



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
RECURSOS NATURAIS – PPGDR

RAFAEL PEREIRA DA CRUZ

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Acrítópappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob.
(ASTERACEAE)

CRATO-CE

2023

RAFAEL PEREIRA DA CRUZ

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Acrítópappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob.
(ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri-URCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

CRATO - CE

2023

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema de geração automático da
Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Cruz, Rafael Pereira da

C957c Composição química e potencial antimicrobiano do óleo essencial de
Acrítópappus confertus (Gardner) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae). / Rafael Pereira da
Cruz. Crato-CE, 2023.

65p. il.

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos
Naturais da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Coorientador(a): Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

1.Antimicrobiano, 2.Antibióticos, 3.GC/MS, 4.Terpenos, 5.Mirceno; I.Título.

CDD: 577

RAFAEL PEREIRA DA CRUZ

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. (ASTERACEAE). Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada à Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre(a) em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

APROVADO(A) EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues (**Orientadora/Presidente**)
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof^a. Dr^a. Daiany Alves Ribeiro (**Membro Externo**)
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Luiz Marivando Barros (**Membro Interno**)
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof^a. Dr^a. Julimery Gonçalves Ferreira Macedo (**Suplente externo**)
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira (**Suplente Interno**)
Universidade Regional do Cariri (URCA)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais **Lúcia Erminia da Cruz** e **José Pereira da Cruz**, que infelizmente não tiveram as oportunidades que eu tive, mas possuem valores e saberes que nenhuma instituição é capaz de ensinar. Eu amo muito vocês...

AGRADECIMENTOS

Agradeço toda e qualquer conquista minha primeiramente aos meus pais, Lúcia Ermínia e José da Cruz, que apesar das dificuldades sempre investiram na minha educação, nunca deixando faltar além do material escolar, muito amor, afeto, carinho e compreensão. Eu nunca vou conseguir retribuir toda a gratidão que eu sinto por vocês...

Aos meus irmãos Lânia, Edy, Vane, Raimundo e Manuel, muito obrigado por sempre apoiaram a minha caminhada, eu não teria conseguido chegar até aqui sem os incentivos de vocês.

Aos meus sobrinhos José Arthur, Emanuely, Nathan Lucca, Maria Eloisa, Lorena, Alice, Enzo e Bernardo, por alegrarem os meus dias mantendo minha criança interior intacta.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, muito obrigado por todos os conselhos, sugestões, dedicação, compreensão e paciência no desenvolvimento dessa pesquisa. Serei eternamente grato por todos os ensinamentos!!!

Ao Meu Co-orientador Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, a quem tenho muito respeito e admiração. Gratidão por todo auxílio, disponibilidade e acolhimento no laboratório.

Ao pessoal do LPPN, em especial a José Walber, obrigado por todo o suporte na condução dos experimentos e pela cumplicidade nas lamúrias da vida acadêmica. Você é uma pessoa incrível, saiba que se precisar estarei sempre aqui.

Ao pessoal do LMBM e o Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, um exemplo de pesquisador para mim, obrigado pela parceira científica e por manter as portas do laboratório sempre abertas.

Ao pessoal do LMAC e a Prof^a Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, um anjo de luz em minha vida, muito obrigado pelos abraços, pelas palavras sábias de conforto e por sempre vibrar comigo a cada conquista. Serei sempre seu filho científico com muito carinho.

Aos pesquisadores que contribuíram diretamente no desenvolvimento desse trabalho, Adrielly Costa, José Jailson, Débora Odília, Natália Kelly, Raimundo Luiz e Prof. Dr. Marcelo Iriti, sou imensamente grato por toda ajuda e colaboração, contem comigo sempre!!!

Aos meus colegas professores da URCA (Campos Sales), obrigado pelo apoio e por tornarem uma viagem de topic tão longa e cansativa em um momento leve e de

descontração. E aos meus queridos alunos e orientandos do Curso de Ciências Biológicas (Campos Sales), por sempre inspiraram o meu melhor na minha identidade como pesquisador e docente.

Ao Prof. Me. José Weverton Almeida Bezerra, que esteve do meu lado desde o início, sendo minha luz nos momentos de dificuldades. Eu não consigo colocar em palavras toda minha gratidão, espero um dia retribuir tudo que vêm fazendo por mim desde 2016. Essa conquista é minha e sua, por você eu consegui!!

Ao Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais e todos aqueles que o compõem, aos docentes, discentes e especialmente ao Coordenador Prof. Dr. Fábio Yamada e a secretaria Francly Brito, por todo o auxílio prestado com dedicação, zelo e competência.

A banca examinada, Prof^a. Dr^a. Daiany Ribeiro, Prof. Dr. Marivando Barros, Prof^a Dr^a. Julimery Macedo e Prof. Dr. Raimundo Teixeira, pelas valiosas sugestões e considerações para aprimoramento do trabalho.

A CAPES e a URCA, pelo suporte financeiro e técnico concedido a esta pesquisa.

E ao meu Deus, essa força que rege o universo e guia minha vida, eu sinto tua presença em tudo que faço. Sou grato por mais um ciclo que se encerra e peço sempre que ilumine meus passos em direção ao melhor caminho para a minha evolução pessoal e profissional. Amém!!

*“I’m on the right track, baby
I was born to be brave”*
Lady Gaga

RESUMO

A resistência microbiana tornou-se um problema nas últimas décadas após o uso abusivo de antibióticos, que ocasiona na sobrevivência e disseminação de microrganismos resistentes. A fim de contornar a resistência, pesquisadores investem esforços na busca de substâncias naturais bioativas, como por exemplo os óleos essenciais. Diante disto, o objetivo desse estudo foi determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Acrítópappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob., bem como, avaliar o seu efeito intrínseco e combinado com drogas contra fungos e bactérias patogênicas, além disso, verificar a inibição de virulência em cepas de *Candida* spp. Para tanto, o óleo foi analisado por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS). Cepas de *Candida* spp. foram utilizadas para os ensaios antifúngicos por meio da técnica de microdiluição seriada, a fim de determinar a concentração inibitória média (IC₅₀). Para os ensaios de modificação, foram utilizadas concentrações sub-inibitórias (CIM/8). Além disso, foi avaliada a capacidade do produto natural em inibir a formação de estruturas filamentosas. Nos testes antibacterianos, foi determinada a CIM do óleo contra cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 25923, SA 10) e *Escherichia coli* (EC ATCC 25922, EC 06) e efeito modificador em associação com gentamicina, eritromicina e norfloxacino. O óleo essencial de *A. confertus* apresentou como constituinte majoritário o monoterpeno Mirceno (54.71%). Os resultados apontam que o óleo apresenta efeito antifúngico, sendo as cepas de *C. albicans* INCQS 90028 as mais susceptíveis. Além disso, o óleo é capaz de intensificar a ação do fluconazol frente as cepas de *C. albicans* INCQS 90028 e *C. tropicalis* INCQS 40042. Referente ao efeito na micromorfologia fúngica, o óleo também foi capaz de inibir os filamentos em todas as cepas testadas. Em relação aos ensaios antibacterianos, o óleo de *A. confertus* apresentou efeito clinicamente relevante contra SA ATCC 25923. Em combinação com antibióticos, o óleo potencializou a ação das drogas pela redução da CIM contra EC 06 e SA 10. Conclui-se que o óleo essencial de *A. confertus* apresenta potencial contra fungos e bactérias patogênicas, tornando-se um alvo para o desenvolvimento de um fármaco antimicrobiano. Assim como, para estudos posteriores com a espécie, a fim de caracterizá-la mais a fundo e identificar quais componentes estão inteiramente associados à sua ação antifúngica e antibacteriana.

Palavras-chaves: Antimicrobiano; antibióticos; GC/MS; terpenos; Mirceno.

ABSTRACT

Microbial resistance has become a problem in recent decades after the abusive use of antibiotics, which causes survival and dissemination of resistant microorganisms. In order to circumvent the resistance, researchers have invested efforts in the search for bioactive natural substances, such as essential oils. In view of this, the objective of this work was to determine the chemical composition of the essential oil of *Acrítópappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. leaves, to evaluate its intrinsic effect and in combination with drugs against pathogenic fungi and bacteria, in addition to verifying the inhibition of virulence in *Candida* spp. strains. For such, the oil was verified by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). *Candida* spp. strains were used for the antifungal assays by means of the serial microdilution technique, in order to determine the average inhibitory concentration (IC₅₀). For the modification assays, sub-inhibitory concentrations (MIC/8) were used. Furthermore, the natural product's ability to inhibit the formation of filamentous structures was evaluated. In the anti-bacterial tests, the MIC of the oil against standard and multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 25923, SA 10) and *Escherichia coli* (EC ATCC 25922, EC 06) and its modifying effect in association with gentamicin, erythromycin and norfloxacin were determined. The essential oil of *A. confertus* presented as major constituent the monoterpene Myrcene (54.71%). The results show that the essential oil has an antifungal effect, with *C. albicans* INCQS 90028 strains being the most susceptible. Furthermore, the oil can potentiate the effect of fluconazole against strains of *C. albicans* INCQS 90028 and *C. tropicalis* INCQS 40042. Regarding the effect on micromorphology, the oil was also able to inhibit the filaments in all strains tested. Regarding antibacterial assays, *A. confertus* oil showed clinical effect relevant against SA ATCC 25923. In combination with antibiotics, the oil potentiated the drug's action by reducing the MIC against EC 06 and SA 10. It is concluded that the essential oil of *A. confertus* has potential against pathogenic fungi and bacteria, making it a target for the development of an antimicrobial drug. As well as, for further studies with the species, in order to further characterize it and identify which components are entirely associated with its antifungal and antibacterial action.

Keywords: Antimicrobial; antibiotics; GC/MS; terpenes; Myrcene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos.....	22
Figura 2: Mecanismos fúngicos de resistência.....	23
Figura3: Aspectos morfológicos da espécie <i>Acritopappus confertus</i>	34
Figura 4: Curva de viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> INCQS 90028 frente ao óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em $\mu\text{g/mL}$	42
Figura 5: Curva de viabilidade celular de <i>Candida krusei</i> INCQS 40095 frente ao óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em $\mu\text{g/mL}$	42
Figura 6: Curva de viabilidade celular de <i>Candida tropicalis</i> INCQS 40042 frente ao óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em $\mu\text{g/mL}$	42
Figura 7: Efeitos do óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> nos aspectos morfológicos de <i>Candida albicans</i>	43
Figura 8: Efeitos do óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> nos aspectos morfológicos de <i>Candida krusei</i>	44
Figura 9: Efeitos do óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> nos aspectos morfológicos de <i>Candida tropicalis</i>	45
Figura 10: Efeito modificador do óleo essencial de <i>Acritopappus confertus</i> (OEAC) contra as cepas multirresistentes <i>Staphylococcus aureus</i> 10 e <i>Escherichia coli</i> 06 em associação com os antibióticos gentamicina, eritromicina e norfloxacino em $\mu\text{g/mL}$	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes do óleo essencial de <i>Acrítopappus confertus</i> (Gardner) R. M. King & H. Rob.....	40
Tabela 2: IC ₅₀ do Óleo Essencial de <i>Acrítopappus confertus</i> frente <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i>	41
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima do Óleo Essencial de <i>Acrítopappus confertus</i> frente a cepas bacterianas.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD:	<i>Agar Sabouraud Dextrose</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI:	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
C.	<i>Candida</i>
CA:	<i>Candida albicans</i>
CG-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
CIM:	Concentração Inibitória Mínima
CK:	<i>Candida krusei</i>
CSD:	<i>Caldo Sabouraud Dextrose</i>
CT:	<i>Candida tropicalis</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
E. C.:	<i>Escherichia coli</i>
FCZ:	Fluconazol
GC-FID:	<i>Gas Chromatography with Flame Detection Analysis</i>
HCDAL:	Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima
HIA:	<i>Heart Infusion Ágar</i>
IDP:	Difosfato de isopentenilo
INCQS:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MDR:	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MEP:	Via do metileritritol fosfato
MRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.
MVA:	Via do ácido mevalônico
OEAC:	Óleo Essencial de <i>Acritopappus confertus</i>
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PDA:	<i>Potato Dextrose Agar</i>
S.A.:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SISBio:	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen:	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
URCA:	Universidade Regional do Cariri

LISTA DE SÍMBOLOS

%:	Porcentagem
<	Menor que
≥:	Maior ou igual que
=	Igual
+	Mais
®:	Marca registrada
C:	Carbono
cel/mL	Unidade formadora de colônias por mililitros
°C:	Graus Celsius
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
h	Horas
mL:	Mililitro
mg:	Miligramas
µg:	Microgramas
µg/mL:	Microgramas de soluto por mililitro de solvente
µL:	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Resistência Microbiana.....	20
3.2 Bactérias Patogênicas.....	24
3.3 Fungos Patogênicos.....	26
3.4 Bioprospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade.....	27
3.5 Plantas Medicinais da Chapada do Araripe.....	28
3.6 Óleos Essenciais.....	30
3.7 Família Asteraceae.....	32
3.8 <i>Acritopappus confertus</i>	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Coleta do Material Botânico.....	35
4.2 Extração do Óleo Essencial.....	35
4.3 Análise da Composição Química do Óleo Essencial por CG-MS.....	35
4.4 Atividade Antifúngica.....	36
4.4.1 Cepas Fúngicas.....	36
4.4.2 Cultura Fúngica.....	36
4.4.3 Determinação da IC ₅₀ e curva de viabilidade celular.....	36
4.4.4 Avaliação da Atividade Modificadora do Fluconazol.....	37
4.4.5 Avaliação da Inibição da Virulência Fúngica.....	37
4.5 Atividade Antibacteriana.....	38
4.5.1 Cepas Bacterianas.....	38

4.5.2 Cultura Bacteriana.....	38
4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	38
4.5.4 Teste de Efeito Modificador de Antibióticos.....	39
4.6 Análises estatísticas.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Resultados.....	40
5.1.1 Composição Química.....	40
5.1.2 Atividade Antifúngica e Modificadora do Fluconazol.....	41
5.1.3 Potencial Anti-virulência.....	43
5.1.4 Atividade Antibacteriana e Modificadora de Antibióticos.....	45
5.2 Discussão.....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO A: Comprovante de Publicação do Artigo Original da Dissertação....	65
ANEXO B: Comprovante de Qualis Vigente na Área de Biodiversidade.....	66

1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana tornou-se uma das mais sérias preocupações de saúde pública em todo o mundo, considerada um grande desafio clínico no tratamento de infecções invasivas, e esse problema tem sido intensificado devido ao uso indiscriminado de antibióticos e drogas sintéticas, favorecendo cada vez mais o aumento da resistência microbiana (VIEIRA; SANTOS, 2017; BEZERRA *et al.*, 2019; ABD EL-BAKY *et al.*, 2020; CRUZ *et al.*, 2020). A sobrevivência e disseminação de microrganismos resistentes tem sido uma motivação para pesquisas com o objetivo de encontrar alternativas seguras e eficazes, ou até mesmo que possam potencializar os efeitos de agentes antimicrobianos atuais (ABD ELLAH *et al.*, 2019; ABD EL-BAKY *et al.*, 2020).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças declarou o rápido crescimento da resistência aos antibióticos como uma das principais preocupações globais e estima que mais de 700.000 pessoas morrem mundialmente por doenças causadas por cepas resistentes (KHAN; MILLER; ARIAS, 2018; KADRI *et al.*, 2020). *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são exemplos de bactérias causadoras de infecções nosocomiais que apresentam resistência contra fármacos padrões disponíveis, além disso, possuem alta capacidade de patogenicidade e virulência sendo associadas a casos clínicos graves (DENAMUR *et al.*, 2021; FORD; HURFORD; CASSAT *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022).

