

Alan Dias Batista

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO DO
MECANISMO
DE AÇÃO DA TRIPTANTRINA EM FUNGOS E
BACTÉRIAS



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2021

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Celuta Sales Alviano e coorientação de Daniela Sales Alviano.

CIP - Catalogação na Publicação

B333a Batista, Alan Dias
Atividade antimicrobiana e estudo do mecanismo
de ação da triptantrina em fungos e bactérias. /
Alan Dias Batista. -- Rio de Janeiro, 2022.
61 f.

Orientadora: Celuta Sales Alviano.
Coorientadora: Daniela Sales Alviano.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Agente Antimicrobiano. 2. Produto Natural. 3.
Cryptococcus neoformans. I. Alviano, Celuta Sales,
orient. II. Alviano, Daniela Sales, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: Alan Dias Batista

DRE: 118105255

BANCA EXAMINADORA: Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira (Presidente)
Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro
Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza
Profa. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: “**Atividade antimicrobiana e estudo do mecanismo de ação da triptantrina em fungos e bactérias**”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/ueq-wpae-eib>

Data e hora de início: 09 de março de 2022 às 14:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 09 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira
<u>10</u>	Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro
<u>10</u>	Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10</u>	Profa. Raquel Regina Bonelli

Presidente da banca:



Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira

Aluno:



Alan Dias Batista

Orientador:



Profa. Celuta Sales Alviano / Coorientador: Prof. Daniela Sales Alviano

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço toda minha família pelo carinho, dedicação e apoio durante esses anos, me servindo de base e referência para saber o que gostaria de me tornar no futuro, em especial meus pais, Rosa Maria e Sergio Tinelli, que me incentivaram desde meus primeiros anos de vida a ser uma pessoa curiosa e buscar através do estudo conhecer o mundo que me cerca. Agradeço meus avós, em especial os maternos, por terem sido parte fundamental da minha criação, me dando de presente memórias de afeto que carregarei por toda vida. Agradeço à minha tia Angélica pelo amor e carinho desde o momento que nasci, e minha irmã Esperança por ser minha companheira de risadas e por saber que tenho alguém com quem contar, não importa a situação.

Agradeço aos meus amigos, Yago, Iuri, Maria, João Paulo, Anderson, João Carlos, Marcela, Jorge, Danilo, Matheus, Bruno, Vicktor, Ronaldo, Abel, Andrezza, João Pedro, Luis e Vinícius por serem parte importante da minha vida, sendo sinônimo de risada, alegria, paz e ótimos momentos.

Agradeço aos meus amigos e colegas de curso, Lucas Carvalho, Julia, Luan, Lucas Vilar e Laís, por terem feito meus dias durante a graduação mais felizes e muito mais fáceis de atravessar.

Agradeço às professoras Daniela e Celuta e à técnica Fátima pela orientação acadêmica e prática ao longo desses anos de graduação e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e crescimento profissional, definindo o tipo de profissional que busco me tornar.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Sandra, Fabiane, Leandro, Ricardo e Gabriel, pelos ensinamentos, amizade e troca de conhecimento.

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes por viabilizar a realização desse trabalho.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa de iniciação científica.

RESUMO

ALAN DIAS BATISTA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA TRIPTANTRINA EM FUNGOS E BACTÉRIAS

Orientadora: Celuta Sales Alviano

Coorientadora: Daniela Sales Alviano

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A era de ouro dos antimicrobianos ocorreu entre as décadas de 1930 e 1960, período em que houve um “boom” de descobertas de substâncias com potencial antimicrobiano a partir da triagem de produtos naturais e modificações estruturais dos mesmos. Com o uso crescente desses novos fármacos, começam a surgir os casos de microrganismos resistentes aos mesmos, associados ao uso extensivo de antibióticos nesse período. Historicamente, o estudo de produtos naturais se mostra uma grande fonte de pesquisa de novas substâncias bioativas, com diversas aplicações médico-farmacológicas e, entre elas, de novos antimicrobianos. A triptantrina é um alcaloide indólico da família das quinazolininas, que pode ser isolado de diversos organismos, como vegetais superiores, *Yarrowia lipolytica* e algumas espécies de micro e macrorganismos marinhos. Algumas de suas propriedades já apontadas na literatura são: atividade anti-inflamatória, antitumoral, antiprotozoária e antimicrobiana. Mesmo com a atividade antimicrobiana da substância sendo conhecida, seu mecanismo de ação não foi elucidado, o que representa um obstáculo para entender o potencial total da triptantrina. O objetivo do projeto

de pesquisa foi estudar a atividade antimicrobiana da triptantrina contra fungos e bactérias, além de investigar um possível mecanismo de ação para a substância. Para alcançá-los, foram realizados testes de diluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória da triptantrina contra *Cryptococcus neoformans* (6,25–3,125 µg/mL), *Cryptococcus gattii* (1,56 µg/mL), *Candida albicans* (125 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (6,25 µg/mL), *Escherichia coli* (não foi observada inibição), *Pseudomonas aeruginosa* (não foi observada inibição), *Klebsiella pneumoniae* (não foi observada inibição) e *Fonsecaea pedrosoi* (6,25 µg/mL), com a triptantrina demonstrando efeito inibitório bacteriostático e fungistático. Os testes seguintes usaram como modelo cepas do gênero *Cryptococcus*, que se mostraram altamente sensíveis *in vitro*. Também foi avaliada a interação sinérgica entre a triptantrina e alguns dos principais fármacos antifúngicos utilizados na clínica, anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina, onde não foi observada interação sinérgica. Foram testadas metodologias que investigam possíveis alvos da triptantrina, como o teste de osmoproteção do sorbitol, investigando alterações na parede celular da célula, marcação com iodeto de propídio, buscando alterações na estrutura de membrana, alterações nos níveis de síntese de ergosterol em fungos e a capacidade da triptantrina de se ligar diretamente ao ergosterol. Nenhuma das metodologias testadas resultou em indicativo positivo da atuação da triptantrina influenciando nas estruturas testadas, apontando o direcionamento de trabalhos futuros para a investigação de mecanismos de ação intracelular. As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxidez (ADMET) da triptantrina também foram avaliadas com auxílio de análise *in silico*, onde através de um software foi possível realizar modelos de predições para apontar algumas propriedades farmacocinéticas da triptantrina, em comparação com anfotericina B e vancomicina. Segundo a análise *in silico*, a triptantrina demonstrou bom perfil ADMET.

Palavras-chave: Antimicrobianos, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Triptantrina.

ABSTRACT**ALAN DIAS BATISTA****ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION
OF TRYPTANTHRIN AGAINST FUNGI AND BACTERIA****Orientadora: Celuta Sales Alviano
Coorientadora: Daniela Sales Alviano**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The golden age of antibiotics occurred between the 30's and 60's, a period in history where there was a boom of discoveries of new substances with antimicrobial activity by the screening of natural products and structural alterations of their molecules. With extensive use of those new medicines, many cases of antimicrobial resistance began to appear, associated with the extensive use of antibiotics during this period. Tryptanthrin is an indole alkaloid from the quinazoline family that can be isolated from a different variety of organisms, like superior plants, *Yarrowia lipolytica* and some species of sea micro and macroorganisms. Some of its properties already described in scientific literature are: anti-inflammatory, antitumor, antiprotozoal activity and antimicrobial activities. Even though its antimicrobial activity is known, the action mechanism of tryptanthrin has never been discovered, presenting itself as an obstacle towards the full understanding of this substance. The objective of the present work is to study the antimicrobial activity exhibited by tryptanthrin against fungi and bacteria, also investigating clues towards a mechanism of action for the substance. To achieve these goals, microdilution assays were performed to determine the minimal inhibitory concentration of tryptanthrin towards *Cryptococcus neoformans* (6,25 – 3,125 µg/mL), *Cryptococcus gattii* (1,56 µg/mL), *Candida albicans* (125 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (6,25 µg/mL), *Escherichia coli* (no activity observed), *Pseudomonas aeruginosa* (no activity observed), *Klebsiella pseudomonas* (no activity observed) e *Fonsecaea pedrosoi* (6,25 µg/mL), with tryptanthrin showing inhibitory effect as a bacteriostatic and fungistatic agent. The following

methodologies focused on the *Cryptococcus* genus, which showed high sensibility to tryptanthrin. The synergic interaction between tryptanthrin and some of the main antifungal drugs used in clinic, amphotericin B, fluconazole and 5-fluorocytosin, was evaluated, where none of the tested interactions resulted in a synergic outcome. Many methodologies were tested with the objective of searching for possible cell structures being altered by tryptanthrin action, such as the sorbitol assay being executed to investigate alterations in the cell wall, propidium iodide staining to investigate alterations in the cell membrane structure, alterations in the ergosterol synthesis in fungi and the ability of tryptanthrin to directly bind to ergosterol. None of the tested methodologies resulted in a positive result towards structures that could have been altered by tryptanthrin, indicating that future works should focus on the search of intracellular interactions of the substance. The ADMET properties of tryptanthrin were also investigated with the help of *in silico* analysis, where a software was used to create prediction models to point some of the pharmacokinetics properties of tryptanthrin, comparing them with those obtained for amphotericin B and vancomycin. *In silico* analysis showed that tryptanthrin exhibited good ADMET profile.

