanum* L. e *Habenaria irwiniana* Ravenne, sobre espécies de *Candida* / Lorene Coelho Silva; orientador Yris Maria Fonseca Bazzo; co orientador Amabel Fernandes Correia. -- Brasília, 2022.
70 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. Amaryllidaceae. 2. atividade antifúngica. 3. *Candida*. 4. alcaloides. I. Fonseca Bazzo, Yris Maria, orient. II. Correia, Amabel Fernandes, co-orient. III. Título.

LORENE COELHO SILVA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE, *CRINUM AMERICANUM* L. E *HABRANTHUS IRWINIANUS* RAVENNA, SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: _____ de _____ de 2022.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr. Yris Maria Fonseca Bazzo (Presidente)

Prof^a. Dr. Maria de Fátima Borin (Examinadora interna)

Dr^a. Paloma Michelle de Sales (Examinadora externa)

Prof^a. Dr^a. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (Examinadora Suplente)

Dedico este trabalho aos meus familiares, especialmente aos meus pais. Obrigada pelo investimento em minha educação e apoio na minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar nesta jornada e por me mostrar soluções às adversidades pelo caminho. Concluo este trabalho com minha fé fortalecida e tendo a certeza de que, para Ele, nada é impossível.

À minha família, que sempre torceu pelas minhas conquistas e me apoiou. Em especial aos meus pais, Pedro e Gracimar, que acreditaram no princípio da educação e pelo caminho renunciaram a seus sonhos para realizar os meus. Obrigada por priorizarem meus estudos e me ajudarem a alcançar meus objetivos.

Ao meu companheiro e incentivador, meu esposo Alexandre. Obrigada pelo carinho e compreensão nesse período.

Ao amigo João Victor, pessoa de luz e de um coração bondoso, sempre disposto a ajudar e de um entusiasmo singular. Sou grata a você por todo auxílio, pelo acolhimento, pelo aprendizado, pela disponibilidade e por suas palavras de otimismo e incentivo.

À minha orientadora, professora Yris Fonseca, pela oportunidade e pela confiança no trabalho, por sua atenção e carinho nos direcionamentos.

À minha coorientadora, Amabel Fernandes, agradeço imensamente por toda ajuda. Pelo direcionamento na condução dos experimentos, pela paciência, pela disponibilidade e apoio. Sua experiência foi essencial na elaboração e condução deste trabalho.

A UFES pela colaboração nos experimentos, pela parceria, pela cooperação técnica e científica. Agradeço especialmente a Larissa pela dedicação e compreensão.

Aos meus gestores no Lacen, pela compressão durante todo esse período, em que diversas vezes precisei ajustar o horário de trabalho para participar das atividades acadêmicas. Aos amigos e colegas do NMCSPS / GMTOX pelo incentivo, compreensão, paciência e exemplo, especialmente ao Rodrigo Lourenço, pela disposição para fotografar e ajustar a iluminação dos resultados de meus experimentos.

A querida amiga Fernanda Sardinha, que sempre me incentivou a ingressar no mestrado. Que me ajudou com dicas e orientações fundamentais para conclusão do meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais, que sempre se mostraram disponíveis a auxiliar nas demandas da rotina e a compartilharem experiências. Agradeço a todos pela atenção e disponibilidade.

As técnicas do laboratório, Júlia e Patrícia, que se dedicam a nos apoiar e cuidam de cada um com muita atenção.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de cursar o mestrado, contribuindo com meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite. Sou grata a atenção e colaboração neste trabalho.

RESUMO

SILVA, Lorene Coelho. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE, *CRINUM AMERICANUM L.* E *HABRANTHUS IRWINIANUS RAVENNA*, SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA***. Brasília, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são um problema de importância global em saúde. Algumas espécies de *Candida* têm demonstrado resistência aos antifúngicos atualmente disponíveis. Embora tenha ocorrido significativo progresso no sentido da identificação de estruturas alvos para fármacos nos fungos, que podem resultar no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Assim, a busca por novas fontes de tratamento de infecções fúngicas é crescente. Neste contexto, as plantas medicinais são reconhecidas por seu potencial promissor. Alguns estudos indicam que espécies da família Amaryllidaceae, popularmente utilizadas no tratamento de diversas doenças infecciosas, possuem constituintes com ação antifúngica promissora, reduzindo a patogenicidade de fungos, entre eles espécies de *Candida*. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de extratos de plantas da família Amaryllidaceae, *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna* sobre espécies de *Candida*. Realizou-se a triagem da atividade antifúngica frente as cepas de *Candida* pelo método de disco-difusão. Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), realizou-se o método de microdiluição em placa dos extratos e de licorina. Analisou-se os extratos que apresentaram atividade antifúngica pela técnica de ESI (+) FT-ICR MS para determinação do perfil de alcaloides. Destacamos a identificação dos alcaloides licorina, crinina, além de outros alcaloides. Além dos alcaloides, identificou-se Naftomicina D e Naftomicina E, que são produtos do metabolismo de micro-organismos endofíticos, já citados na literatura como presentes em plantas da família Amaryllidaceae. Nos ensaios por disco-difusão destaca-se o desempenho do Ext. 6 (fração ácida obtida do bulbo de *Crinum americanum L.*), que apresentou resultados estatisticamente relevantes, com halo de inibição maior que o antibiótico controle, Anfotericina B, em todos os ensaios. Os testes de CIM apresentaram diferentes resultados, com CIM de 86 a 1250 µg /mL. O Ext. 6 foi o que apresentou atividade a uma menor concentração frente a todas as cepas de *Candida* testadas, sendo seu melhor desempenho frente a *C. albicans* e *C. krusei*. *Candida auris* foi a cepa que precisou de maior concentração para ser inibida, sendo o Ext. 6 o mais ativo, com CIM de 344

$\mu\text{g}/\text{mL}$. O composto licorina mostrou-se ativo frente a todas as cepas. A cepa mais suscetível a licorina foi a *C. parapsilosis* com CIM de $20,3 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados evidenciaram que espécies Amaryllidaceae são fontes promissoras de compostos com atividade antifúngica.

Palavras-chave: Amaryllidaceae, atividade antifúngica, *Candida*, alcaloides.

ABSTRACT

SILVA, Lorene Coelho. **ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS OF THE AMARYLLIDACEAE FAMILY, *CRINUM AMERICANUM* L. AND *HABRANTHUS IRWINIANUS* RAVENNA, ON SPECIES OF CANDIDA.** Brasília, 2022. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) – Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2022.

Fungal infections caused by yeasts of the genus *Candida* are a problem of global health importance. Some *Candida* species have shown resistance to currently available antifungals. Although significant progress has been made towards the identification of target structures for drugs in fungi, which may result in the development of new antifungal agents. Thus, the search for new sources of treatment for fungal infections is increasing. In this context, medicinal plants are recognized for their promising potential. Some studies indicate that species of the Amaryllidaceae family, popularly used in the treatment of several infectious diseases, have constituents with promising antifungal action, reducing the pathogenicity of fungi, including *Candida* species. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of extracts from plants of the Amaryllidaceae family, *Crinum americanum* L. and *Habranthus irwinianus* Ravenna, on *Candida* species. Screening of antifungal activity against *Candida* strains was performed by the disk diffusion method. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the extracts and licorin microdilution method was used. The extracts that showed antifungal activity were analyzed by the ESI (+) FT-ICR MS technique to determine the alkaloid profile. We highlight the identification of the alkaloids lycorine, crinine, and other alkaloids. In addition to the alkaloids, Naphthomycin D and Naphthomycin E were identified, which are products of the metabolism of endophytic microorganisms, already mentioned in the literature as present in plants of the Amaryllidaceae family. In disk-diffusion tests, the performance of Ext. 6 (acid fraction obtained from the bulb of *Crinum americanum* L.) stands out, which presented statistically relevant results, with a higher inhibition halo than the control antibiotic, Amphotericin B, in all assays. The MIC tests showed different results, with MIC from 86 to 1250 µg/mL. The Ext. 6 was the one that showed activity at a lower concentration against all tested *Candida* strains, with its best performance against *C. albicans* and *C. krusei*. *Candida auris* was the strain that needed the highest concentration to be inhibited, with Ext. 6 was the most active, with a MIC of 344 µg/mL. The licorine compound was active against all strains. The strain most susceptible to licorin was *C. parapsilosis* with a MIC of 20.3 µg/mL.

The results showed that Amaryllidaceae species are promising sources of compounds with antifungal activity.

Keywords: Amaryllidaceae, antifungal activity, *Candida*, alkaloids.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5FC	5-fluorocitosina
5FU	5-fluorouracil
AChE	Acetilcolinesterase
ANFO	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
BChE	Butirilcolinesterase
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CG-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DBE	<i>Double Bound Equivalent</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESI	Fonte Eletrospray
EXT.	Extrato
FT-ICR MS	Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier
LACEN-DF	Laboratório Central do Distrito Federal
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i>
MS	Espectrometria de Massas
RNA	Ácido Ribonucleico
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UNB	Universidade de Brasília

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esqueletos dos principais tipos de alcaloides de Amaryllidaceae formados a partir do precursor norbelladina.	27
Figura 2 –	Fluxo de obtenção dos extratos e frações de <i>Crinum americanum L.</i>	32
Figura 3 –	Fluxo de obtenção dos extratos de <i>Habranthus irwinianus</i>	33
Figura 4 -	Execução da análise por ESI (+) FT-ICR MS.	35
Figura 5 -	Execução do método de disco-difusão.	38
Figura 6 -	Execução do método de microdiluição em placa para determinação da CIM.	42
Figura 7 -	Formação dos halos de inibição nas placas semeadas com <i>C. auris</i> e <i>C. albicans</i>	43
Figura 8 -	Formação dos halos de inibição nas placas semeadas com <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	43
Figura 9 -	Diâmetro dos halos de inibição (valores expressos em mm).....	44
Figura 10 -	Poços da placa de microdiluição no teste de CIM.	47
Figura 11 -	Espectro de massas dos extratos 01, 02 e 06 de <i>Crinum americanum L.</i>	48
Figura 12 -	Alcalóides Amaryllidaceae e Naftomicinas identificados em <i>Crinum americanum L.</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Plantas utilizadas, partes da planta, solventes e extratos brutos vegetais	34
Tabela 2 -	Plantas utilizadas, partes da planta, diluente da solução estoque e cepas de <i>Candida</i> spp.	39
Tabela 3 -	CIM dos extratos e resultado dos controles (resultados em µg/mL).....	46
Tabela 4 -	CIM da Licorina (resultados em µg/mL)	47
Tabela 5 -	Alcaloides identificados por ESI (+) FT-ICR MS nos extratos 01, 02 e 06 de <i>Crinum americanum</i> L.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O GÊNERO <i>CANDIDA</i>	16
1.2 ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DE <i>CANDIDA SPP.</i>	21
1.3 AMARYLLIDACEAE.....	24
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LOCAL DA PESQUISA	30
3.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	30
3.2.1 Extração botânica	30
3.2.1.1 Extração de <i>Crinum americanum L.</i>	31
3.2.1.2 Extração de <i>Habranthus irwinianus Ravenna</i>	32
3.3 PERFIL FITOQUÍMICO: ANÁLISE POR ESI (+) FT-ICR MS COM FOCO NA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE	34
3.3.1 Processamento dos dados	35
3.4 MATERIAL MICROBIOLÓGICO	36
3.4.1 Cepas Padrões	36
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS	36
3.5.1 Diluição dos extratos: preparo para utilização nos ensaios	36
3.5.2 Preparo dos discos	36
3.5.3 Preparo do inóculo fúngico	37
3.5.4 Execução do método de disco-difusão	37
3.5.5 Leitura e interpretação dos resultados	37
3.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	39
3.6.1 Diluição dos extratos	39
3.6.2 Preparo dos inóculos fúngicos	40
3.6.3 Procedimento do ensaio	40
3.6.4 Leitura e interpretação dos resultados	41
4 RESULTADOS	43
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS	43

4.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	46
4.3 PERFIL FITOQUÍMICO: ANÁLISE POR ESI (+) FT-ICR MS COM FOCO NA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE	47
4.3.1 Resultados dos espectros dos extratos com atividade antifúngica	48
4.1.2 Identidade das estruturas: processamentos dos dados obtidos por ESI (+) FT-ICR MS.....	49
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos vivos eucariontes que, a nível celular, possuem parede celular, geralmente composta pelo polissacarídeo quitina, citoplasma com diversas organelas, envolto por uma membrana citoplasmática, e o núcleo, contendo o DNA. Os fungos podem ser unicelulares ou multicelulares. Algumas espécies são causadoras de doenças que abrangem desde infecções de pele a infecções sistêmicas, além de alergias (LACAZ et al., 2002).

Os fungos que em geral estão relacionados a doenças, são caracterizados morfológicamente como: leveduras, que são unicelulares, e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares. As leveduras se reproduzem, a maioria das vezes, de forma assexuada por brotamento, único ou múltiplo, que geralmente originam estruturas de forma arredondada, denominadas blastoconídios ou ainda blastoporo. Alguns gêneros de leveduras menos importantes em micologia médica, reproduzem-se por divisão binária ou cissiparidade (BRASIL, 2004).

As infecções fúngicas humanas variam de infecções superficiais de unha e pele, a candidíase mucocutânea e infecções fúngicas invasivas. As infecções fúngicas invasivas em humanos geralmente afetam pessoas com imunidade prejudicada, como aquelas submetidas a transplante de órgãos sólidos ou células-tronco hematopoiéticas. Nesta população, é crescente a incidência de infecções fúngicas invasivas (GAUTHIER; KELLER, 2013).

Já foram descritas mais de 100.000 espécies de fungos onipresentes no meio ambiente, no entanto, apenas algumas causam doenças em mamíferos. Fungos pertencentes a gêneros comensais, como *Candida* e *Malassezia*, possuem potencial para infectar o hospedeiro humano, porém, são tratados como patógenos apenas se encontrados pelo sistema imunológico no local "errado" (ILIEV; UNDERHILL, 2013). O sistema imunológico humano mantém vigilância contra a invasão de fungos nos tecidos, mas não devem evocar respostas inflamatórias prejudiciais contra a exposição normal a fungos que são comuns no ambiente ou que são comensais ao hospedeiro. Situações que permitem a invasão ou desequilíbrio por crescimento excessivo de fungos, como imunodeficiências ou predisposições genéticas, quebram esse sistema de vigilância (ILIEV; UNDERHILL, 2013).

Dentre as espécies de fungos descritas, leveduras do gênero *Candida* são os principais agentes de quadros infecciosos de pacientes no ambiente hospitalar. Infecções causadas por *Candida* são um desafio clínico na sobrevivência de pacientes com doenças graves e naqueles em período pós-operatório (BRASIL, 2004).

1.1 O GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* é originário da divisão taxonômica dos ascomicetos, caracterizado na literatura como: leveduras asporogênicas (não formadora de esporo) com a capacidade de formar pseudo-hifas e hifas (CHIN et al., 2016).

As leveduras de *Candida* spp. possuem tamanhos variáveis, entre 2 a 11 μm de diâmetro e se caracterizam por se apresentarem como células simples, ovais, que se reproduzem por brotamento (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). As espécies de *Candida* crescem tipicamente na forma de levedura ou filamentosa. As leveduras são células únicas de brotamento de formato oval, enquanto os filamentos consistem em células alongadas ligadas de ponta a ponta. Existem dois tipos de morfologias filamentosas: pseudo-hifas e hifas. As pseudo-hifas são geralmente elipsoidais (isto é, sua largura é maior no centro do que nas extremidades) e apresentam constrições nas junções. Já as células hifais, possuem lados paralelos que, são uniformes em largura e possuem septos verdadeiros sem constrições (KADOSH & MUNDODI, 2020).

Os fungos do gênero *Candida* são constituintes da microbiota humana, algumas espécies deste gênero podem estar presentes na pele, mucosas, cavidade oral, gastrointestinal e geniturinária como organismos comensais (LACAZ et al., 2002). O gênero é constituído por centenas de espécies, que podem ser diferenciadas pelas suas características genômicas e por suas diferenças fenotípicas. As variações fenotípicas entre espécies de *Candida* são principalmente relacionadas à tamanho celular, morfologia, requisitos metabólicos e de crescimento, componentes da parede celular e aos mecanismos de virulência (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Algumas espécies de *Candida*, possuem a habilidade de realizar a transição entre estados morfológicos distintos, incluindo formas leveduriformes, hifas e pseudo-hifas. A capacidade de fazer transição morfológica está relacionada à virulência de muitos desses patógenos. Existem também muitas conexões entre a morfogênese de *Candida* e a sua suscetibilidade aos antifúngicos disponíveis para tratamento (WHIBLEY; GAFFEN, 2015; SHARMA et al., 2019). *Candida albicans* é o patógeno mais estudado, esta espécie faz a transição entre as formas de levedura, pseudo-hifas e hifas, sob diversas condições ambientais. Outras espécies de *Candida* são igualmente capazes de sofrer a transição de levedura para

hifa/pseudo-hifa, incluindo *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Já *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. haemulonii* e *C. krusei* não formam hifas verdadeiras, mas podem fazer a transição entre estados de levedura e pseudo-hifas (SHARMA et al., 2019).

Quanto ao metabolismo, as espécies de *Candida* necessitam de fontes de carbono e fontes de nitrogênio para crescimento, preferencialmente carboidratos simples como: D-glicose, maltose, sacarose, trealose, entre outros. Esses micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. Os carboidratos podem ser fermentados e assimilados por *Candida* spp., já os compostos nitrogenados são assimilados. As habilidades fermentativa e assimilativa são essenciais para a diferenciação e identificação bioquímica das espécies de *Candida* (LACAZ et al., 2002). Essas vias metabólicas estão relacionadas principalmente à produção de energia, mas também são associadas aos mecanismos infecciosos. Os fungos do gênero *Candida* spp. produzem diferentes quantidades de metabólitos, dependendo do local da infecção, das espécies e dos fatores de virulência. Portanto, as análises metabômicas podem ser utilizadas tanto para identificação de espécies de *Candida*, como também para estudos de patogenicidade (OLIVER et al., 2020).

As espécies do gênero *Candida* possuem parede celular bem definida, sendo os componentes básicos principais: quitina, polissacarídeos (glucanas e mananas) e proteínas. Um dos mecanismos de diferenciação dentre as espécies de *Candida* é a proporção destes compostos na parede celular e sua forma de organização (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). A parede celular de *C. albicans* é composta por duas camadas bem definidas: uma camada interna composta de quitina, β 1,3- e β 1,6-glucanos e uma camada externa predominantemente composta de polímeros de manose ligados à O e N (mananas) que estão ligados a proteínas para formar glicoproteínas (GOW et al., 2012; NAVARRO-ARIAS et al., 2019). Já a parede as paredes de *C. krusei* e *C. auris* são ricas em quitina, sendo que a espécie *C. krusei* possui menor teor de mananas (NAVARRO-ARIAS et al., 2019). Além disso, em espécies em que ocorre transição morfológica, como descrito para *C. albicans*, embora componentes básicos na parede celular permaneçam semelhantes, há diferenças na proporção e organização destes constituintes na parede celular, entre a diferentes morfologias (GOW et al., 2012).