Dentro dessa problemática destaca-se também os fungos de interesse clínico, onde representantes do gênero *Candida* podem ocasionar desde infecções superficiais e cutâneas (dermatomicoses) até problemas mais graves, como candidíase (infecções invasivas e disseminadas) (KUMAR *et al.*, 2019). A espécie mais conhecida do gênero, *Candida albicans*, é responsável por 90% dos casos de infecções fúngicas (KUMAR *et al.*, 2019; NAVARRO-ARIAS *et al.*, 2019). Outras como, *C. Tropicalis* e *C. Krusei*, também se destacam como agentes causadores de infecções emergentes, e são frequentemente mais resistentes que as linhagens de *C. albicans*, tornando imperativa a busca por novas formulações antifúngicas (KOLACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016).

Estes fungos patogênicos podem mudar sua morfologia de levedura ovoide de brotamento para o crescimento filamentoso (hifa alongada) em resposta a diferentes sinais ambientais, como por exemplo, falta de nutrientes (SANCHEZ-MARTI; PÉREZ-

MARTI, 2001; KOLACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016; CID-CHEVECICH *et al.*, 2022;). Este fator pode proporcionar características de virulência, inicialmente por meio de adesão, impulsionada pela expressão de inúmeras proteínas adesinas de superfície (MCCALL *et al.*, 2019). Desta forma, essa virulência permite que os fungos colonizem tecidos e expressem resistência a drogas. Porém, de acordo com Sharma *et al.* (2019) a virulência de fungos pode ser amenizada ou eliminada se a capacidade morfogênica for comprometida.

A busca constante por substâncias que tenham como alvo inibir fenótipos de virulência fúngica tem se tornado constante (KHAN *et al.*, 2020). Neste contexto, pesquisa com óleos essenciais de plantas medicinais tem crescido significativamente como uma nova estratégia para inibir o crescimento fúngico e potencializar fármacos contra *Candida* spp (MACEDO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2019; BRAGA *et al.*, 2021).

Tais óleos essenciais são compostos voláteis formados por terpenos e terpenoides, substâncias que apresentam propriedades biológicas e farmacológicas, sendo relacionados na literatura a atividade inseticida, anti-inflamatória, citotóxica, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, entre outras (HANIF *et al.*, 2019; WIŃSKA *et al.*, 2019; BAPTISTA-SILVA *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais de espécies da família Asteraceae, tem ganhado destaque em várias pesquisas com diversas finalidades, demonstrando impressionantes efeitos microbiológicos (FERRONATTO *et al.*, 2007; SALKAR *et al.*, 2013). Esta família botânica é uma grande detentora de espécies com propriedades medicinais, apesar de que apenas 15% das espécies pertencentes a esta família foram estudadas (SALKAR *et al.*, 2013). Ressalta-se que várias classes de metabolitos secundários com potencial antimicrobiano estão presentes nos óleos essenciais das espécies desta família.

O gênero *Acritopappus* (Compositae, Eupatorieae) pertencente à família Asteraceae é considerado endêmico do Brasil, consiste em 19 espécies de arbustos e pequenas árvores com distribuição restrita as regiões do Nordeste e Sudeste (BAUTISTA, 2000; NAKAJIMA; BAUTISTA, 2023). Como um representante deste gênero com propriedades promissoras, destaca-se a espécie *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. Conhecida popularmente como “cura-facada” é utilizada na medicina tradicional através da maceração das folhas para tratamento de ferimentos de pele devido seus efeitos cicatrizantes (FUNCH, 2004). Sua composição química relata a presença predominante de monoterpenos em seu óleo essencial (LIMA *et al.*,

2005) e estes componentes bioativos podem apresentar diferentes modos de ação na atividade antimicrobiana (KUMAR *et al.*, 2019).

Considerando a diversidade de recursos vegetais da Chapada do Araripe, esse trabalho com a espécie *Acritopappus confertus* contribuirá para a compreensão da composição química do seu óleo essencial e de como estes compostos podem estar relacionados a bioatividades, identificando assim seu potencial biotecnológico. Do ponto de vista biológico *A. confertus* ainda é subutilizada, pois pouco se conhece sobre suas aplicações e propriedades medicinais. Com a comprovação científica das atividades biológicas do óleo essencial de *A. confertus*, esse estudo poderá fornecer subsídios para a descoberta de novos fitoterápicos e auxiliar no combate de microrganismos patogênicos resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Acrotopappus confertus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *A. confertus* por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS);
- Avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de forma intrínseca e combinada com antifúngicos contra cepas do gênero *Candida*;
- Verificar o efeito antivirulento na morfologia das leveduras de *Candida spp.*
- Analisar a atividade antibacteriana de *A. confertus* contra bactérias padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como seu efeito modificador de antibióticos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resistência Microbiana

A descoberta e a introdução de antimicrobianos na prática clínica, representou uma das intervenções médicas mais importantes na história da saúde global, reduzindo os números de morbidade e mortalidade humanas causadas por infecções. Atualmente os antibióticos são necessários para a realização de diversos procedimentos hospitalares, onde podemos citar: controle de infecções severas, recuperação pós cirurgias invasivas, transplante de órgãos, tratamento de pacientes com câncer e imunocomprometidos, dentre outros (DURÃO; BALBONTÍN; GORDO, 2018; KHAN; MILLER; ARIAS, 2018).

Existem diversas classes químicas de antibióticos, e estes podem ser agrupados de acordo com o alvo biológico na célula bacteriana em: Inibidores da síntese de parede celular (Penicilinas, Cefalosporinas e Polipeptídicos); inibidores da síntese proteica (Aminoglicosídeos, Pleuromutilinas, Tetraciclina, Macrolídeos, Estreptograminas, Oxazolidinonas e Glicilciclina); danos à membrana plasmática (Lipopeptídeos); inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Rifamicinas, Quinolonas e fluoroquinolonas) e inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais (Sulfonamidas) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Apesar do grande arsenal de antibióticos disponíveis, casos de infecções causadas por microrganismos multirresistentes vêm aumentando mundialmente e o espectro de infecções intratáveis está se tornando uma realidade. Muitos antimicrobianos antigamente empregados no controle de microrganismos patogênicos sofrem decréscimos quanto ao uso e a eficácia, aumentando os riscos de voltarmos à era pré-antibiótica (DIAS; MONTEIRO; MENEZES, 2010; BLAIR *et al.*; 2015).

A Organização mundial da Saúde (OMS, 2017) alerta que a resistência aos antimicrobianos eleva-se para níveis preocupantes em vários países do mundo. O surgimento de mecanismos complexos e a rápida disseminação de microrganismos patogênicos impõem uma barreira no tratamento de doenças microbianas comuns, causando grande preocupação para a saúde global.

Vários microrganismos possuem habilidades de se adaptarem ao meio com facilidade, então a exposição a antimicrobianos resulta em um processo de resistência natural. Os antibióticos, por exemplo, efetivam sua ação na eliminação de bactérias

sensíveis, mas simultaneamente pode disseminar a sobrevivência de cepas multirresistentes por um processo de pressão seletiva, ocasionada principalmente pela automedicação e uso indiscriminado destas drogas (QUEIROZ, 2004).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes aos antibióticos ou adquirir mecanismos de resistência. Na resistência intrínseca, o microrganismo apresenta características morfológicas e enzimáticas que o tornam resistente a determinado antibiótico naturalmente. Enquanto a resistência adquirida, pode ser caracterizada por mutações em genes que diminuem a suscetibilidade a drogas ou pela transferência horizontal de genes (DŽIDIĆ; ŠUŠKOVIĆ; KOS, 2008; MUNITA; ARIAS, 2016).

As mutações ocorrem aleatoriamente durante a replicação do DNA, surge quando o antibiótico seleciona cepas que apresenta vantagem de crescimento, resultando na proliferação de uma população geneticamente resistente. Embora essa resistência não se espalhe entre as bactérias, a disseminação da resistência pode ocorrer pela expansão de um clone ou linhagem bacteriana (KHAN; MILLER; ARIAS, 2018).

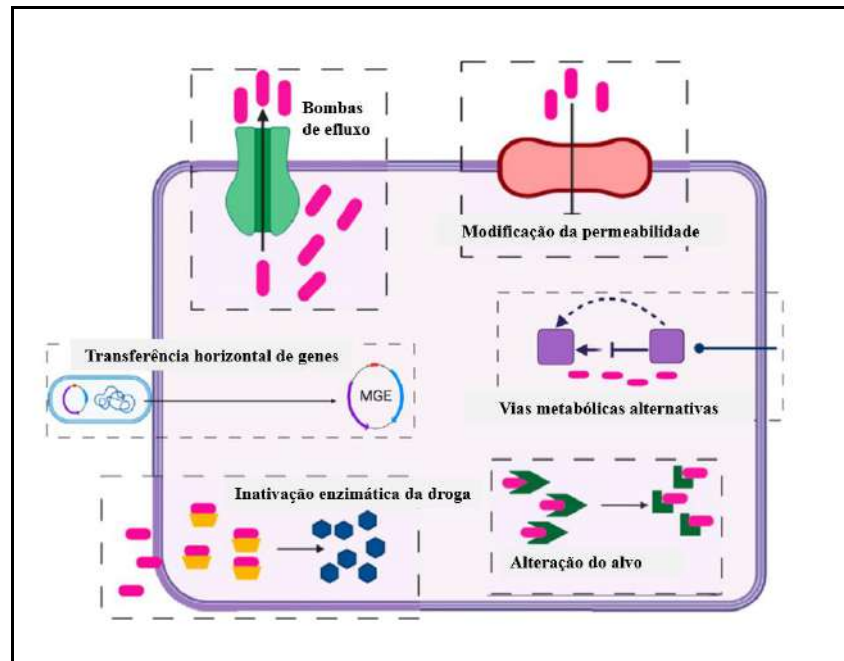
No entanto, a transferência horizontal de genes traz o risco de rápida disseminação de uma única cepa para um conjunto de cepas da mesma espécie ou de espécies diferentes. A transferência de material genético de um doador resistente para um receptor suscetível, ocorre por meio da transformação (Incorporação do DNA do meio), transdução (troca genética mediada por fagos) ou conjugação (contato célula a célula) que envolve elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposões (THOMAS; NIELSEN, 2005; KHAN; MILLER; ARIAS, 2018).

Dessa forma, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibióticos por meio de vários mecanismos que se enquadram em três grupos principais: primeiro, aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico, como consequência de uma fraca penetração na bactéria ou efluxo ativo da substância; segundo, aqueles que modificam o alvo do antibiótico por mutação genética ou alteração pós-translacional do alvo; e terceiro, aqueles que inativam o antibiótico por hidrólise ou modificação enzimática de grupos funcionais ativos da molécula (Figura 1) (POOLE, 2002; KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013; BLAIR *et al.*, 2015).

Apropriando-se destes mecanismos isolados ou em conjunto, cepas patogênicas vêm conseguindo superar antibióticos promissores das mais diversas classes químicas (SILVEIRA *et al.*, 2006). *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* são apenas alguns exemplos de bactérias que são resistentes a múltiplas drogas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; SAHA; SARKAR,

2021). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças declarou o rápido crescimento da resistência aos antibióticos como uma das principais preocupações globais e calcula que mais de 700.000 pessoas morrem mundialmente por doenças causadas por cepas resistentes (KHAN; MILLER; ARIAS, 2018; KADRI *et al.*, 2020).

Figura 1: Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos.



Fonte: Adaptado de Saha e Sakar (2021)

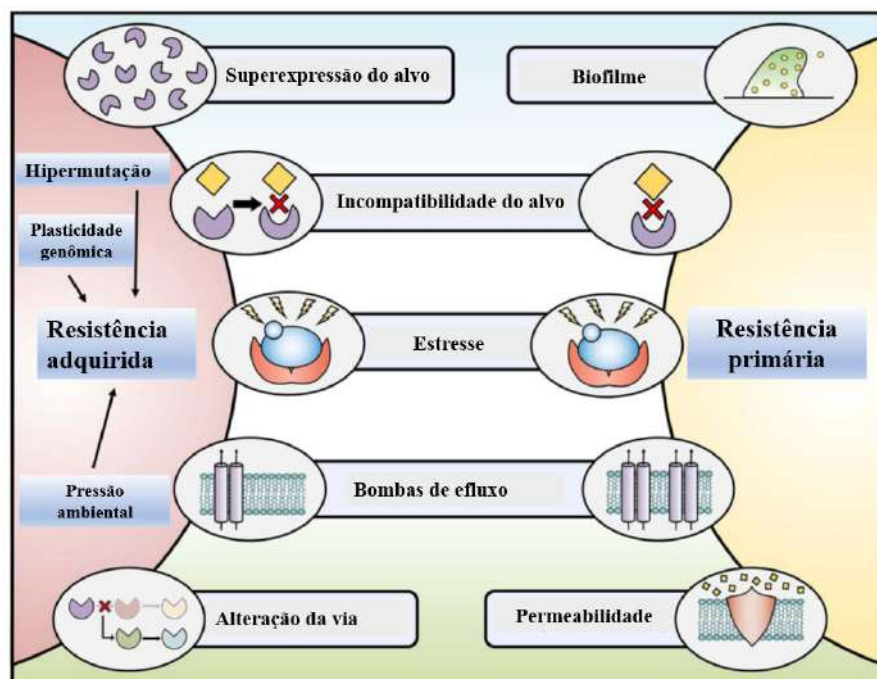
O número de infecções e mortes associadas a fungos patogênicos também são alarmantes. Estima-se que até 150 milhões de pessoas são infectadas anualmente por fungos invasivos, com 1,5 milhão de mortes decorrentes dessas infecções (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021). Entre os patógenos fúngicos mais virulentos estão *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus spp.* (BONGOMIN *et al.*, 2017). Sendo as espécies de *Candida*, os patógenos fúngicos invasivos mais prevalente em humanos, causando infecções sistêmicas graves em pacientes imunocomprometidos com taxas de mortalidade que se aproximam de 40% (PFALLER; DIEKEMA, 2010; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

Atualmente, o arsenal de antifúngicos disponíveis para uso clínico de tais infecções, consiste em três classes principais: os polienos, azóis e equinocandinas, os quais atuam por diferentes mecanismos de ação (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021). Os polienos atuam pela formação de complexos que extraem ergosterol dos fosfolípidos das membranas celulares, além disso, em altas concentrações, podem inibir a síntese

de quitina na parede celular fúngica (ANDERSON, 2014). Os azóis inibem enzimas que participam da biossíntese do ergosterol, formando uma membrana celular modificada que não desempenha as funções essenciais para desenvolvimento dos fungos (BERTO *et al.*, 2018). Já as equinocandinas inibem a enzima β -1,3-glucano sintase, cuja função é catalisar a polimerização da glucose-uridina-difosfato (UDP glucose) em β -1,3-glucano. Esse mecanismo leva o extravasamento de componentes importantes na célula fúngica, como resultado da alta pressão osmótica exercida sobre a membrana enfraquecida (ZAAS, 2008).