Keywords: Antimicrobials, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and Tryptanthrin.

RESUMO PARA LEIGOS

ALAN DIAS BATISTA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA TRIPTANTRINA EM FUNGOS E BACTÉRIAS

**Orientadora: Celuta Sales Alviano
Coorientadora: Daniela Sales Alviano**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A era de ouro dos antimicrobianos ocorreu entre as décadas de 1930 e 1960, período onde houve um grande aumento no número de descobertas de substâncias com capacidade de combater infecções causadas por microrganismos, a partir da pesquisa de produtos naturais. Com o uso crescente desses novos fármacos, aumentaram os casos de microrganismos resistentes aos mesmos, associados ao uso indiscriminado de antibióticos nesse período. O número de notificações mundiais de detecção de doenças causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos continua aumentando ao longo dos anos, com o surgimento de casos de infecções em unidades de tratamento intensivo e na comunidade se tornando de difícil tratamento, em alguns casos até mesmo intratáveis. Historicamente, o estudo de produtos naturais se mostra uma grande fonte de pesquisa de novas substâncias com atividade biológica, com diversas aplicações na medicina, entre elas, a criação de novos antimicrobianos. A triptantrina é um desses produtos naturais, que pode ser isolada de diversos organismos, como plantas, fungos e algumas espécies de organismos marinhos. Algumas das propriedades já conhecidas da triptantrina são atividade anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana. Mesmo com a atividade antimicrobiana da substância sendo conhecida, a forma como a triptantrina atua para gerar o efeito observado de inibição do crescimento de microrganismos é desconhecida, o que representa um obstáculo para compreender como a triptantrina age. Para investigar o mecanismo de ação da triptantrina, foram feitas análises com o foco de observar alterações nas estruturas de parede e membrana celular após o tratamento com a substância a partir de um modelo fúngico. As análises com foco em observar o efeito inibitório da triptantrina em testes

com culturas celulares de bactérias e fungos demonstraram os efeitos antimicrobianos da substância. As metodologias investigando associação sinérgica da triptantrina e alterações em parede e membrana celular não indicaram resultados positivos, apontando que provavelmente a triptantrina possui mecanismo de ação intracelular. As propriedades da triptantrina de ser usada como fármaco foram analisadas através de análise por *software*, em comparação com drogas já utilizadas na clínica, onde a mesma apresentou bom perfil farmacocinético.

Palavras-chave: Antimicrobianos, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Triptantrina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADMET: Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxidez.
- BHE: Barreira hematoencefálica.
- BHI: *Brain heart infusion*.
- CMB: Concentração mínima bactericida.
- CMF: Concentração mínima fungicida.
- CMI: Concentração mínima inibitória.
- CMIs: Concentrações mínimas inibitórias.
- DHE: Dehydroergosterol.
- D.O.: Densidade óptica.
- Gp-P: Glicoproteína-P.
- ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada.
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.
- OATP1B1: Polipeptídio transportador de ânions orgânicos 1B1.
- PBS: Tampão fosfato-salino.
- PI: Iodeto de propídio (*propidium iodide*).
- UFC: Unidades formadoras de colônias.
- 5-FC: 5-fluorocitosina.

ÍNDICE

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
RESUMO PARA LEIGOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XII
ÍNDICE.....	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A problemática da resistência a antimicrobianos e como combatê-la.....	1
1.2 A Triptantrina e histórico do projeto	6
1.3 Atividade antimicrobiana da Triptantrina em dermatófitos	8
1.4 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra micobactérias	9
1.5 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra <i>E. coli</i> e investigação do mecanismo de ação	11
1.6 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra <i>Cryptococcus</i> e investigação do mecanismo de ação	12
1.7 Citotoxicidade da Triptantrina	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 Preparo e manutenção da triptantrina.....	18
4.2 Cepas de microrganismos testados e meios de cultura	18
4.3 Determinação da concentração mínima inibitória	19
4.4 Determinação da concentração mínima bactericida/fungicida	21
4.5 Avaliação de associação sinérgica	22
4.6 Ensaio de osmoproteção do sorbitol	23
4.7 Ensaio de avaliação da permeabilidade de membrana celular	23
4.8 Avaliação de alteração na síntese de ergosterol	24
4.9 Avaliação da capacidade de ligação da Triptantrina ao ergosterol.....	25
4.10 Análise de citotoxicidade <i>in silico</i>	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Determinação da concentração mínima inibitória	27
5.2 Determinação da concentração mínima bactericida/fungicida	28
5.3 Avaliação de associação sinérgica	29
5.4 Ensaio de osmoproteção do sorbitol	31
5.5 Ensaio de avaliação da permeabilidade de membrana celular	32

5.6 Avaliação de alteração na síntese de ergosterol.....	33
5.7 Avaliação da capacidade de ligação da Triptantrina ao ergosterol.....	34
5.8 Análise de citotoxicidade in silico.....	35
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 A problemática da resistência a antimicrobianos e como combatê-la

A era de ouro dos antibióticos ocorreu entre as décadas de 1930 e 1960, período onde houve um *boom* de descobertas de substâncias com potencial antimicrobiano a partir da triagem de produtos naturais e modificações estruturais dos mesmos (Nathan e Cars, 2014). Essa busca foi motivada pela descoberta da penicilina em 1928, acompanhada de seu enorme sucesso e a rápida difusão de seu uso na sociedade, sendo vista na época como uma panaceia capaz de tratar diversos casos de infecção bacteriana e com o potencial de salvar milhões de vidas. Novas substâncias foram descobertas e estudadas para passar a compor o arsenal de antimicrobianos disponíveis na clínica, entre elas várias drogas bastante utilizadas até hoje, como a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e vancomicina (Mahajan e Balachandran, 2012).

Com o uso crescente dessas novas drogas, tanto como opção número um de enfrentamento às infecções em humanos, quanto em animais de produção como forma de promover crescimento (Herago e Agonafir, 2017), começam a surgir os casos de microrganismos resistentes às mesmas, associados ao uso intensivo de antibióticos nesse período (Davies, 2006). A pesquisa por novos antimicrobianos se intensificou, buscando desenvolver drogas que se mostrassem efetivas contra microrganismos resistentes, tornando-se uma alternativa para o tratamento dessas infecções.

O número de novas classes de antimicrobianos descobertos foi diminuindo ao longo dos anos com o progresso das pesquisas (Davies, 2006), diminuição essa causada pela dificuldade em encontrar novos compostos que sejam bioativos, estáveis e apresentem baixa citotoxicidade a mamíferos. A influência da indústria farmacêutica também atua nessa diminuição, com exigências mais severas para a realização de ensaios clínicos com novas drogas e a diminuição do interesse em investimento. Entre os fatores responsáveis, estão a baixa rentabilidade desse tipo de droga, que geralmente possui baixo custo, curto período de uso, comparado a drogas utilizadas no tratamento de doenças crônicas (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013), e o fato de novos antimicrobianos serem usados como último recurso na clínica, apenas quando os tradicionalmente utilizados se mostram ineficazes (Ventola, 2015). Esse conjunto de fatores teve um efeito de desaceleração da descoberta de novos antimicrobianos, ao passo que a ameaça de infecções causadas por microrganismos multirresistentes cresce.

Um microrganismo é considerado resistente quando adquire mecanismos para reduzir a ação inibitória que determinado antimicrobiano possui sobre ele. Esses mecanismos de resistência podem atuar de diversas formas, com a produção de enzimas que degradam drogas, alteração dos sítios alvo do antimicrobiano, mudança na permeabilidade da membrana citoplasmática da célula e bombeamento ativo de antimicrobianos (**Figura 1**) (Dever e Dermody, 1991). Microrganismos resistentes são selecionados através da pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos, selecionando aquelas células que sofreram algum tipo de mutação, tornando-as resistentes à ação antimicrobiana de uma droga. O mecanismo é então passado para outras células, através de transferência vertical ou horizontal de genes (Marston *et al.*, 2016; Lerminiaux e Cameron, 2018), criando aos poucos uma população de microrganismos resistentes em que os antimicrobianos anteriormente utilizados com sucesso para o controle de uma infecção agora se mostram ineficazes.

