

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ZITA DINIS LOPES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE
POUTERIA RAMIFLORA SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

BRASÍLIA

2018

ZITA DINIS LOPES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE
POUTERIA RAMIFLORA SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Co-orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira

BRASÍLIA

2018

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

DD585a Dinis Lopes da Silva, Zita
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE POUTERIA RAMIFLORA SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS / Zita Dinis Lopes da Silva; orientador Yanna Karla de Medeiros Nóbrega; co-orientador Dâmaris Silveira. - Brasília, 2018.
114 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, 2018.

1. Candida spp.. 2. candidíase sistêmica. 3. fungos biodeteriogênicos. 4. plantas medicinais. 5. atividade antifúngica. I. de Medeiros Nóbrega, Yanna Karla, orient. II. Silveira, Dâmaris, co-orient. III. Título.

ZITA DINIS LOPES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE
POUTERIA RAMIFLORA SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (UnB)
Presidente

Prof. Dr. Fabiano José Queiroz Costa (LACEN-DF)
Membro

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (UnB)
Membro

Profa. Dra. Paula Melo Martins (UnB-Ceilândia)
Membro

Prof. Dr. Natan Monsores de Sá (UnB)
Suplente

BRASÍLIA

2018

DEDICATÓRIA

Ao meu avô João Dinis,
que tal como eu, um dia teve que ir para longe para
concretizar sonhos e seguir novas aventuras.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Yanna. Yanna é muito difícil por em palavras o quanto foste importante durante todo este percurso de 4 anos em um país completamente novo para mim, o Brasil. Aceitaste-me mal me conhecendo e embarcaste comigo nesta aventura. Ensinaste-me a ser melhor investigadora, melhor profissional, e a lidar com as coisas não tão boas da vida. Acreditaste em mim e no meu potencial permitindo que eu realizasse este meu sonho de juntar a ciência à medicina natural. E acima de tudo contruímos uma amizade linda e maravilhosa da qual me orgulho com cada pedacinho do meu ser. Obrigada por teres entrado na minha vida!

À minha co-orientadora Dâmaris Silveira que me deu dicas essenciais durante este percurso me incentivando e ajudando sempre em todos os momentos. Obrigada por todos os ensinamentos e partilhas.

À CAPES, pelo suporte técnico e financeiro, o qual proporcionou a realização de parte do meu projeto de Doutorado em Évora, Portugal.

Aos professores Riccardo Pratesi e Lenora Gandolfi por me receberem de braços abertos e cuidaram de mim como uma neta, me fizeram sentir muito bem-vinda no Brasil. Muito obrigada pelos ensinamentos, pelas partilhas e pelo carinho.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Crônicas degenerativas e Imunogenéticas pertencente Laboratório Interdisciplinar de Biociências por toda a amizade, ajuda e apoio, especialmente quando cheguei ao Brasil. Obrigada por evitarem que eu fizesse figuras tristes na rua, dizendo coisas erradas e sem sentido como “rapariga”, “assento confortável para o rabo” e outras que tais, e em especial à Isabella por toda ajuda, apoio e partilha ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais por todo o companheirismo, amizade e ajuda e também às técnicas Patrícia e Júlia por toda a disponibilidade e ajuda, em especial à Patrícia por ter disponibilizado os extratos de *Pouteria ramiflora*, essenciais para a realização deste trabalho.

À professora Patrícia Albuquerque e ao professor André, pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia e ao Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina, respectivamente, por toda a ajuda e ensinamentos. Obrigada por aceitarem participar neste meu projeto de vida e me mostrarem o mundo das “larvinhas”.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pela disponibilidade e apoio na recolha das imagens por microscopia eletrônica de varredura.

À Amabel pela amizade e por alinhar nas minhas ideias loucas tentando convencer a Yanna que “vai funcionar”. Amabel muito obrigada por tudo! Aprendi muito contigo sobre estes nossos amiguinhos fungos que nós tanto amamos!

À Ana Paula, a minha querida estagiária, por me ensinar a ser professora. Foi com ela que tive as primeiras experiências de ensino, foram praticamente 3 anos de partilhas, aventuras e descobertas. Obrigada por me questionar e me fazer pensar, pela dedicação, pelo interesse, por toda a ajuda para o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo pela amizade. Não poderia ter uma estagiária melhor!