A resistência a azóis entre as espécies de *Candida* e *Aspergillus* é um dos maiores desafios para o tratamento clínico, seguido pela multirresistência de *Candida glabrata* e outras espécies do gênero *Candida* as equinocandinas. Os mecanismos de resistência contra essas drogas incluem: modificações nas interações droga-alvo, concentrações celulares das drogas reduzidas por meio de canais de bombas de efluxo e barreiras de permeabilidade associadas a biofilmes (figura 2) (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; REVIE *et al.*; 2018).

Figura 2: Mecanismos fúngicos de resistência.



Fonte: Adaptado de Revie *et al.* (2018)

Apesar das opções de tratamento atualmente disponíveis, como os fungos são eucariotos assim como seus hospedeiros humanos, há uma limitação de alvos que

podem ser explorados para inibir seletivamente o patógeno com toxicidade mínima para o hospedeiro. A maioria dos antifúngicos utilizados têm como alvo o esterol ergosterol da membrana celular, assim como sua biossíntese, ou a molécula ligante da parede celular 1,3- β -D-glucano. A resistência às classes disponíveis de antifúngicos emergiu como um problema grave, com infecções fúngicas tornando-se cada vez mais difíceis de tratar (XIE *et al.*, 2014).

3.2 Bactérias Patogênicas

As infecções bacterianas nosocomiais são frequentes nos serviços de saúde, sendo responsáveis por altos números de mortalidade e morbidade entre pacientes internados no mundo todo (UPRETI *et al.*, 2018). Dentre os patógenos causadores de infecções em ambientes hospitalares, destacam-se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, espécies que além de grande capacidade de adaptação apresentam também resistência contra agentes antimicrobianos (POOLMAN; ANDERSON, 2018).

A espécie *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva de grande interesse clínico, sendo responsável por ocasionar graves infecções superficiais ou invasivas em humanos, como carbúnculos, foliculites, bacteremia, endocardite, pneumonia, osteomielite, além de promover formação de biofilme em instrumentos cirúrgicos implantados (CAVALCANTI *et al.*, 2005; FOSTER *et al.*, 2014; TONG *et al.*, 2015). Em pessoas saudáveis *S. aureus* pode ser encontrada em diversos sítios anatômicos, principalmente na pele, orofaringe, fossas nasais e microbiota intestinal (BENITO *et al.*, 2013).

A versatilidade de *S. aureus* deve-se principalmente pelos diversos fatores de virulência, muitos dos quais são codificados geneticamente e transferidos entre a espécie facilitando a aderência, colonização, interações celulares, evasão dos sistemas de defesa do hospedeiro e lesões teciduais (HOLDEN *et al.*, 2004; OTTO, 2014). Os fatores de virulência podem ser agrupados em três tipos: a) Fatores relacionados à adesão celular ou matriz extracelular, por síntese de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão imunológica, pela produção de importantes enterotoxinas, inclusive que pode causar choque tóxico e produção de biomoléculas como proteína A, lipases e polissacarídeos encapsulados; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a

penetração nos tecidos ou adesão em instrumentos cirúrgicos implantados, os quais incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e δ – hemolisinas (JARRAUD, 2001).

A espécie pode apresentar resistência intrínseca ou adquirida, onde a aquisição do gene *mecA* apresenta grande importância clínica por conferir resistência contra meticilina e beta-lactâmicos (BENITO *et al.*, 2015). O surgimento e disseminação de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) aumentaram os números de infecções nosocomiais, causando grande preocupação na comunidade hospitalar (WITTE *et al.*, 2007). MRSA é a maior causa de infecções de peles e tecidos moles na América do Norte, sendo o clone USA 300 é responsável por 98% dessas infecções (THURLOW; JOSHI; RICHARDSON, 2012).

Dentro das bactérias Gram-negativas, a espécie *Escherichia coli* apresenta importância médica pelo potencial de virulência e patogenicidade, sendo agente etiológico de diversas doenças, como: diarreias, colite hemorrágica e síndrome urêmica. Se encontra de forma comensal no trato gastrointestinal de animais e humanos, especificamente no intestino grosso, sendo expelida do organismo através das fezes. Sua disseminação e sobrevivência dependem das condições ideais de temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, competição com outros micro-organismos e formação de biofilmes (JANG *et al.*, 2017).

Cepas patogênicas de *E. coli* são classificadas em diferentes patótipos, onde cada patótipo causa um tipo de doença específica: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), e *E. coli* difusão aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013). Os patótipos intestinais de *E. coli* são responsáveis por distúrbios intestinais que variam de diarreia leve a colite grave, enquanto os patótipos extra-intestinais da espécie são assintomáticas no trato intestinal, mas podem causar infecções após migrarem para outras partes do corpo, como por exemplo ao atingir o sistema circulatório e o trato urinário (KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

E. coli é o patógeno causador de mais de 80% dos casos de infecções urinárias. Geralmente as mulheres são as mais afetadas devido características anatômicas (proximidade da uretra e ânus) e fisiológicas (ausência de um mecanismo antimicrobiano, como o líquido prostático no homem). Além disso, diversos fatores de virulência e antígenos que facilitam a disseminação e aderência dessa bactéria no epitélio urinário, contribuem para a efetivação da infecção (LOPES *et al.*, 2015).

Intrinsecamente, *E. coli* é suscetível a quase todos os antimicrobianos clinicamente relevantes, mas essa espécie apresenta grande capacidade de acumular genes de resistência, especialmente por meio da transferência horizontal de genes. Os mecanismos mais evidentes em *E. coli* correspondem à aquisição de genes que codificam β -lactamases de espectro estendido (conferindo resistência a cefalosporinas), carbapenemases (resistência a carbapenêmicos), 16S rRNA metilases (pan-resistência a aminoglicosídeos), genes de plasmídeo PMQR (resistência a quinolonas e fluoroquinolonas) e genes *mcr* (resistência a polimixinas). Além da mediação por plasmídeos de multirresistência, outros elementos genéticos móveis, como transposons e cassetes de genes em integrons de classe 1 e 2, também desempenham papel importante na disseminação de genes de resistência em *E. coli* (POIREL *et al.*, 2018).

3.3 Fungos Patogênicos

Entre os fungos de importância médica, representantes do gênero *Candida* estão associados às infecções fúngicas mais comuns entre os seres humanos (KOLACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016). Tais leveduras fazem parte da microbiota humana desde o parto, sem ocasionar quadro clínico em hospedeiros saudáveis. Porém, o comprometimento da resposta imune do hospedeiro, entre outros fatores, pode levar ao surgimento de infecções oportunistas superficiais como candidíase vulvovaginal, candidúria, onicomicose e candidíase orofaríngea, e em casos mais graves candidíase sistêmica invasiva, como candidemia e infecção de órgãos, especialmente cérebro, rins e olhos (TONG; TANG, 2017; KHAN *et al.*, 2020).

Candida spp. apresentam vários traços de virulência que facilitam a aderência, infiltração e disseminação nos tecidos do hospedeiro, sendo os principais fatores: transição morfogênica, capacidade de formação de biofilme em dispositivos médicos implantados, produção e secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de complexos proteicos de adesina e a invasão de células da epiderme e mucosas (KHAN *et al.*, 2020).

Desses fatores de virulência, a morfogênese apresentada em algumas espécies de *Candida* é definida como uma alteração da forma de levedura unicelular com a projeção de estruturas filamentosas (hifas e pseudohifas). Essas transições morfológicas são reversíveis e ocorrem durante o crescimento como reação às condições de temperatura, PH, soro, ausência de nutrientes e oxigênio. As formas filamentosas são bastante adaptadas para penetração e danos aos tecidos, sendo um fator importante para a

patogenicidade e eficiência da infecção (BRAUN; KADOSH; JOHNSON, 2001; VILA *et al.*, 2017). Em casos de candidemia, a formação de hifas e pseudohifas permite que o fungo invada a corrente sanguínea para se disseminar e atingir os órgãos internos do hospedeiro (KORNITZER, 2019).

Dentre das infecções causadas por representantes do gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* é o patógeno fúngico mais comum em isolados clínicos. Porém a emergência de espécies de *Candida* não *albicans*, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* variam de acordo com o sítio anatômico afetado e a localização geográfica (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006). Dentro do limitado arsenal antifúngico, compostos azólicos como o fluconazol, são frequentemente utilizados para tratamento de infecções por *Candida*, pois apresentam baixo custo, possuem toxicidade moderada e podem ser administrados de forma oral (WHALEY *et al.*, 2017). No entanto, por causa do seu efeito apenas fungistático, há relatos de desenvolvimento de resistência adquirida das leveduras contra esse antifúngico por pressão seletiva, e no caso de *C. krusei* resistência intrínseca (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Nesse sentido, identificar moléculas que tenham potencial bioativo é de extrema necessidade, podendo contribuir para formulação de novos agentes antifúngicos ou auxiliando no uso de combinações entre o fármaco e moléculas bioativas para restaurar a eficácia desses medicamentos contra cepas resistentes (BRAGA *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2022).

3.4 Bioprospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade

A Biodiversidade é entendida como a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos, e os complexos ecológicos de que fazem parte; abrangendo ainda, a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (BRASIL, 2000). O território brasileiro abriga entre 15% e 20% de toda a biodiversidade do mundo, além de possuir o maior número de espécies endêmicas, a maior floresta tropical (floresta Amazônica) e dois dos 19 *hotspots* globais (Mata Atlântica e Cerrado) (PRATES; IRVING, 2015).

O Brasil também foi o primeiro país a assinar a Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB, durante a Conferência das Organizações das Nações Unidas – ONU sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio92), evento de impacto global no debate

ambiental (PRATES; IRVING, 2015). A CDB foi o primeiro instrumento a abordar obrigações a serem cumpridas pelos países signatários, sendo estes: a conservação da diversidade biológica, o uso sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos. Esse documento é um lembrete de que os recursos naturais não são infinitos e que é importante pensar, agir e pesquisar em busca do uso sustentável da biodiversidade (BRASIL, 2000; PEIXOTO *et al.*, 2016).

Diante desta problemática, várias pesquisas científicas buscam alternativas promissoras para o manejo e conservação da biodiversidade e dos recursos naturais do Brasil. Peixoto *et al.* (2016) propõem um modelo conceitual simplificado de algumas atividades de pesquisa ligadas diretamente com a biodiversidade, incluindo: estudos de variabilidade genética, levantamentos biológicos, planejamento do uso da terra, avaliações de processos ecossistêmicos, coleções biológicas e pôr fim a bioprospecção.

A bioprospecção pode ser definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral (coletivamente chamados de recursos genéticos) que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto (MATEO; NADER; TAMAYO, 2001). É relevante para uma ampla gama de setores e atividades, incluindo a biotecnologia, agricultura, nutrição, biorremediação, saúde, indústria farmacêutica e de cosméticos, dentre outros (REED, 2005).

O desenvolvimento de novos medicamentos obtidos diretamente ou indiretamente a partir de produtos naturais é uma das maiores potencialidades da bioprospecção. Estima-se que 40% dos medicamentos comercializados foram desenvolvidos de fontes biológicas, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. O mercado mundial de vendas de drogas naturais atinge vários bilhões de dólares por ano. Porém, a extração desordenada de espécies de importância biológica visando apenas o aspecto econômico, no caso de uma exploração não regulamentada e não sustentável, pode comprometer a existência futura dessas espécies (CALIXTO, 2003). Por isso é interessante propor através destas pesquisas, o uso mais ordenado e o conhecimento mais aprofundado sobre estas espécies potenciais.

3.5 Plantas Medicinais da Chapada do Araripe

A Chapada do Araripe é um enclave geográfico que divide os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí. Localizada no semiárido brasileiro, apresenta uma variedade de fitofisionomias, incluindo a Caatinga, Cerrado, Cerradão e resquícios de Mata Atlântica. Possui duas unidades de conservação que desempenham importante papel na preservação de fontes naturais, da flora e fauna local: a Área de Preservação da Chapada do Araripe (APA-Araripe) e a Floresta Nacional do Araripe-Apodi (Flona Araripe-Apodi) (MORO *et al.*, 2015; JUNIOR *et al.*, 2018).

A Flona Araripe-Apodi fornece importantes recursos naturais para as populações que residem em seu entorno, onde podemos citar principalmente a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades (CREPALDI *et al.*, 2016; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2021). As plantas medicinais são utilizadas pelas populações desde o início das civilizações. A procura por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas possivelmente tenha sido uma das primeiras formas de uso dos recursos vegetais para fins medicinais, sendo principalmente utilizado pelas sociedades Gregas, Romanas e Chinesas (JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Mesmo com o avanço da medicina moderna, muitos fatores ainda contribuem para o consumo de plantas medicinais como recursos terapêuticos pelas comunidades rurais, tais como: o custo elevado dos medicamentos industrializados, distância e dificuldades de acesso aos serviços básicos de saúde e por ser uma prática culturalmente aceita. Acredita-se que o tratamento através de plantas medicinais traga vantagens a saúde humana, desde que haja conhecimento prévio das suas finalidades, riscos e benefícios (BADKE *et al.*, 2012; BITU *et al.*, 2015).

Nesse sentido, é possível encontrar na literatura diversos estudos etnobotânicos que fornecem dados sobre o potencial terapêutico e utilização de plantas medicinais pelas comunidades da Chapada do Araripe (SOUZA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014; JUNIOR *et al.*, 2015; MACEDO *et al.*, 2015; BITU *et al.*, 2015; LEMOS *et al.*, 2016; MACEDO *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2021).