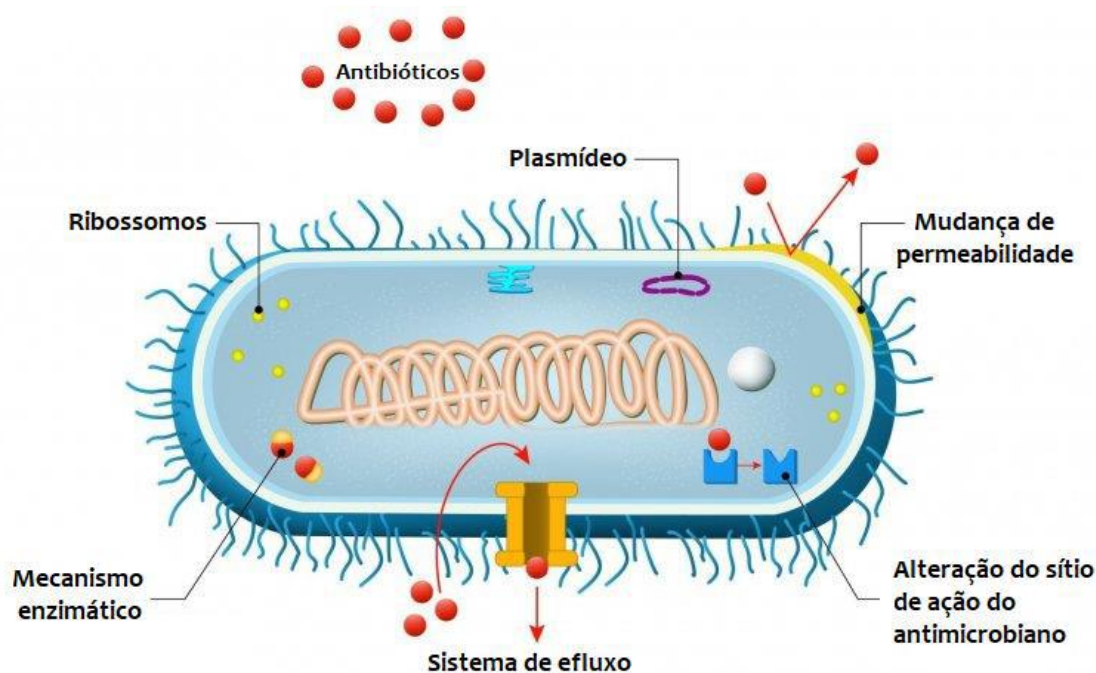


Figura 1 – Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos em modelo de célula bacteriana. Imagem retirada de <https://www.zoetis.com.br/paineldaavicultura/posts/66-como-a-escherichia-coli-e-demais-bactérias-resistem-aos-antibióticos.aspx>.

É importante destacar que o processo de desenvolvimento de resistência ocorre naturalmente através da seleção natural (Holmes *et al.*, 2016), mas está ocorrendo de forma acelerada dada a intensa pressão seletiva causada pelo uso intensivo de antibióticos, tanto no tratamento de doenças humanas quanto na agropecuária (Aslam *et al.*, 2018). A relação direta entre o alto consumo de antibióticos e o surgimento de cepas resistentes é amplamente conhecida (Monroe e Polk, 2000; Odonkor e Addo, 2011; Bennani *et al.*, 2020). Vários fatores relacionados ao mau uso desse tipo de fármaco como forma terapêutica acabam atuando para a emergência de novas cepas de microrganismos adquirindo resistência, como o uso de antimicrobianos sem necessidade ou sem respeitar a duração prevista na prescrição, eliminando os microrganismos sensíveis, mas sem atuar tempo suficiente ou em concentrações inadequadas para eliminar todos que apresentem algum grau de resistência, favorecendo a proliferação dessas células através da redução de competição por nutrientes. Além disso, um tratamento realizado com doses sub-inibitórias de um antimicrobiano pode levar a mudanças na expressão genética, transferência horizontal de genes e mutagênese, que em conjunto podem atuar favorecendo o surgimento de um mecanismo de resistência contra o antimicrobiano causando a situação de estresse imposta e a sua subsequente propagação (Ventola, 2015). Outro problema encontrado na clínica é a prescrição incorreta de antimicrobianos, onde estudos apontam que entre 30 – 50% dos tratamentos utilizando-os sejam feitos de forma indevida, seja pelo seu uso desnecessário, escolha incorreta da droga ou duração do tratamento (Milani *et al.*, 2019).

O uso de antimicrobianos na criação de animais para o controle e prevenção de infecções e como promotor de crescimento também é responsável pela indução do surgimento de cepas resistentes. As drogas são normalmente adicionadas ao alimento e à água consumida pelos animais, o que permite que eles ganhem peso mais facilmente e se desenvolvam com menor necessidade de alimento, através da redução da população de microrganismos do trato gastrointestinal do animal, reduzindo também a competição pelos nutrientes ingeridos e consequentemente maximizando sua absorção pelo animal (Herago e Agonafir, 2017). No entanto, o uso abusivo de antimicrobianos acaba gerando intensa pressão seletiva para os microrganismos que apresentam resistência, com estudos apontando níveis frequentes de detecção de microrganismos resistentes na microbiota do trato gastrointestinal desses animais, assim como dos seres humanos responsáveis pelos cuidados dos mesmos (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013). Existem também evidências que apontam que o consumo da carne desses animais pode conter traços dos antimicrobianos ou até mesmo bactérias patogênicas resistentes, sendo, portanto, um risco direto ao consumidor desses produtos (Larsen *et al.*, 2010). O consumo de antimicrobianos por animais de criação também é uma fonte de contaminação

ambiental, onde estudos apontam que traços e metabólitos das drogas consumidas podem ser encontrados nas excretas dos animais, em diferentes taxas dependendo do antimicrobiano utilizado, interferindo na ecologia do ambiente próximo aos criadouros (Aust *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Essa exposição dos microrganismos ambientais aos antimicrobianos favorece o surgimento de mecanismos de resistência, alterando a proporção entre microrganismos resistentes e sensíveis no meio ambiente e permitindo que os genes responsáveis por esses mecanismos se disseminem (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013).

Cada um desses fatores e problemáticas apontados no presente trabalho contribuem individualmente para o surgimento de novas cepas de microrganismos resistentes e permitem que os genes responsáveis por esses mecanismos circulem e se disseminem, favorecendo um perfil de elevada resistência na população global de microrganismos. Seus efeitos em conjunto podem representar uma ameaça à saúde pública global caso nenhuma medida seja tomada para combater as infecções por microrganismos resistentes, com aumento do número de casos, mortes, tempo de permanência em ambientes de cuidados à saúde e custo de tratamento como consequência (Roca *et al.*, 2015). O já consolidado, e ainda em expansão, fenômeno da globalização permite que centenas de milhões de pessoas circulem por diferentes países e continentes, interagindo entre si e criando a possibilidade da rápida disseminação de patógenos multirresistentes, que possam se espalhar mundialmente de forma rápida, os transformando em uma ameaça global à saúde humana em um curto período.

O número de notificações mundiais de detecção de doenças causadas por microrganismos resistentes continua aumentando ao longo dos anos, com o surgimento de casos de infecções comuns na comunidade e unidades de tratamento intensivo se tornando de difícil tratamento e em alguns casos até mesmo intratáveis (Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015). Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem sinalizando durante a última década a importância de se criar conscientização global sobre o problema, incluindo o combate à resistência antimicrobiana como um dos 10 maiores desafios para a saúde humana, incentivando a formação de frentes mundiais para garantir seu enfrentamento e a coleta de dados de forma precisa e eficiente, incentivando a notificação de casos para que o problema possa ser devidamente acompanhado ao longo do tempo.

Segundo a *Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance*, um grupo associado à OMS e às Nações Unidas com objetivo de desenvolver e guiar ações globais para o enfrentamento da resistência a antimicrobianos, o número de mortes mundiais causadas por microrganismos resistentes é de no mínimo 700.000 pessoas por ano, com a estimativa de que, caso nenhuma ação global de enfrentamento ao problema seja tomada, esse número possa

aumentar para um total de 10 milhões de mortes ao ano em 2050 (O'Neill, 2016; IACG, 2019). Além do enorme número de vítimas previsto, o relatório também comenta os graves danos que o problema pode causar na economia mundial caso não seja combatido, com prejuízos semelhantes a crises financeiras mundiais passadas através do aumento expressivo dos custos para tratamento intensivo em instalações de saúde, interferência nas taxas de produção de alimentos e no mercado em geral. O documento cita algumas formas de como a ameaça dos microrganismos resistentes pode ser combatida, entre elas a conscientização mundial e campanhas para reduzir o uso abusivo de antimicrobianos em humanos e animais, garantindo sua acessibilidade em países subdesenvolvidos através de grupos de doações associadas ao Banco Mundial e o investimento em pesquisas focadas na descoberta e desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana, que consigam superar os mecanismos de resistência já estabelecidos nesses microrganismos e serem efetivos no combate a essas infecções (O'Neill, 2016).

Uma fonte bastante comum e relevante na pesquisa por novas substâncias biologicamente ativas é a pesquisa de produtos naturais. Por definição, um produto natural é uma molécula produzida por uma fonte biológica, como bactérias, fungos e plantas, que possuem alguma aplicação (Nature Chemical Biology, 2007). Essas moléculas são amplamente estudadas no campo científico, por algumas delas possuírem forte atividade biológica com diversas aplicações no campo da medicina e farmacologia, servindo como base para a produção de novas drogas a partir de algumas de suas várias propriedades, como ação antimicrobiana, antiparasitária, antiprotozoária, antialérgica, analgésica e antitumoral, entre outras (Li e Vederas, 2009). Como parte dos produtos naturais, o estudo de plantas medicinais e seus metabólitos é uma das principais vertentes, onde é notório o uso tradicional em algumas culturas de extratos vegetais para o tratamento de algumas doenças. Esses organismos são conhecidos por sintetizarem uma variedade de compostos biológicos de interesse, como flavonoides, alcaloides, taninos e terpenoides (Khan *et al.*, 2013). É, portanto, de extremo interesse o estudo desses extratos, buscando comprovar e caracterizar as substâncias isoladas responsáveis pela atividade biológica neles observada. Através dessas pesquisas, é possível encontrar substâncias com potencial para servir de base na produção de novas drogas antimicrobianas e atuar no combate contra o desenvolvimento e disseminação de microrganismos resistentes, aumentando o arsenal de antimicrobianos disponíveis à medicina, com ação através de mecanismos e sítios alvo diferentes das drogas tradicionalmente utilizadas na clínica, sendo, portanto, eficazes contra microrganismos que apresentem resistência (Stefanakis *et al.*, 2013).