Clinicamente, o gênero *Candida* está envolvido nas infecções denominadas candidíase, que são infecções oportunistas e se manifestam clinicamente de forma superficial ou sistêmica. As espécies de *Candida* causam doenças em pacientes imunocomprometidos, bem como em

indivíduos que receberam implantes cirúrgicos ou passaram por processos em que ocorre o comprometimento de barreiras anatômicas (GOW et al., 2012; ILIEV; UNDERHILL, 2013). As espécies de *Candida* mais associadas à candidíase sistêmica são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, dentre outras. A espécie mais frequentemente identificada nas infecções por *Candida* ainda é *C. albicans*, no entanto vem ocorrendo uma diminuição do isolamento desta espécie ao longo dos anos, entre 1997-2001 as infecções por *C. albicans* correspondiam a cerca de 57,4% dos casos, já entre 2015-2016 foi responsável por cerca de 46,4% dos casos, ou seja, atualmente as espécies de *Candida* não *albicans* tem demonstrado percentual maior que 50% nos quadros infecciosos (PFALLER et al., 2019).

A interação patógeno-hospedeiro do processo infeccioso por *Candida* spp. é complexo e depende de um conjunto de fatores, a patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada por moléculas de adesão, particularmente interações ligante-receptor específicas e interações inespecíficas que permitem que espécies de *Candida* se fixem a uma variedade de tecidos eucarióticos (CHIN et al., 2016). Os mecanismos que viabilizam a progressão das infecções por *Candida* spp. são os mais diversos, entre eles estão: secreção de enzimas hidrolíticas, aderência a superfícies, formação de biofilme, transição morfológica entre outros mecanismos que lhe atribuem maior capacidade de disseminação e aptidão de sobrevivência e resistência. A virulência da *Candida* pode variar dependendo da espécie, origem geográfica, reação do hospedeiro e do estágio das infecções (MROCYŃSKA; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, 2021).

Candida albicans é a espécie de *Candida* mais estudada, seus mecanismos de patogenicidade estão sendo cada dia mais descritos e elucidados, diversos fatores de virulência já foram identificados nessa espécie. É uma espécie comumente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos, sendo causa de candidíase em todas as partes do mundo. *Candida albicans* na morfologia filamentosa (pseudo-hifas ou hifas verdadeiras) são observadas em processos patogênicos (BERMAN, 2006; CANNOM et al., 2002; MAYER et al., 2013). A natureza polimórfica tem um grande impacto na virulência e é considerada essencial durante a transição de um modo de crescimento comensal para um patogênico (RAI et al., 2021).

Durante a mudança de comensal para patógeno, *C. albicans* passa por reprogramação transcricional e diferenciação celular dentro do hospedeiro para se adaptar a novos nichos que diferem na disponibilidade de micronutrientes, nível de CO₂, nível de O₂ e pH (WITCHLEY

et al., 2019; RAI et al., 2021). Além das mudanças morfológicas, a adaptação a diferentes nichos, como concentrações variáveis de íons, também decide o destino do crescimento de *C. albicans*. Uma rede transcricional bem orquestrada regulando a morfogênese e adaptação a condições variáveis dos níveis de ferro também tem sido relatada (WITCHLEY et al., 2019; RAI et al., 2021).

A forma leveduriforme de *C. albicans* tem sido relacionada ao aumento de sua capacidade de disseminação, já a produção de hifas, aumenta sua capacidade invasiva, sua resistência à fagocitose e são consideradas importantes fatores de virulência (MAYER et al., 2013). Habitualmente, considera-se que a origem de *C. albicans* causadora de infecções seja da microbiota do trato digestório humano (organismo comensal). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos antifúngicos da classe dos azóis são conhecidos em pacientes expostos a estes medicamentos por longos períodos (MACMANUS; COLEMAN, 2014; TALAPKO et al., 2021; CHIN et al., 2016).

Candida krusei é uma levedura diploide, heterozigótica, que apresenta morfologia alongada, assemelhando a longos grãos de arroz, em contraste com a maioria das outras espécies do gênero *Candida*, que possuem formato ovoide (JAMIU et al., 2020). Esta espécie é um patógeno nosocomial ocasional, que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol. Os fatores de risco para infecções por *C. krusei* são: profilaxia antifúngica (especialmente com fluconazol), uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, neutropenia, sistema imunocomprometido e uso de dispositivos médicos (JAMIU et al., 2020; PFALLER et al., 2008). Os mecanismos de virulência da *C. krusei*, são semelhantes à de *C. albicans* e compreendem modulação do sistema imune, adesão a superfícies, produção de enzimas, como proteinases e fosfolipases, variabilidade antigênica, dimorfismo (levedura e pseudo-hifa), mudanças fenotípicas e formação de biofilmes (JAMIU et al., 2020).

Candida parapsilosis é uma espécie comumente isolada das mãos de profissionais de saúde e relacionada às infecções adquiridas de fontes exógenas. Estudos têm demonstrado que *C. parapsilosis* é capaz de formar biofilmes e sua incidência pode estar relacionada à presença de Cateter Venoso Central (CVC) e nutrição parenteral. Além dos fatores de risco para candidemia em geral, a nutrição parenteral fornece um ambiente rico em glicose e lipídios, fatores que favorecem a formação de biofilme por essa espécie (TÓTH et al., 2019; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Os mecanismos de virulência de *C. parapsilosis* compreendem capacidade de adesão a superfície do hospedeiro, dimorfismo (fase leveduriforme e filamentosa), habilidade de crescimento em objetos e superfícies inanimadas, e em soluções contendo glicose para nutrição parenteral, formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares (lipases, proteinases e fosfolipases), que podem modular a resposta imune, celular e humoral, e, assim, contribuir para danos no tecido do hospedeiro, viabilizar a infecção e progressão das células fúngicas (TÓTH et al., 2019; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Algumas espécies de *Candida* têm demonstrado resistência aos antifúngicos atualmente disponíveis. Embora tenha ocorrido significativo progresso no sentido da identificação de estruturas alvos para fármacos nos fungos, que podem resultar no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, é premente a busca por novas fontes de tratamento de infecções fúngicas. Neste contexto, as plantas medicinais são reconhecidas por seu potencial promissor (SU et al., 2018).

Além disso, novas espécies de *Candida* têm sido relatadas. Desde 2009, *Candida auris* vem sendo identificada em todo o mundo, essa espécie tem sido associada a infecções e surtos em ambientes de saúde (RUIZ-GAITAN et al., 2018).

Candida auris, morfológicamente, se apresenta como células leveduriformes, ovoides a alongadas, que podem ocorrer como células individuais, pares ou grupos; geralmente não forma pseudo-hifas, mas pode apresentar formas semelhantes às pseudo-hifas em condições de alto teor de sal. São descritas como colônias rosa a bege em ágar cromogênico e colônias brancas a creme em ágar *Sabouraud* (CORSI-VASQUEZ; OSTROSKY-ZEICHNER, 2019). Caracterizam-se por crescer bem em temperaturas entre 37°C e 42°C, mas seu crescimento é variável em temperaturas mais altas. A morfologia e a cor das colônias de *C. auris* em cultura podem corroborar a sua identificação, mas não podem ser usadas como o único método de identificação para a espécie (CORSI-VASQUEZ; OSTROSKY-ZEICHNER, 2019). Meios de reação cromogênica dependem da adequada ação da beta-glicosidase, produzindo cores diferentes. No entanto, por ser um método fenotípico, apresenta limitações que afetam a precisão da identificação (WOHLMEISTER et al., 2017).

A identificação de *C. auris* e sua diferenciação de outras espécies de *Candida* requer métodos proteômicos e moleculares, mas essas técnicas não estão disponíveis em muitos laboratórios clínicos. Esta espécie pode ser identificada incorretamente por sistemas comerciais de rotina ou pode não ser identificada, o que prejudica o adequado manejo para prevenir a sua

propagação e a terapia antifúngica apropriada (RUIZ-GAITAN et al., 2018). As manifestações clínicas da infecção por *C. auris* são as mais variadas e envolvem: colonização, infecções da mucosa, infecções profundas e candidemia em um curto período (FAKHIM et al., 2018).

A doença fúngica mais frequente que afeta as populações no mundo é a candidíase. Existem vários tipos de candidíase como candidíase mucosa, candidíase cutânea, onicomicose e candidíase sistêmica. Um fato importante é que a candidíase é uma infecção que pode afetar tanto, pessoas imunocomprometidas, quanto saudáveis. Candidemia é outra infecção causada por *Candida* spp. e é a infecção fúngica nosocomial mais relevante e prevalente associada a uma alta taxa de mortalidade (até 49%) em pacientes com sistema imunológico comprometido (SANTOS et al., 2018). As infecções fúngicas são uma preocupação crescente de saúde pública, no mais, as espécies de *Candida* são os patógenos fúngicos oportunistas mais frequentemente encontradas em processos infecciosos graves (SHARMA et al., 2019).

1.2 ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DE *CANDIDA* SPP.

Uma variedade de drogas antifúngicas foi desenvolvida para agir preferencialmente na parede celular fúngica e na sua membrana plasmática, no entanto, esses patógenos vêm adquirindo novos mecanismos de defesa que os tornam resistentes ao tratamento padrão (GUEVARA-LORA et al., 2020).

Os agentes antifúngicos são classificados de acordo com seu alvo de atuação na célula fúngica. Podem interferir na síntese de ácidos nucleicos, ergosterol, na integridade da membrana e da parede celular e em outros sítios. Apesar dos avanços no tratamento médico das doenças causadas por fungos, as terapias específicas são limitadas por semelhanças na estrutura e nos processos bioquímicos das células humanas e fúngicas (GUEVARA-LORA et al., 2020). Portanto, os fármacos mais eficazes baseiam-se nas diferenças na composição da membrana plasmática que ocorre entre as células do hospedeiro e do patógeno, bem como na parede celular formada exclusivamente por leveduras. Outros antifúngicos bloqueiam os ácidos nucleicos ou a síntese de proteínas. Para o tratamento de infecções por espécies de *Candida*, quatro classes mais populares de drogas são usadas atualmente, a saber, equinocandinas, azóis, polienos e fluoropirimidinas (ALDHOLMI et al., 2019; GUEVARA-LORA et al., 2020).

Os azóis são uma classe de antifúngicos em que o alvo é uma enzima essencial para a biossíntese de ergosterol. Essas drogas agem pela ligação e inibição da lanosterol-14 α -

desmetilase, uma enzima do citocromo P450 (o produto do gene *ERG11*) mediando uma etapa limitadora da taxa na biossíntese de ergosterol. Isso resulta na formação de esteróis tóxicos (14- α -metilesteróis), colocados livremente nas bicamadas lipídicas e diminuindo a rigidez e a estabilidade da membrana celular do fungo. Miconazol e econazol foram os compostos azólicos usados originalmente, seguidos por cetoconazol, fluconazol e itraconazol (GUEVARA-LORA et al., 2020; MARTINS et al., 2015).

Embora geralmente bem tolerados, os azóis também têm limitações, uma delas é a hepatotoxicidade, observada principalmente para o clotrimazol e o miconazol. Além disso, existem problemas com a eficiência dos medicamentos desta classe: eles não são ativos contra biofilme de *Candida* spp., *C. krusei* possui uma resistência intrínseca a azóis e *C. glabrata* tem se mostrado cada vez menos suscetível à ação de medicamentos desta classe (GUEVARA-LORA et al., 2020). Apesar de durante vários anos esses fármacos terem apresentado uma grande eficácia como antifúngico, o seu uso generalizado tem levado a um crescente surgimento de espécies resistentes de *Candida* spp., há relatos de resistência aos azóis em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (MARTINS et al., 2015).

Os polienos constituem outra classe de agentes antifúngicos que afetam as membranas celulares contendo ergosterol. Esses agentes apresentam propriedades anfipáticas que permitem sua intercalação entre membranas contendo ergosterol, formando canais que favorecem o desequilíbrio iônico, destroem o gradiente de prótons e levam à morte da célula. Como uma classe, os polienos têm nefrotoxicidade significativa devido aos seus mecanismos relativamente não seletivos de ligação, resultando na afinidade dos polienos ao colesterol localizado na membrana das células hospedeiras, afetando a permeabilidade dos túbulos renais (ALDHOLMI et al., 2019; GUEVARA-LORA et al., 2020; MARTINS et al., 2015).

Nistatina e anfotericina B são os polienos mais comumente usados. Embora todas as espécies de *Candida* sejam suscetíveis a polienos, o tratamento da candidíase causada por *C. krusei* e *C. glabrata* requer uma dose segura máxima de medicamentos; entretanto, a nefrotoxicidade é um fator limitante para o uso de polienos (SANTOS et al., 2018; GUEVARA-LORA et al., 2020). A anfotericina B também é eficaz contra *Candida* spp. biofilme e é frequentemente usado em uma forma mais segura encapsulada em lipossomas, no entanto, essa forma também é mais cara, tornando seu uso limitado. Além disso, a nistatina ou natamicina são úteis apenas para o tratamento de infecções superficiais (GUEVARA-LORA et al., 2020).

As fluoropirimidinas, nomeadamente a 5-fluorocitosina (5FC), é uma pirimidina fluorada que prejudica a biossíntese do ácido nucleico devido à formação de antimetabólitos tóxicos de pirimidina fluorada. Uma enzima permeasse ajuda a 5FC a entrar nas células fúngicas, onde é convertida em 5-fluorouracil (5FU), catalisada pela citosina desaminase. Após isso, o 5FU é convertido em ácido 5-fluorouridílico (FUMP) e, a seguir, fosforilado e incorporado ao RNA, levando à interrupção da síntese protéica. Outro mecanismo de ação do 5FU resulta de sua conversão em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um potente inibidor da enzima envolvida na síntese de DNA e divisão nuclear (MARTINS et al., 2015).

O uso de fluoropirimidinas está associada a uma toxicidade considerável e seu uso como monoterapia é limitado pela facilidade de desenvolver resistência durante o tratamento. Há relatos de resistência intrínseca contra *C. krusei*. Desta forma, este agente é utilizado, frequentemente como adjuvante terapêutico, em combinação com anfotericina B, para pacientes com candidíase sistêmica (GUEVARA-LORA et al., 2020).

Uma nova classe de drogas, as equinocandinas, tem mostrado ter efeitos fungicidas em todas as espécies de *Candida*. As equinocandinas incluem caspofungina, micafungina e anidulafungina. Atuam impedindo a biossíntese de glucanas, pela inibição da β -1,3-glucano sintase, presente na membrana celular dos fungos. Essa inibição resulta em uma parede celular anormal que é fraca, incapaz de resistir ao estresse osmótico, tornando-se suscetível à lise celular (SANTOS et al., 2018).

As equinocandinas tem certas vantagens atribuíveis aos seus efeitos na parede celular fúngica, incluindo um menor risco de efeitos colaterais, uma vez que as células animais não têm essa estrutura. Além disso, as drogas dessa classe podem ser usadas em casos de resistência azol-antifúngica. Embora a seletividade do alvo equinocandina para fungos forneça um bom perfil de segurança, esses compostos são peptídeos grandes, exigindo administração intravenosa (ALDHOLMI et al., 2019). Exibem alta atividade contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. No entanto, *C. parapsilosis* é intrinsecamente menos suscetível a essas drogas devido a uma alteração natural no gene que codifica a subunidade *FSK1* da β -1,3-glucano sintase (GUEVARA-LORA et al., 2020).

A crescente resistência das espécies de *Candida* leva ao aumento dos casos de candidíase e impõe a necessidade urgente de intensificar a busca por novas fontes de tratamento que possam ser úteis, isoladamente ou em sinergia com os medicamentos tradicionais, para o

controle da patogenicidade de *Candida* (GUEVARA-LORA et al., 2020). Dessa forma, o controle das infecções por *Candida* é um desafio na clínica moderna (SANTOS et al., 2018).

Metabólitos vegetais têm demonstrado boa eficácia e vem sendo considerados como potenciais agentes antifúngicos. Estudos estão indicando que essas substâncias inibem o crescimento e alteram a virulência de diferentes espécies de *Candida*, tanto na forma de levedura e hifal, quanto durante a formação de biofilme (ALDHOLMI et al., 2019; FELICE et al., 2019; MARTINS et al., 2015). O desenvolvimento de novas drogas e a identificação de novas moléculas com potencial antifúngico, mais eficazes e menos tóxicas, são fundamentais para enfrentar o desafio de controlar as infecções por *Candida* (SANTOS et al., 2018).

1.3 AMARYLLIDACEAE

Amaryllidaceae consiste em cerca de 85 gêneros e 1100 espécies, que estão distribuídos nas regiões tropicais e quentes do mundo, sendo sua presença descrita na África do Sul, América do Sul, particularmente na região andina e no Mediterrâneo (CAHLÍKOVÁ; BREITEROVÁ; OPLETAL, 2020; RANSTED et al., 2012).

A família Amaryllidaceae é essencialmente composta por plantas terrestres, eventualmente aquáticas ou epifíticas, que possuem bulbos subterrâneos e perenes, compostos de bainhas foliares de espessuras variadas; suas folhas são simples, sésseis ou subpeciouladas, dísticas, sendo concentradas basalmente, podendo ser lanceoladas a elípticas. Possuem escapos florais terminais (cheios ou fistulosos), inflorescências frequentemente umbeliformes, subentendidas por duas brácteas livres ou concrecidas somente de um lado, ou formando um tubo, podendo haver bractéolas pequenas e filiformes (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

Destacam-se duas características botânicas principais nas espécies de Amaryllidaceae: a presença de bulbos, os quais podem ser subterrâneos ou superficiais, e as flores, que possuem formatos variados e cores diversas, podendo ser branca, verde, rosa, alaranjada, entre outras (DUTILH, 2005). Os habitats nativos das espécies silvestres da família Amaryllidaceae variam e geralmente florescem no final do inverno e primavera, com exceções ocasionais no outono. A maioria das espécies tem grandes e vistosas flores actinomórficas, variando de estrela para a forma de trompete ou tubular. Em geral liberam um odor altamente perfumado e por isso são cultivadas como plantas ornamentais por séculos (JIN; XU, 2013).

Espécies da família Amaryllidaceae são utilizadas tradicionalmente pela população africana, predominantemente para o tratamento de feridas e de distúrbios gástricos (JIN; XU, 2013). Como constituinte da família Amaryllidaceae, ressalta-se o gênero *Crinum* por possuir notável importância medicinal, além de comercial e econômica (FENNELL; STADEN, 2001; TRAM et al., 2002). As espécies deste gênero são muito utilizadas na ornamentação, uma vez que possuem flores com uma variedade de cores (DUTILH, 2005).

Crinum se caracteriza por apresentar folhas dísticas com margens lisas, flores geralmente pediceladas, inflorescência uniflora, brácteas espatáceas unidas na metade inferior formando um tubo (DUTILH, 2005). O uso popular de *Crinum americanum* é diverso, há evidências em casos de asma, bronquite e malária, no mais, foram observadas propriedades cardiotônicas, expectorantes e antieméticas (FENNELL; STADEN, 2001).

O gênero *Habranthus Herb.*, que também é um dos constituintes da família Amaryllidaceae, reúne cerca de 40 espécies, sendo sua ocorrência registrada no sul da América do Sul, México e sudoeste dos Estados Unidos. No Brasil, ocorrem cerca de 20 espécies, em campos ou cerrados, sendo muitas regionais ou localmente endêmicas (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010). *Habranthus irwinianus Ravenna* é reconhecida pela presença de bulbos globosos, folhas presentes na antese, possui ainda flores róseas a lilases com sépalas oblanceoladas, filetes em comprimentos diferentes e estigma trilobado. Floresce de julho a fevereiro (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015).