Dentre as espécies com maiores versatilidades de uso terapêutico citadas em tais pesquisas, podemos elencar: *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. (aroeira), *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba), *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba), *Caryocar coriaceum* Wittm. (pequi), *Dimorphandra gardneriana* Tul. (faveira), *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (barbatimão), *Ximenia americana* L. (ameixa), *Croton heliotropiifolius* Kunth. (velame), *Copaifera langsdorffii* Desf.

(copaíba), *Bowdichia virgiloides* Kunth (sucupira), *Amburana cearenses* (Allemão) A. C. Sm. (imburana de cheiro), *Lippia gracillis* Schauer (alecrim), *Ocimum basilicum* L. (alfavaca), *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto), *Anacardium occidentale* L. (cajú) e *Hymenaea courbail* L. (jatobá).

3.6 Óleos Essenciais

Denominamos de metabolismo as reações químicas celulares que regem o funcionamento dos organismos. O metabolismo primário é caracterizado pela ação de aminoácidos, proteínas, carboidratos e lipídeos, presentes em todos os organismos e com funções definidas. Entretanto, além do metabolismo primário, as plantas apresentam também o metabolismo secundário, responsável pela síntese de uma variedade de compostos químicos que não parecem ter ligação direta com os processos fisiológicos vegetais, mais que podem funcionar como forma de defesa contra predadores naturais e microrganismos fitopatogênicos (GARCÍA; CARRIL, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012; CARMO; VIEIRA, 2016).

Esses metabólitos vegetais são divididos em três grandes grupos, oriundos através de rotas biossintéticas diferentes e com funções de defesa contra fatores físicos e biológicos: os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados (alcaloides) e os terpenos. Estes últimos por sua vez, representam a maior classe química dentre os três grupos com uma estimativa de mais de 30.000 substâncias registradas (RAVEN *et al.*, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os terpenos são formados pela união de unidades pentacarbonadas (C₅), e com isso podemos classificá-los pela quantidade de unidades C₅ que possuem em sua estrutura. Logo, os terpenos que apresentam 10 carbonos apresentam duas unidades C₅ e são denominados monoterpenos, os que apresentam três unidades C₅, com 15 carbonos, são os sesquiterpenos, e os diterpenos apresentam quatro unidades de C₅, com 20 carbonos. Existem outros terpenos maiores com mais de 20 carbonos em sua estrutura, dentre eles os triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e os politerpenoides com mais de 40 carbonos (KERBAUY, 2004; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os terpenos são produzidos por duas rotas biossintéticas diferentes. A primeira rota é a do ácido mevalônico, na qual três moléculas de Acetil-CoA são ligadas em uma sequência de reações formando o ácido mevalônico. Este ácido é um intermediário-

chave de seus carbonos que é posteriormente pirofosforilado, descarboxilado e, finalmente, desidratado, tendo como produto o isopentenil difosfato (IPP). A segunda rota biossintética é denominada de metileritritol fosfato (MEP) que atua nos cloroplastos e outros plastídeos, na qual o IPP é formado a partir de intermediários da glicose ou do ciclo de redução fotossintética. Na reação química o gliceraldeído 3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato condensam-se, formando o 1-desóxi-D-xilulose 5-fosfato, o qual é rearranjado e reduzido a 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que finalmente é convertido em IPP (DEGENHARDT *et al.*, 2003; KITAOKA *et al.*, 2015; TAIZ; ZEIGER, 2017; SIMÕES *et al.*, 2017).

Por meio dessas rotas são produzidos os terpenos voláteis denominados de óleos essenciais, estes são as misturas de mono e sesquiterpenos, os quais apresentam um forte aroma característico. Os óleos essenciais são secretados normalmente pelos tricomas glandulares, estruturas do limbo foliar, e armazenados em um espaço extracelular modificado. Estão presentes em diversos órgãos vegetais, como, folhas, flores, frutos, caules, cascas e raízes, e são extraídos geralmente por técnicas de destilação por arraste à vapor (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; BRITO *et al.*, 2010; EICHHORN *et al.*, 2014).

São líquidos geralmente incolores ou amarelados, com baixo peso molecular, insolúveis em solventes inorgânicos (água) e solúveis em solventes orgânicos (éter, álcool, óleos fixos), apresentam pouca estabilidade em contato com o ar, presença de luz, calor e umidade (MATOS; MATOS, 1989). A composição química do óleo essencial pode variar em qualidade e quantidade de acordo com o clima, tipo de solo, estação do ano, condições geográficas, período de coleta, órgão da planta, idade, fase do ciclo e a técnica de destilação utilizada para extração (MACIEL *et al.*, 2002; ANGIONI *et al.*, 2006).

Na natureza os óleos essenciais desempenham um importante papel ecológico. Através da liberação de sinais químicos a planta controla e regula seu ambiente, podendo atrair insetos para a dispersão de pólenes e sementes, repelir animais herbívoros indesejáveis e inibir a germinação de sementes de outras espécies. Além disso, é comprovada a presença de propriedades inseticidas, antibacterianas e antifúngicas (BAKKALI *et al.*, 2008; HANIF *et al.*, 2019). Esses compostos voláteis são produzidos por mais de 17.500 espécies de plantas aromáticas. Quase todas as espécies das famílias Lamiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Zingiberaceae e Myrtaceae produzem óleos

essenciais, porém apenas cerca de 300 destas são comercializadas (MÉRILLON; RIVIERE, 2018; WI'NSKA *et al.*, 2019).

Em relação à sua utilização comercial, os óleos essenciais são aplicados como componentes funcionais de diversos produtos com importância econômica para a indústria de fragrâncias, cosméticos e medicamentos. São empregados na formulação de perfumes, cremes, sabonetes, maquiagens, produtos de limpeza e remédios naturais. Na indústria alimentícia, são utilizados para adicionar sabores e aromas, mascarar odores desagradáveis e prolongar a conservação dos alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008; WI'NSKA *et al.*, 2019). Atualmente os óleos essenciais também são muito apreciados como recursos terapêuticos na aromaterapia, onde são usados para relaxamento na forma *in natura* para a prática de inalações, massagens e banhos perfumados (HANIF *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais são conhecidos por apresentarem propriedades antimicrobianas associadas a grande complexidade de misturas e presença de vários constituintes químicos. A grande diversidade estrutural dos compostos químicos que são encontrados nos óleos essenciais, fornece uma importante fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, uma alternativa promissora para auxiliar no controle de microrganismos resistentes contra drogas sintéticas (LORENZI, 2008; SAKLANI; KUTTY, 2008).

3.7 Família Asteraceae

Asteraceae é considerada a família de angiospermas com maior abundância em diversidade vegetal, com mais de 1.700 gêneros e aproximadamente 27.000 espécies de árvores, arbustos e herbáceas. São cosmopolitas, com predominância especialmente em habitats temperados, tropicais, secos e abertos, pois são dependentes de condições sazonais e geográficas. No Brasil, a família está distribuída em 287 gêneros e 2.086 espécies, que ocorrem em todos os domínios fitogeográficos com maior frequência em áreas do cerrado, campos rupestres, campos sulinos, caatinga e restinga (PANERO *et al.*, 2014; BFG, 2015; FLORA DO BRASIL, 2020; EKIERT *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021).

É uma família popularmente conhecida devido aos seus representantes ornamentais, tais como *Helianthus annuus* L. (girassol), *Leucanthemum vulgare* Lam. (margarida), *Dahlia pinnata* Cav. (dália), dentre outros. Assim como também

apresentam uma série de plantas de importância medicinal como *Matricaria chamomilla* L. (camomila) e *Taraxacum officinale* F.H. Wigg. (dente-de-leão) (ERUYGUR et al., 2019). Devido as características de sua estrutura floral e composição fitoquímica, pesquisadores consideram esta família como uma das mais evoluídas em todas as dicotiledôneas (PANERO et al., 2014; EKIERT et al., 2020).

Um crescente interesse na busca de compostos ativos tem se destacado nos últimos tempos, dentre as espécies de interesse, incluem diversos representantes da família Asteraceae (SATYAL et al., 2017; LAWSON et al., 2020). Isso porque a maioria dos membros desta família tem aplicações terapêuticas, e seu uso medicinal datam de 3000 anos atrás, uma longa história na medicina tradicional, onde alguns relatos literários descrevem que foram cultivadas antigamente para fins comestíveis e etnobotânicos (ROLNIK; OLAS, 2021).

Em relação ao seu metabolismo, a triagem fitoquímica em relação a este grupo de vegetais destacam uma grande variedade de lactanas e sesquiterpenos como principais metabolitos químicos com potencial promissor contra diversas patologias (NINO et al., 2006; LAWSON et al., 2020). Membros desta família apresentam efeitos positivos na saúde humana, relatos científicos descrevem uma ampla gama de atividades farmacológicas e biológicas, como: anti-inflamatórias, antimicrobiano, antioxidante, hepatoprotetor, antipiréticos, diuréticos, etc, (ERUYGUR et al., 2019).

3.8 *Acritopappus confertus*

Dentre os representantes da família Asteraceae, *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob (Figura 3) apresenta-se como uma espécie promissora na busca de moléculas bioativas. Morfologicamente a espécie *A. confertus* apresenta hábitos arbustivos a arbóreo, folhas em forma de lâmina, glabra, lustrosa, venação broquidódroma, receptáculo plano e papus aristado (SOUSA et al., 2020). Em relação ao seu metabolismo fitoquímico, destaca-se a predominância de monoterpenos como compostos bioativos majoritários (SOUSA et al., 2020; LIMA et al., 2005).

Figura 3: Aspectos morfológicos da espécie *Acritopappus confertus*



Fonte: Autor (2022)

A. confertus apresenta maior distribuição dentre as espécies do gênero *Acritopappus* (Compositae, Eupatorieae), sendo encontrada no Nordeste Brasileiro principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Ceará (BAUTISTA; ORTIZ; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, 2011). No Ceará, especificamente na Chapada do Araripe, é comumente encontrada em áreas de carrasco (CRUZ *et al.*, 2022). Na medicina popular é conhecida como “cura-facada”, sendo amplamente utilizada na cura de dermatites e feridas por meio da maceração das folhas (FUNCH *et al.*, 2004), no entanto, poucos trabalhos científicos são relatados quanto aos seus efeitos terapêuticos.

No estudo de Fernandes (2012) efeitos promissores do óleo essencial de *A. confertus* contra bactérias patogênicas são descritos, e em outros trabalhos, efeitos citotóxicos com linhagens de células cancerígenas tiveram resultados significativos (PINHO *et al.*, 2014; ERUYGUR *et al.*, 2019; STOJANOVIC-RADIC *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Pinho *et al.* (2014) ressaltam em seu estudo que *A. confertus* não apresentou citotoxicidade contra células saudáveis, fator crucial para um bom fitoterápico, pois substâncias com toxicidades seletivas é o recomendável para utilização medicinal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do Material Botânico

Folhas (frescas) livres de danos físicos ou doenças infecciosas de *Acritopappus confertus* foram coletadas na Chapada do Araripe, Crato – Ceará (Brasil), sob as coordenadas -7°28'91.81" S e -39°54'50.33" W. Além das folhas, ramos férteis foram coletados, prensados, desidratados e depositados no Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA com número de voucher 15.148. O projeto foi submetido aos órgãos competentes a fim de obtenção e licença de coletas, tendo sido aprovado e registrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) sob autorização 82789-1 e Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A0B4402.

4.2 Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi conforme metodologia de Matos (1997) com algumas modificações. As folhas frescas foram inicialmente acondicionadas (250 g) em um balão de vidro com capacidade de 5 L, contendo 2 L de água destilada. Posteriormente o balão contendo as folhas foi submetido à ebulição constante por duas horas. O óleo essencial extraído por meio do sistema de hidrodestilação foi coletado em aparelho *Clevenger*, e separado da solução aquosa com o auxílio da adição de sulfato de sódio (Na_2SO_4) (BEZERRA *et al.*, 2017). Por fim, foi calculado o seu rendimento.

4.3 Análise da Composição Química do Óleo Essencial por CG-MS

O óleo essencial de *A. confertus* foi analisado quimicamente por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) realizada em um aparelho Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS operando no modo EI a 70 eV, equipado com um injetor split/splitless (220 °C). Com temperatura inicial de 280 °C. Foram utilizadas colunas com as especificações: HP 5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) e HP Innowax (30 m x 0,32 mm, 0,50 µm). Como gás de fase móvel foi utilizado o Hélio em uma taxa de transporte de (1,0 mL/min). O programador térmico consistiu de uma temperatura inicial de 50 °C até atingir uma temperatura de 300 °C a uma taxa de

5°C/min. Um total de 1 µL do óleo foi injetado na coluna, estando diluído em clorofórmio (1:10 v/v).

Após a análise cromatográfica, foi realizada a identificação dos fitoconstituintes do óleo essencial de *A. confertus*, para tanto, foi realizada com base em índices de retenção (IR), determinados com referências de séries homólogas de *n*-alcanos, C₇-C₃₀, sob condições experimentais idênticas, comparando com biblioteca de espectros de massa (NIST e Wiley) e com literatura de espectros de acordo com Adams (2001). As quantidades relativas de componentes individuais foram calculadas com base nas áreas de pico de CG.

4.4 Atividade Antifúngica

4.4.1 Cepas Fúngicas

Para avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *A. confertus* foram utilizadas cepas padrões de *Candida* spp., obtidas da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS): *Candida albicans* - CA INCQS 90028, *Candida krusei* – CK INCQS 40095 e *Candida tropicalis* – CT INCQS 40042.

4.4.2 Cultura fúngica

Todas as cepas fúngicas foram inicialmente cultivadas no meio de cultura Agar *Sabouraud Dextrose* (ASD) (37°C, 24 h) e no meio Caldo *Sabouraud Dextrose* (CSD) duplamente concentrado durante os experimentos. O meio Agar Potato Dextrose empobrecido, foi utilizado para induzir a emissão de hifas e pseudohifas no teste de análise de alterações morfológicas. Para preparação dos inóculos, pequenas alíquotas das cepas foram transferidas para tubos contendo solução salina (0,9% NaCl) e comparados à escala de McFarland resultando em uma concentração de 1×10^5 cel/mL. O óleo essencial e o fluconazol (150 mg, Gn-Germed) foram mensurados (150 mg) em balança analítica e diluídos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO-Vetec) e água destilada estéril respectivamente, até obter a concentração matriz de 2.048 µg/mL.