1.2 A Triptantrina e histórico do projeto

A triptantrina (indolo[2,1-b]quinazolina-6,12-diona) (**Figura 2**) é um alcaloide indólico da família das quinazolininas, que pode ser isolado de diversos organismos, como vegetais superiores, a espécie fúngica *Yarrowia lipolytica* e algumas espécies de micro e macrorganismos marinhos (Kirpotina *et al.*, 2020). Uma das espécies de vegetais da qual a triptantrina pode ser isolada é a *Couropita guianensis*, espécie tropical de origem na região amazônica, pertencente à família Lecythidaceae e popularmente conhecida como abricó-de-macaco, macacarecuia, amêndoa-dos-andes, entre outros. Essa substância tem atraído o interesse de diversas pesquisas por conta da abrangência de atividades biológicas que ela possui, além de ser uma substância de estrutura simples e de fácil síntese. Algumas de suas propriedades já apontadas na literatura são: atividade anti-inflamatória, antitumoral, antiprotozoária e antimicrobiana (Kaur *et al.*, 2017; Kirpotina *et al.*, 2020), com destaque para seu efeito inibitório contra o gênero *Mycobacterium* (Mitscher e Baker, 1998) e fungos dermatófitos, caracterizados pela produção de enzimas queratinolíticas e pela utilização dos produtos da degradação da queratina como fonte de nutrição, especialmente os do gênero *Trichophyton* (Macabata *et al.*, 2020).

O projeto com a triptantrina teve início antes da minha entrada no laboratório de pesquisa, com a investigação do efeito inibitório do extrato da flor de *Couropita guianensis* (**Figura 3**). Após uma triagem utilizando microrganismos de importância médica, foi observada atividade inibitória do extrato da flor contra bactérias e leveduras, o que comprovou a presença de alguma substância no extrato com atividade antimicrobiana. O projeto então seguiu buscando determinar a substância responsável pelo efeito inibitório observado, com auxílio das metodologias de cromatografia de camada delgada e bioautografia, identificando finalmente a partição responsável pela atividade antimicrobiana e analisando sua composição através da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, onde a substância responsável pelo efeito inibitório foi identificada como a triptantrina e foi relatado seu efeito inibitório contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Costa *et al.*, 2017).

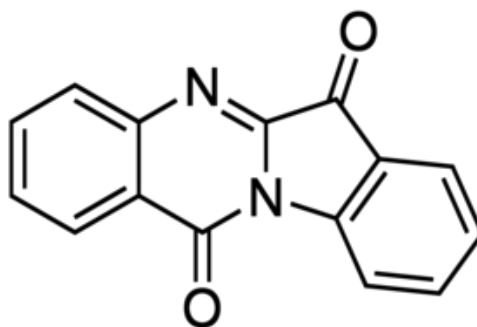


Figura 2 - Fórmula estrutural da Triptantrina. Imagem retirada de <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/sml0310>.



Figura 3 - Flor de *Couroupita guianensis*. Imagem retirada de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Abriçó-de-macaco>.

Mesmo com a maior parte das publicações abordando o efeito antimicrobiano da triptantrina relacionado a micobactérias e dermatófitos, uma pequena fração de publicações sugere grande potencial inibitório da substância contra outros microrganismos de extrema relevância microbiológica, nunca investigados ou relatados. Esses estudos podem indicar que o já considerado amplo espectro de atuação e atividade biológica da triptantrina pode ser ainda maior. Além disso, mesmo com a atividade antimicrobiana da triptantrina sendo conhecida, seu mecanismo de ação ainda não foi descrito, o que significa que não se sabe com certeza quais são os alvos com que a triptantrina interage para causar seu efeito inibitório.

1.3 Atividade antimicrobiana da Triptantrina em dermatófitos

O primeiro relato de atividade antimicrobiana da triptantrina foi em 1979, no trabalho “*The Antimicrobial Specificity of Tryptanthrin*” (Honda, Tabata e Tsuda, 1979), onde foi descrito o isolamento da substância através do extrato das folhas de *Strobilanthes cusia* e apontada a atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*, sendo todos fungos dermatófitos, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) variando entre 3,1 - 6,3 µg/mL. Um estudo mais recente, “*Tryptanthrin promotes keratinocyte and fibroblast responses in vitro after infection with Trichophyton benhamiae DSM6916*” (Macabata *et al.*, 2020), além de confirmar o efeito antimicrobiano contra um representante do gênero *Trichophyton*, determinou CMI de 4 µg/mL seguindo metodologias de avaliação mais atuais e precisas. O trabalho também investigou o efeito do tratamento com triptantrina em um modelo *in vitro* de infecção por *Trichophyton benhamiae* DSM6916 em queratinócitos e fibroblastos humanos, até 72h após a infecção, e avaliando a viabilidade celular das células de mamíferos e a citotoxicidade causada pela infecção fúngica nos dois modelos. Com o tratamento com a triptantrina, foi observado nos queratinócitos uma redução nos efeitos citotóxicos causados pela infecção nos períodos de 24h e 48h após o tratamento com a triptantrina, mas ao alcançar o estágio de 72h, os efeitos citotóxicos foram semelhantes aos observados no modelo de infecção sem o tratamento com a substância. Foi também observada intensa redução de citotoxicidade causada pela infecção fúngica, com aumento particularmente expressivo na viabilidade celular de fibroblastos, atingindo a uma média de 75% de viabilidade no período de 72h, efeito observado até mesmo na menor concentração de triptantrina usada no ensaio (0,5 µg/mL).

Foram também avaliados efeitos do tratamento com a triptantrina que extrapolam o campo da atividade antimicrobiana, com a observação da redução da expressão genética e secreção de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, mostrando que o tratamento com a substância levou à supressão do estado de inflamação aguda causada pela infecção fúngica *in vitro*. Mesmo com a redução dos níveis transcricionais e proteicos de citocinas e quimiocinas observada no estudo, não foi possível afirmar se a redução foi causada por um efeito direto da triptantrina interferindo em alguma via de sinalização celular e de síntese de moléculas pró-inflamatórias ou se o efeito de supressão foi observado pela própria atividade antimicrobiana da triptantrina contra o dermatófito, eliminando a maior parte da carga infecciosa e portanto reduzindo também a resposta de sinalização inflamatória. Apesar disso, o estudo sugere que a

triptantrina possui de fato um mecanismo de *down-regulation* de vias de citocinas, demonstrando a redução em nível transcricional de IL-6 tanto no modelo de infecção com *Trichophyton benhamiae* DSM6916 quanto em um modelo sem a presença de agente infeccioso. Foi também observado pelo estudo um efeito de redução da síntese do marcador de proliferação MK167 no modelo de infecção utilizando queratinócitos infectados por *Trichophyton benhamiae* e não-infectados, também sugerindo um efeito modulatório negativo para a expressão dessa molécula causado pela triptantrina (Macabata *et al.*, 2020).

O estudo “*Tryptanthrin Protects Mice against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis through Inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 Pathways*” (Wang *et al.*, 2018), também aponta a influência direta da triptantrina na redução dos níveis de expressão de IL-6, utilizando um modelo de colite induzida pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS) a 5% na água consumida por camundongos, modelo esse sem a presença de microrganismos causando o processo inflamatório. Apesar do direcionamento para a inibição de vias de citocinas e quimiocinas para seu efeito anti-inflamatório e a possível inibição do marcador de proliferação MK167, nenhum direcionamento para o mecanismo de ação do efeito inibitório direto da triptantrina é sugerido pelo trabalho.

1.4 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra micobactérias

O efeito inibitório da triptantrina contra micobactérias, em destaque conta *Mycobacterium tuberculosis*, é abordado no trabalho “*Tuberculosis: A Search for Novel Therapy Starting with Natural Products*” (Mitscher e Baker, 1998), um estudo que aposta na triagem de produtos naturais como forma de identificar novas substâncias com atividades tão eficientes quanto, ou até mesmo superiores, aos principais antimicrobianos tradicionalmente utilizados na clínica para tratar casos de tuberculose, principalmente ao enfrentar cepas resistentes ou multirresistentes. O trabalho inicia abordando algumas metodologias de triagem, através das quais os autores encontram a triptantrina como uma substância com inibição acentuada contra *Mycobacterium smegmatis*, com a CMI de 4 μ g/mL. Após a identificação do potencial inibitório da substância contra *M. smegmatis*, a CMI da mesma foi testada para *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*, onde foram obtidos os valores de concentração 1 μ g/mL e 2 μ g/mL, respectivamente. É feita uma comparação entre as CMIs observadas para a triptantrina e a isoniazida, uma das principais drogas utilizadas para o tratamento de casos de tuberculose. Utilizando um grupo de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis a antimicrobianos, a

faixa de CMI obtida para a triptantrina variou entre 0,5 – 1 µg/mL, enquanto para isoniazida a faixa de concentrações variou entre 0,03 – 0,06 µg/mL. Ao utilizar um grupo de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente, as faixas de CMI obtidas para a isoniazida foram alteradas, sendo de 0,5 – 1 µg/mL para a triptantrina, mantendo a mesma faixa de valores de CMI encontrada para cepas sensíveis, e de 4 – 16 µg/mL para a isoniazida, demonstrando um aumento na CMI quando testada contra cepas multirresistentes. O trabalho aponta que a triptantrina demonstrou atividade bacteriostática contra os modelos de microrganismos testados.