À Cristina que desde o primeiro momento esteve presente demonstrando uma sensibilidade e carinho muito profundos. Tina estiveste comigo em todos os instantes, sempre com uma palavra de conforto e força, especialmente quando tinha a hora do “Piti”. Muito obrigada por estares sempre lá, por significares o que significas para mim. Amiga, irmã tornaste este tempo no Brasil mais maravilhoso, mais humano, mais profundo.

Ao Luiz que me ensinou o lado divertido da vida, mas sempre com muito profissionalismo e dedicação, fazendo-me sentir como a irmã caçula, ensinando-me sempre com muito carinho e paciência.

À Nathália que esteve presente nos momentos bons e maus, que me deu força quando eu pensava não ter, que me mostrou o lado lindo, divertido, imaginativo e relaxado de ser brasileiro e como isso é tão bom em tantos momentos da nossa vida.

À Rosa que me adotou como filha, a sua “filha portuguesa” como ela diz, estando sempre presente como amiga ouvinte, parceira, e acima de tudo mãe nestes quatro anos de luta e aprendizagens.

À minha “irmã gêmea” Maína que me ajudou muito, que me escutou nos meus momentos de incerteza, frustração e angústia, mas também que esteve comigo nos momentos de alegria e felicidade. Obrigada por tudo irmã!

Ao Cristian, o meu pesquisador favorito! Cristian aprendi muito contigo em todos os aspectos da vida. A forma com encaras tudo e como te dedicas é uma inspiração para mim. Agradeço muito todos estes anos de amizade e partilha! Saías de casa a que horas fosse para vir ter comigo e me alegrares quando eu me sentia triste e perdida! Muito obrigada por esta maravilhosa amizade! Tens sido essencial para mim!

Ao Samuel pela amizade, pelo carinho, por me apoiar em todos os momentos e estar presente sempre que eu precisava, me ensinando um pouco mais sobre o Peru e as maravilhosas comidas de lá.

À Gigi e à Thaís por todas as conversas, brincadeiras, partilhas, apoio e por cuidarem das minhas roupas de forma maravilhosa. Obrigada pelos fins de tarde em que me sentia meio sozinha e descia à lavanderia para um pedacinho de conversa e logo caia na gargalhada com a vossa boa disposição!

À Dona Zilá, ao senhor Rogério e ao senhor Gilvan pela companhia, ajuda, conversas, preocupação e amizade nas muitas manhãs e tardes de fim-de-semana e feriados passadas a trabalhar no laboratório. Não sabem a força que me deram!

À Dona Eliete e Dona Zenilda pela amizade, companheirismo e apoio que ofereceram.

Às funcionárias da Pós-graduação em Ciências farmacêuticas, que sempre com imensa simpatia me ajudaram em todas as questões e preocupações que tinha sobre assuntos académicos relacionados ao Doutorado.

Aos meus colegas e amigos do apartamento da Colina, agradeço a amizade, partilhas e palavras de força, em especial ao Carlos por ter sido um pai para mim, preocupando-se se eu estava a comer bem, a descansar... Muito obrigada por tudo!

À professora Teresa Caldeira que me aceitou receber em Portugal no laboratório HERCULES da Universidade de Évora, e realizar o meu projeto sanduíche, lugar que há anos desejava trabalhar e assim diversificar o meu tema de Doutoramento. Professora mesmo não trabalhando comigo há muitos anos aceitou-me sem pensar duas vezes! Muito obrigada pela confiança!

Aos meus colegas, alguns amigos de longa data, do Laboratório HERCULES e do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Química, Universidade de Évora, que me receberam de braços abertos fazendo-me sentir de novo em casa, em especial à Mara e à Tânia que foram o meu porto de abrigo, estando presentes em todos os instantes, ensinando-me sobre o mundo dos “fungos biodeteriorogênicos”. Meninas, obrigada por toda a amizade, carinho e partilhas, vocês foram essenciais nesta etapa!