4.4.3 Determinação da IC₅₀ e Curva de Viabilidade Celular

Para realizar este experimento foi utilizado o método de microdiluição em caldo de acordo com Javadpour *et al.* (1996) com algumas modificações. Inicialmente, placas

de 96 poços foram preenchidas com 90 μL de CSD e então microdiluídas até a penúltima cavidade com 100 μL do óleo essencial, obtendo concentrações variadas de 1024 a 1 $\mu\text{g/mL}$. Após esse processo, foram adicionados 10 μL de inóculo fúngico. O último poço não foi microdiluído sendo destinado para o controle de crescimento. Controles de esterilidade do meio de cultura e controles de diluição das substâncias também foram realizados. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e subsequentemente a leitura foi realizada em um aparelho espectrofotômetro ELISA modelo DR.-200BS-NM-BI no comprimento de onda de 630 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados obtidos foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e calcular a IC_{50} do óleo essencial e do fluconazol. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração capaz de reduzir a curva de crescimento fúngico (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

4.4.4 Avaliação da Atividade Modificadora do Fluconazol

Após a definição da CIM, o óleo essencial foi testado em concentrações sub-inibitórias (CIM/8) de acordo com o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As placas foram preenchidas com uma solução contendo meio CSD e óleo essencial em concentração sub-inibitória, então 100 μL de fluconazol foram adicionados no primeiro poço, seguindo da microdiluição seriada na proporção de 1:1 até o penúltimo poço. Por fim, 10 μL do inóculo fúngico foi adicionado em cada cavidade. O controle da esterilidade do meio de cultura e o controle da diluição do fluconazol também foram realizados. Posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ELISA em um comprimento de onda de 630 nm (Rodrigues *et al.*, 2022).

4.4.5 Avaliação da Inibição da Virulência Fúngica

Para verificar se o óleo essencial de *A. confertus* causa alguma mudança na morfologia fúngica por inibição da emissão de hifas, foram montadas câmaras estéreis micromorfológicas. Na câmara úmida, 3 mL de meio PDA empobrecido, contendo o óleo essencial em concentrações sub-inibitórias (CIM/2 e CIM/4) foram vertidos em lâmina estéril. Alíquotas do inóculo fúngico foram utilizadas para fazer duas estrias paralelas nas lâminas e depois estas foram cobertas por uma lamínula estéril. A câmara foi levada para a incubadora e após 24 h (37 °C) a cultura foi observada sob

microscopia óptica usando um aumento de 400 X. Um controle para o crescimento das leveduras (com emissão de hifas estimulada pelo empobrecimento do meio) foi realizado, bem como, um controle com o fluconazol para fins comparativos (SIDRIM; ROCHA, 2010).

4.5 Atividade Antibacteriana

4.5.1 Cepas Bacterianas

Para os testes antibacterianos, foram utilizadas as cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, e os isolados clínicos multirresistentes: *S. aureus* 10 (swab reto) e *E. coli* 06 (urina).

4.5.2 Cultura Bacteriana

Todas as cepas bacterianas foram mantidas em meio Heart Infusion Agar (HIA) (37°C, 24 h) e cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI) 10% durante os experimentos. As suspensões celulares foram preparadas em tubos de ensaio contendo solução salina e sua turbidez foi comparada e ajustada com a escala MacFarland 0,5. Para a análise da atividade antibacteriana, o óleo essencial foi mensurado em balança analítica (10 mg) e posteriormente diluído em 1 mL de DMSO até uma concentração final de 1.024 µg/mL. Os antibióticos gentamicina, eritromicina e norfoxacino foram diluídos em 1 mL de água destilada estéril e preparados na mesma concentração do óleo.

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi verificada pelo método de microdiluição em caldo. Uma placa de microdiluição foi preenchida com 100 µL de solução contendo 900 µL de BHI 10% e 100 µL de suspensão bacteriana. Em seguida, foi procedida a microdiluição seriada (1:1) com 100 µL do óleo essencial de *A. confertus* até o penúltimo poço da placa, com as concentrações finais variando de 512 a 8 µg/mL. Foram realizados controles de crescimento microbiano e esterilidade do meio de cultura. As placas foram então incubadas em estufa por 24 h a 37 °C. Para leitura dos ensaios, a resazurina sódica (Sigma-Aldrich) foi utilizada como indicador colorimétrico de crescimento bacteriano por redução de oxidação. Para tanto, 20 µL de resazurina foi adicionada a cada poço e, após 1 h as placas foram analisadas visualmente (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

4.5.4 Teste de Efeito Modificador de Antibióticos

Para avaliar o potencial modificador de antibioticos, o óleo essencial foi testado em concentração sub-inibitória (COUTINHO *et al.*, 2008). Inicialmente foram preparadas em tubos eppendorfs soluções contendo meio BHI 10%, o óleo em concentração sub-inibitória (CIM/8) e 150 µL do inóculo bacteriano. Posteriormente, as placas foram preenchidas com 100 µL da solução em cada poço, seguido por microdiluição seriada (proporção de 1:1) com 100 µL da droga de referência (gentamicina, eritromicina e norfloxacina), as concentrações dos antibióticos variaram de 512 µg/mL a 1 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e em seguida a leitura do teste foi realizada com a adição de rezasurina.

4.6 Análises Estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo calculadas suas médias com seus respectivos desvios padrões. Para as atividades biológicas as médias foram submetidas a análise de variância de uma via seguidas pelo teste de Tukey, sendo considerado significativos quando $p < 0,0001$. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não linear e os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão. Todas as análises foram realizadas no *software* Graphpad Prism®, versão 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados dados do artigo científico original oriundo da dissertação, intitulado “Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae)”. Tal artigo foi publicado no periódico internacional *Pharmaceuticals* (ISSN: 1424-8247), no dia 17 de outubro de 2022, com Doi: <https://doi.org/10.3390/ph15101275> (Anexo A). O periódico *Pharmaceuticals* apresenta fator de impacto 5.215, percentil de 56% na Scopus e Qualis A1 na área de Biodiversidade referente ao quadriênio vigente (2017-2020) da Plataforma Sucupira (Anexo B).

5.1 Resultados

5.1.1 Composição Química

O óleo essencial em estudo apresentou um rendimento de 0.361%. De acordo com a análise cromatográfica do óleo essencial de *A. confertus*, foi possível identificar 10 constituintes químicos correspondendo a 96.33% da composição total. Os compostos identificados pertencem às classes dos monoterpenos e sesquiterpenos. Mirceno (54.71%), um monoterpeno de importância farmacológica, se destacou por ser o constituinte majoritário da amostra analisada. Os constituintes β -pineno (18.2%), limoneno (6.52%) e β -eudesmol (5.72%) também apresentaram uma concentração razoável no óleo essencial de *A. confertus*. Em relação aos fitoquímicos com menores traços de concentração (<1%), foram identificados α -humuleno (0.80%), α -eudesmol (0.21%) e sabineno (0.19%) (Tabela 1).

Tabela 1: Constituintes do óleo essencial de *Acritopappus confertus* (Gardner) R. M. King & H. Rob.

Compostos	IR ^a	IR ^b	(%)
α -Pineno	937	935	3.24
Sabineno	978	978	0.19
β -Pineno	983	981	18.2
Mirceno	987	989	54.71
Limoneno	1029	1031	6.52
β -Cubebeno	1390	1391	4.81

β -cariofileno	1418	1418	1.93
α -Humuleno	1454	1459	0.80
α -Eudesmol	1631	1630	0.21
β -Eudesmol	1652	1652	5.72
Identificação Total (%)			96.33

Legenda: ^aÍndice de retenção experimental (baseado na série de n-alcenos C₇-C₃₀ homólogos). ^bÍndice de retenção da literatura (Adams, 1995).

5.1.2 Atividade Antifúngica e Modificadora do Fluconazol

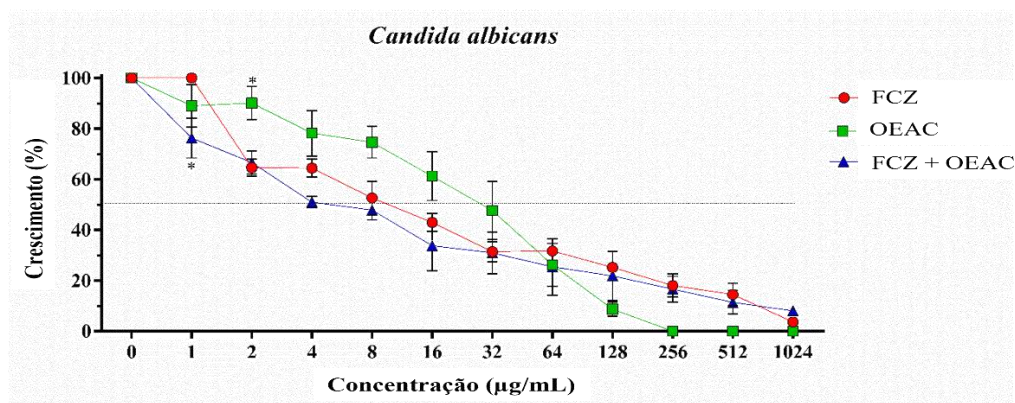
O óleo essencial de *A. confertus* apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* (IC₅₀ = 22.19 µg/mL) em concentração semelhante ao controle positivo fluconazol (IC₅₀ = 12.33 µg/mL), medicamento padrão amplamente utilizado em infecções fúngicas (Tabela 2) (Figura 4). No entanto, contra as cepas de *C. krusei* e *C. tropicalis*, o óleo essencial apresentou baixo efeito antifúngico com valores de IC₅₀ 592.6 µg/mL e 615.4 µg/mL, respectivamente (Tabela 2) (Figuras 5 e 6). Quando associado ao fluconazol, o óleo essencial de *A. confertus* potencializou o efeito do antifúngico contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentando valores de IC₅₀ de 6.53 µg/mL e 2.25 µg/mL, respectivamente.

Com base no comportamento da curva por meio de regressão não linear, os valores de IC₅₀ do óleo essencial da espécie vegetal estudada foi clinicamente relevante quando avaliado isoladamente para *C. albicans*. Em relação a cepa de *C. krusei*, não foram observados resultados positivos do referido óleo testado isoladamente ou associado ao fluconazol. Além disso, o produto natural apresentou uma CIM de 256 µg/mL para *C. albicans* (Figura 4), tornando-se um ótimo candidato ao desenvolvimento de novos fármacos.

Tabela 2: IC₅₀ do Óleo Essencial de *Acrítopappus confertus* frente *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

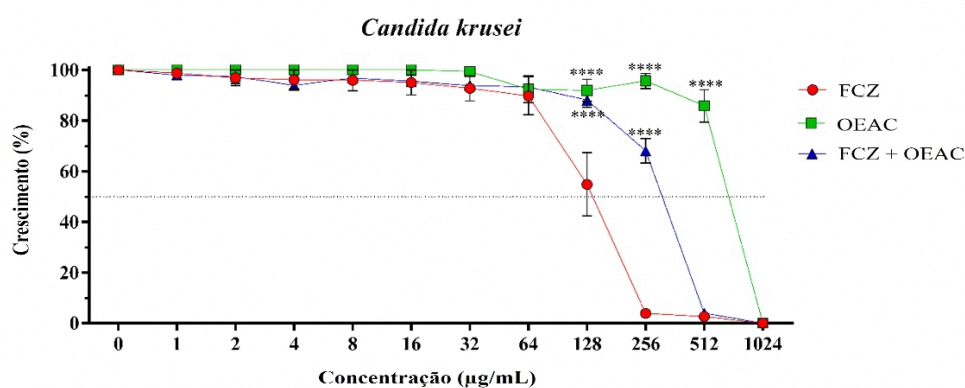
Produtos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida tropicalis</i>
FCZ	12.33 µg/mL	131.6 µg/mL	362.9 µg/mL
OEAC	22.19 µg/mL	592.6 µg/mL	615.4 µg/mL
FCZ + OEAC	6.53 µg/mL	295.8 µg/mL	2.25 µg/mL

Figura 4: Curva de viabilidade celular de *Candida albicans* INCQS 90028 frente ao óleo essencial de *Acritopappus confertus* (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em µg/mL.



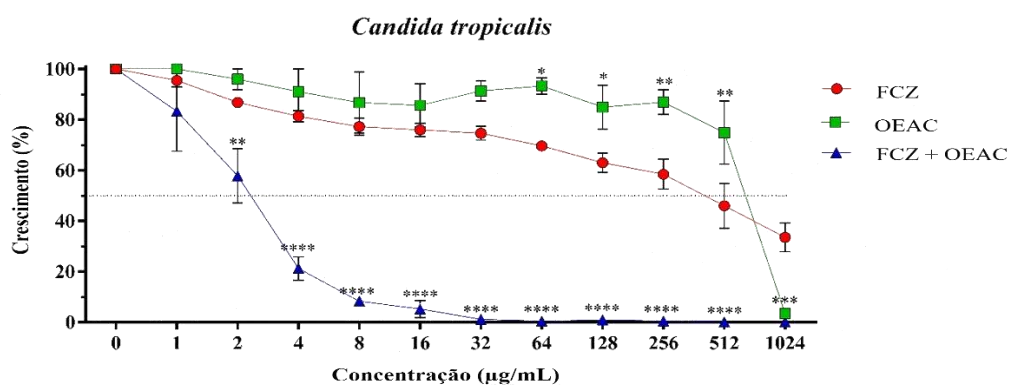
Legenda: Valor estatisticamente significativo com * $p < 0,05$.

Figura 5: Curva de viabilidade celular de *Candida krusei* INCQS 40095 frente ao óleo essencial de *Acritopappus confertus* (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em µg/mL.



Legenda: Valor estatisticamente significativo com **** $p < 0,0001$.

Figura 6: Curva de viabilidade celular de *Candida tropicalis* INCQS 40042 frente ao óleo essencial de *Acritopappus confertus* (OEAC) e Fluconazol (FCZ) em µg/mL.