Após a avaliação do potencial antimicobacteriano da triptantrina, foram testadas as CMI de vários análogos da substância, sintetizados a partir da adição de átomos ou grupamentos na estrutura da molécula de triptantrina, buscando investigar um possível aumento na atividade inibitória causada por essas alterações, através de fatores como maior biodisponibilidade, maior interação com o sítio alvo da molécula, adição de átomos ou grupamentos com efeito oxidativo, entre outros. Foi obtido o composto denominado PA-505, considerado pelos autores como sendo o de maior atividade entre os testados, com CMI de 0,015 µg/mL para *M. tuberculosis* e 0,06 µg/mL para *M. avium*, tanto em cepas sensíveis quanto multirresistentes a antimicrobianos. Apesar de relatar o efeito inibitório da triptantrina contra alguns representantes do gênero *Mycobacterium*, principalmente a manutenção da sua CMI em cepas multirresistentes, com a possibilidade da intensificação da atividade inibitória com a síntese de compostos análogos, o estudo não explora a investigação de um possível mecanismo de ação da substância.

Contudo, esse tema é abordado no trabalho “*Docking studies on novel alkaloid tryptanthrin and its analogues against enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis*” (Tripathi *et al.*, 2012), onde foram realizados ensaios de interação, afinidade e *docking* entre a triptantrina e seus análogos mais ativos contra *M. tuberculosis* e a enzima InhA. Essa enzima é de grande importância na síntese do ácido micólico, ácidos graxos de cadeia longa característicos do gênero *Mycobacterium* (Marrakchi, Laéelle e Daffé, 2014), e estão envolvidas no processo de alongamento da cadeia dos mesmos, com enzimas envolvidas nesse processo já sendo apontada como um possível alvo para a avaliação de novos antimicrobianos com atividade antimicótica. A triptantrina e outros quinze análogos testados foram positivos para a ligação com a enzima InhA, com o melhor resultado de interação sendo da triptantrina em sua formulação original, sugerindo um possível mecanismo de ação para a triptantrina, pelo menos contra o modelo de micobactérias. O estudo ressalta ainda a forma de atuação da molécula de isoniazida contra *M. tuberculosis*, onde a mesma depende da interação com a enzima KatG desse microrganismo para ser modificada e se ligar covalentemente à molécula de NADH, inibindo então a atividade da enzima InhA. Algumas cepas resistentes de

micobactéria desenvolveram um mecanismo de resistência com a mutação do gene codificante da enzima KatG, deixando de modificar a molécula de isoniazida e anulando sua atividade antimicrobiana, o que torna o estudo de antimicrobianos com atividade direta na InhA bastante relevante, uma vez que não precisariam sofrer nenhuma modificação para atuar de forma específica. Este trabalho é de grande importância para a investigação do mecanismo de ação da triptantrina, sendo um dos únicos até então publicados que buscaram propor algum direcionamento para investigação do mesmo, apesar de ser em um modelo exclusivo para micobactérias e utilizando metodologias puramente baseadas em análise por softwares, sendo necessários estudos que comprovem a interação sugerida de forma direta e específica.

1.5 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra *E. coli* e investigação do mecanismo de ação

O trabalho “*Antimicrobial Activity of Tryptanthrins in Escherichia coli*” (Bandekar *et al.*, 2010) investiga o efeito inibitório da triptantrina e alguns de seus derivados sintéticos contra *Escherichia coli* (cepa AS19), nunca relatado até essa publicação, além de buscar um direcionamento para o mecanismo de ação da substância. Nesse estudo também foram testados compostos derivados da triptantrina, buscando a melhora da atividade observada. São relatados valores baixos de concentrações inibitórias necessárias para inibir o crescimento microbiano em 50% (IC₅₀), variando entre 0,6 – 2,25 µg/mL nos 10 derivados diferentes de triptantrina, apontando também a dose-dependência da inibição observada e atividade predominantemente bacteriostática para a maioria dos derivados, em 6 dos 10 testados.

Após a avaliação da atividade inibitória contra a cepa de *E. coli*, foram feitos experimentos buscando investigar o mecanismo de ação da substância, onde é sugerida pelos autores a possibilidade da molécula de triptantrina, por possuir conformação plana, se intercalar entre os pares de base do DNA, interferindo diretamente no processo de enovelamento do mesmo e consequentemente na expressão gênica da célula. Foi avaliada a capacidade mutagênica do tratamento com a triptantrina através da inserção do plasmídeo pBRF14C, com uma sequência repetitiva de 106 pares de base, analisando a frequência de casos de mutação nos genes conferindo resistência a rifampicina. Nenhuma das duas estratégias mostrou resultados consistentes na observação de eventos de mutação induzida pela triptantrina.

A indução de mudança de frameshifts também foi avaliada, onde apenas dois dos dez derivados testados apresentaram algum aumento na sua frequência, com nenhum deles sendo a

formulação original da substância. Ainda testando a possível interferência na ultraestrutura do DNA, através do intercalamento da triptantrina, foram analisadas alterações no grau de enovelamento da dupla fita com o tratamento de um plasmídeo na presença de triptantrina e DNA topoisomerase I humana, seguido da observação dos resultados através da técnica de eletroforese em gel de agarose. Dos dez derivados testados, cinco apresentaram alterações no grau de enovelamento do DNA, incluindo a formulação original da triptantrina, indicando a capacidade da sua estrutura de se ligar ao DNA e interferir na sua conformação. Apesar disso não foi observada uma relação significativa entre a ligação da triptantrina ao DNA com seu efeito antimicrobiano, onde as formulações que foram responsáveis por alterar o grau de enovelamento da dupla fita não apresentaram efeito inibitório mais acentuado. De fato, até mesmo a formulação derivada com maior potencial inibitório foi uma das que menos apresentou interferência no grau de enovelamento do DNA.

1.6 Atividade antimicrobiana da Triptantrina contra *Cryptococcus* e investigação do mecanismo de ação

O estudo recentemente publicado “*Natural alkaloid tryptanthrin exhibits novel anticryptococcal activity*” (Lin *et al.*, 2021) relata efeito inibitório da triptantrina nunca descrito até então contra *Cryptococcus deuterogatti* e *Cryptococcus neoformans*, explorando também possíveis indícios de um mecanismo de ação para a substância. Foram obtidos valores de CMI de 2 µg/mL para as três cepas de *Cryptococcus neoformans* (H99, T1 e 89-610) e de 4 µg/mL para as duas cepas de *Cryptococcus deuterogatti* testadas (R265 e R272). O valor da concentração mínima fungicida (CMF) foi determinado como 64 µg/mL para todas as cepas. Foi constatado o efeito dose dependente da inibição causada pela substância, através de um ensaio acompanhando a curva de crescimento dos microrganismos em múltiplas concentrações de triptantrina, variando de 1 a 4 µg/mL. Também através da análise da curva de crescimento, os autores apontaram o efeito fungistático da substância, caracterizado pela inibição do crescimento do número de células fúngicas tratadas com determinado antimicrobiano, onde na concentração respectiva à CMF obtida foi observada densidade óptica (D.O.) próxima à apresentada no início do experimento, no tempo final de 48 horas após seu início. Ao realizarem a incubação das culturas após o tratamento com a triptantrina, foi notada uma relação direta entre a temperatura de incubação e o efeito inibitório da substância. Neste caso, ao incubar a

cultura a 25°C o efeito inibitório foi drasticamente reduzido, com o maior nível de inibição sendo atingido ao realizar a incubação à 37°C.

O efeito sinérgico da triptantrina foi avaliado em primeiro momento com duas drogas utilizadas na clínica no tratamento de infecções por *Cryptococcus*, fluconazol e anfotericina B, onde todos os valores de índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) obtidos após a análise da interação entre as substâncias foram iguais ou maiores que 1, caracterizando efeito indiferente na associação entre as substâncias. No entanto, ao realizarem o teste do efeito sinérgico com FK506, um agente imunossupressor que foi demonstrado possuir efeito inibitório contra *Cryptococcus* atuando através da inibição da proteína calcineurina, foi observada interação sinérgica com valores de ICIF inferiores a 0,5 para as cepas testadas de *C. neoformans*, *C. gatti* e *C. deuterogatti*, caracterizando efeito sinérgico entre as substâncias. Após os resultados positivos, os autores testaram o efeito sinérgico com outro inibidor de calcineurina, a ciclosporina A, onde também foi visto efeito sinérgico. Com o sinergismo nesses dois casos, os autores estudaram a mudança de efeito fungistático da triptantrina para fungicida com a associação entre as drogas, mas após a transferência de parte das células utilizadas no teste de sinergismo para meio de cultura sem a presença de antimicrobianos, houve retomada do crescimento de colônias fúngicas, mantendo o efeito fungistático da substância.