À Dona Lena, Dona Esperança, Anabela e Deolinda, técnicas de laboratório da Fase III do Colégio Luís António Verney da Universidade de Évora, que me viram crescer enquanto aluna durante a licenciatura e passado 7 anos receberam-me novamente com muito carinho e amizade! A elas agradeço toda a disponibilidade, ajuda, partilhas, conversas. Tornaram a minha estadia maravilhosa!

À minha “Big Family” e às XAMIZI que mesmo longe estiveram sempre presentes, apoiando-me, dando-me força quando eu mais precisava. Meus amigos vocês foram fantásticos! Sempre acreditaram em mim e que eu iria conseguir. Sempre que as saudades apertavam vocês estavam lá para falar comigo, me fazer sorrir... Muito obrigada!

À minha Dreia que eu tanto adoro, que esteve firme e forte sempre! E mesmo do outro lado do oceano estava sempre aqui, dando força, carinho, tornando os meus dias mais alegres.

Aos meus avós, tios e primos que me apoiaram em todos os instantes, acreditando em mim.

Aos meus irmãos, as minhas preciosidades, que me ajudaram a enfrentar a distância, me apoiaram em todos os instantes, ensinando-me a ser forte e me mostraram mais uma vez a importância da família! Tenho muito orgulho em vocês!

À minha Mamã e ao meu Papá que são os meus exemplos de vida! Vocês são tudo para mim, sem vocês não teria conseguido chegar onde cheguei. Ensinaaram-me que se deve lutar pelo que acreditamos e sempre tentarmos nos tornar melhores seres humanos tratando as pessoas com respeito e bondade. Obrigada por acreditarem na vossa filhota!

Ao Kris que tem partilhado comigo todos os momentos da minha vida destes últimos 4 anos. Meu melhor amigo, meu parceiro, meu companheiro, meu amor, esteve sempre, sempre presente escutando-me, apoiando-me nos meus momentos de angústia e tristeza e celebrando as minhas vitórias. Kris, tu és um homem maravilhoso com o qual me sinto honrada de poder partilhar esta vida. Jag älskar dig så mycket!

RESUMO

LOPES DA SILVA, Zita Dinis. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *POUTERIA RAMIFLORA* SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS. Brasília, 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Os fungos são micro-organismos de grande importância em diversas áreas possuindo um papel vital na manutenção do equilíbrio do ambiente. No entanto apresentam-se em certas circunstâncias como agentes patogênicos humanos e agentes biodeteriogênicos de bens patrimoniais. Entre as várias infecções humanas provocadas por fungos, a Candidíase sistêmica apresenta grande importância especialmente no ambiente hospitalar, onde o número de casos de resistência aos antifúngicos comumente utilizados para tratamento tem aumentado gerando a necessidade da procura de novos produtos com atividade antifúngica. Os fungos também são os principais agentes biodeteriogênicos de bens patrimoniais provocando alterações estéticas e estruturais, levando em última instância à formação de fissuras e destacamento das camadas superficiais destes bens. Existe assim a necessidade do tratamento e preservação destes artefatos do Patrimônio cultural. Dentre os métodos usados para eliminação dos fungos biodeteriogênicos, os biocidas químicos são os mais utilizados, mas apresentam alta toxicidade para os seres humanos e ambiente, sendo necessária a procura de alternativas *eco-friendly*. Este trabalho tem como objetivo estudar atividade antifúngica dos extratos aquoso e etanólico de *Pouteria ramiflora* contra *Candida* spp. e espécies de fungos biodeteriogênicos isolados de bens patrimoniais, de forma a apresentar alternativas tanto para o tratamento da Candidíase sistêmica e também para o desenvolvimento de novos biocidas. Para determinar a atividade antifúngica dos extratos de *Pouteria ramiflora* frente aos fungos leveduriformes foi utilizada a técnica de microdiluição e para os fungos filamentosos foram realizados testes de interação. Foi também estudada a ação *in vitro* dos extratos frente a *Candida* spp. através da técnica de microscopia eletrônica de varredura e estudada a atividade *in vivo* tanto de *Candida* spp. quanto dos extratos de *Pouteria ramiflora* usando o modelo *Galleria mellonella*. Para os fungos biodeteriogênicos foram realizados ainda ensaios de simulação em provetes de armassa sintética para estudar a ação dos extratos frente a fungos biodeteriogênicos utilizando o ensaio de MTT e técnica de Microscopia eletrônica de varredura, e testada a toxicidade dos extratos pelo modelo *in vivo Artemia salina*. Os extratos apresentaram atividade antifúngica frente a todos os fungos testados mostrando, no entanto, diferentes níveis de atividade, e parecem influenciar no desenvolvimento de *Candida* spp. No modelo *in vivo Galleria mellonella*, *Candida* spp. apresentaram diferentes níveis de virulência, enquanto que os extratos não mostraram toxicidade. Por fim foi comprovada a ação dos dois extratos frente a *Rodothorula* sp. quando crescida em provetes de argamassa sintética e ainda mostrou-se que os dois extratos são muito menos tóxicos que os biocidas comumente utilizados para o tratamento de bens patrimoniais. Com os nossos resultados concluímos que os extratos aquoso e etanólico de *Pouteria ramiflora* têm pontencial atividade como futuros agentes antifúngicos para aplicação na medicina e como biocidas *eco-friendly* para aplicação no Patrimônio Cultural.