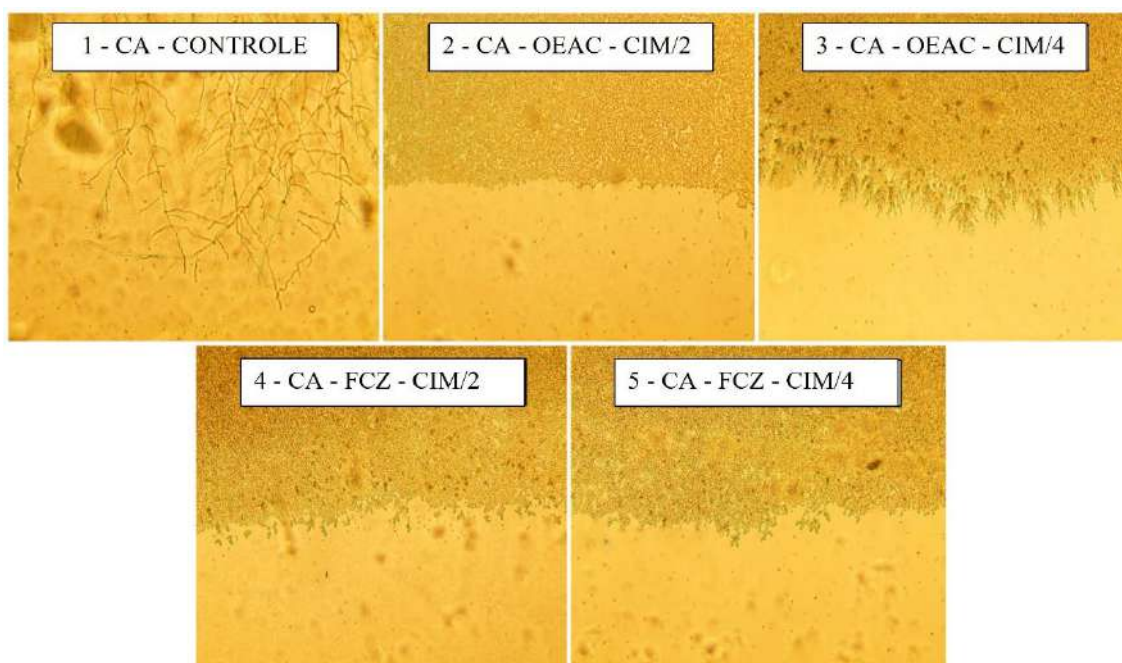


Legenda: Valor estatisticamente significativo com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.1.3 Potencial Anti-virulência

A avaliação do efeito do óleo essencial de *A. confertus* na morfologia das leveduras de *C. albicans* foi realizado por meio do empobrecimento do meio de cultura, estimulando as leveduras a projetarem hifas e pseudohifas em busca de nutrientes. Para o controle de crescimento de *C. albicans* (Figura 7, Foto 1), é possível observar a formação de várias hifas, enquanto ao serem tratadas com o óleo essencial de *A. confertus*, há uma diminuição significativa na projeção das hifas, principalmente na concentração de 128 µg/mL (F2), a qual inibiu totalmente a formação de filamentos.

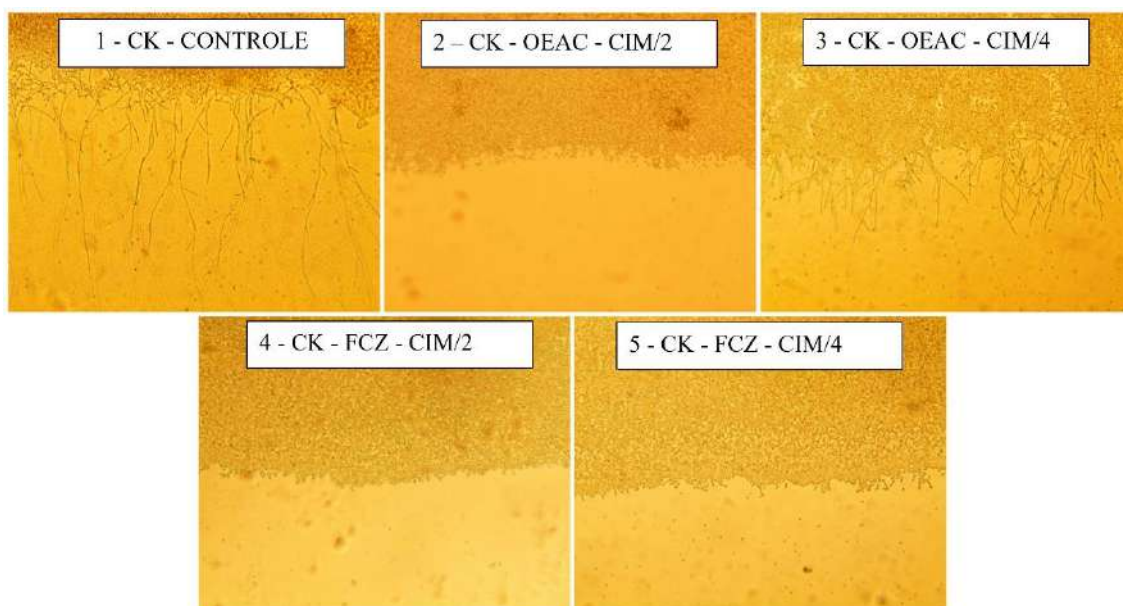
Figura 7: Efeitos do óleo essencial de *Acritopappus confertus* nos aspectos morfológicos de *Candida albicans*.



Legenda: Foto (F1-CA): Controle de crescimento; (F2-CA): Efeito do óleo essencial na concentração de 128 µg/mL; (F3-CA): Efeito do óleo essencial na concentração de 64 µg/mL; (F4-CA): Efeito do fluconazol na concentração de 1024 µg/mL; (F5-CA): Efeito do fluconazol na concentração de 512 µg/mL. Exibição 400× aumentada.

Para a cepa de *C. krusei*, o fluconazol diminuiu a virulência nas duas concentrações avaliadas (512 µg/mL e 256 µg/mL) (Figura 8, F4 e F5). Na concentração de 512 µg/mL, o óleo essencial de *A. confertus* também inibiu o crescimento das hifas de *C. krusei* (F2) semelhante ao controle positivo fluconazol, no entanto, quando avaliado na concentração de 256 µg/mL, o óleo não apresentou efeito sob a virulência da referida cepa fúngica (F3), apresentando projeções citoplasmáticas semelhantes ao controle de crescimento.

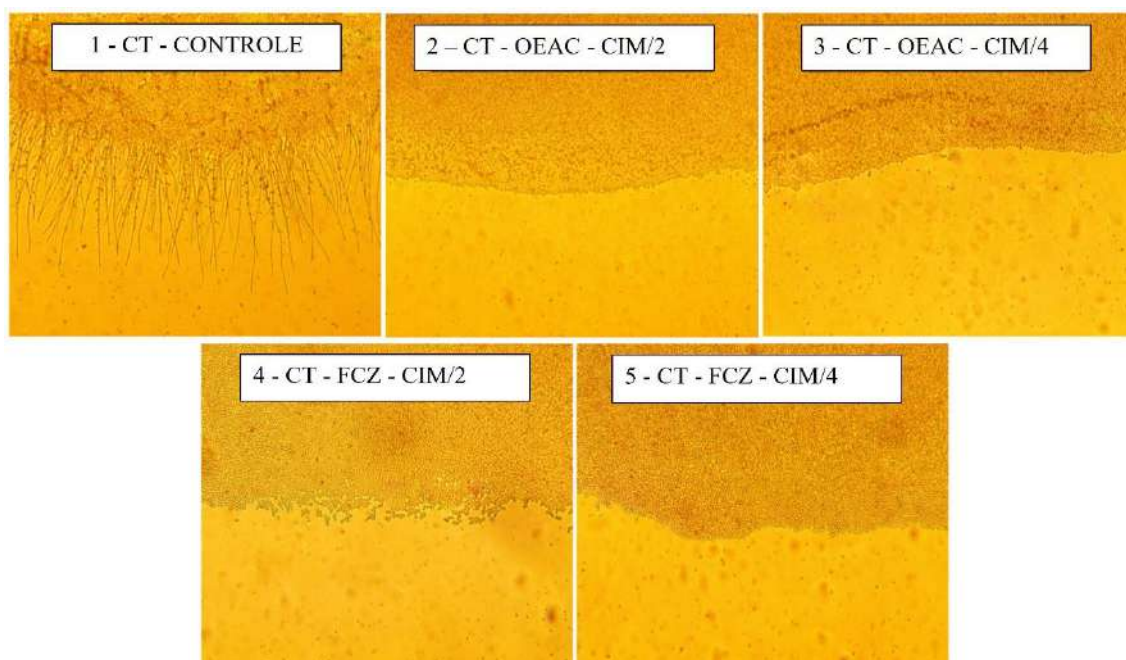
Figura 8: Efeitos do óleo essencial de *Acritopappus confertus* nos aspectos morfológicos de *Candida krusei*.



Legenda: Foto (F1-CK): Controle de crescimento; (F2-CK): Efeito do óleo essencial na concentração de 512 µg/mL; (F3-CK): Efeito do óleo essencial na concentração de 256 µg/mL; (F4-CK): Efeito do fluconazol na concentração de 512 µg/mL; (F5-CK): Efeito do fluconazol na concentração de 256 µg/mL. Exibição 400× aumentada.

A cepa de *C. tropicalis* foi sensível a todos os tratamentos analisados, não sendo observado o crescimento de hifas nas concentrações de 1024 µg/mL e 512 µg/mL do óleo essencial de *A. confertus* (F2, F3), e do controle positivo fluconazol nas concentrações de 1024 µg/mL e 512 µg/mL (F4, F5) (Figura 9). No controle de crescimento (F1) utilizando apenas meio de cultura empobrecido de nutrientes, é possível observar as projeções de hifas e pseudohifas de *C. tropicalis*.

Figura 9: Efeitos do óleo essencial de *Acritopappus confertus* nos aspectos morfológicos de *Candida tropicalis*.



Legenda: Foto 1 (F1-CT): Controle de crescimento; (F2-CT): Efeito do óleo essencial na concentração de 1024 µg/mL; (F3-CT): Efeito do óleo essencial na concentração de 512 µg/mL; (F4-CT): Efeito do fluconazol na concentração de 1024 µg/mL; (F5-CT): Efeito do fluconazol na concentração de 512 µg/mL. Exibição 400× aumentada.

5.1.4 Atividade Antibacteriana e Modificadora de Antibióticos

A atividade antibacterina do óleo essencial de *A. confertus* foi determinada pela concentração inibitória minina (CIM) conforme resultados descritos na tabela 3. Foi verificado que o óleo de *A. confertus* não apresentou atividade antibacteriana direta contra a maioria das cepas padrões e multiressistentes testadas, apresentando CIM acima de 512 µg/mL. Porém foi observada contra a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, CIM de 256 µg/mL, sendo esta concentração indicativa de relevância clínica e atividade antibacteriana intrínseca.

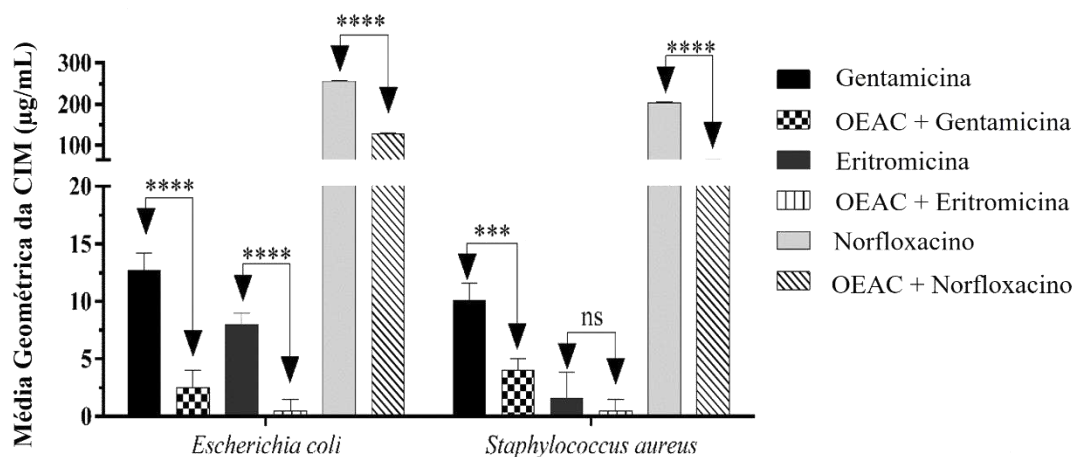
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima do Óleo Essencial de *Acritopappus confertus* frente a cepas bacterianas

Cepas	OEAC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	256 µg/mL

<i>Staphylococcus aureus</i> 10	$\geq 512 \mu\text{g/mL}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$\geq 512 \mu\text{g/mL}$
<i>Escherichia coli</i> 06	$\geq 512 \mu\text{g/mL}$

Quando testado em concentrações sub-inibitórias (CIM/8) em associação com antibióticos padrões, o óleo de *A. confertus* demonstrou efeito sinérgico, potencializando a ação das drogas contra as cepas multirresistentes testadas (Figura 10). Frente *E. coli* 06, o óleo diminuiu a CIM da gentamicina (12,69 para 2,51 $\mu\text{g/mL}$), eritromicina (8 para 0,5 $\mu\text{g/mL}$) e norfloxacin (256 para 128 $\mu\text{g/mL}$). Enquanto contra *S. aureus* 10 reduziu a CIM da gentamicina (10,07 para 4 $\mu\text{g/mL}$) e norfloxacin (203,18 para 54 $\mu\text{g/mL}$), não sendo verificado efeito modificador apenas para a combinação do óleo com eritromicina. Esses resultados promissores indicam que o óleo de *A. confertus* pode atuar aumentando a susceptibilidade de cepas resistentes contra fármacos sintéticos.

Figura 10: Efeito modificador do óleo essencial de *Acratopappus confertus* (OEAC) contra as cepas multirresistentes *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06 em associação com os antibióticos gentamicina, eritromicina e norfloxacin em $\mu\text{g/mL}$.



Legenda: Valor estatisticamente significativo com *** $p > 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.2 Discussão

Assim como os resultados encontrados no presente trabalho sobre a composição fitoquímica, Lima *et al.* (2005) relataram que o óleo essencial das folhas de *A. confertus*

apresenta predominância de monoterpenos, correspondendo a cerca de 81.0% dos compostos totais. Além disso, os autores identificaram mirceno (52.0%), β -pineno (16.8%) e limoneno (8.2%) como principais constituintes. Resultados semelhantes também foram observados por Sousa *et al.* (2020), onde os principais fitoquímicos identificados no óleo essencial das folhas de *A. confertus* foram mirceno (49.16%), β -pineno (17.09%) e limoneno (8.73%).

O monoterpeno mirceno se destaca por ser um dos compostos majoritários do óleo essencial de outras espécies da família Asteraceae, incluindo *Cladanthus arabicus* Cass. (HANBALI *et al.* 2005), *Pteronia incana* (Burm.) DC. (MAYEKISO; MAGWA; COOPOOSAMY, 2006; HULLEY *et al.*, 2010a), *Pteronia onobromoides* DC. (HULLEY *et al.*, 2010b), *Glebionis coronaria* (L.) Tzvelev (HAOUAS *et al.*, 2016), *Vernonia polyanthes* Less (MOREIRA *et al.*, 2017), *Coreopsis triloba* SF Blake (ESPINOSA *et al.*, 2019) e *Montanoa quadrangularis* Schultz Bipontinus (ROJAS *et al.*, 2021).

O surgimento de cepas fúngicas resistentes aos fármacos padrões tem crescido nas últimas décadas, principalmente as nosocomiais, como é o caso de *Candida* spp.. Um agravante para este problema, é que o desenvolvimento de novas drogas não tem acompanhado tal evolução, de forma que se torna uma “guerra” constante contra o mundo microscópico. Neste estudo, demonstramos que o óleo essencial de uma espécie medicinal, *A. confertus*, apresenta efeito anti-*Candida*, além de ser capaz de intensificar a ação do fluconazol.