Após a observação da atividade fungistática da triptantrina sobre *Cryptococcus*, os autores investigaram o perfil de fase do ciclo celular em que as células fúngicas se encontravam após o tratamento, buscando algum efeito que justificasse a interrupção do crescimento celular observado. Foi constatada redução do número de células na fase G₂ e o aumento do número de células na fase G₁, quanto maior fosse a concentração de tratamento com a triptantrina, até 8 µg/mL, onde foi visualizado um perfil de células na fase G₁ semelhante ao observado após o tratamento de *Cryptococcus* com fluconazol e rapamicina, ambas drogas que induzem a manutenção do ciclo celular na fase G₁. Em seguida foi investigada a influência da triptantrina na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, onde foi observado o aumento na expressão de ciclinas e fatores de transcrição específicos das fases G₁ e S do ciclo celular, diretamente associadas à concentração utilizada no tratamento com triptantrina. Foi ainda observado o aumento da expressão de ERG11, uma enzima alvo da ação inibitória de fluconazol, o mesmo não sendo observado para a expressão de TAP42, alvo da rapamicina, levando os autores a sugerir que a triptantrina talvez possa regular o ciclo celular de forma semelhante ao fluconazol e diferente da rapamicina, apesar de todas as substâncias gerarem perfis semelhantes de manutenção das células fúngicas nas fases G₁ e S.

Utilizando uma coleção de *Cryptococcus* mutantes com genes deletados, os autores buscaram identificar cepas que se mostrassem resistentes a triptantrina, investigando alguma associação entre o gene ausente e a resistência observada. Em conjunto com os dados apontando o aumento do efeito inibitório da triptantrina em temperaturas próximas aos 37°C, alteração dos níveis de expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular e o efeito sinérgico com drogas inibidoras de calcineurina, o estudo sugere um efeito da substância na fisiologia celular como um todo, alterando a capacidade de adaptação da levedura e de suportar situações de estresse, que pode estar associada à via de ativação das calcineurinas, apontando uma possível relação com a ativação de receptores aril-hidrocarboneto (AhR), efeito já relatado em outros alcaloides indólicos, interferindo em vias de sinalização ativadas por esses receptores, como a proteína quinase A e a homeostase de cálcio.

1.7 Citotoxicidade da Triptantrina

Existem poucas informações quanto ao perfil citotóxico da triptantrina contra células de mamíferos e em modelos de testes *in vivo*. Essas informações são de grande importância para avaliar se a substância, apesar de mostrar bons resultados em modelos *in vitro*, também apresentará bons resultados em modelos biológicos completos, apresentando citotoxicidade seletiva elevada contra o microrganismo alvo e não contra as células do hospedeiro. O estudo “*Analysis of Stereoelectronic Properties, Mechanism of Action and Pharmacophore of Synthetic Indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione Derivatives in Relation to Antileishmanial Activity Using Quantum Chemical, Cyclic Voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST Procedures*” (Bhattacharjee *et al.*, 2002) aborda a atividade anti-*Leishmania* de 27 análogos da triptantrina, analisando quais componentes da estrutura das moléculas de triptantrina são mais importantes para sua atividade inibitória e testando o perfil de citotoxicidade em células de mamífero em modelo *in vitro*. São relatados valores variados de IC₅₀ contra *Leishmania donovani* para cada um dos análogos, com o melhor resultado sendo de 16 ng/mL para o denominado composto 1, valor inferior ao da anfotericina B, a qual teve o valor de IC₅₀ seguindo o mesmo modelo de experimento de 416 ng/mL. O valor de IC₅₀ também foi determinado para dois modelos de células de mamífero, macrófagos e células neuronais de murino. O composto 1, de maior atividade contra *L. donovani*, obteve IC₅₀ de 850 ng/mL para macrófagos e de 200 ng/mL para células neuronais. Segundo os autores, o composto mais promissor entre os testados foi o composto 6, apresentando IC₅₀ de 35 ng/mL contra *L. donovani* e IC₅₀ de 2,5 µg/mL tanto

para macrófagos quanto células neuronais, atingindo índice de seletividade de aproximadamente sessenta e nove vezes mais citotoxicidade para os protozoários do que para as células de mamífero testadas.

2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento crescente de casos de infecções causadas por microrganismos resistentes em escala global, tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, é de extrema importância que os órgãos de saúde pública trabalhem para conscientizar a população, governantes e trabalhadores da área da saúde sobre a importância da adoção de políticas visando controlar o consumo indiscriminado de antibióticos na saúde humana e animal. Além de promover e fiscalizar o uso correto de antimicrobianos, é imprescindível a triagem, pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias com atividade antimicrobiana, buscando novas drogas que se mostrem eficazes contra infecções causadas por microrganismos que apresentem mecanismos de resistência.

A triptantrina é uma substância com atividade antimicrobiana apontada pela literatura e por experimentos já realizados no laboratório de pesquisa, de estrutura e síntese simples e que permite a obtenção de substâncias derivadas. Além de apresentar atividades biológicas diversas, sua atividade antimicrobiana em específico é bastante notável, se mostrando eficiente contra fungos e bactérias, o que indica um amplo espectro de atuação. Ainda assim, seu mecanismo de ação permanece indeterminado, um obstáculo para melhor compreender a forma como a substância atua contra os microrganismos. É, portanto, de grande importância a realização de um estudo investigando o mecanismo de ação da triptantrina e comprovando a atividade antimicrobiana da substância, buscando compreender de forma mais extensiva o seu potencial.

3 OBJETIVOS

1. Geral:

Estudar e avaliar a atividade antimicrobiana da triptantrina contra fungos e bactérias e investigar um possível mecanismo de ação para a substância, utilizando cepas do gênero *Cryptococcus* como modelo para os testes.

2. Específicos:

- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) da triptantrina contra cepas dos seguintes microrganismos: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.
- Investigar efeito de associação sinérgica entre a triptantrina e anfotericina b, fluconazol e 5-fluorocitsina, drogas utilizadas tradicionalmente na clínica como antifúngicos.
- Investigar possíveis alterações nas estruturas de membrana e parede fúngicas, indicando possíveis mecanismos de ação da triptantrina através de metodologias como osmoproteção de membrana com sorbitol, perda de integridade de membrana celular, síntese de ergosterol e ligação direta ao ergosterol.
- Estudar o perfil de citotoxicidade da substância através de análise *in silico*, utilizando software que realiza análises com base na estrutura molecular da triptantrina para predizer suas propriedades ADMET.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo e manutenção da triptantrina

A triptantrina foi adquirida em forma purificada (>98%) através da empresa Sigma-Aldrich. A solução estoque foi preparada na concentração de 1 mg/mL, solubilizada em DMSO com auxílio de vórtex, e armazenada em um freezer, sob proteção da incidência de luz.

4.2 Cepas de microrganismos testados e meios de cultura

Para determinar a atividade antimicrobiana da triptantrina, foram utilizados no estudo as cepas dos seguintes microrganismos: *Cryptococcus neoformans* – cepa Δ grasp, mutante com deleção do gene que codifica a proteína de empilhamento da remontagem do complexo de Golgi; cepa T₁ 444, isolado clínico do sorotipo A e altamente encapsulada; cepa Cap67, um mutante acapsular; ATCC 24067, cepa de referência pertencente ao sorotipo D. *Cryptococcus gattii* – cepa 10697, um isolado clínico cedido pelo professor D.Sc. Márcio Lourenço Rodrigues do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ – RJ). *Candida albicans* - cepas ATCC 36801 e ATCC 10231, ambas cepas de referência pertencentes ao sorotipo A; isolado clínico de *C. albicans* resistente a fluconazol. *Staphylococcus aureus* – MRSA BMB 9393, isolado pertencente ao clone epidêmico brasileiro e resistente à meticilina. *Escherichia coli* – isolado clínico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ). *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 9027, uma cepa utilizada para testes de qualidade. *Fonsecaea pedrosoi* – ATCC 46428, isolado clínico de pele e tecido subcutâneo de pacientes com cromoblastomicose. As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultura ágar Brain Heart Infusion (BHI). Leveduras foram crescidas em meio de cultura ágar Sabouraud e fungos filamentosos em ágar Batata Dextrose.