As plantas produzem uma diversidade de metabólitos os quais podem ser divididos em dois grupos, metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários compreendem os carboidratos, aminoácidos, lipídeos e proteínas. Estes compostos são precursores para elaboração dos metabólitos secundários representados principalmente por: compostos fenólicos, terpenóides, flavonoides, óleos essenciais e alcaloides (KUMAR et al., 2015). Os metabólitos secundários estão envolvidos em processos essenciais ao mecanismo de proteção contra tensões ambientais, reagir aos estímulos externos à planta, tais como pragas, predadores, microorganismos, e contribuem para os odores, sabores e cores específicos das plantas. Os metabólitos secundários das plantas são fontes únicas de aditivos, flavorizantes e fármacos industrialmente importantes. Apresentam, portanto, significativas aplicações práticas para fins medicinais, nutritivos e cosméticos, além de importância na fisiologia do estresse em plantas para adaptação (PIASECKA et al., 2015).

Os metabólitos secundários de *Amaryllidaceae* são sintetizados tanto pela planta quanto por sua microbiota endofítica. Na verdade, fungos endofíticos associados a este grupo de plantas fornecem às plantas hospedeiras nutrientes e água, aliviam estresses bióticos e abióticos, aumentam a tolerância ao estresse e afetam o perfil do metaboloma (CARUSO et al., 2020). Eles são uma fonte de metabólitos de atividade antifúngica e antiparasitária e têm uma perspectiva promissora na aplicação como eficazes agentes de biocontrole, em substituição a fungicidas e pesticidas químicos. Além disso, para a quimiossíntese de alcaloides de *Amaryllidaceae* são necessários procedimentos complicados e caros, fazendo das plantas uma fonte exclusiva de alcaloides para a indústria farmacêutica. Fungos endofíticos simbióticos podem ser usados para aumentar a produção de alcaloide em plantas ou como uma fonte alternativa de alcaloides e outros compostos bioativos em culturas *in vitro* (CARUSO et al., 2020).

Alcaloides podem ser definidos como bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também, em menor extensão, em organismos marinhos, fungos e animais. São ainda definidos como substância orgânica, que possui um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos (SIMÕES et al., 2017). Para englobar as diversas estruturas que os alcaloides podem apresentar, mais tarde foram agrupados em: alcaloides verdadeiros, os que efetivamente derivam de aminoácidos e possuem nitrogênio heterocíclico; protoalcaloides, os que possuem nitrogênio fora de um heterociclo e por fim pseudoalcaloides, que correspondem àqueles que não se originam de aminoácidos, mas incorporam nitrogênio a suas estruturas (SIMÕES et al., 2017).

Os alcaloides *Amaryllidaceae* constituem um grupo importante de compostos naturais que possuem uma diversidade de funcionalidade e estrutura. Aproximadamente 600 alcaloides de ocorrência natural em plantas *Amaryllidaceae* foram identificados, muitos dos quais possuem uma variedade de potentes propriedades biológicas e farmacológicas (DESGAGNÉ-PENIX, 2021). Alcaloides de *Amaryllidaceae* são compostos únicos conhecidos por pertencerem ao grande grupo dos alcaloides de isoquinolina, eles são quase exclusivamente isolados da família *Amaryllidaceae* (DING et al., 2017).

Dois aminoácidos, tirosina e fenilalanina, são as estruturas chave da origem biossintética dos alcaloides de *Amaryllidaceae*. A tirosina está relacionada com o anel aromático ligado a dois carbonos e um nitrogênio (C6-C2-N), enquanto a fenilalanina está relacionada a outro anel aromático ligado a uma unidade de carbono (C6-C1). O precursor

biosintético dos esqueletos de Amaryllidaceae, o alcaloide norbelladina, é produto da reação que ocorre via grupo aldeído e grupo amina (BASTIDA et al., 2011). Na Figura 1 (pág. 27) demonstramos o precursor e os principais tipos de grupos de alcaloides formados a partir dele.

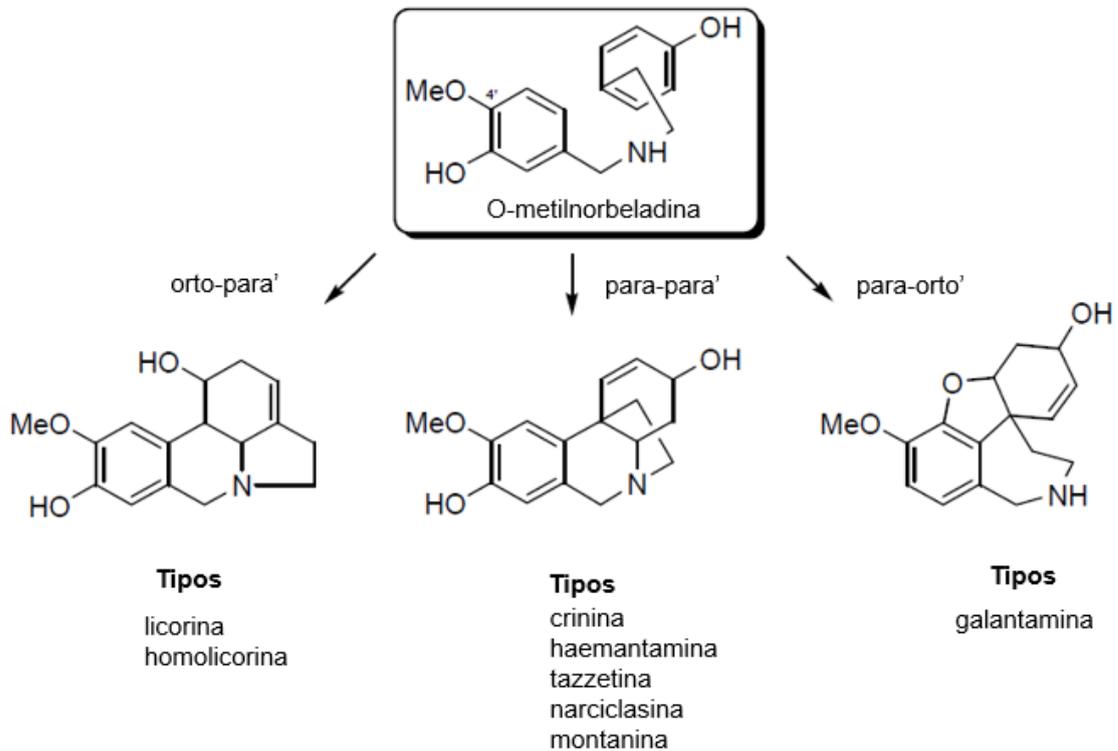


Figura 1 - Esqueletos dos principais tipos de alcaloides de Amaryllidaceae formados a partir do precursor norbelladina.

Fonte: Adaptado de Bastida et al. (2011).

Tradicionalmente, várias espécies desta família têm sido usadas para funções relacionadas a condições inflamatórias, circulatórias e lesões neurológicas. O valor medicinal das espécies Amaryllidaceae é atribuído à presença de alcaloides. A principal aplicação medicamentosa dos alcaloides da Amaryllidaceae é representada pela galantamina, que é comercializada como medicamento para Alzheimer devido à sua potente e seletiva atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase (DING et al., 2017).

Preparações a partir de espécies do gênero *Crinum* têm sido usados na medicina popular para tratar febre, dor, inchaço, feridas, câncer e malária (TRAM et al., 2002). As atividades biológicas das espécies *Crinum*, incluindo antitumorais, imunoestimulantes, analgésicos, antivirais, antibacterianos e antifúngicos, são atribuídas aos seus alcaloides, que podem ser isolados do bulbo, folhas, raízes e flores (MAROYI, 2016; TRAM et al., 2002).

Há extensas pesquisas sobre a potencialidade biológica de compostos químicos derivados de plantas, com destaque aos alcaloides (GOMES et al., 2022; HAGA et al., 2013; KONRATH et al., 2013; LONG et al., 2018; NOGUTI et al., 2016). Neste contexto, espécies de Amaryllidaceae, incluindo os gêneros *Crinum* e *Habranthus*, vêm despertando cada vez mais interesse, principalmente pela diversidade de seus alcaloides, que são metabólitos secundários de alto interesse biológico, possuindo atividade antimicrobiana, antitumoral e atividade inibidora da acetilcolinesterase (DING et al., 2017; KONRATH et al., 2013; NAIR; VAN STADEN, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de extratos de *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna* sobre espécies do gênero *Candida*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) definir o perfil de alcaloides dos extratos de *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna*;
- b) determinar se extratos obtidos das folhas, bulbo e raiz de *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna* são capazes de inibir cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida auris*;
- c) definir a concentração inibitória mínima (CIM) de cada extrato de de *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna* que apresentou atividade, frente a cada cepa fúngica testada;
- d) definir a concentração inibitória mínima (CIM) da licorina, frente a cada cepa fúngica testada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

Os ensaios laboratoriais microbiológicos foram realizados no Laboratório de Micologia do Laboratório Central do Distrito Federal, Brasília (LACEN-DF).

Os experimentos analíticos de espectrometria de massas dos extratos, foram gentilmente realizados no Laboratório Multiusuário de Petroleômica e Forense, coordenado pelo prof. Dr. Wanderson Romão, localizado nas dependências do Núcleo de Competência em Química de Petróleo-NCQP/LABPETRO na Universidade Federal do Espírito Santo.

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

Os exemplares de *Crinum americanum* L. foram coletados no Setor de Clubes Esportivos Sul, Quadra 713/913, Brasília, Distrito Federal, especificamente na área de jardim da Associação Geral dos Policiais Civis (Agepol), localizada nas coordenadas 15°49'08'' sul e 47°55'14'' oeste. O responsável pela coleta foi Prof. Dr. Christopher Willian Fagg. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília, sob o registro Fagg 2474.

As folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. foram separadamente cortados com o auxílio de uma tesoura previamente higienizada. O material vegetal rasurado foi então seco com auxílio de uma estufa com circulação e renovação de ar (Solab® SL 102), até atingir umidade entre 8-14 %, conforme preconiza o Consolidado de normas da Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados (COFID) (BRASIL, 2015).

Os exemplares de *Habranthus irwinianus* Ravenna foram obtidos por meio do cultivo *in vitro*. Para a germinação *in vitro*, as sementes foram desinfestadas com etanol (70%) por 1 min, seguido de imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2-2,5%) por 8 min, e posteriormente lavadas com água destilada estéril. As sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose e 1,5% de *Phytigel* e foram mantidas em sala de crescimento a 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 h com 50 µmol m⁻².s⁻¹ de intensidade por 90 dias. Após 120 dias de crescimento, os exemplares foram transferidos para vasos de cultivo, os quais foram cultivados por 1 ano em casa de vegetação.

3.2.1 Extração botânica

Todos os extratos utilizados neste trabalho fazem parte da coleção de extratos do Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento, Produção e Controle da Qualidade de Medicamentos e foram produzidos pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília (UnB).

3.2.1.1 Extração de *Crinum americanum* L.

Após ser rasurado e seco, o material vegetal proveniente da espécie *Crinum americanum* L. foi separado em partes com mesma massa de material vegetal seco (14 g) e submetido ao processo de extração descrito por Gomes et al. (2022).

Em síntese, inicialmente, foi utilizado o solvente hexano no processo de extração (1:10, relação de massa de material vegetal seco e volume de solvente extrator), sendo renovado após 72 horas de contato com o material vegetal. Após três renovações consecutivas realizou-se a troca por solvente de maior polaridade. Posteriormente, realizou-se a mesma metodologia utilizando-se como solvente extrator o etanol. Finalizada esta etapa de extração obtivemos o Extrato 01 (Ext. 1) e o Extrato 02 (Ext. 2), extratos etanólicos da folha e do bulbo de *Crinum americanum* L., respectivamente.

Após a extração com etanol, o material vegetal remanescente (torta) do material que deu origem ao Ext. 02 foi submetido a extração aquosa ácida. Foram adicionados, a este material, 120 mL de ácido clorídrico 0,01 mol/L e a mistura foi aquecida até iniciar ebulição. O produto ácido formado foi filtrado, a fim de ser obtido o lavado ácido (LA). O LA foi neutralizado com hidróxido de amônio 25% (v/v) até atingir pH entre 7,0 e 8,0. Posteriormente, o material neutralizado foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 60 mL). Finalizada esta etapa de extração obtivemos o Extrato 06 (Ext. 6), que corresponde a fração acetato de etila do bulbo de *Crinum americanum* L..

Os solventes orgânicos foram eliminados por rota-evaporação com pressão reduzida e temperatura inferior a 40 °C, enquanto a água foi eliminada por liofilização. Os extratos foram armazenados em refrigerador (2 - 4 °C) até utilização nos ensaios subsequentes. Na Figura 2 (pág. 32) demonstra-se o esquema de obtenção dos extratos e da fração obtidos a partir da espécie *Crinum americanum* L..

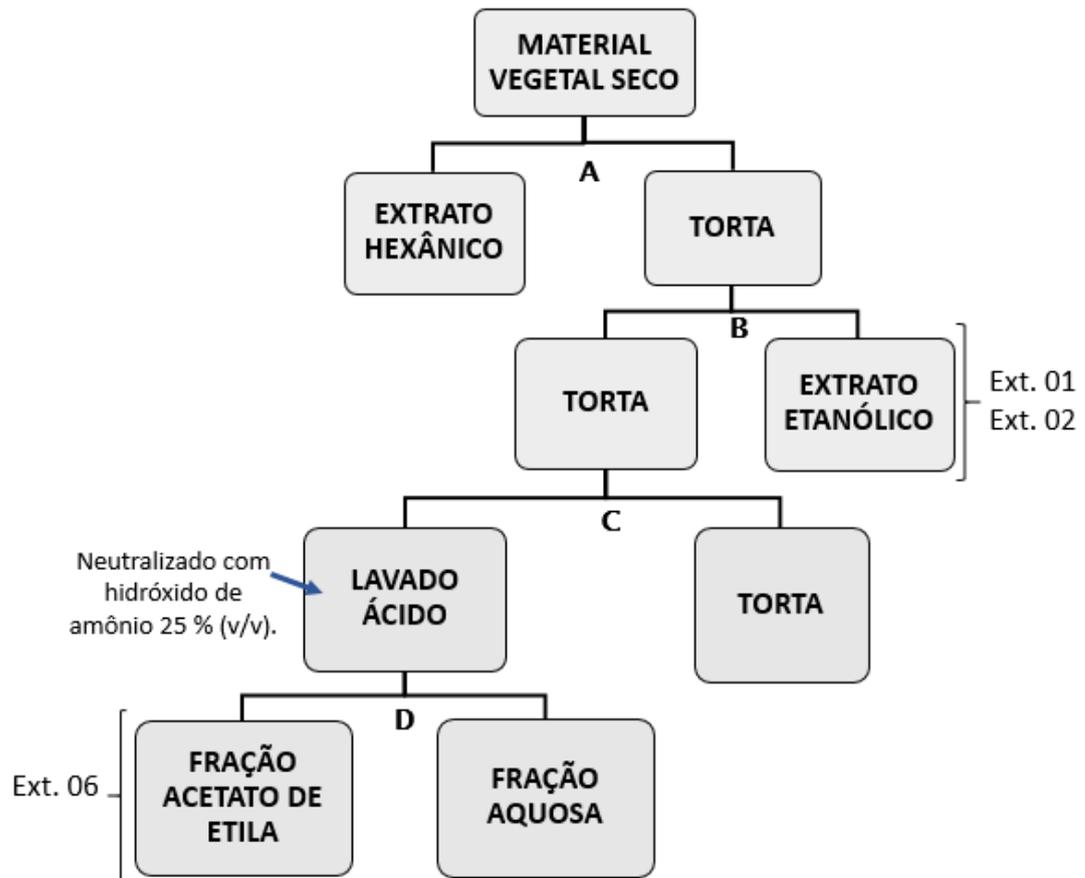


Figura 2 – Fluxo de obtenção dos extratos e frações de *Crinum americanum L.*

Legenda:

A – MACERAÇÃO COM HEXANO

B – MACERAÇÃO COM ETANOL

C – EXTRAÇÃO ÁCIDA - Com ácido clorídrico 0,01 mol/L (v/v)

D – PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ACETATO DE ETILA

3.2.1.2 Extração de *Habranthus irwinianus Ravenna*

O material vegetal proveniente da espécie *Habranthus irwinianus Ravenna* foi segmentado em raiz, bulbo e folha, os quais foram secos em estufa com circulação e renovação do ar até peso constante. Em seguida, o material vegetal seco foi extraído pela técnica de maceração com os solventes hexanos e, em seguida, por etanol, método semelhante ao realizado para espécie *Crinum americanum L.* Na Figura 3 (pág. 33) demonstra-se o esquema de obtenção dos extratos de *Habranthus irwinianus Ravenna*.

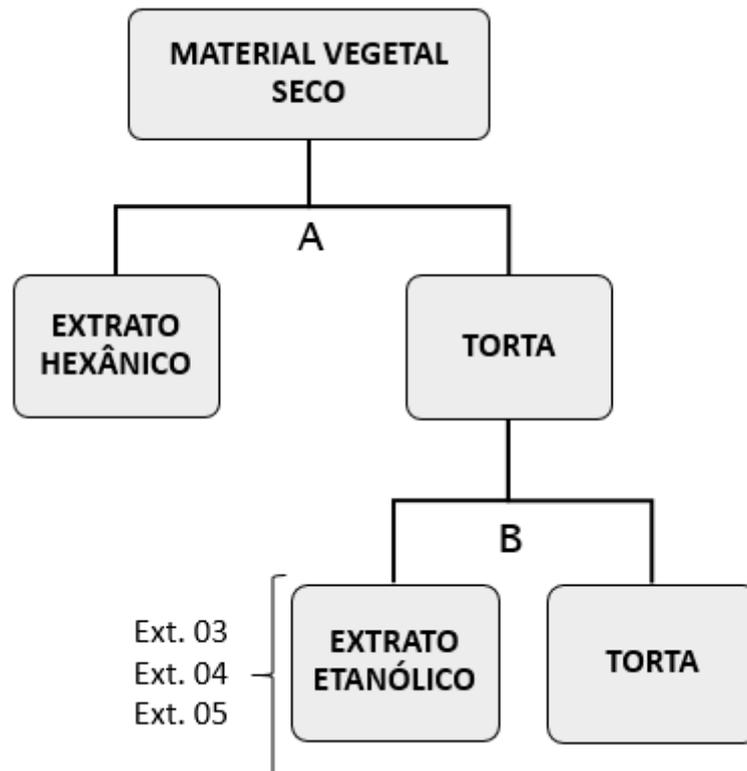


Figura 3 – Fluxo de obtenção dos extratos de *Habranthus irwinianus*.

Legenda:

A – MACERAÇÃO COM HEXANO

B – MACERAÇÃO COM ETANOL

Neste estudo, os extratos etanólicos de folha e bulbo de *Crinum americanum L.* e os extratos de folha, bulbo e raiz de *Habranthus irwinianus Ravenna*, além da fração ácida do bulbo de *Crinum americanum L.* foram selecionados para a avaliação da atividade antifúngica frente as cepas das espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. auris*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Todos os extratos e partes de plantas utilizadas em sua elaboração estão descritos na Tabela 1 (pág. 34).