Em estudo realizado por Tavares *et al.* (2010), verificou-se que o composto mirceno isolado apresentou atividade antifúngica contra as cepas *Candida albicans* ATCC 10231 (MIC: 5 μ g/mL), *Candida tropicalis* ATCC 13803 (MIC: 20 μ g/mL) e *Candida krusei* H9 (MIC: 10 μ g/mL). Resultados negativos foram observados por Taweekaisupapong *et al.* (2012), onde mirceno foi considerado inativo contra *C. albicans* e *C. krusei* nas concentrações testadas (0.06–32 μ L/mL).

De acordo com Donati *et al.* (2014), mirceno foi avaliado contra *Candida parapsilosis* e apresentou um diâmetro de zona de inibição de apenas 8.3 ± 0.3 mm quando comparado com o controle fluconazol (18.3 ± 0.3 mm) pelo método de difusão em disco. Jain e Sharma (2020) relataram que mirceno apresentou um moderado efeito contra *C. albicans* com o valor de MIC de < 2.1 μ L/mL. Diante destes dados, sugere-se que mirceno, composto majoritário do óleo essencial de *A. confertus*, pode estar

relacionado com a atividade anti-*Candida* avaliada neste estudo, mas não pode ser considerado como um composto que apresenta excelentes resultados antifúngicos.

Os compostos β -pineno e limoneno, identificados em concentração razoáveis no óleo essencial de *A. confertus*, também foram avaliados por outros autores quanto ao seu potencial anti-*Candida* (SILVA *et al.*, 2012; RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013; ANDRADE *et al.*, 2018; THAKRE *et al.*, 2018; MUÑOZ *et al.*, 2020). De acordo com Rajput e Karuppayil (2013), o monoterpene β -pineno apresentou uma MIC de 1 mg/mL contra *C. albicans*. Esse efeito foi considerado moderado pelos autores Prabajati *et al.* (2017) relataram que o mecanismo de ação de β -pineno pode estar envolvido com a ruptura da membrana celular de *C. albicans* ou pela interferência no funcionamento das mitocôndrias.

Em estudo realizado por Thakre *et al.* (2018), observou-se que limoneno se destacou por ser um composto fungicida inibindo 99.9% do crescimento de 35 isolados clínicos e duas cepas padrão de *C. albicans* sob uma concentração de 20 mM. Estes autores relataram ainda que o mecanismo de ação do limoneno pode estar envolvido com os danos causados na integridade da membrana das leveduras. Muñoz *et al.* (2020) relataram que houve uma diminuição significativa na viabilidade celular de *C. albicans* quando as leveduras foram previamente tratadas com limoneno, nas concentrações de 500 μ M e 600 μ M, por um período de 8 h.

Relatos sobre o potencial antifúngico do óleo essencial de *A. confertus* não foram encontrados na literatura, no entanto, outras espécies de Asteraceae tem apresentado resultados promissores como fungicidas (GAZIM *et al.*, 2008; ZAPATA *et al.*, 2010; SILVÉRIO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2018). O óleo essencial de *Calendula officinalis* L., por exemplo, apresentou alta atividade anti-*Candida* pelo método de difusão em disco com zonas de inibição de 20-27 mm, contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* ATCC 777, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* (GAZIM *et al.*, 2008).

De acordo com Silvério *et al.* (2013), óleos essenciais extraídos de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch foram eficazes contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, inibindo o crescimento fúngico entre 15 e 125 μ g/mL. Assim como no presente estudo, Rodrigues *et al.* (2018) também relataram que quando associado ao antifúngico fluconazol, o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Barker apresentou potencial modulador e atividade sinérgica contra diferentes cepas de *Candida* em concentrações sub-inibitórias menores que a droga comercial testada isoladamente.

Óleos essenciais da família Asteraceae também têm sido avaliados quanto ao seu potencial relacionado à virulência fúngica (STOJANOVIĆ-RADIĆ *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Stojanović-Radić *et al.* (2020) relataram que além de seu efeito no crescimento celular, o óleo essencial de *Inula helenium* L. também diminui significativamente fatores de virulência de *Candida* sp., incluindo a inibição da produção de biofilmes, tubos germinativos e fosfolipases. De acordo com Silva *et al.* (2021), o óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC inibiu significativamente as alterações morfológicas associadas ao aumento da virulência e patogenicidade das cepas de *C. albicans* (CAINCQS 40006), *C. tropicalis* (CT INCQS 40042) e *C. krusei* (CK INCQS 40095). Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, onde o óleo essencial de *A. confertus* inibiu o crescimento de hifas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, sendo o primeiro trabalho a evidenciar o efeito antipleomórfico da referida espécie.

Essa combinação do fluconazol com o óleo essencial de *A. confertus* pode ser uma alternativa para contornar a resistência fúngica. Visto que, algumas cepas resistentes são capazes de expulsar o fármaco do conteúdo citoplasmático por meio de bombas de efluxo. Como o fluconazol atua na inibição da síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima 14 α -desmetilase que está presente na membrana celular, a sua ação apenas ocorrerá com sua presença no meio intracelular. Para tanto, é necessário que haja uma inibição dos genes da bomba de efluxo, podendo estes serem possíveis alvos do óleo essencial em estudo (KEEREEDACH *et al.*, 2020).

Com relação as atividades antibacterianas, a espécie *A. Confertus* ainda é pouco investigada. Fernandes *et al.* (2014) testaram o óleo essencial das folhas de *A. Confertus* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* em ensaios de difusão em meio sólido e ensaios em meio líquido, com concentrações variando de 1000 a 4000 ppm. Foi verificado que o óleo de *A. confertus* apresentou apenas efeito bacteriostático contra *B. subtilis* e não demonstrou efeito contra *Escherichia coli* por nenhum dos métodos empregados.

Como esses dados são preliminares mais estudos são necessários para verificar se realmente a espécie não possui atividade antibacteriana direta. Porém, devemos ressaltar que produtos sem atividade antibacteriana intrínseca são menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência quando utilizados como modificadores da ação de antibióticos, consequentemente apresentam mais potencial para combater bactérias resistentes pelo uso de combinações (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012).

O terpeno mirceno, composto majoritário do óleo essencial de *A. confertus*, em estudo de Inoue *et al.*, (2004) inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e causou danos as membranas celulares pelo vazamento de íons K^{+} , tanto isolado como em combinação com o composto terpinen-4-ol. Já em associação com a penicilina em estudo de Galluci *et al.* (2006), a interação do mirceno com o antibiótico demonstrou efeito clínico insignificante contra *S. aureus* e antagonismo contra *E. coli*. No entanto, quando combinado com antibióticos frente a bactéria causadora da tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*, o mirceno conseguiu diminuir a CIM de 16 para 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (etambutol), de 32 para 0,95 $\mu\text{g/mL}$ (isoniazida) e de 16 para 0,475 $\mu\text{g/mL}$ (rifampicina) (SIENIAWSKA *et al.*, 2017), sugerindo então que o efeito sinérgico desse composto varia de acordo com a classe de antibióticos e tipos de cepas testadas.

Outros terpenos presentes no óleo essencial de *A. confertus* apresentam grande potencial antibacteriano de acordo com a literatura. O composto β -pineno em estudo de Leite *et al.*, (2007) demonstrou atividade contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*. A CIM do β -pineno variou de 20 a 40 $\mu\text{g/mL}$, inibindo significativamente o crescimento e a viabilidade celular das cepas. Já o monoterpene limoneno em testes de *in vitro* e *in silico* diminuiu a CIM do controle positivo brometo de etídio contra a estirpe 1119B de *S. aureus* portadora do mecanismo de bomba de efluxo, também potencializou a ação do norfloxacinol contra a cepa indicando potencial como possível inibidor da bomba NorA que expulsa fluoroquinolonas hidrofílicas (ARAÚJO *et al.*, 2021).

Enquanto os mecanismos moleculares envolvidos na ação dos óleos essenciais sobre as células bacterianas não são totalmente elucidados, sugere-se que devido à sua lipofilicidade, os compostos terpenoides podem alterar a permeabilidade da membrana interferindo no transporte de uma grande variedade de substâncias, incluindo facilitando a entrada de antibióticos no citoplasma (FREITAS *et al.*, 2021). No entanto, a sensibilidade de uma cepa a um óleo essencial varia dependendo da sua complexidade de constituintes e dos mecanismos de resistência dos microrganismos. O efeito modificador de *A. confertus* observado nesse estudo, pode-se estar relacionado a capacidade de óleos essenciais interagir com a membrana plasmática, desordenando peptídeos anfifílicos e ocasionando o rompimento do citoplasma e danificação de lipídeos e proteínas (AZEVEDO *et al.*, 2016; BAKALLI *et al.*, 2008; MOLLICA *et al.*, 2018).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial obtido das folhas de *A. confertus* foi capaz de reduzir o crescimento de *Candida* spp., conforme avaliado pela Concentração Inibitória Mínima. Este resultado tem implicações importantes para o organismo humano, pois tais microrganismos fazem parte de sua microbiota. Além disso, o óleo essencial foi capaz de inibir a formação de um importante fator de virulência fúngica, a formação de hifas e pseudohifas das leveduras em estudo, em concentrações de relevância clínica. Quando testado em bactérias, esse óleo rico em monoterpene Mirceno foi capaz de modificar a ação de todos os antibióticos testados, tornando-os mais eficazes contra cepas resistentes quando usado em combinação. Esses dados são promissores, porém são necessárias mais pesquisas para elucidar os mecanismos de ação e interação entre os compostos do óleo essencial de *A. confertus* e as drogas antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-BAKY, R. M. *et al.* Prevalence and some possible mechanisms of colistin resistance among multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 323, 2020.
- ABD ELLAH, N. H. *et al.* Efficacy of ketoconazole gel-flakes in treatment of vaginal candidiasis: formulation, in vitro and clinical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, p. 118472, 2019.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography / Quadruple Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 2001.
- ANDERSON, T. M. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400-406, 2014.
- ANDRADE, A. C. M. *et al.* Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+)- β -pinene enantiomers against *Candida spp.* **Current topics in medicinal chemistry**, v. 18, n. 29, p. 2481-2490, 2018.
- ANGIONI, A. *et al.* Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, 2006.
- ARAÚJO, A. C. J. *et al.* *In vitro* and *in silico* inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pump NorA by α -pinene and limonene. **Current Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3388-3393, 2021.
- AZEVEDO, I. L. *et al.* Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 25-31, 2016.
- BADKE, M. R. *et al.* Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363, 2012.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAUTISTA, H. P.; ORTIZ, S.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J. A new species of the Brazilian endemic genus *Acritopappus* (Compositae, Eupatorieae) from Minas Gerais. **Systematic Botany**, v. 36, n. 1, p. 227-230, 2011.
- BAPTISTA-SILVA, S. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 4, p. 279-295, 2020.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to antifungal drugs. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 279-311, 2021.

BENITO, D. *et al.* Detection of methicillinsusceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. **Microbiology ecology**, 2013.

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BERTO, C. *et al.* Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. **Revista Uningá**, v. 55, n. 3, p. 52-71, 2018.

BEZERRA, J. W. A. *et al.* Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 437-442, 2017.

BFG – Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.

BITU, V. D. C. N. *et al.* Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, 265-272, 2015.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42, 2015.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BRAGA, A. L. *et al.* *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 495-501, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre diversidade biológica**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente; 2000.

BRAUN, B. R.; KADOSH, D.; JOHNSON, A. I. D. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4753-4761, 2001.

BRITO, N. M. *et al.* Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n. 2, p. 207-211.2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARMO, J. B. M.; VIEIRA, A. C. M. **Plantas com Atividade Inseticida para Uso em Cultivo Orgânico e Agroecológico**. Rio de Janeiro: Cerceau. 2016. 54p.

CARNEIRO, J. N. P. *et al.* *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial pathogenesis**, v. 136, p. 103700, 2019.

CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CID-CHEVECICH, C. *et al.* *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida spp.* and potentiates the effects of fluconazole and nystatin *in vitro*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022.

COUTINHO, H. D. M *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

CREPALDI, C. G. *et al.* Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **Soul African Journal of Botany**, v. 102, p. 157-165, 2016.

CRUZ, R. P. *et al.* Effect of α -bisabolol and its β -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 2020.

CRUZ, R. P. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Acritopappus confertus* (Gardner) RM King & H. Rob.(Asteraceae). **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, p. 1275, 2022.

DEGENHARDT, J. *et al.* Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 169-176, 2003.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S.; MENEZES, M. F. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Caderno Otorrinolaringol**, 2010.

DONATI, M. *et al.* Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. **Natural product research**, v. 29, n. 10, p. 939-946, 2015.

- DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 8, p. 677-691, 2018.
- DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.
- EICHHORN, S. E. *et al.* **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 8 ed, 2014. 830 p.
- EKIERT, H. *et al.* Significance of *Artemisia vulgaris* L.(Common Mugwort) in the history of medicine and its possible contemporary applications substantiated by phytochemical and pharmacological studies. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4415, 2020.
- ERUYGUR, N. *et al.* Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 141-145, 2019.
- ESPINOSA, S. *et al.* Chemical, enantioselective, and sensory analysis of a cholinesterase inhibitor essential oil from *Coreopsis triloba* SF Blake (Asteraceae). **Plants**, v. 8, n. 11, p. 448, 2019.
- FERNANDES, E. L. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais das plantas *Acritopappus confertus*, *Cuphea carthagenensis* e *Poiretia bahiana* (Chapada Diamantina, Brasil)**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais), Universidade do Minho, Braga-PT, 2012.
- FERNANDES, E.; SOUSA, M. J.; DIAS, A. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils from the Brazilian plants *Acritopappus confertus*, *Cuphea carthagenensis* and *Poiretia bahiana*. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. P2065, 2014.
- FERNANDES, P. A. S. *et al.* Diversidade de uso medicinal da flora em uma área de cerrado na Chapada do Araripe, NE, BR. In: SILVA, C. D. D. **Ciências biológicas: realidades e virtualidades**. Ponta Grossa - PR: Atena, 2020.
- FERRONATTO, R. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.
- Flora do Brasil. 2020 Asteraceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB55>>. Acesso em 13 de Outubro de 2022.
- FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence strategies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a mini review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 632706, 2021.

FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.

FREITAS, M. A. *et al.* HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae). **3 Biotech**, v. 12, n. 3, p. 1-15, 2022.

FREITAS, P. R. *et al.* Inhibition of efflux pumps by monoterpene (α -pinene) and impact on *Staphylococcus aureus* resistance to tetracycline and erythromycin. **Current Drug Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 123-126, 2021.

FUNCH, L. S. *et al.* **Chapada da Diamantina A Useful Plants**. São Carlos: Rima, Brazil, 2004. 206 p.