Cepas	Referência
<i>Cryptococcus neoformans</i> Δ grasp	(Kmetzsch <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cryptococcus neoformans</i> T ₁ 444	(Rodrigues <i>et al.</i> , 1997)
<i>Cryptococcus neoformans</i> Cap67	(Jacobson <i>et al.</i> , 1982)

<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 24067	(Franzot, <i>et al.</i> , 1998)
<i>Cryptococcus gattii</i> 10697	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 36801	(Rossoni <i>et al.</i> , 2014)
<i>Candida albicans</i> 10231	(Blanco <i>et al.</i> , 1992)
<i>Candida albicans</i> resistente a fluconazol	-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428	(Gomes e Resende, 1992)
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA BMB 9393	(Melo <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i> isolado clínico HUCFF UFRJ	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	(Becerra <i>et al.</i> , 2016)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	(Poudyal <i>et al.</i> , 2008)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	(Rasheed <i>et al.</i> , 2000)

4.3 Determinação da concentração mínima inibitória

Para determinar a CMI da triptantrina contra os microrganismos testados, foram seguidos os protocolos do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) referentes às metodologias de teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição em caldo. Foram utilizados os protocolos M27-A3 (CLSI, 2008a) para determinar a CMI de leveduras, M07-A10 (CLSI, 2015) para bactérias e M38-A2 (CLSI, 2008b) para fungos filamentosos, com algumas modificações.

Leveduras foram crescidas em ágar Sabouraud a 37°C por um período de 48 horas, sendo coletada uma pequena massa de células com auxílio de alça microbiológica e colocadas em suspensão de água destilada estéril para ter a concentração do inóculo ajustada. Com o auxílio de um espectrofotômetro, a concentração do inóculo foi ajustada para $5 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, após diluição em meio RPMI 1640, a partir de D.O. entre 0,08 e 0,1 a 530 nm. Foram adicionados 100µL do inóculo em cada poço da placa de 96 poços, fora os poços de controle, já contendo 100µL das diluições de triptantrina em RPMI, totalizando 200µL por poço com concentrações finais da triptantrina variando entre 25 – 0,195 µg/mL (**Figura 4**).

Bactérias foram crescidas em ágar BHI a 37°C por um período de 24 horas, sendo coletada uma pequena massa de células com auxílio de alça microbiológica e colocadas em suspensão de água destilada estéril para ter a concentração do inóculo ajustada. Com o auxílio de um

espectrofotômetro, a concentração do inóculo foi ajustada para aproximadamente 5×10^5 UFC/mL, após diluição em caldo Mueller Hinton, a partir de D.O. entre 0,08 e 0,1 a 625 nm. Foram adicionados 10 μ L do inóculo em cada poço da placa de 96 poços, fora os poços de controle, já contendo 100 μ L das diluições de triptantrina em caldo Mueller Hinton, totalizando 110 μ L por poço com concentrações finais de triptantrina variando entre 50 – 0,39 μ g/mL.

Fungos filamentosos foram crescidos em ágar Batata Dextrose a 35°C por um período de cinco dias, sendo adicionados aproximadamente 5mL de água destilada estéril à placa de Petri com a cultura, agitando e transferindo a água destilada contendo conídios com auxílio de uma pipeta para tubo falcon de 15 mL. Após 5 minutos aguardando a sedimentação de hifas, foi transferido 1mL do conteúdo para uma Câmara de Neubauer, onde os conídios foram contados para determinar a concentração celular do inóculo, ajustando-o para atingir a concentração final desejada de $0,4 \times 10^4$ – 5×10^4 UFC/mL após diluição em RPMI. Foram adicionados 100 μ L do inóculo em cada poço da placa de 96 poços, fora os poços de controle, já contendo 100 μ L das diluições de triptantrina em RPMI, totalizando 200 μ L por poço com concentrações finais de triptantrina variando entre 25 – 0,195 μ g/mL.

Em todos os casos foram feitas diluições seriadas, com cada coluna tendo metade da concentração da substância encontrada na coluna anterior. As placas foram então vedadas com parafilm e incubadas pelos períodos de 24h, 48h e 120h para bactérias, leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, a 37°C para bactérias e fungos leveduriformes e 35°C para fungos filamentosos. Após o período de incubação, foi feita a análise das placas para identificar a concentração mínima da triptantrina onde não foi possível visualizar crescimento de microrganismos, com adição de 30 μ L do indicador de crescimento celular resazurina 0,08% em cada poço para auxiliar na detecção. A resazurina é um corante biológico púrpura utilizado como indicador de oxirredução, usado para medir respiração aeróbica. Caso seja adicionada a um meio com células realizando respiração aeróbica, sua molécula é reduzida à resofurina, um corante rosa, sendo possível detectar presença de células viáveis (Borra *et al.*, 2009).

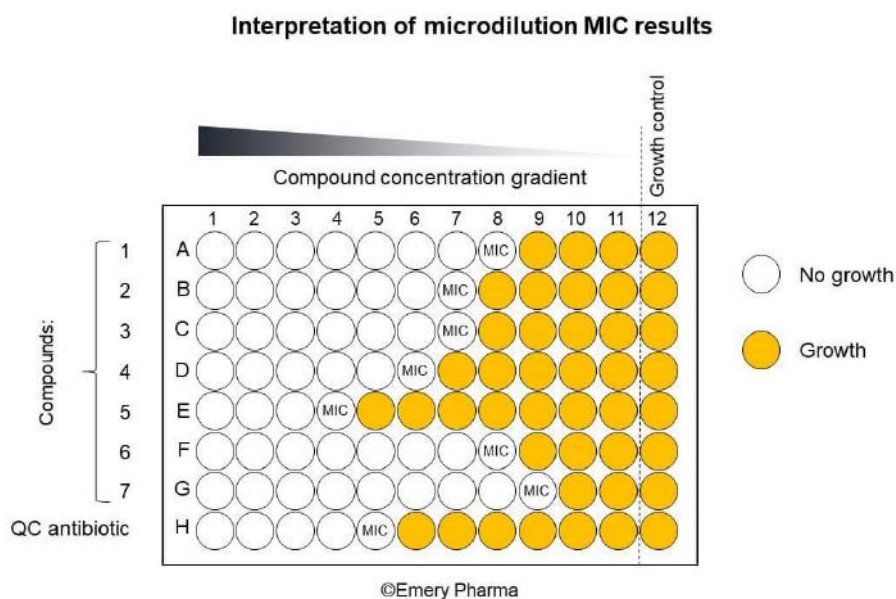


Figura 4 - Esquema em placa de 96 poços representando o experimento de determinação da CMI. Imagem retirada de <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>.

4.4 Determinação da concentração mínima bactericida/fungicida

Para determinar se a triptantrina possui ação bactericida/fungicida ou bacteriostática/fungistática, foram transferidas alíquotas de poços em que as células tiveram crescimento inibido pelo tratamento com triptantrina após o teste de microdiluição em caldo, para um meio de cultura sólido livre da presença de antimicrobianos. Foram retirados 10 μ L dos poços correspondentes a 0,5x CMI, CMI e 2xCMI, homogeneizando o conteúdo dos poços com auxílio de uma pipeta antes de retirar a alíquota. Os 10 μ L retirados de cada um dos poços foram inoculados em meio de cultura com ágar em placa de Petri adequado ao microrganismo testado, já abordados anteriormente. A placa de Petri foi vedada com parafilm e incubada pelo mesmo período de tempo e temperatura utilizados na incubação do teste de microdiluição em caldo para determinar as CMIs. Após o período de incubação, foi avaliada a presença ou ausência do crescimento de colônias nas placas.

4.5 Avaliação de associação sinérgica

O teste de sinergismo investiga a interação entre dois antimicrobianos, buscando avaliar a potencialização do efeito inibitório causado pela associação entre eles. Foi seguida a metodologia de *checkerboard* descrita por (Zore *et al.*, 2011). Foram preparadas placas de 96 poços de forma semelhante às utilizadas nos testes de CMI, com as culturas de microrganismos seguindo os mesmos padrões de tempo de incubação e concentrações de inóculo. Foram testadas associações entre a triptantrina e três opções de antimicrobianos utilizados na clínica para o tratamento de infecções fúngicas, a anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina (5-FC), contra *C. neoformans* T₁ 444, *C. neoformans* Δgrasp e *C. gattii* 10697. Foram preparadas as duas diluições de antimicrobianos na mesma placa, seguindo os eixos verticais e horizontais da mesma, com concentrações iniciais de 2x a CMI da triptantrina e 2x a CMI do outro antimicrobiano testado (**Figura 5**). Após a realização das diluições seriadas na base dois de ambos os antimicrobianos e a adição do inóculo, totalizando volume de 200μL por poço, as placas foram vedadas com parafilm e incubadas pelo mesmo período de incubação utilizando nos testes de CMI. O efeito sinérgico é definido através da análise do ICIF, utilizando a seguinte fórmula: $(\text{CMI da droga A combinada} / \text{CMI da droga A}) + (\text{CMI da droga B combinada} / \text{CMI da droga B})$, onde um ICIF de valor $<0,5$ indica efeito sinérgico entre os antimicrobianos, $0,5 - 1$ indica efeito aditivo, >1 indica efeito indiferente e >4 indica efeito antagônico (Schelz, Molnar e Hohmann, 2006).