Tabela 1 - Plantas utilizadas, partes da planta, solventes e extratos brutos vegetais

Dados dos extratos utilizados na avaliação da atividade antifúngica em diferentes espécies de <i>Candida</i>.						
Código	Espécie vegetal	Voucher de identificação	Órgão vegetal	Método de extração	Proporção planta:solvente	Solvente extrator
Ext. 1	<i>Crinum americanum</i> L. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2474	Folha	Maceração	1:10	Etanol
Ext. 2	<i>Crinum americanum</i> L. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2474	Bulbo	Maceração	1:10	Etanol
Ext. 3	<i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2409	Bulbo	Maceração	1:10	Etanol
Ext. 4	<i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2409	Folha	Maceração	1:10	Etanol
Ext. 5	<i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2409	Raiz	Maceração	1:10	Etanol
Ext. 6	<i>Crinum americanum</i> L. (Amaryllidaceae)	Fagg CW 2474	Bulbo	*Extração ácida	-	HCl 0,01 mol/L

*Descrito por Gomes et al. (2022).

3.3 PERFIL FITOQUÍMICO: ANÁLISE POR ESI (+) FT-ICR MS COM FOCO NA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE

Os extratos etanólicos e a fração acetato de etila foram analisadas por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclôtrica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS) com foco na identificação dos alcaloides. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do LabPetro-UFES.

Os extratos foram solubilizados em 1mL de metanol (Vetec® Química Fina Ltda, Brasil, pureza superior a 99.8%), e injetados, a taxa de fluxo de injeção foi de 5 μLmin^{-1} . A análise foi realizada na fonte eletrospray (ESI) operada em modo positivo, modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha) em um intervalo de massas m/z 150–1000 Da.

Os parâmetros da fonte ESI (+) foram: (i) tensão capilar (cone): 3500–4100 V; (ii) deslocamento da placa final = 500 V; (iii) temperatura e vazão do gás de secagem: 250°C e 2 μLmin^{-1} ; (iv) pressão do gás nebulizador: 1 bar; (v) skimmer = 15 V; e (vi) tensão de colisão =

(\pm) 1 V. Na transmissão iônica, os tempos de acúmulo de íons no hexapolo e o tempo de voo foram de 0,02 se 0,9 ms, respectivamente. Cada espectro foi adquirido pelo acúmulo de 16 varreduras de sinais no domínio do tempo em 4 M (mega ponto). Todos os espectros de massa foram calibrados externamente usando uma solução de arginina (m/z de 150 a 1000). O poder de resolução foi de aproximadamente 500.000 em m/z 400, fornecendo as atribuições de fórmula molecular precisa para íons moleculares carregados individualmente.

Na Figura 4 (pág. 35) esquematizamos os procedimentos realizados para análise.

3.3.1 Processamento dos dados

Os espectros de massa FT-ICR foram adquiridos e processados usando o *Software Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), para a determinação das estruturas propostas para cada fórmula molecular, foram atribuídas utilizando o banco de dados chemspider (www.chemspider.com) e PubChem (PubChem - nih.gov).

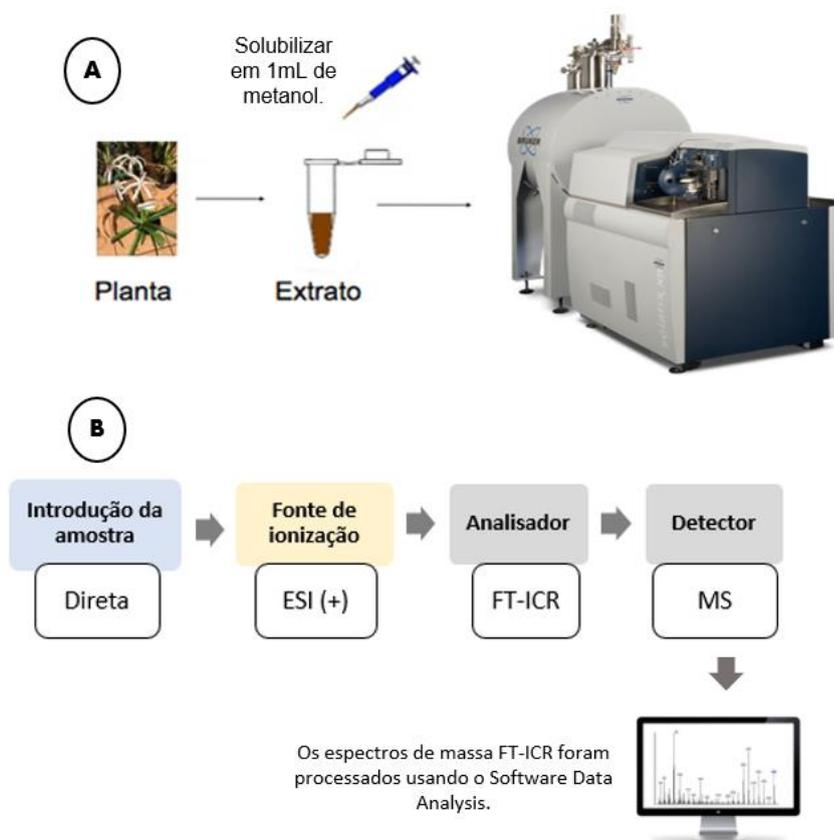


Figura 4 - Execução da análise por ESI (+) FT-ICR MS.

Legenda: Representação esquemática detalhando o passo a passo para execução da análise do perfil fitoquímico dos extratos por ESI (+) FT-ICR MS. A – Preparação das amostras. B – Execução da análise – passo a passo do fluxo da amostra no equipamento e da obtenção e interpretação dos resultados.

3.4 MATERIAL MICROBIOLÓGICO

3.4.1 Cepas Padrões

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 34135) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Para *Candida auris* foi utilizada cepa controle do Laboratório de Micologia do Lacen - DF, identificada por espectrometria de massas com *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF). O material, proveniente de análise inter-laboratorial, foi gentilmente cedido pelo Lacen do Distrito Federal.

As cepas de *Candida* spp. foram mantidas por meio de repiques sucessivos em meio Ágar Sabouraud Dextrose, sob resfriamento (4°C), e na forma de crioestoque em Caldo Sabouraud Dextrose com glicerol (20%), mantidos a -80°C. Para os testes, as cepas foram repicadas em Sabouraud e incubadas por 24h a 48h a 37°C.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS

Para avaliação da atividade antifúngica dos extratos frente as cepas de *Candida* spp. foram realizados testes pelo método de disco-difusão, adaptado do descrito no documento M44-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dos Estados Unidos da América (CLSI, 2004).

3.5.1 Diluição dos extratos: preparo para utilização nos ensaios

Os extratos foram individualmente pesados em microtubos de 1,5 mL e dissolvidos para obter uma solução de concentração aproximada de 100 mg/mL. O solvente utilizado para diluição de todos os extratos foi etanol (Marca: Dinâmica, Lote: 91357).

3.5.2 Preparo dos discos

Foram aplicados 10 µL de cada extrato a ser testado no centro dos discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro. Os discos foram mantidos em placa de petri, à temperatura ambiente durante 24 horas, para secagem (evaporação do solvente).

Discos de controle negativo com solvente puro (etanol e metanol) foram preparados do mesmo modo que o descrito para os extratos. Foram preparados ainda discos do antifúngico

Anfotericina B na concentração aproximada de 100 mg/mL, dissolvido em metanol (Marca: Neon, Lote: 45200), para controle positivo.

3.5.3 Preparo do inóculo fúngico

A partir de colônias provenientes dos subcultivos das cepas, em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) à 35°C (\pm 2°C) por 24 a 48 horas, foram preparados inóculos fúngicos. Para tal, foram suspensas e homogeneizadas, por agitação em vórtex, colônias das cepas em cerca de 5,0mL de solução salina estéril 0,85%, em tubos de ensaios, a fim de obter uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/mL) (CLSI, 2004). A padronização da suspensão de colônias de cada cepa foi confirmada com auxílio de um turbidímetro (Marca: Biomeriueux, Modelo: Densicheck).

3.5.4 Execução do método de disco-difusão

Na execução do método de disco-difusão foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), no qual inoculou-se, com auxílio de swab estéril, o inóculo fúngico, aplicando-se a técnica de esgotamento em estria com rotação da placa em ângulo de 60° por três vezes. Após o preparo da placa inoculada, foram aplicados os discos com os extratos a serem testados sobre a superfície inoculada. Cada disco foi pressionado para garantir seu contato completo com a superfície do ágar. Os discos foram distribuídos uniformemente na placa.

Em seguida as placas invertidas foram incubadas a 35°C (\pm 2°C) por até 48 horas (CLSI, 2004). O mesmo procedimento foi realizado com o controle. Todos os extratos e controles foram testados em triplicata e ao final do período de incubação foi calculada a média dos diâmetros dos halos de inibição (RAZMAVAR et al., 2014). Na Figura 5 (pág. 38) esquematizamos os procedimentos realizados.

3.5.5 Leitura e interpretação dos resultados

As áreas de inibição formaram zonas arredondadas, nas quais não se observa crescimento microbiano, denominadas por halos de inibição. A leitura dos resultados foi realizada utilizando-se paquímetro para medir os diâmetros dos halos de inibição do crescimento em milímetros (mm), observados em volta dos discos com os antifúngicos.

Os extratos testados que apresentaram halo de inibição foram considerados ativos frente as espécies de *Candida*, estes extratos foram então utilizados nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

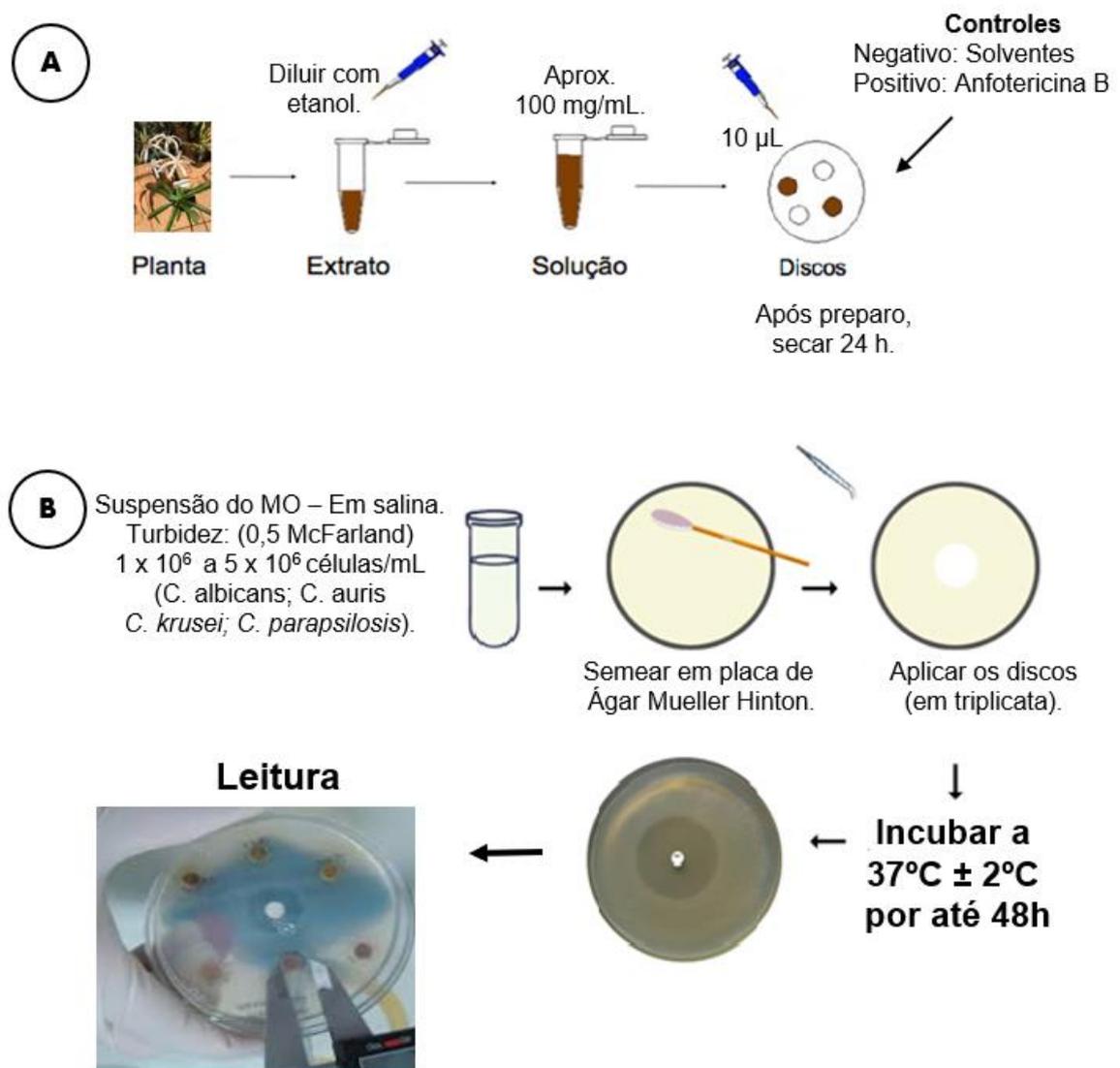


Figura 5 - Execução do método de disco-difusão.

Legenda: Representação esquemática detalhando o passo a passo para execução do método de disco disusão. **A** – Preparo dos discos. **B** – Execução do teste e leitura dos resultados.

3.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A avaliação da CIM, foi realizada para os extratos que apresentaram atividade antifúngica nos testes com o método disco-difusão. O método do ensaio é o de microdiluição em placa, adaptado do descrito por Mlozi et al. (2020). Para o teste de microdiluição foram utilizadas placas de 96 poços de fundo côncavo, as diluições seriadas ocorreram em orientação horizontal e em triplicata para cada um dos extratos testados e frente às cepas as quais os extratos demonstraram ser ativos.

3.6.1 Diluição dos extratos

A concentração da solução estoque (solução de partida e de maior concentração) dos extratos utilizados para realização do CIM está descrita na Tabela 2 (pág. 39). Realizou-se a diluição de todos os extratos para obtenção de volume suficiente da solução estoque para a realização do CIM em triplicata.

Tabela 2 - Plantas utilizadas, partes da planta, diluente da solução estoque e cepas de *Candida*

Código	Espécie vegetal	Diluente	Concentração da solução estoque utilizada no CIM	Espécies de <i>Candida</i> testadas
Ext. 1	<i>Crinum americanum</i> L. (extrato etanólico da folha)	Etanol	113 mg/mL	<i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>
Ext. 1	<i>Crinum americanum</i> L. (extrato etanólico da folha)	Etanol	103 mg/mL	<i>C. albicans</i> e <i>C. auris</i>
Ext. 2	<i>Crinum americanum</i> L. (extrato etanólico do bulbo)	Etanol	108 mg/mL	<i>C. albicans</i> , <i>C. auris</i> e <i>C. parapsilosis</i>
Ext. 5	<i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna. (extrato etanólico da raiz)	Etanol	80 mg/mL	<i>C. albicans</i> , <i>C. auris</i> e <i>C. parapsilosis</i>
Ext. 6	<i>Crinum americanum</i> L. (extração ácida do bulbo)	Etanol	88 mg/mL	<i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>
Ext. 6	<i>Crinum americanum</i> L. (extração ácida do bulbo)	Etanol	44 mg/mL	<i>C. albicans</i> e <i>C. auris</i>

Além dos testes com extratos, a Licorina também foi testada. Foi utilizado cloridrato de licorina (CAS: 2188-68-3) da Sigma-Aldrich. Dissolveu-se 1,3 mg em 1 mL de etanol 70%.

A metodologia empregada foi idêntica ao descrito para os extratos, no entanto este teste foi realizado em duplicata. A faixa de concentração da licorina nos poços da placa de microdiluição foi de 650 a 0,32 µg/mL, adaptado ao descrito por Ločárek et al. (2015). Foram testadas as cepas fúngicas objeto deste estudo e controles foram realizados.

3.6.2 Preparo dos inóculos fúngicos

A partir de colônias provenientes dos subcultivos das cepas, em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) à 35°C (± 2°C) por 24 a 48 horas, foram preparados inóculos fúngicos. Para tal, foram suspensas e homogeneizadas por agitação em vórtex, colônias do micro-organismo em cerca de 5,0mL de solução salina estéril 0,85%, em tubos de ensaios, a fim de obtermos uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/mL) (CLSI, 2004). A padronização da suspensão de colônias de cada cepa foi confirmada com auxílio de um turbidímetro.

3.6.3 Procedimento do ensaio

Antes de iniciar o ensaio os materiais, exceto extratos e tubos de cultura dos inóculos, foram colocados na cabine de fluxo laminar sob luz UV por 20 minutos. Todo o ensaio foi conduzido em condições assépticas e com materiais previamente esterilizados.

Inicialmente foi adicionado 100 µL do meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth) em cada um dos poços. Em seguida adicionou-se no primeiro poço 100 µL da solução estoque do extrato a ser testado, após homogeneização (3 aspirações e 3 “esvaziamentos” da ponteira) diluições seriadas de 1:2 foram realizadas na direção horizontal da placa, totalizados 12 poços, e em triplicata, no último poço foi descartado 100 µL a fim de se manter a concentração de trabalho. Posteriormente 100 µL do inóculo fúngico foi adicionado a cada poço.

Para o Ext. 1 a concentração dos poços na placa foi de 56,5 mg/mL (posição 01) a 0,0275 mg/mL (posição 12) para *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Já nas placas *Candida albicans* e *Candida auris* a concentração dos poços foi de 51,5 mg/mL a 0,0251 mg/mL.

Para o Ext. 2 a concentração dos poços na placa foi de 54,0 mg/mL (posição 01) a 0,0263 mg/mL (posição 12) para *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida auris*.

Para o Ext. 5 a concentração dos poços na placa foi de 40,0 mg/mL (posição 01) a 0,0195 mg/mL (posição 12) para *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida auris*.

Para o Ext. 6 a concentração dos poços na placa foi de 44,0 mg/mL (posição 01) a 0,0214 mg/mL (posição 12) para *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Já nas placas *Candida albicans* e *Candida auris* a concentração dos poços foi de 22,0 mg/mL a 0,0107 mg/mL.

Foram ainda adicionados às placas os controles, visando garantir a qualidade e confiabilidade do teste: controle do meio de cultura, onde somente o meio foi depositado nos poços para confirmar sua esterilidade e da placa utilizada, controle de crescimento (inóculo + meio de cultura) para verificar a capacidade do meio em permitir o crescimento fúngico e controle negativo de crescimento com o antifúngico Anfotericina B na presença do inóculo. A concentração da Anfotericina B em cada poço foi de 500 µg/mL. Os controles foram testados na mesma placa em triplicata (3 poços). Por fim, foi realizado o controle do solvente, para o qual foram realizadas diluições seriadas de 1:2 do solvente puro, de modo idêntico aos descrito para os extratos. A finalidade do controle de solvente é demonstrar que não há inibição do crescimento fúngico por ação do solvente, o que poderia gerar dúvidas no resultado do teste, causando um falso positivo para atividade do extrato.

Ao final, cada placa foi selada, com adesivo apropriado e incubada a 37 °C por 24 horas. Após este período, adicionou-se a cada poço 15 µL de solução de resazurina (0,01%) recém preparada e foi realizada homogeneização em mesa agitadora por 20 minutos. A placa selada foi incubada a 37°C de 18 a 24 horas. Na Figura 6 (pág. 42) esquematizamos os procedimentos realizados.