GALLUCCI, N. *et al.* Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. **Mol. Med. Chem**, v. 10, n. 1, p. 30-32, 2006.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GAZIM, Z. C. *et al.* Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L.(Asteraceae) growing in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 61-63, 2008.

HANBALI, F. E. *et al.* Composition and antibacterial activity of essential oils of *Cladanthus arabicus* cass.(Asteraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 8, n. 2, p. 213-217, 2005.

HANIF, M. A. *et al.* Essential oils. In: Essential oil research. **Springer, Cham**, p. 3-17, 2019.

HAOUAS, D. *et al.* Variation of chemical composition in flowers and leaves essential oils among natural population of Tunisian *Glebionis coronaria* (L.) Tzvelev (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 10, p. 1251-1261, 2016.

HOLDEN, M. T. G. *et al.* Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9786-9791, 2004.

HULLEY, I. M. *et al.* The ethnobotany, leaf anatomy, essential oil variation and biological activity of *Pteronia incana* (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 668-675, 2010a.

HULLEY, I. M. *et al.* Ethnobotany, leaf anatomy, essential oil composition and antibacterial activity of *Pteronia onobromoides* (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 1, p. 43-48, 2010b.

INOUE, Y. *et al.* The antibacterial effects of myrcene on *Staphylococcus aureus* and its role in the essential oil of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*). **Natural medicines**, v. 58, n. 1, p. 10-14, 2004.

JAIN, N.; SHARMA, M. Inhibitory effect of some selected essential oil terpenes on fungi causing superficial infection in human beings. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 4, p. 862-869, 2020.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, 2017.

JARRAUD, S. *et al.* egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669-677, 2001.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

JUNIOR, W. S. F. *et al.* Checklist das plantas medicinais na chapada do Araripe. In: Sociobiodiversidade na Chapada do Araripe, Recife, PE: NUPPEA, 1 ed, 431-450. 2012.

KADRI, S. S. Key takeaways from the US CDC's 2019 antibiotic resistance threats report for frontline providers. **Critical care medicine**, 2020.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KEEREEDACH, P.; HRIMPENG, K.; BOONBUMRUNG, K. Antifungal activity of Thai cajuput oil and its effect on efflux-pump gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-10, 2020.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 ed., 2004. 452 p.

KHAN, A.; *et al.* Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. **Future science OA**, v. 6, n. 2, p. FSO440, 2020.

KHAN, A.; MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 4, p. 269-287, 2018.

- KITAOKA, N. *et al.* The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 6-16, 2015.
- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642-647, 2011.
- KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1438-1450, 2016.
- KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.
- KUMAR, A. *et al.* Exploration of medicinal plants as sources of novel anticandidal drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 2579-2592, 2019.
- KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. **International journal of bacteriology**, v. 2013, 2013.
- LAWSON, S. K. *et al.* Volatile compositions and antifungal activities of native american medicinal plants: Focus on the asteraceae. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 126, 2020.
- LEAL, A. L. A. B. *et al.* *Piper cernuum* Vell.: Chemical profile and antimicrobial potential evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111577, 2019.
- LEITE, A. M. *et al.* Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 121-126, 2007.
- LEMOES, I. C. S. *et al.* Ethnobiological survey of plants and animals used for the treatment of acute respiratory infections in children of a traditional community in the municipality of barbalha, ceará, Brazil. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 4, 166-175, 2016.
- LIMA, M. A. S. *et al.* Volatile compositions of two asteraceae from the north-east of Brazil: *Ageratum conyzoides* and *Acrilotopappus confertus* (Eupatorieae). **Flavour and fragrance journal**, v. 20, n. 6, p. 559-561, 2005.
- LOPES, P. *et al.* Análise da frequência e do perfil de sensibilidade da *Escherichia coli* como agente causador de infecções do trato urinário na microrregião de viçosa, mg. **Anais Simpac**, v. 2, n. 1, 2015.
- LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- MACÊDO, D. G. *et al.* Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. **PeerJ**, v. 6, p. e5476, 2018.

MACÊDO, D. G. *et al.* Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 6, 491-508, 2015.

MACÊDO, M. J. F. *et al.* Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, 738-750, 2018.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 3, 2002.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MATEO, N.; NADER, W.; TAMAYO, G. Bioprospecting. **Encyclopedia of biodiversity**, v. 1, p. 471-487, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. edições UFC, 1997.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacologia: Curso teórico-prático**. Fortaleza: Edições UFC, 1989.

MAYEKISO, B.; MAGWA, M. L.; COOPOOSAMY, R. M. Variation in the essential oil constituents of *Pteronia incana* (Asteraceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 12, 2006.

MCCALL, A. D. *et al.* *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

MÉRILLON, J. M; RIVIERE, C. **Natural antimicrobial agents**. Cham, Switzerland: Springer, 2018.

MOLLICA, A. *et al.* Arginine-and lysine-rich peptides: synthesis, characterization and antimicrobial activity. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, n. 3, p. 220-226, 2018.

MORAIS-BRAGA, M. Fl. B. *et al.* *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 200-207, 2016.

MOREIRA, R. R. D. *et al.* Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 31, n. 24, p. 2905-2908, 2017.

MORO, M. F. *et al.* Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 66, n. 3, 717-743, 2015.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MUÑOZ, J. E. *et al.* In Vitro and In Vivo Inhibitory Activity of Limonene against Different Isolates of *Candida spp.* **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 183, 2020.

NAKAJIMA, J.; BAUTISTA, H. P. *Acritopappus in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15916>>. Acesso em: 09 mai. 2023

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, 2019.

NGUYEN, D. T. C. *et al.* Engineering conversion of Asteraceae plants into biochars for exploring potential applications: a review. **Science of The Total Environment**, v. 797, p. 149195, 2021.

NIÑO, J. *et al.* Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 566-570, 2006.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Antibiotic resistance**. WHO Library Cataloguing-in-Publication, 2017.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 32-37, 2014.

PANERO, J. L. *et al.* Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 80, p. 43-53, 2014.

PEIXOTO, A. L. *et al.* **Conhecendo a biodiversidade**. Brasília: MCTIC, CNPq, PPBio, 2016. 196 p.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement_1, p. S3-S14, 2006.

PINHO, C. *et al.* In vitro anti-cancer activities of *Poiretia bahiana* and *Acritopappus confertus*. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. P2B111, 2014.

POIREL, L. *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4. 14, 2018.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, 2002.

POOLMAN, J. T.; ANDERSON, A. S. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 7, p. 607-618, 2018.

PRABAJATI, R.; HERNAWAN, I.; HENDARTI, H. T. Effects of citrus limon essential oil (*Citrus limon* L.) on cytomorphometric changes of *Candida albicans*. **Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2017.

PRATES, A. P. L.; IRVING, M. A. Conservação da biodiversidade e políticas públicas para as áreas protegidas no Brasil: desafios e tendências da origem da CDB às metas de Aichi. **Revista brasileira de políticas públicas**, v. 5, n. 1, p. 27-57, 2015.

QUEIROZ, N. S. D. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, 2004.

RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2013.

RAVEN, P. H. *et al.* **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 7ª ed., 2007.

REED, P. A. Bioprospecting. **The technology teacher**, v. 64, n. 4, 2005.

REVIE, N. M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RODRIGUES, F. C. *et al.* Antimicrobial activity, modulatory effect and phytochemical analysis of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 286-293, 2022.

RODRIGUES, F. F. G. *et al.* In vitro antimicrobial activity of the essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Barker (Asteraceae) and its major constituent, α -bisabolol. **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 144-149, 2018.

ROJAS, J. *et al.* Antibacterial Activity and Reversal of Multidrug Resistance of Tumor Cells by Essential Oils from Fresh Leaves, Flowers, and Stems of *Montanoa quadrangularis* Schultz Bipontinus (Asteraceae) Collected in Mérida—Venezuela. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 605, 2021.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

SAHA, M.; SARKAR, A. Review on Multiple Facets of Drug Resistance: A Rising Challenge in the 21st Century. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, n. 4, p. 197-214, 2021.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plantderived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 3, p.161-171, 2008.

SALKAR, K. *et al.* Evaluation of selected medicinal plants for anticandida potential. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1229-1235, 2013.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; PÉREZ-MARTÍN, J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 2, p. 214-221, 2001.

SANTOS, J. F. S. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food chemistry**, v. 261, p. 233-239, 2018.

SATYAL, P. *et al.* The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). **Foods**, v. 6, n. 8, p. 63, 2017.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

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.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**, 1st ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2010.

SIENIAWSKA, E. *et al.* Natural terpenes influence the activity of antibiotics against isolated *Mycobacterium tuberculosis*. **Medical Principles and Practice**, v. 26, n. 2, p. 108-112, 2017.

SILVA, A. C. *et al.* Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, T. G. *et al.* Phytochemical characterization and inhibition of *Candida* sp. by the essential oil of *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 3077-3087, 2021.

SILVEIRA, G. P. *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006.

SILVEIRA, L.; MARQUES, A.; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002 e 2012. **Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde**, v. 1, n. 8, p. 1–4, 2013.

SILVÉRIO, M. S. *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9785-9796, 2013.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 502 p.

SOUSA, J. D. *et al.* Chromatographic profile and allelopathic potential of the essential oil of *Acrítópappus confertus* (Gardner) RM King & H. Rob.(Asteraceae). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e1991210450-e1991210450, 2020.

SOUSA-JÚNIOR, J. R. *et al.* Traditional management affects the phenotypic diversity of fruits with economic and cultural importance in the Brazilian Savanna. **Agroforestry Systems**, v. 92, n. 1, p. 11-21, 2018.

SOUZA, R. K. D. *et al.* Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99-104, 2014.

STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. *et al.* Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: Synergistic potential, anti-virulence efficacy and mechanism of action. **Industrial crops and products**, v. 149, p. 112373, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5 ed., 2017. 820 p.

TAVARES, A. C. *et al.* Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 593-598, 2010.

TAWEECHASUPAPONG, S. *et al.* Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. **South African Journal of Botany**, v. 81, p. 95-102, 2012.

THAKRE, A. *et al.* Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 565-578, 2018.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711-721, 2005.

THURLOW, L. R.; JOSHI, G. S.; RICHARDSON, A. R. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Pathogens and Disease**, v. 65, n. 1, p. 5-22, 2012.

TONG, S. Y. C *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological research**, v. 198, p. 27-35, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artemed 12 ed., 2017. 935 p.

UPRETI, N. *et al.* Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sci. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2018.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

VILA, T. *et al.* Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 150-158, 2017.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTEC-A-E)**, 2010.

WIŃSKA, K. *et al.* Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2130, 2019.

WITTE, W. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 255, 2007.

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

ZAAS, A. K. Echinocandins: a wealth of choice—how clinically different are they?. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 426-432, 2008.

ZAPATA, B. *et al.* Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010.

ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO



pharmaceuticals



Article

Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae)

Rafael Pereira da Cruz ¹, José Walber Gonçalves Castro ¹, Débora Odília Duarte Leite ², Natália Kelly Gomes de Carvalho ³, José Weverton Almeida-Bezerra ¹, Raimundo Luiz Silva Pereira ¹, Fázia Fernandes Galvão Rodrigues ¹, José Jailson Lima Bezerra ³, Adrielle Rodrigues Costa ⁴, Edna Mori ⁵, Pablo Antonio Maia de Farias ⁵, Henrique Douglas Melo Coutinho ⁶, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga ¹, Marcello Iriti ^{7,*}, José Galberto Martins da Costa ⁶ and Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues ¹

¹ Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil

² Northeast Biotechnology Network, Postgraduate Program in Biotechnology, State University of Ceará, Fortaleza 60740-000, Brazil

³ Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

⁴ Department of Biochemistry, Federal University of Cariri, Barbalha 63180-000, Brazil

⁵ CECAP College, Av. Padre Cicero, Juazeiro do Norte 63024-015, Brazil

⁶ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil

⁷ Department of Biomedical, Surgical and Dental Sciences, Università degli Studi di Milano, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy

* Correspondence: marcello.iriti@unimi.it (M.I.)

Citation: da Cruz, R. P.; Castro, J.W.G.; Leite, D.O.D.; de Carvalho, N.K.G.; Almeida-Bezerra, J.W.; Pereira, R.L.S.; Rodrigues, F.F.G.; Bezerra, J.J.L.; Costa, A.R.; Mori, E.; et al. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae). *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1275. <https://doi.org/10.3390/ph15101275>

Academic Editors: Stefania Garzoli and Riccardo Petrelli

Received: 5 September 2022

Accepted: 14 October 2022

Published: 17 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Microbial resistance has become a worrying problem in recent decades after the abusive use of antibiotics causing the selection of resistant microorganisms. In order to circumvent such resistance, researchers have invested efforts in the search for promising natural substances, such as essential oils. Thus, the objective of this work was to determine the chemical composition of the essential oil of *Acritopappus confertus* leaves, to evaluate its intrinsic effect and its effects in combination with drugs against pathogenic fungi and bacteria, in addition to verifying the inhibition of virulence in *Candida* strains. To this end, the oil was verified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). *Candida* strains were used for antifungal assays by means of the serial microdilution technique, in order to determine the average inhibitory concentration (IC₅₀), and for the modification assays, sub-inhibitory concentrations (MIC/8) were used. Finally, the natural product's ability to inhibit the formation of filamentous structures was evaluated. In antibacterial tests, the MIC of the oil against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and its modifying effects in association with gentamicin, erythromycin, and norfloxacin were determined. The major constituent of the essential oil was the monoterpene myrcene (54.71%). The results show that the essential oil has an antifungal effect, with *C. albicans* strains being the most susceptible. Furthermore, the oil can potentiate the effect of fluconazole against strains of *C. tropicalis* and *C. albicans*. Regarding its effect on micromorphology, the oil was also able to inhibit the filaments in all strains. In combination with antibiotics, the oil potentiated the drug's action by reducing the MIC against *E. coli* and *S. aureus*. It can be concluded that the essential oil of *A. confertus* has potential against pathogenic fungi and bacteria, making it a target for the development of an antimicrobial drug.

ANEXO B: COMPROVANTE DE QUALIS VIGENTE NA ÁREA DE BIODIVERSIDADE

 ACESSO RESTRITO
(/sucupira/portais/menu_portal.jsf)

INÍCIO (/SUCUPIRA/PUBLIC/INDEX.JSF) >> Qualis >> Qualis Periódicos

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020 ▼

Área de Avaliação:

☒ BIODIVERSIDADE ▼ +

ISSN:

☒ 1424-8247

Título:

☒ PHARMACEUTICALS

<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/ListaConsultaGeralPeriodicos.jsf>

1/2

06/01/2023 15:41

Plataforma Sucupira

Classificação:

☒ -- SELECIONE -- ▼

Consultar

Cancelar

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1424-8247	PHARMACEUTICALS	BIODIVERSIDADE	A1

Início

Anterior

1 ▼

Próxima

Fim