Palavras-chaves: *Candida* spp., candidíase sistêmica, fungos biodeteriogênicos, plantas medicinais, atividade antifúngica, biocidas *eco-friendly*

ABSTRACT

LOPES DA SILVA, Zita Dinis. EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LEAVES CRUDE EXTRACTS FROM *POUTERIA RAMIFLORA* AGAINST YEASTS AND FILAMENTOUS FUNGI. Brasília, 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Fungi are microorganisms of great importance in several areas and play a vital role in maintaining the balance of the environment. However, in certain circumstances they appear like human pathogens and biodeteriogenic agents of artwork. Among various human infections caused by fungi, systemic Candidiasis is especially important in the hospital environment. The number of resistance cases to antifungal commonly used in the treatment of systemic Candidiasis has increased, generating the need for the search of new products with antifungal activity. Fungi are also the main biodeteriogenic agents of Cultural Heritage artworks causing aesthetic and structural changes, leading ultimately to the formation of cracks and detachment of the superficial layers. Thus there is the need to treat and preserve these artefacts. Among the methods used to eliminate biodeteriogenic fungi, chemical biocides are the most used. Nevertheless these biocides are highly toxic to humans and environment, requiring the search of eco-friendly alternatives. The aim of this work was to study the antifungal activity of *Pouteria ramiflora* aqueous and ethanolic extracts against *Candida* spp. and biodeteriogenic fungi species isolated from artworks; in order to present alternatives either for the treatment of systemic Candidiasis and also for the development of new biocides. For the purpose of determination of the antifungal activity of *Pouteria ramiflora* extracts against yeast, microdilution assay was used, and for the filamentous fungi, interaction assays were performed. The *in vitro* activity of the extracts against *Candida* spp. was evaluated through scanning electron microscopy and *in vivo* activity of *Candida* spp., and *Pouteria ramiflora* extracts *in vivo* activity was studied using the *Galleria mellonella* model. Simulation tests were carried out on synthetic mortars slabs in order to study the action of the extracts against biodeteriogenic fungi using the Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium assay and the scanning electron microscopy method. The toxicity of the extracts was evaluated using the *Artemia salina* model. The extracts presented antifungal activity against all tested fungi, however, they were observed to have different levels of activity, and they appear to influence the development of *Candida* spp. The *Candida* spp. showed different levels of virulence in the *in vivo* *Galleria mellonella* model whereas the extracts showed no toxicity. Finally the action of the two extracts against *Rodothorula* sp. when grown on synthetic mortar slabs was proven and it was also showed up that the two extracts are much less toxic than the biocides commonly used for the treatment of artworks. Our results allow us to conclude that the aqueous and ethanolic extracts of *Pouteria ramiflora* have a potential activity as future antifungal agents for application in medicine and also as eco-friendly biocides for application in Cultural Heritage.

Keywords: *Candida* spp., systemic candidiasis, biodeteriogenic fungi, medicinal plants, antifungal activity, eco-friendly biocides