3.6.4 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi realizada por visualização da mudança de coloração dos poços. Para este estudo será considerada CIM a menor concentração que manteve a coloração inicial (azul), indicando ausência de crescimento microbiano ou a primeira diluição que sofreu alteração de azul para sutilmente rosa. A mudança de cor indica redução de resazurina e, portanto, crescimento microbiano.

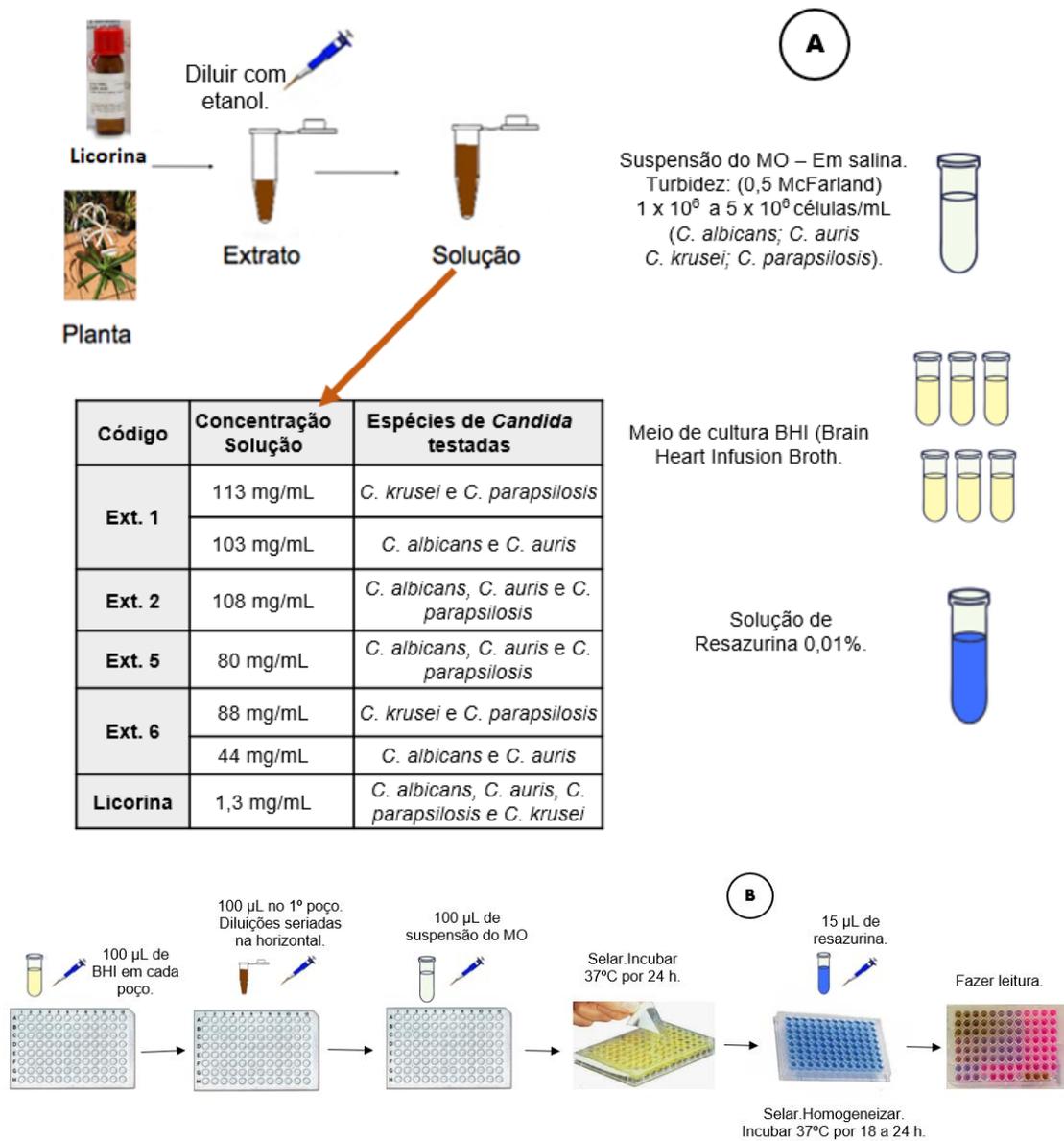


Figura 6 - Execução do método de microdiluição em placa para determinação da CIM.

Legenda: Representação esquemática detalhando o passo a passo para execução do método de microdiluição em placa. A – Materiais, preparações e reagentes necessários para realização do ensaio. B – Execução do teste e leitura dos resultados.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS

Após a execução do ensaio pelo método de disco-difusão, as placas invertidas foram incubadas a 35°C (\pm 2°C) por até 48 horas e ao final os halos formados foram medidos.

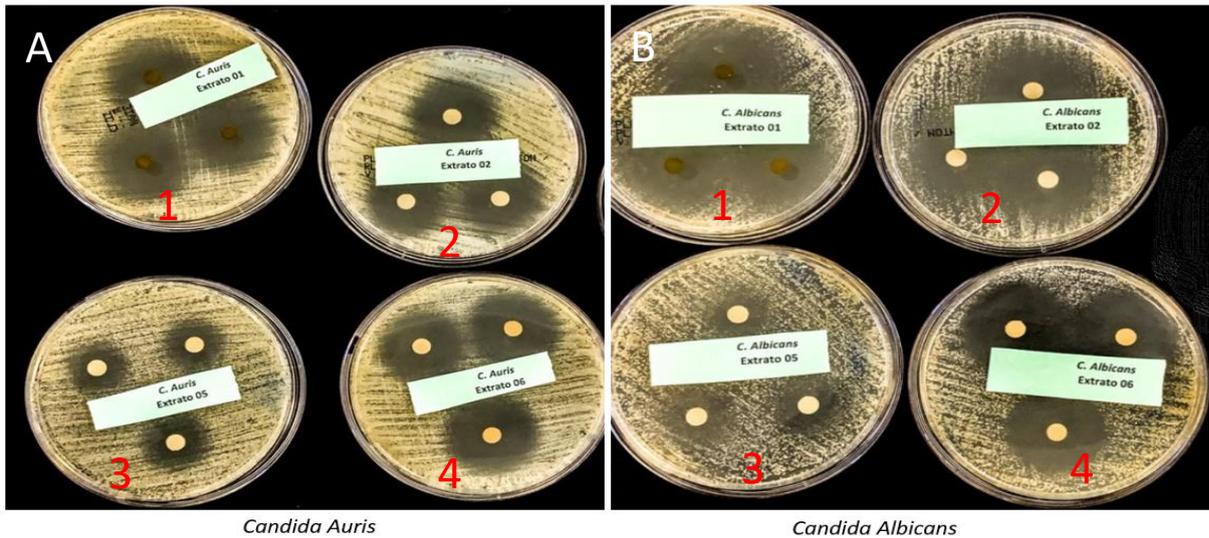


Figura 7 - Formação dos halos de inibição nas placas semeadas com *C. auris* e *C. albicans*.

Legenda: Atividade antifúngica pelo método de disco-difusão. Halos de inibição ao final do teste nas placas semeadas com *C. auris* (A) e *C. albicans* (B). 1) Ext. 01 (extrato etanólico da folha de *Crinum americanum* L.), 2) Ext. 02 (extrato etanólico do bulbo de *Crinum americanum* L.), 3) Ext. 05 (extrato etanólico da raiz de *Habranthus irwinianus* Ravenna) e 4) Ext. 06 (fração ácida do bulbo de *Crinum americanum* L.).

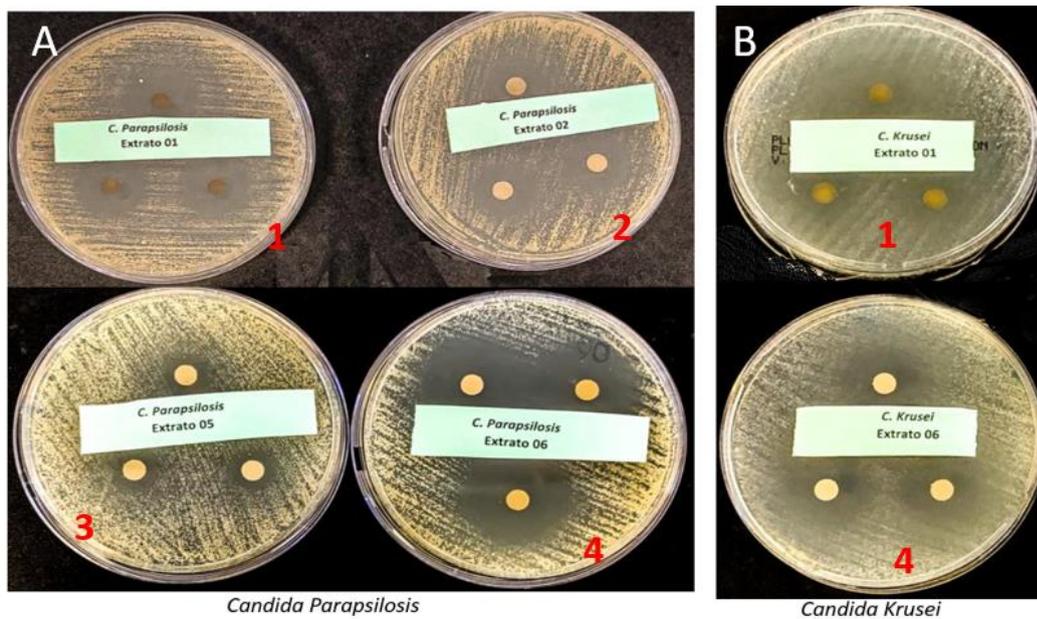


Figura 8 - Formação dos halos de inibição nas placas semeadas com *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Legenda: Atividade antifúngica pelo método de disco-difusão. Halos de inibição ao final do teste nas placas semeadas com *C. parapsilosis* (A) e *C. krusei* (B). 1) Ext. 01 (extrato etanólico da folha de *Crinum americanum* L.), 2) Ext. 02 (extrato etanólico do bulbo de *Crinum americanum* L.), 3) Ext. 05 (extrato etanólico da raiz de *Habranthus irwinianus* Ravenna) e 4) Ext. 06 (fração ácida do bulbo de *Crinum americanum* L.).

As medidas descritas na Figura 9 (pág. 44) correspondem às áreas de inibição do extrato. Para determinação dos valores foram medidas nas placas as zonas arredondadas, formadas ao redor dos discos impregnados com os extratos, nas quais não se observou crescimento microbiano, denominadas por halos de inibição, os halos formados são demonstrados nas figuras 7 e 8 (pág. 43). A leitura dos resultados está expressa em milímetros (mm) e foi realizada utilizando-se paquímetro para medir os diâmetros dos halos de inibição do crescimento, observados em volta dos discos com os antifúngicos.

Os valores de diâmetro de halo de inibição foram expressos como média e desvio padrão (n=3). Os valores foram comparados com o grupo anfotericina B por meio de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Dunnet. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como diferença significativa.

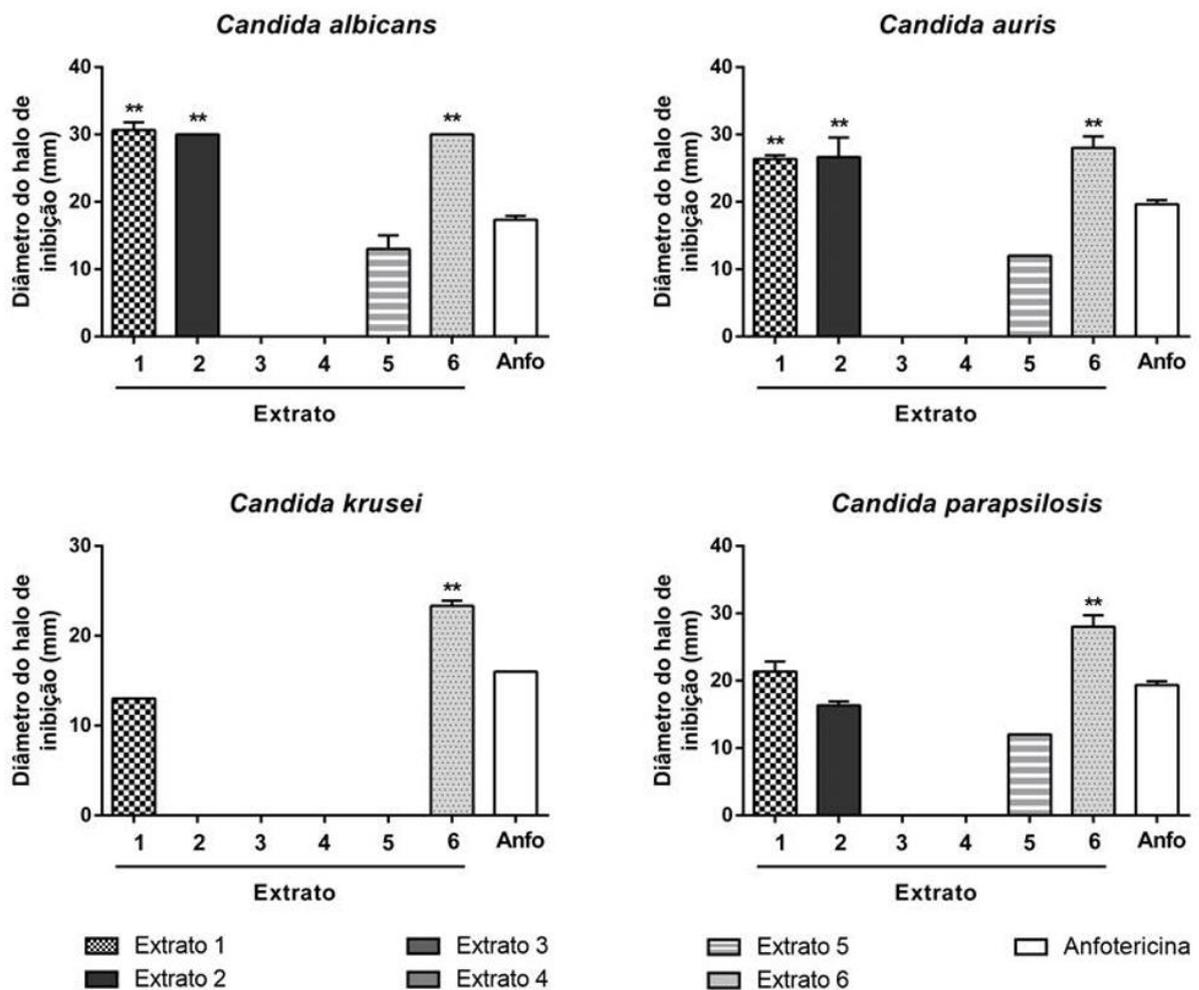


Figura 9 - Diâmetro dos halos de inibição no ensaio de atividade antifúngica por disco-difusão.

Legenda: As medidas expressas nos gráficos de barra correspondem ao resultado do perfil de susceptibilidade das cepas de *Candida* spp. aos extratos vegetais e a Anfotericina B (Anfo). Os valores de diâmetro (mm) de halo de inibição foram expressos como média e desvio padrão (n=3). Os valores foram comparados com o grupo Anfotericina B por meio de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Dunnet. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como diferença significativa.

O extrato etanólico obtido pela maceração das folhas de *Crinum americanum* L., denominado por código Ext. 1, apresentou formação de halo de inibição nas placas com cultivo das cepas *C. auris*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Seu desempenho foi estatisticamente significativo para *C. auris* e *C. albicans*, quando comparado a Anfotericina B.

O extrato etanólico obtido pela maceração do bulbo de *Crinum americanum* L., denominado por código Ext. 2, apresentou formação de halo de inibição nas placas com cultivo das cepas *C. auris*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Seu desempenho foi estatisticamente significativo para *C. auris* e *C. albicans*, quando comparado a Anfotericina B.

O extrato etanólico obtido pela maceração do bulbo de *Habranthus irwinianus* Ravenna, denominado por código Ext. 5, apresentou formação de halo de inibição nas placas com cultivo das cepas *C. auris*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. No entanto seu desempenho não foi significativo, quando comparado a Anfotericina B.

O extrato obtido pelo método de extração ácida a partir do bulbo de *Crinum americanum* L., denominado por código Ext. 6, apresentou formação de halo de inibição nas placas com cultivo das cepas *C. auris*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Seu desempenho foi superior a Anfotericina B frente a todos, tendo formado os halos de maior diâmetro.

Entretanto, nas placas em que foram aplicados os discos impregnados com o extrato etanólico obtido pela maceração do bulbo de *Habranthus irwinianus* Ravenna, denominado por código Ext. 3 e nas placas em que foram aplicados discos impregnados pelo extrato de etanólico obtido pela maceração das folhas de *Habranthus irwinianus* Ravenna, denominado por código Ext. 4, não houve evidência de formação de halo o que sugere que não há atividade de inibição deste extrato frente as cepas de *Candida* testadas.

A formação do halo indica atividade do extrato, os testes de CIM foram realizados para os extratos que inibiram crescimento e frente às cepas inibidas. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, os extratos para os quais foram realizados os ensaios de Concentração Inibitória Mínima são: Ext. 1, Ext. 2, Ext. 5 e Ext. 6.

Os controles positivos, realizado com a Anfotericina B diluída em metanol, apresentaram halos de inibição para todos as cepas de *Candida* testadas. Os valores estão expressos na Figura 9 (pág. 44).

Os controles negativos apresentaram resultados conforme esperado, sendo que as placas com discos impregnados com solvente puro (etanol e metanol) não apresentaram halo de inibição

4.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os testes para determinação da CIM foram realizados pelo ensaio de microdiluição em placas de 96 poços de fundo côncavo, as diluições seriadas ocorreram em orientação horizontal, em triplicata para cada um dos extratos testados e frente as cepas as quais os extratos demonstraram ser ativos.

A Tabela 3 (pág. 46) resume os valores da CIM dos quatro extratos testados frente as cepas de *Candida spp.*, bem como os resultados obtidos com os controles positivos e negativos.

Tabela 3 - CIM dos extratos e resultado dos controles (resultados em µg/mL)

Cepa de <i>Candida spp.</i>	CIM Ext 01	CIM Ext 02	CIM Ext 05	CIM Ext 06	Controle Positivo	Controle ANFO	Controle Negativo
<i>C. auris</i>	805	422	1250	344	+	-	-
<i>C. albicans</i>	805	422	156	86	+	-	-
<i>C. krusei</i>	221	NA	NA	86	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	441	422	625	172	+	-	-

Legenda: (+) = houve crescimento; (-) = não houve crescimento; NA – não se aplica.

A leitura dos resultados após período de incubação das placas foi realizada por visualização da mudança de coloração dos poços. Utilizou-se a resazurina que é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade microbiana. Na sua forma oxidada apresenta coloração azul e na forma reduzida cor rósea (LIU et al., 2007). Para este estudo foi considerada CIM a menor concentração que manteve a coloração inicial (azul), indicando ausência de crescimento microbiano ou a primeira diluição que sofreu alteração de azul para sutilmente rosa. A mudança de cor indica redução de resazurina e, portanto, crescimento microbiano. A Figura 10 (pág. 47) demonstra um exemplo de leitura de resultados do CIM na placa em ensaios do extrato de *Crinum americanum L.* (extrato etanólico do bulbo) e dos controles frente a cepa *C. parapsilosis*.

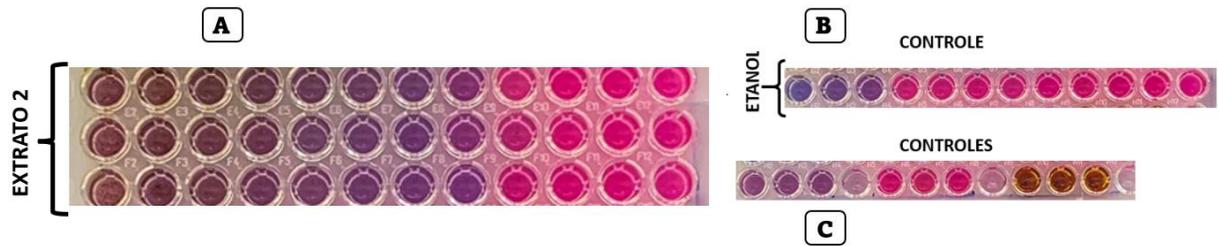


Figura 10 - Poços da placa de microdiluição no teste de CIM.

Legenda: Atividade antifúngica pelo teste de CIM. A - CMI Ext. 2 para a cepa de *C. parapsilosis*. Houve inibição de crescimento do micro-organismo pelo extrato até a concentração da posição 8 (da esquerda para direita) da placa, que corresponde a 422 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B – CIM solvente (controle). Demonstra que na posição da CIM não há interferência do solvente (não há inibição do micro-organismo pelo solvente) e C – Da esquerda para direita: 3 poços de meio (controle negativo - sem crescimento), 3 poços de meio com inóculo (controle positivo – mudança de cor indica crescimento) e 3 poços com Anfotericina com inóculo (controle negativo – não houve crescimento).

Os testes com os controles apresentaram resultado esperado. O CIM do solvente puro (etanol) frente a cada uma das cepas testadas demonstrou que não há interferência do solvente no crescimento microbiano.

Os testes para determinação da CIM da licorina foram realizados pelo ensaio de microdiluição em placas de 96 poços de fundo côncavo, as diluições seriadas ocorreram em orientação horizontal e em duplicata para cada uma das cepas estudadas.

A Tabela 4 (pág. 47) resume os valores da CIM da licorina frente as cepas de *Candida* spp., bem como os resultados obtidos com os controles positivos e negativos.

Tabela 4 - CIM da Licorina (resultados em $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Cepa de <i>Candida</i> spp.	CIM Licorina	Controle Positivo	Controle ANFO	Controle Negativo
<i>C. auris</i>	162,5	+	-	-
<i>C. albicans</i>	40,6	+	-	-
<i>C. krusei</i>	81,25	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	20,3	+	-	-

Legenda: (+) = houve crescimento; (-) = não houve crescimento.

4.3 PERFIL FITOQUÍMICO: ANÁLISE POR ESI (+) FT-ICR MS COM FOCO NA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE

O teste foi realizado com os extratos que apresentaram atividade, portanto, Ext. 1, Ext. 2, Ext. 5 e Ext. 6. Porém, após obtenção dos espectros observamos no Ext. 5 presença de pico característico de contaminação por propilenoglicol, o que resultou em dados não confiáveis que não serão apresentados neste trabalho.

4.3.1 Resultados dos espectros dos extratos com atividade antifúngica

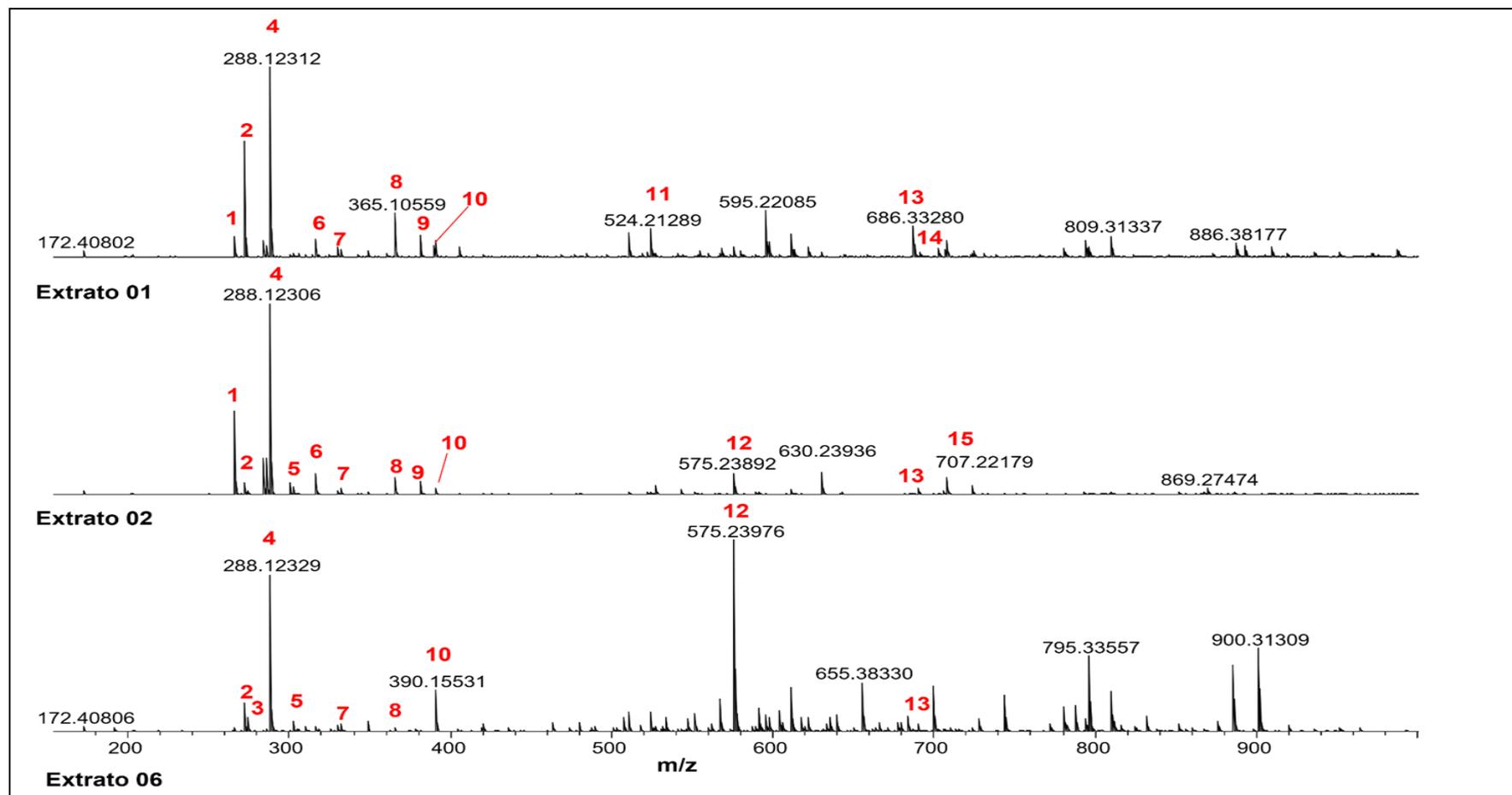


Figura 11 - Espectro de massas dos extratos 01, 02 e 06 de *Crinum americanum* L..

Legenda: Picos identificados conforme numeração da Tabela 5 (pág. 49).

4.1.2 Identidade das estruturas: processamentos dos dados obtidos por ESI (+) FT-ICR MS

Tabela 5 – Alcaloides e Naftomicinas identificados por ESI (+) FT-ICR MS nos extratos 01, 02 e 06 de *Crinum americanum* L.

ESI (+) FT-ICR MS: Alcaloides de Amaryllidaceae									
Ordem	Composto	Ext. 01	Ext. 02	Ext. 06	Fórmula Molecular	m/z Teórico	m/z Medido	Erro ppm	DBE
1	Licobetaína/Ungeremina	X	X	-	[C ₁₆ H ₁₁ NO ₃ + H] ⁺	266.08117	266.08110	0.26	12
2	Crinina	X	X	X	[C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ + H] ⁺	272.12812	272.12808	-0.33	9
3	Norgalantamina	-	-	X	[C ₁₆ H ₁₉ NO ₃ + H] ⁺	274.14377	274.14378	-0.02	8
4	Licorina ou Flexinina	X	X	X	[C ₁₆ H ₁₇ NO ₄ + H] ⁺	288.12303	288.12312	-0.31	9
5	Crinamina ou 8-O-desmetil-homolicorina	-	X	X	[C ₁₇ H ₁₉ NO ₄ + H] ⁺	302.13868	302.13872	-0.11	9
6	Homolicorina	X	X	-	[C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ + H] ⁺	316.15433	316.15414	-0.02	9
7	1-O-acetillicorina	X	X	X	[C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ + H] ⁺	330.13360	330.13379	-0.47	10
8	Sacarose ou isômeros (aduto de sódio)	X	X	X	[C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + Na] ⁺	365.10543	365.10545	-0.04	2
9	Sacarose ou isômeros (aduto de potássio)	X	X	-	[C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + K] ⁺	381.07937	381.07951	-0,47	2
10	-	X	X	X	[C ₂₀ H ₂₃ NO ₇ + H] ⁺	390.15473	390.15501	-0.56	10
11	Cripowellina B	X	-	-	[C ₂₅ H ₃₃ NO ₁₁ + H] ⁺	524.21264	524.21289	-0.48	10
12	Dímero Licorina	-	X	X	2 [C ₁₆ H ₁₇ NO ₄ + H] ⁺	575.23879	575.23933	-0.93	17
13	Naftomicina E	X	X	X	[C ₄₀ H ₄₇ NO ₉ + H] ⁺	686.33236	686.33242	-0.64	18
14	Naftomicina D	X	-	-	[C ₄₀ H ₄₇ NO ₁₀ + H] ⁺	702.32727	702.32807	-1.13	18
15	Dímero Sacarose ou isômeros (aduto de potássio)	-	X	-	2 [C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + Na] ⁺	707.22164	707.22179	-0.21	2

Legenda: (x) = presença. (-) = ausência

5 DISCUSSÃO

As plantas produzem uma variedade de compostos resultantes do seu metabolismo primário e secundário. Os metabólitos secundários são essenciais à adaptação das plantas as variações de condições climáticas, variações de aporte de nutrientes e a sua sobrevivência frente ao estresse ambiental, podendo fazer parte dos seus mecanismos de defesa, dentre outras funções. Diversos destes metabólitos são estudados e avaliados quanto a atividades farmacológicas. Os alcaloides são um dos metabólitos secundários de plantas que vêm sendo aplicados na medicina há séculos (SIMÕES et al., 2017).

Espécies da família Amaryllidaceae têm atraído considerável atenção devido a sua diversificada composição de alcaloides. A variação na composição de alcaloides nas plantas desta família foi observada tanto entre diferentes espécies, devido à expressão diferencial das enzimas biossintéticas necessárias as quais têm sua própria especificidade do substrato, quanto dentro das mesmas espécies de plantas quando foram coletadas em diferentes localizações (MARTÍNEZ-PEINADO et al., 2021).

As plantas da família Amaryllidaceae têm uma presença notável na medicina tradicional para a remediação de doenças infecciosas, diversas plantas de suas espécies já foram estudadas e funções distintas no tratamento de variadas doenças foram apontadas. Quimicamente, os alcaloides de Amaryllidaceae podem ser agrupados em grupos estruturalmente diversos, todos os quais estão relacionados com o precursor norbelladina (NAIR; VAN STADEN, 2014). Galantamina, licorina e crinina representam os três principais tipos estruturais para esses alcaloides, enquanto homolicorina, tazettina e montanina compõem a série secundária de compostos discerníveis dentro da Amaryllidaceae (NAIR; VAN STADEN, 2014). A Figura 11 (pág. 48), mostra os espectros de massas ESI (+) para três extratos de *Crinum americanum L.* Sinais variando de m/z 150 – 1000 foram detectados, como moléculas protonadas $[M + H]^+$, e a sacarose foi identificada como aduto de sódio $[M + Na]^+$.

A técnica de Espectrometria de Massas (MS) consiste na ionização das moléculas de interesse por meio de um sistema de ionização ou fonte de íons, e na posterior separação dos íons formados com base em suas diferentes razões massa/carga (m/z) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; ROMÃO et al., 2011).

O valor de razões carga/massa (m/z) representa a unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon (em unidade de massa atômica unificada) pelo seu número de carga (independente do sinal) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). A carga positiva ou negativa é necessária para que ocorra a interação do íon

com campos magnéticos e elétricos utilizados pelos analisadores de massas (HAM, 2008). As diferentes magnitudes de resposta para os íons de diferentes massas é a base para suas separações no analisador de massas. Os diferentes tipos de fonte de ionização e analisadores de massas determinam a aplicabilidade da MS (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; ROMÃO et al., 2011).

A exatidão em massa é comumente expressa em ppm, ela indica o quanto o valor experimental está próximo do valor verdadeiro. A alta exatidão de massas varia entre valores menores que 2 ppm de erro, quanto menor for o erro, maior é a probabilidade da fórmula molecular atribuída ser a verdadeira (VAZ; DE MORAES; ROMÃO, 2017). Para calcular a exatidão de massas é utilizado a equação do erro em ppm (1).

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{massa medida} - \text{massa teórica}}{\text{massa teórica}} \times 10^6 \quad (1)$$

O grau de insaturação para cada molécula pode ser deduzido diretamente de seu valor equivalente de ligação dupla (DBE - do inglês – *double bound equivalent*) de acordo com a equação (2) (GROSS, 2004):

$$\text{DBE} = c - \frac{h}{2} + \frac{n}{2} + 1 \quad (2)$$

Onde, c, h e n são, respectivamente, os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, na fórmula molecular.

A Tabela 5 (pág. 49) demonstra os valores teóricos e medido de m/z , fórmula molecular, erro de massa (ppm) e DBE dos principais compostos identificados. Os íons de m/z 266, 272, 274, 288, 302, 316, 318, 330, 390, 680, 686 e 702, apresentam em sua forma neutra, valores de peso moleculares ímpares, como consequência, um número ímpar de Nitrogênio é identificado em sua estrutura química, classe NIOX, onde X = 3-10. A Figura 11 (pág. 48) demonstra os espectros de massa obtidos em nossas análises.

Os nossos resultados das análises por ESI (+) FT-ICR MS dos extratos de Amaryllidaceae apontaram presença de diversos alcaloides. Na Figura 12 (pág. 52) demonstramos a estrutura química dos alcaloides e naftomicinas identificados em *Crinum americanum L.*

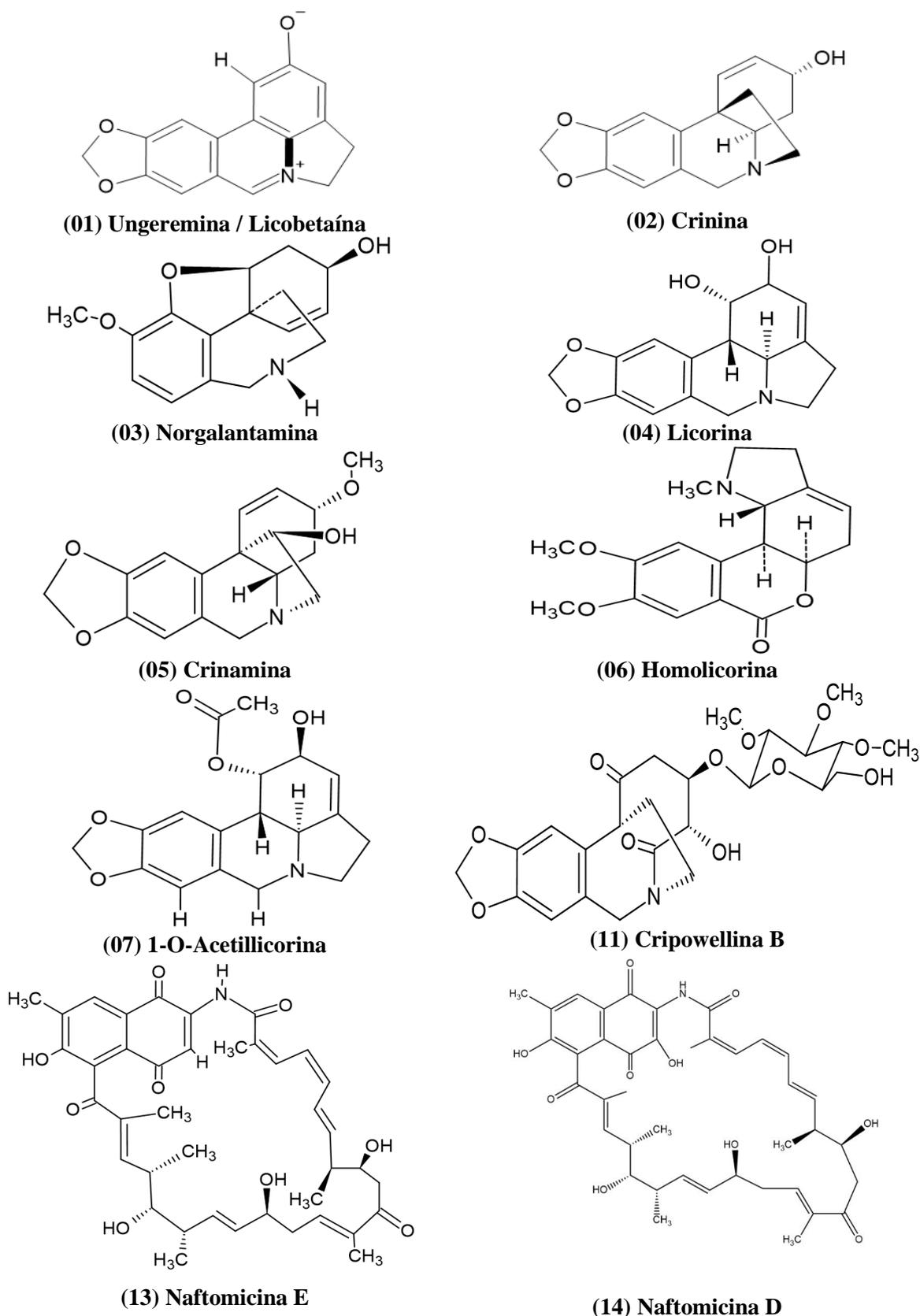


Figura 12 - Alcalóides Amaryllidaceae e Naftomicinas identificados em *Crinum americanum L.*

Nos extratos de *Crinum americanum L.*, denominados Ext. 1, Ext. 2 e Ext. 6, houve identificação simultânea dos alcalóides licorina, crinina e 1-O-acetillicorina. O composto m/z

288.12303 correspondente ao íon $[C_{16}H_{17}NO_4 + H]^+$, ou seja, licorina (ou Flexinina) e Crinina, m/z 272.12812 - $[C_{16}H_{17}NO_3 + H]^+$, são frequentemente relatados em diversas espécies da família Amaryllidaceae, e especialmente em *Crinum*, podemos citar *Crinum amabile*, *Crinum delagoense* I.Verd., *Crinum lugardiae* N.E.Br., *Crinum macowanii* Baker e *Crinum moorei* (DING et al., 2017; MAROYI, 2016; TALLINI et al., 2018). Refaat et al. (2012), descrevem que alcaloides do tipo crinina e licorina são os grupos mais comuns dentre os alcaloides isolados nas espécies *Crinum* conhecidas, o que corrobora os resultados de nossas análises. O alcaloide licorina tem um significado histórico considerável, pois foi o primeiro alcaloide descrito na família Amaryllidaceae. Ele também foi o primeiro dos alcaloides desta família a ser testado e a exibir efeitos antiproliferativos (NAIR; VAN STADEN, 2014). O composto 1-O-acetillicorina (m/z 330.13360) fórmula molecular $[C_{18}H_{19}NO_5 + H]^+$ é um potente inibidor da Acetilcolinesterase (KONRATH et al., 2013). Uma outra substância foi identificada nos três extratos, com m/z 390.15501 e fórmula molecular $[C_{20}H_{23}NO_7 + H]^+$, embora nenhuma estrutura química tenha sido proposta até agora.

No Ext. 1 e no Ext. 2 identificamos ainda homolicorina, com m/z 316.15433 e fórmula molecular $[C_{18}H_{21}NO_4 + H]^+$ e licobetaína (m/z 266.08117) com fórmula molecular $[C_{16}H_{11}NO_3 + H]^+$. Os alcalóides homolicorínicos estão presentes em diversos gêneros da família Amaryllidaceae, as características estruturais dos seus compostos tornam esses alcaloides fortes candidatos para o desenvolvimento de drogas anticâncer, além de possuir atividade inibitória da Acetilcolinesterase moderada (NAIR; VAN STADEN, 2021a; ŠAFRATOVÁ et al., 2018). Estudo de Evidente et al., 2004 testou Hipeastrina, que é um representante do grupo homolicorina, contra *C. albicans* e obteve atividade moderada, com CIM de 125 μ g / mL. A licobetaína é um alcaloide da Amaryllidaceae e estudo de Barthelmes et al 2001, relata que este alcaloide possui propriedades inibidoras *in vitro* e atividade citotóxica significativa para diversos tipos de carcinomas em camundongos.

Outro alcaloide identificado, tanto no Ext. 2 quanto no Ext. 6, foi a crinamina (m/z 302.13868) de fórmula molecular $[C_{17}H_{19}NO_4 + H]^+$. O alcaloide crinamina já foi identificado na espécie *Crinum jagus*, ele foi isolado dos bulbos da planta e mostrou forte atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, no entanto não houve confirmação de atividade antifúngica do alcaloide, que foi testado frente a *Trichophyton mentagrophytes* e *Aspergillus flavus* (ADESANYA et al., 1992).

No Ext. 01 foi identificado cripowellina B (m/z 524.21289) de fórmula molecular $[C_{25}H_{33}NO_{11} + H]^+$. Este alcalóide já foi descrito por Velten et al., 1998 quando foi isolado do bulbo da espécie *Crinum powellii*. Em estudo anterior, cripowellin B também foi isolado a partir

de *Crinum erubescens* (sinônimo de *Crinum americanum L.*) e mostrou possuir potente atividade antiplasmódica, além de apresentar atividades antiproliferativas contra linhagens de células cancerígenas humana (NAIR; VAN STADEN, 2021b; PRESLEY et al., 2016).

No Ext. 6, elaborado a partir do bulbo de *Crinum americanum L.* foi identificado norgalantamina (m/z 274.14377) de fórmula molecular $[C_{16}H_{19}NO_3 + H]^+$. Norgalantamina possui atividade inibitória de ambas as colinesterases (AChE e BChE) e pode ser a molécula candidata anti-Alzheimer mais promissora para experimentos futuros (ORHAN et al., 2021).

Estudo realizado com as folhas de *C. erubescens* (sinônimo de *Crinum americanum L.*) identificou, por meio de análises usando a técnica de de CG-MS, alcaloides já conhecidos, destacando-se a crinamina como um componente de proporção significativa (GUERRIERI et al., 2016).

O Ext. 5, obtido de *Habranthus irwinianus Ravenna* e que apresentou atividade em nossos estudos, demonstrou picos sugestivos de contaminação com polietilenoglicol nos espectros de ESI (+) FT-ICR MS, gerando, portanto, resultados não confiáveis e impossibilitando a elucidação de sua composição de alcaloides. *Habranthus irwinianus Ravenna* foi umas das espécies utilizadas no estudo de Paiva et al. (2020). Seus resultados demonstraram presença dos alcaloides galantamina e pseudolicorina nos extratos obtidos a partir do bulbo (PAIVA et al., 2020). Ensaio realizado com outra espécie do gênero *Habranthus*, *H. Cardenasianus*, identificou composição variada de alcaloides, dentre eles a licorina que também foi identificada em nossos resultados com a espécie *Crinum americanum L.* (ZARAGOZA-PUCHOL et al., 2021). A presença do alcaloide licorina nas espécies de *Crinum* e *Habranthus*, pode ser uma das razões para a atividade antifúngica frente as cepas de *Candida* testadas em nosso estudo.

A literatura aponta ainda, em outras espécies do gênero *Crinum* a presença de alcaloides idênticos aos que identificamos, dos bulbos de *Crinum pratense*, coletados na floração, identificou-se presença da licorina (GHOSAL et al., 1981). Em estudo realizado por Tallini et al., 2018, com extratos obtidos a partir do bulbo e das folhas de *Crinum amabile*, por CG-MS, vinte e três alcaloides já conhecidos foram identificados, dentre eles crinina, crinamina, licorina e 1-O-acetillicorina, que também foram identificados em nossos ensaios. Os alcaloides licorina e crinamina foram ainda identificados, por CG-MS a partir do extrato etanólico, na espécie *Crinum angustum Steud* (IANNELLO et al., 2014). Além disso, licorina e licobetaína foram descritos nos achados de Kianfe et al. (2020), que estudou a composição das frações solúveis obtidas a partir de *Crinum Glaucum*.

Os alcaloides licorina e 1-O-acetillicorina, além de ismina, foram isolados da fração básica solúvel em diclorometano de bulbos *Crinum x powellii* "Album". Os três alcaloides isolados foram testados contra cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que a licorina foi o único alcaloide que apresentou atividade inibitória da topoisomerase I moderada (NIÑO et al., 2007).

Além dos alcaloides, identificamos ainda Naftomicina D (m/z 702.32727 e $[C_{40}H_{47}NO_{10} + H]^+$) no Ext. 01 e Naftomicina E (m/z 686.33236 e $[C_{40}H_{47}NO_9 + H]^+$) nos extratos Ext.01, Ext. 02 e Ext. 06. Estes compostos são produtos do metabolismo de micro-organismos endofíticos, já citados na literatura como presentes em plantas da família Amaryllidaceae (CARUSO et al., 2020). Naftomicina D e Naftomicina E foram testadas frente a fungos fitopatogênicos, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium cinnabarium* e *Phyricularia oryza*, mas não apresentaram atividade inibitória (YANG et al., 2012). Lu e Shen (2007) relatam presença de substâncias semelhantes a partir de fungos endofíticos. Foi identificada, na planta medicinal *Maytenus hookeri*, presença de naftomicina K, juntamente com duas outras naftomicinas A e E, já conhecidas, e esses compostos foram isolados da cepa comensal *Streptomyces* sp. CS. A elucidação estrutural foi realizada pela análise de dados de NMR e MS. A naftomicina K mostrou evidente citotoxicidade contra P388 e linhas celulares A-549, mas nenhuma atividade inibidora contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (LU; SHEN, 2007).

Metabólitos bioativos sintetizados por fungos endofíticos mostram ações multidirecionais em plantas e podem ser explorados para o cultivo de plantas funcionais e medicinais específicas (CARUSO et al., 2020). O microbioma fúngico de Amaryllidaceae é dependente da espécie e do tecido, embora os endofitos dominantes sejam onipresentes e isolados em todo o mundo e de diversas espécies. Fungos endofíticos simbióticos podem influenciar na produção de alcaloides pelas plantas (CARUSO et al., 2020).

A atividade antifúngica dos compostos constituintes da família Amaryllidaceae foi objeto de estudo de Nair e Van Staden (2018). Em sua revisão os autores descrevem achados relacionados a ensaios realizados com quase 40 constituintes da família, principalmente alcaloides isoquinolínicos, que foram testados contra cerca de 50 patógenos fúngicos. Resultados promissores, a nível de $\mu\text{g/mL}$ foram relatados. Dentre os alcaloides estavam representantes de sete grupos incluindo a fenantridona, licorano, crinano, galantamina, tazetina, montanina e alcaloides homolicorínicos (NAIR; VAN STADEN, 2018). Nesse contexto, utilizamos cepas de *Candida* para avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *Crinum americanum* L..

O teste *in vitro* de disco-difusão, utilizado em nosso estudo, é uma estratégia amplamente utilizada para triagem de atividade antimicrobiana *in vitro*. A técnica de disco-difusão é uma técnica preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (OSTROSKY et al, 2008). Neste estudo foi utilizado como método qualitativo, aplicado com a finalidade de realizar uma triagem da atividade antifúngica dos extratos estudados.

O método de disco-difusão se baseia na difusão dos extratos, que foram aplicados em um disco de papel, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, na qual houve prévia semeadura dos micro-organismos (OSTROSKY et al, 2008). Após incubação, observamos na placa a ausência de crescimento do micro-organismo, ou seja, uma extensão em que o crescimento não seja observado, em geral correspondente a uma área circular ou “zona”, denominada por halo de inibição, ao redor do disco de papel que contém o extrato a ser estudado.

Em nossos ensaios por disco-difusão obtivemos resultados significativos. Destacamos o desempenho do Ext. 6, que apresentou resultados estatisticamente relevantes, com halo de inibição maior que o antibiótico controle, Anfotericina B, em todos os ensaios. Ressaltamos ainda o desempenho dos Ext. 1 e Ext. 2 que, para *C. albicans* e *C. auris*, apresentaram resultados expressivos.

Outros estudos já relataram atividade antimicrobiana de extratos de plantas da família Amaryllidaceae. Alawode et al. (2021) realizaram testes com o extrato metanólico de *Crinum jagus* pelo método de difusão em ágar. O extrato demonstrou atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*, *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* com uma zona de inibição de 20 mm a 200 mg/mL.

Crinum jagus é popularmente utilizado para curar feridas na medicina tradicional africana ágar (UDEGBUNAM et al., 2015). Estudo com esta espécie buscou validar seu uso popular, comprovando sua atividade antimicrobiana. Nos testes realizados, o extrato metanólico exibiu efeito antimicrobiano *in vitro* de maneira dependente da concentração com concentração de 100 mg/mL do extrato tendo o maior diâmetro da zona inibitória para *Bacillus subtilis* (25 mm), *Staphylococcus aureus* (21 mm) e *C. albicans* (14 mm), utilizou-se a metodologia de difusão em ágar (UDEGBUNAM et al., 2015). A concentração utilizada é semelhante à que utilizamos em nossos testes e em nossos resultados os halos de inibição que obtivemos foram ainda mais significativos para *C. albicans*, chegando a medir mais de 30 mm. Portanto, os nossos extratos demonstram uma atividade antimicrobiana mais significativa que o relatado na literatura para outra espécie de *Crinum*.

Evidente et al. (2004) realizaram a triagem antibacteriana e antifúngica de diferentes alcaloides isolados de bulbos de *Amaryllis belladonna* L. e os seus resultados demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans* nos testes por difusão em ágar, corroborando nossos resultados e os dados da literatura que indicam potencial antimicrobiano das diversas espécies de plantas da família Amaryllidaceae (EVIDENTE et al., 2004; NAIR; VAN STADEN, 2018).

Já nos estudos realizados com extratos de bulbos de *Polianthes tuberosa* L. (Amaryllidaceae) não houve evidência de atividade antimicrobiana. Os extratos foram testados pela metodologia de disco-difusão, com concentração de 50 mg/mL e frente a diversas bactérias, além de *C. albicans* ATCC 90028. Não foi observada inibição de crescimento (BARGHOUT et al., 2020). Os autores concluíram que os solventes utilizados nas extrações precisam ser verificados quanto a sua adequabilidade como extrator. No mais, o estudo não elucidou composição química de alcaloides, o que dificulta a correlação aos nossos resultados (BARGHOUT et al., 2020).

Apesar dos testes em ágar serem amplamente utilizados e possuírem o benefício da simples interpretação dos resultados pela visualização da formação do halo, possuem algumas desvantagens, como por exemplo: o processo de aplicação do extrato no disco pode deixar resíduo adjacente ao disco, influenciando na medição dos halos e na concentração do próprio disco (BONA et al., 2014). Realizamos o teste de microdiluição, o que gera uma economia de reagentes, meio de cultura, requer pouco espaço e, ainda, possibilita a determinação quantitativa da CIM de modo mais preciso que o teste de disco-difusão, uma vez que viabiliza a realização de várias repetições, se necessário, e diversas diluições de modo uniformes, dando assim maior confiabilidade aos testes (BONA et al., 2014). Portanto, em nosso estudo o teste de disco-difusão foi complementado pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), visando determinar quantitativamente a suscetibilidade dos micro-organismos, ou seja, a menor concentração (aproximada) de cada extrato capaz de inibir o crescimento das espécies de *Candida* estudadas.

Obtivemos resultados de CIM de 86 a 1250 µg /mL. Segundo Scorzoni et al. (2007), produtos vegetais com atividade antifúngica em concentrações inibitórias mínimas ≤ 250 µg/mL são considerados relevantes para a pesquisa de substâncias com finalidade terapêutica. Já Borges-Argaez et al. (2007) consideram que valores de CIM entre 100 e 200 µg/mL são aceitáveis. Enquanto Kuete (2010) classifica a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais como significativa (CIM <100 µg / mL), moderada (100 <CIM <ou = 625 µg / mL) e fraca (CIM > 625 µg / mL). Neste trabalho adotamos a mesma classificação de Kuete (2010).

Nossos resultados demonstram que o Ext. 6 é o que apresenta atividade a uma menor concentração frente a todas as cepas de *Candida* testadas, sendo seu melhor desempenho frente a *C. albicans* e *C. krusei*, ambos com CIM significativo em torno de 86 µg/mL. *C. parapsilosis* apresentou CIM moderado de 172 µg/mL e *C. auris* foi a menos suscetível ao Ext. 6 com CIM de 344 µg/mL, também classificada como moderada.

Os e Ext. 1, Ext. 2, Ext. 5 e Ext. 6 se mostraram ativos contra *C. auris*. Ressaltamos a importância deste achado, uma vez que desde o seu primeiro relato, em 2009, *C. auris* emergiu como um fungo multirresistente a drogas e foi rapidamente identificada como um patógeno globalmente emergente. *Candida auris* pode causar infecções fúngicas invasivas e formar biofilmes nas superfícies (CORSI-VASQUEZ; OSTROSKY-ZEICHNER, 2019; KIM; EOM, 2021; RUIZ-GAITAN et al., 2018). Os relatos de infecções por *C. auris* são crescentes. De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a notificação de casos nos EUA em 2018 aumentou 318%, quando comparada à média de casos notificados de 2015 a 2017. Dados do CDC também indicam que pelo menos 90% de *C. auris* isolados são resistentes a uma das classes de antifúngicos clássicos e cerca de 30% são resistentes a pelo menos dois antifúngicos (CDC, 2021). Deste modo, *C. auris* é relatado como um problema de saúde pública, tendo altas taxas de mortalidade em geral e uma alta taxa de resistência a medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis, portanto, a descoberta de compostos com atividade antifúngica frente a esta cepa é de alta relevância (CORSI-VASQUEZ; OSTROSKY-ZEICHNER, 2019; KIM; EOM, 2021; RUIZ-GAITAN et al., 2018).

Mesmo sendo sensível aos nossos extratos, *C. auris* foi a cepa que precisou de maior concentração dos extratos para ser inibida, sendo o Ext. 5 o menos ativo, com atividade fraca, CIM de 1250 µg/mL, e o Ext. 6 o mais ativo, com CIM de 344 µg/mL. Não encontramos na literatura publicações a respeito da atividade de espécies da família Amaryllidaceae contra *C. auris*, o que sugere que nossos resultados são inovadores neste aspecto.

Outro produto natural já se mostrou ativo contra *C. auris*. Estudo com α -*Cyperona*, que é o principal componente no rizoma da planta *Cyperus rotundus*, preveniu o crescimento de *C. auris* nas concentrações de 150 µg/mL e 300 µg/mL, os resultados foram avaliados por meio do sistema de monitoramento de crescimento Bioscreen-C (HORN; VEDIYAPPAN et al., 2021). Resultados promissores também foram obtidos nos testes com o *6-shogaol*, que é um produto desidratado de *6-gingerol* extraído da espécie *Zingiber officinale*. O composto exibiu atividade antifúngica e anti-biofilme ao inibir a formação de biofilme e erradicar os biofilmes pré-formados de *C. auris* (KIM; EOM, 2021).

Já *C. krusei* não foi suscetível a todos os extratos em nossos testes, sendo inibida somente pelos extratos Ext. 1 e Ext. 6 nos testes de disco-difusão. Destacamos que na literatura *C. krusei* é reconhecida como um patógeno fúngico potencialmente multirresistente, uma vez que possui intrínseca resistência ao fluconazol combinada com relatos de suscetibilidade diminuída à flucitosina e anfotericina B (JAMIU et al., 2020; PFALLER et al., 2008).

Quando comparada a *C. auris*, outra cepa com resistência reconhecida, *C. krusei* apresentou resultados de inibição a concentrações mais baixas nos testes de CIM. As CIM foram de 221 µg/mL para o Ext. 1 e 86 µg/mL para o Ext. 6, sendo estes extratos de atividade moderada e significativa, respectivamente.

Candida albicans e *C. parapsilosis* foram sensíveis a todos os extratos. Os nossos extratos possuem atividade antifúngica majoritariamente moderada, frente a essas cepas, uma vez que os resultados de CIM foram variados. Estudo de Panging et al. (2016) utilizando extratos, compostos isolados e derivados semissintéticos de flavanona a partir de *Scadoxus pseudocaulus*, espécie da família Amaryllidaceae rica em alcaloides do tipo fenantridonas, também demonstrou excelente potencial de atividade antimicrobiana frente a bactérias e a cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Podemos citar estudo de Kianfe et al. (2020), que obteve resultados que corroboram o potencial antimicrobiano das espécies de *Crinum*. Os autores testaram extratos e compostos isolados de *Crinum glaucum* A. Chev. frente a diversas cepas bacterianas, e observaram atividade antimicrobiana significativa frente a algumas delas (KIANFE et al., 2020). Estudo com extrato alcaloide obtido de plantas inteiras de *Crinum angustum* Steud., espécie do mesmo gênero da testada em nosso estudo, encontrou atividade micostática contra *Candida albicans*, com IC₅₀ (concentração necessária para uma redução de crescimento de 50%) de 78 µg/mL após 48 h de incubação (IANNELLO et al., 2014). Destacamos ainda que extrato obtido a partir do bulbo de *Crinum jagus* exibiu atividade antibacteriana (ADESANYA et al., 1992).

A família de plantas Amaryllidaceae tem uma presença notável na medicina alternativa, em que vários de seus membros são usados para tratar doenças diversas que se acredita serem uma consequência da patogênese fúngica (NAIR; VAN STADEN, 2018). Os nossos resultados somam evidências a literatura demonstrando que espécies Amaryllidaceae são fontes promissoras de compostos com atividade antimicrobiana. Mais testes, com avaliação da ação dos extratos e de seus componentes, isoladamente, frente aos fungos são necessários para elucidar mecanismo de ação dos nossos extratos frente as cepas de *Candida*.

Ensaio realizado por Rosli et al., 2014, investigaram mecanismos específicos da atividade dos extratos ricos em alcaloides de *Hymenocallis littoralis*, espécie da família

Amaryllidaceae. Seus resultados sugerem que os extratos possuem efeitos na parede celular do fungo. O extrato elaborado com metanol:clorofórmio (3: 1) a partir da folha da planta teve efeito inibitório do crescimento (CIM 6,25 mg/mL) em *C. albicans*. Se tornou visivelmente fungicida com o dobro da CIM (12,5 mg/mL), uma vez que a maioria das células foram esgotadas em 8 h nesta concentração. O estudo demonstrou ainda que a parede celular de *C. albicans* foi fortemente rompida, observação foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (ROSLI et al., 2014).

O maior grupo de alcaloides de Amaryllidaceae, os alcaloides de licorano, são conhecidos por uma ampla gama de propriedades biológicas, sendo a licorina o alcaloide mais estudado do grupo em ensaios de patogênese fúngica (NAIR; VAN STADEN, 2018). Em nosso estudo realizamos os ensaios de CIM com o composto licorina, para avaliação do seu potencial antifúngico. Em nossos resultados a licorina mostrou-se ativa frente a todas as cepas. A cepa mais suscetível ao composto foi a *C. parapsilosis* com CIM de 20,3 µg/mL, seguida por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. auris*, respectivamente.

A CIM de licorina frente a *C. albicans* obtida em nosso ensaio, de 40,6 µg/mL, é semelhante ao encontrado por Ločárek et al., 2015, em seus ensaios eles obtiveram CIM de 64 µg/mL de licorina frente a um isolado clínico desta espécie. No referido estudo foram testados seis extratos, juntamente com 19 alcaloides de Amaryllidaceae isolados, e detectou-se propriedades anti-levedura promissoras. A atividade mais potente foi demonstrada pela licorina, que inibiu *Candida dubliniensis* com um CIM de 32 µg/mL e *Lodderomyces elongiosporus*, com CIM de 64 µg/mL (LOČÁREK et al., 2015).

É importante notar que muitas vezes a atividade encontrada para o extrato de alcaloide total é inferior à de componentes puros, como consequência do fato de que os compostos puros são altamente seletivos em sua interação com os patógenos bacterianos, sendo assim atenuados em sua potência quando misturada com outros componentes em um extrato total (IANNELLO et al., 2014). Os extratos são de composição variada, denominados por fitocomplexo, correspondendo ao conjunto de compostos, originados do metabolismo primário ou secundário das plantas. Esses compostos são responsáveis pelas propriedades de uma planta medicinal ou de seus derivados, podendo atuar sinergicamente (BRASIL, 2014). Em nosso estudo não determinamos a concentração de cada um dos componentes identificados nos extratos analisados, não sendo possível comparar a atividade da licorina (pura) em relação a atividade dos extratos (complexos).

No estudo realizado com o extrato de *Pancratium illyricum* todos os isolados clínicos de *Candida* foram suscetíveis à atividade inibitória do crescimento nos testes do extrato obtido

a partir do bulbo, com valores finais de IC₅₀ (concentração necessária para uma redução de crescimento de 50%) variando de 1,22 a 78 µg/mL. Os alcaloides licorina e vittatina, identificados como componentes do extrato, também foram testados quanto à capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, e a licorina demonstrou-se muito ativa, com valores finais de IC₅₀ variando de 0,89 a 28,5 µg/mL (BONVICINI et al., 2014). Nossos ensaios não avaliaram interferências a nível estrutural, sendo necessários mais testes para esta avaliação do mecanismo de ação da licorina frente a espécies de *Candida*.

Estudo preliminar, que teve como objetivo explorar as atividades antifúngicas do cloridrato de licorina contra *C. albicans*, indica que a menor concentração em que a licorina foi ativa é de 64 µM. Abaixo de seu CIM, a licorina demonstrou ainda propriedade antivirulência ao suprimir a adesão, filamentação, formação de biofilme e desenvolvimento, bem como a produção de fosfolipase extracelular e substâncias exopoliméricas. Além disso, a licorina apresentou efeito sinérgico com Anfotericina B, embora sua interação com o fluconazol, assim como com a caspofungina, tenha sido indiferente. Ressalta-se o uso potencial de licorina, sozinho ou em combinação com os antifúngicos atuais, para combater infecções por *C. albicans* (YANG et al., 2019).

Estudos morfológicos realizados por Toenjes et al., 2009 avaliaram a capacidade da licorina de inibir a transição do estado de blastosporo para hifal em culturas de *C. albicans*. A virulência de *C. albicans* depende, em grande medida, de sua capacidade de interconversão entre esses estados vários estados morfológicos, incluindo blastosporo, pseudo-hifas e hifas, que por sua vez é regulada por vários fatores celulares e ambientais. No ensaio envolvendo 480 moléculas da coleção ICCB da Universidade de Harvard, a licorina foi uma das cinquenta e três que exibiram efeitos citotóxicos em um isolado clínico de *C. albicans*, testado a 37° C em meio Spider a 130 µM ao longo de um período de 4 h (TOENJES et al., 2009). Os autores ressaltam que as moléculas citotóxicas identificadas neste estudo, dentre elas a licorina, poderiam ter papéis poderosos na terapêutica antifúngica e, portanto, podem ser excelentes pontos de partida para o desenvolvimento de novos antifúngicos. No entanto, os efeitos sobre a morfologia de *C. albicans* da licorina foram mostrados como uma consequência da citotoxicidade ao invés da inibição da transição do blastosporo para as hifas (TOENJES et al., 2009).

Portanto, nossos resultados de CIM da licorina são compatíveis ao descrito na literatura. Ensaio de avaliação de mecanismo de atividade são necessários para elucidar a via de ação da licorina frente às cepas de *Candida*. No mais, testes de sinergismo, com tratamentos antifúngicos já consagrados, podem ser relevantes para evidenciar as propriedades antifúngicas da licorina.

6 CONCLUSÃO

As plantas da família Amaryllidaceae, *Crinum americanum L.* e *Habranthus irwinianus Ravenna*, possuem potencial antifúngico e provavelmente o futuro se voltará para seu uso em diferentes formulações. Embora existam relatos na literatura da atividade antifúngica de plantas da família Amaryllidaceae, especialmente de espécies do gênero *Crinum*, nosso estudo ampliou essa investigação.

Nossos resultados de atividade antifúngica, com resultados de CIM variando predominantemente de significativo a moderado, frente as cepas de *Candida*, especialmente frente ao patógeno *C. auris* são animadores, tendo em vista o crescente relato de resistência desta espécie.

Os resultados de CIM da licorina corroboram ainda a descrição na literatura quanto a atividade antifúngica deste composto, isoladamente.

Os resultados que obtivemos na caracterização química dos extratos de *Crinum americanum L.* corroboram a literatura, trata-se de extratos ricos em alcaloides, e ainda indicam a presença de compostos de fungos endofíticos.

O que se faz necessário é que se estabeleça com brevidade, os mecanismos de ação de cada extrato, ampliando conhecimento acerca do potencial de cada um dos seus componentes e definindo como eles afetam os micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- ADESANYA, S. A. et al. Antibacterial Alkaloids in *Crinum jagus*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 30, n. 4, p. 303-307, 1992.
- ALAWODE, T. T. et al. Investigation of Bulb Extracts of *Crinum jagus* for Antibacterial and Antifungal Activities. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 25, n. 1, p. 113-117, 2021.
- ALDHOLMI, M. et al. A Decade of Antifungal Leads from Natural Products: 2010–2019. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 182, 2019.
- AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. Habranthus (Amaryllidaceae) do Brasil. **Rodriguésia** [online], v. 66, n. 1, p. 203-220, 2015.
- BARGHOUT, N. et al. Antioxidant and antimicrobial effect of alkaloid bulbs extract of *Polianthes tuberosa* L. (Amaryllidaceae) cultivated in Algeria. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 44-48, 2020.
- BARTHELMES, H. U. et al. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 10, p. 1585-1591, 2001.
- BASTIDA, J. et al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: NETWORK, T. R. (Ed.). **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**. Kerala, India: 2011. p. 65-100.
- BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 9, n. 6, p. 595-601, 2006.
- BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.
- BONVICINI, F. et al. Relevant and selective activity of *Pancreatium illyricum* L. against *Candida albicans* clinical isolates: a combined effect on yeast growth and virulence. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID (Versão V)**: Coordenação de Fitoterápicos e de Medicamentos Dinamizados (COFID). 2015. 737 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos eo registro ea notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial Uniao, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Módulo VII. Brasília: ANVISA, 2004. 24p.
- CAHLÍKOVÁ, L.; BREITEROVÁ, K.; OPLETAL, L. Chemistry and Biological Activity of Alkaloids from the Genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). **Molecules**, v. 25, p. 4797, 2020.

- CANNOM, R. R. et al. *Candida albicans* stimulates local expression of leukocyte adhesion molecules and cytokines in vivo. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 3, p. 389-396, 2002.
- CARUSO, G. et al. Biodiversity, Ecology, and Secondary Metabolites Production of Endophytic Fungi Associated with *Amaryllidaceae* Crops. **Agriculture**, v. 10, n. 11, p. 533, 2020.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/exposurereport/>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- CHIN, V. K. et al. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host– Pathogen Interaction: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1643, 2016.
- CLSI. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline**. Wayne, Pensilvânia - USA, 2004.
- CORSI-VASQUEZ, G.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 559-564, 2019.
- DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis of alkaloids in *Amaryllidaceae* plants: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, p. 409-431, 2021.
- DING, Y. et al. Phytochemical and biological investigations of *Amaryllidaceae* alkaloids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 1, p. 53-100, 2017.
- DUTILH, J. H. A. *Amaryllidaceae*. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2005. Cap. 4, p. 244-256.
- EVIDENTE, A. et al. (-)Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2113-2118, 2004.
- FAKHIM, H. et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, v. 61, p. 377-382, 2018.
- FELICE, M. R. et al. Looking for New Antifungal Drugs from Flavonoids: Impact of the Genetic Diversity of *Candida albicans* on the in-vitro Response. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5108-5123, 2019.
- FENNELL, C. W.; STADEN, J. V. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 15-26, 2001.
- GAUTHIER, G. M.; KELLERN, P. Crossover fungal pathogens: The biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 146-157, 2013.
- GHOSAL, S. et al. Alkaloids of *Crinum pratense*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2003-2007, 1981.

- GOMES, J. V. D. et al. Chemical profile and biological activity of *Crinum americanum* L. (*Amaryllidaceae*). **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 25-35, 2022.
- GOW, N. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p.112-122, 2012.
- GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**. Berlin: Springer, 2004.
- GUERRIERI, C. G. et al. Alkaloids from *Crinum erubescens* Aiton. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 688-693, 2016.
- GUEVARA-LORA, I. et al. Plant-Derived Substances in the Fight Against Infections Caused by *Candida* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6131, 2020.
- HAGA, A. et al. Pyridone alkaloids from a marine-derived fungus, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, and their activities against azole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 750-754, 2013.
- HAM, B.M. **Even electron mass spectrometry with bimolecular applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008.
- HOFFMANN, E. de; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. [S.l: s.n.], 2007. v. 29.
- HORN, C.; VEDIYAPPAN, G. Anticapsular and Antifungal Activity of α -Cyperone. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 1, p. 51, 2021.
- ILIEV, I. D.; UNDERHILL, D. M. Striking a balance: fungal commensalism versus pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 366-73, 2013.
- JAMIU, A. T. et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.
- JIN, Z.; XU, X.-H. *Amaryllidaceae* Alkaloids. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Ed.). **Natural Products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin: Springer Reference, 2013. p. 4198.
- KADOSH, D.; MUNDODI, V.. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.
- KIANFÉ, B. Y. et al. Antimicrobial secondary metabolites from the medicinal plant *Crinum glaucum* A. Chev.(*Amaryllidaceae*). **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 161-166, 2020.
- KIM, H. R.; EOM, Y. B.. Antifungal and anti-biofilm effects of 6-shogaol against *Candida auris*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1142-1153, 2021.
- KONRATH, E. L. et al. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701-1725, 2013.
- KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.

- KUMAR, A. et al. Metabolites In Plants And Its Classification. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 287-305, 2015.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica; Prefácio:** Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LIU, M. et al. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 325-329, 2007.
- LOČÁREK, M. et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 9, p. 1934578X1501000912, 2015.
- LONG, S. Y. et al. Indole alkaloids from the aerial parts of *Kopsia fruticosa* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. **Fitoterapia**, v. 129, p. 145-149, 2018.
- LÓPEZ, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 2521-2529, 2002.
- LU, C.; SHEN, Y. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 10, p. 649-653, 2007.
- MAROYI A. A review of ethnobotany, therapeutic value, phytochemistry and pharmacology of *Crinum macowanii* Baker: A highly traded bulbous plant in Southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 595-608, 2016.
- MARTÍNEZ-PEINADO, N. et al. Amaryllidaceae plants: a potential natural resource for the treatment of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2021.
- MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-28, 2013.
- MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 166-178, 2014.
- MLOZI, S. H.; MMONGOYO, J. A.; CHACHA, M.. Antimicrobial activities of *Tephrosia vogelii* against selected pathogenic fungi and bacteria strains. **Mycology**, v. 11, n. 1, p. 49-55, 2020.
- MROCZYŃSKA, M.; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. Virulence of Clinical *Candida* Isolates. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 466, 2021.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Antifungal constituents of the plant family Amaryllidaceae. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 976-984, 2018.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cytotoxic Agents in the Minor Alkaloid Groups of the Amaryllidaceae. **Planta Medica**, v. 87, n. 12-13, p. 916-936, 2021b.

- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the *Amaryllidaceae*. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1193-1210, 2014.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Insight to the antifungal properties of Amaryllidaceae constituents. **Phytomedicine**, v. 73, p. 152753, 2020.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, 262-275, 2013.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. The plant family *Amaryllidaceae* as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. **South African Journal of Botany**, v. 136, 2021, p. 157-174, 2021a.
- NAVARRO-ARIAS, M. J. et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 783-794, 2019.
- NIÑO, J. et al. Alkaloids of *Crinum x powellii* "Album" (Amaryllidaceae) and their topoisomerase inhibitory activity. **Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences**, v. 62, n. 3-4, p. 223-226, 2007.
- NOGUTI, J. et al. Antifungal Activity of Alkaloids Against *Candida albicans*. **Journal Archive – California Dental Association**, v. 44, p. 493-498, 2016.
- OLIVEIRA, R. S. D.; ANTOINETTE, J. H.; SANO, P. T. Habranthus (Amaryllidaceae) da cadeia do espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, p. 491-503, 2010.
- OLIVER, J. C. et al. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- ORHAN, I. E. et al. Molecular approach to promising cholinesterase inhibitory effect of several amaryllidaceae alkaloids: Further re-investigation, **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 175-181, 2021.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.
- PAGNING, A. N. et al. Antimicrobial, antioxidant and butyrylcholinesterase inhibition activities of extracts and isolated compounds from *Scadoxus pseudocaulus* and semi-synthetic farrerol derivatives. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 166-174, 2016.
- PAIVA, José R. de et al. Desenvolvimento e validação de um método UPLC-ESI-MS para quantificação do fármaco anti-Alzheimer galantamina e outros alcaloides de Amaryllidaceae em plantas. **Revista da Sociedade Brasileira de Química** [online], v. 31, n. 2, 2020.
- PFALLER, M. A. et al. Global Antifungal Surveillance Group. (2008). *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515-521, 2005.
- PFALLER, M. A. et al. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. **Open Forum Infectious Disease**, v. 6, n. 1, p. S79-S94, 2019.

- PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK P.. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytol**, v. 206, p. 948-964, 2015.
- PRESLEY, C. C. et al. New potentially bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 21, p. 5418-5422, 2016.
- RAI, L. S. et al. Regulators of commensal and pathogenic life-styles of an opportunistic fungus—*Candida albicans*. **Yeast**, v. 38, p. 243-250, 2021.
- RANSTED, N. et al. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of *amaryllidaceae*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, 2012.
- RAZMAVAR, S. et al. Antibacterial activity of leaf extracts of *Baeckea frutescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomed Research International**, 2014, p. 521287, 2014.
- REFAAT, J. et al. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1-*Crinum* alkaloids: lycorine-type alkaloids. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 7, p. 1883, 2012.
- ROMÃO, W. et al. Química forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1717-1728, 2011.
- ROSLI, N. et al. Growth profile and SEM analyses of *Candida albicans* and *Escherichia coli* with *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb leaf extract. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 871-879, 2014.
- RUIZ-GAITAN, A. et al. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and *Candidaemia* in a tertiary care European hospital. **Mycoses**, v. 61, p. 498-505, 2018.
- ŠAFRATOVÁ, M. et al. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. **Archives of Phamarcal Research**, v. 41, n. 2, p. 208-218, 2018.
- SANTOS, G. C. O. et al. “*Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents.” **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.
- SCORZONI, L. et al. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.
- SHARMA, J. et al. Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.
- SINGH, G.; SAXENA, R. K.; SINGH, N. K. Screening of Potential Antimicrobial Activity of Indian Medicinal Plant of Different Solvent Extract: *Tinospora cordifolia* and *Hymenocallis*

- littoralis. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 3, n. 3, p. 928-932, 2016.
- SU, H.; HAN, L.; HUANG, X. Potential targets for the development of new antifungal drugs. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 12, p. 978-991, 2018.
- SUNDARASEKAR, J.; SAHGAL, G.; SUBRAMANIAM, S. Anti-*Candida* activity by *Hymenocallis littoralis* extracts for opportunistic oral and genital infection *Candida albicans*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 211-216, 2012.
- TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 22, n. 7(2), p. 79, 2021.
- TALLINI, L. R. et al. N-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1277, 2018.
- THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryote Cel**, v. 10, n. 9, p. 1173-82, 2011.
- TOENJES, K. A. et al. Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 779, 2009.
- TÓTH, R. et al. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 32(2), p. e00111-18, 2019.
- TRAM, N. T. N. et al. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). **Fitoterapia**, v. 73, p. 183-208, 2002.
- UDEGBUNAM, S. O. et al. Antimicrobial and antioxidant effect of methanolic *Crinum jagus* bulb extract in wound healing. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 239-248, 2015.
- VAZ, B. G.; DE MORAES, L. A. B.; ROMÃO, W. Fundamentos da Espectrometria de Massas e Aplicações. In: BEATRIZ, A.; LACERDA, V. (Org.). **Fundamentos da Espectrometria e Aplicações**. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 322.
- VELTEN, R. et al. Cripowellin A and B, a novel type of Amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powellii*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 13, p. 1737-1740, 1998.
- VILADOMAT, F. et al. Alkaloids of the south african Amaryllidaceae. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, v. 1, p. 131-171, 1997.
- WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.
- WITCHLEY, J. N. et al. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. **Cell Host Microbe**, v. 25, n. 3, p. 432-443, 2019.
- WOHLMEISTER, D. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 121-125, 2017.
- YANG, L. et al. Lycorine hydrochloride inhibits the virulence traits of *Candida albicans*. **BioMed Research Unternational**, 2019.

YANG, Yin-He et al. Naphthomycins L–N, ansamycin antibiotics from *Streptomyces* sp. CS. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 7, p. 1409-1413, 2012.

ZARAGOZA-PUCHOL D. et al. Alkaloids Analysis of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae), Anti-Cholinesterase Activity and Biomass Production by Propagation Strategies. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 192, 2021.