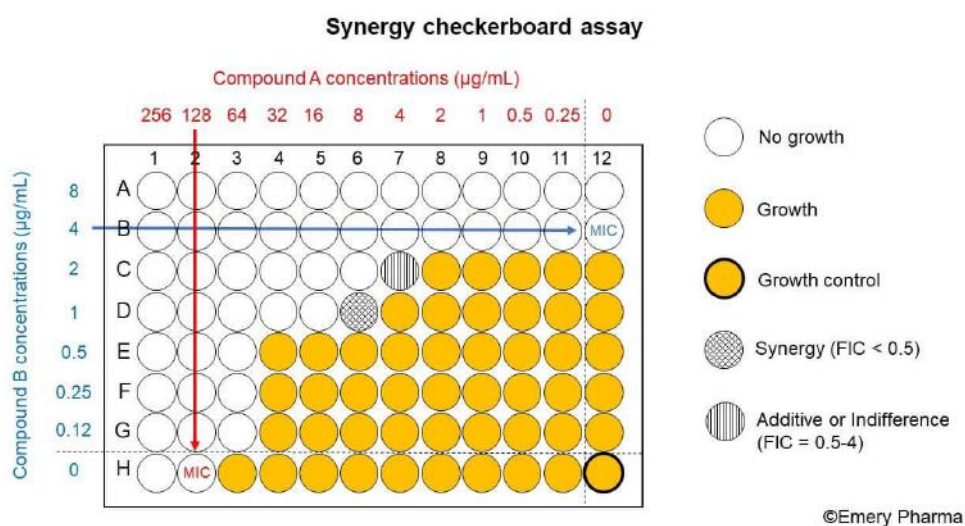


Figura 5 - Esquema representando o experimento de determinação de efeito sinérgico entre antimicrobianos.

(<https://emerypharma.com/biology/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-assay/>)

4.6 Ensaio de osmoproteção do sorbitol

O ensaio de osmoproteção do sorbitol tem como objetivo investigar a perda de equilíbrio osmótico na célula fúngica através da adição de sorbitol em meio de cultura líquido, atuando como osmoprotetor e impedindo que células com alguma alteração/dano na estrutura de parede celular sofram lise osmótica. Foi seguida a metodologia descrita por (Frost *et al.*, 1995). Foram feitos dois testes de microdiluição em caldo, seguindo os protocolos já citados, onde em ambos o microrganismo foi tratado com triptantrina, mas em um dos testes é adicionado sorbitol a 0,8 mol/L ao meio líquido. Caso seja observado um aumento na CMI no grupo com a presença de sorbitol no meio, é possível atribuir esse efeito à ação de osmoproteção do mesmo, impedindo a lise osmótica da célula fúngica e elevando sua CMI, indicando a ação do antimicrobiano na parede celular.

4.7 Ensaio de avaliação da permeabilidade de membrana celular

Para investigar efeitos da triptantrina na perda de integridade de membrana celular nos modelos testados, foi realizado tratamento com iodeto de propídio (PI), um agente fluorescente que se liga a ácido nucleico. O PI não consegue permear a membrana plasmática da célula, fazendo com que a observação de células com sua marcação após tratamento com triptantrina indique a perda da integridade na membrana celular. Foi seguida a metodologia descrita por Cox *et al.*, 2000, com algumas modificações. Uma cultura de *C. neoformans* T₁ 444 foi incubada por 48 horas e sua concentração ajustada após o período de incubação para 10⁶ células/mL, suspendendo as mesmas em tubo falcon de 15mL contendo meio de cultura apropriado para o modelo sendo testado 0,5 CMI e CMI de triptantrina. Os tubos foram incubados a 37°C por 24h. Após o período, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS), onde foi transferida uma alíquota de 50µL para um tubo eppendorf contendo 950µL de tampão e foram adicionados 5µL de PI, atingindo uma concentração final de 10 µg/mL. Os tubos foram então incubados por 30 minutos a 37°C no escuro antes da análise da amostra em citômetro de fluxo FACS-Calibur (Becton-Dickinson Biosciences), com um laser de argônio azul de 488 nm a 10mW. Os dados foram analisados através do software CellQuest Pro Software (Becton-Dickinson Biosciences).

4.8 Avaliação de alteração na síntese de ergosterol

O ergosterol é um importante constituinte da membrana celular de fungos, com função de manter a integridade de membrana, semelhante ao colesterol nas células de mamíferos. Alguns antifúngicos possuem atuação nessa molécula, sejam se ligando a ela e formando poros na membrana, como a anfotericina B e outros polienos, ou interferindo na sua via de síntese, como o fluconazol e outros azóis. O ensaio tem como objetivo investigar se o tratamento das células fúngicas com triptantrina resulta numa mudança no perfil de síntese de ergosterol, podendo gerar instabilidade na membrana celular fúngica e levando ao extravasamento de conteúdo intracelular, indicando um possível mecanismo de ação para a substância. Foi seguida a metodologia descrita por Skaggs *et al.*, 1999, com algumas alterações. O teste foi realizado com a cepa 24067 de *C. neoformans*, começando com a transferência de uma colônia após crescimento em placa por 48 h a 37 °C em meio Sabouraud ágar, para 50mL de meio Sabouraud em caldo contendo a CMI de triptantrina, e para um tubo com meio livre de antimicrobianos, como controle de crescimento celular. As culturas foram incubadas por 24 h a 37 °C sobre agitação leve. As células foram coletadas através de centrifugação a 3000 RPM por 5 minutos e lavadas com salina, tendo o peso do *pellet* de células determinado. Seguiu-se a adição de 3 mL de uma solução de hidróxido de potássio alcoólico a 25% (25 g de hidróxido de potássio e 36 mL água destilada estéril, completada para 1 L com a adição de etanol a 100%) e mistura do conteúdo com auxílio de vórtex por cerca de um minuto. A suspensão foi incubada em banho-maria por 1 hora a 85 °C, com os tubos sendo resfriados até a temperatura ambiente ao final desse período. Foram adicionados 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de ciclohexano, para extrair os esteróis, e o conteúdo novamente misturado com um vórtex por cerca de três minutos. Da fração de ciclohexano foi retirada uma alíquota de 200 µL contendo o extrato de esterol, sendo diluída para 20% em etanol a 100% e o conteúdo analisado através de um espectrofotômetro a 281,5 nm. O ergosterol extraído foi calculado como a porcentagem de ergosterol e de dehydroergosterol (DHE), um intermediário da síntese, em relação ao peso total do *pellet* de células obtido após centrifugação, seguindo a seguinte equação:

$$\% \text{ ergosterol + 24(28)DHE} = [(A_{281.5} / 290) \times F] / \text{peso do } \textit{pellet} \text{ em gramas}$$

Onde, F é o fator de diluição em etanol, $A_{281.5}$ é o valor de absorbância encontrado na leitura do extrato de esterol, 290 é o valor de E em porcentagem por centímetro determinado para o ergosterol cristalino.

4.9 Avaliação da capacidade de ligação da Triptantrina ao ergosterol

Além de atuar na inibição da síntese de ergosterol, um outro mecanismo de ação encontrado em substâncias com atividade antifúngica é a ligação direta ao ergosterol. A anfotericina B, junto de outros polienos, atua dessa forma. Esses compostos ligam-se ao ergosterol presente na membrana celular de fungos, formando um agregado que consegue abrir poros na membrana fúngica, ocasionando aumento de sua permeabilidade e no extravasamento de conteúdo intracelular, levando à morte celular (Laborín e Vargas, 2009). Para determinar se a triptantrina atua de forma semelhante aos polienos, interagindo diretamente com o ergosterol presente na membrana fúngica, foi executada a metodologia descrita por Escalante *et al.*, 2008, com algumas modificações. Foi realizado teste de microdiluição em caldo seguindo o protocolo M27-A3 do CLSI em dois grupos, um com ausência e um com presença de ergosterol comercial produzido pela Sigma-Aldrich, solubilizado em dimetilformamida e diluído em meio RPMI, de forma que a concentração final do solvente não ultrapasse 0,1%. Foram utilizadas as concentrações de ergosterol em 50, 75 e 100 µg/mL. Anfotericina B também foi testada como um controle positivo do teste, seguindo os mesmos padrões do experimento e em uma faixa de concentração de 12,5 – 0,0976 µg/mL.

4.10 Análise de citotoxicidade *in silico*

A análise *in silico* é feita através de um *software* computacional que permite, através da análise estrutural de uma molécula e seus constituintes, prever algumas propriedades farmacocinéticas, como estabilidade, propriedades de ligação com receptores, interações com outras moléculas e perfil de citotoxicidade de uma substância, entre outras informações. A triptantrina foi analisada através do software ADMET Predictor™ (*Simulations Plus, Inc*- Versão 7.1, 2014), que consegue prever as principais propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxidez (ADMET) a partir da análise da estrutura de determinada molécula, apresentando predições quanto ao perfil de absorção, interferência no metabolismo de xenobióticos e perfil de toxidez da substância. Essa análise é feita através de comparações com estrutura molecular de fármacos já conhecidos e com propriedades descritas, analisando e comparando os descritores moleculares para gerar uma

estimativa dos parâmetros solicitados para cada propriedade ADMET. As propriedades exploradas através do software foram:

- Absorção: solubilidade da molécula em água, permeabilidade intestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e grau de lipofilicidade.
- Distribuição: análise de dois modelos de transporte de fármacos, buscando função de substrato e inibição da Glicoproteína-P (gp-P) e como inibidora do polipeptídeo transportador de ânions orgânicos 1B1 (OATP1B1).
- Metabolismo: avaliação da função de substrato e inibição das enzimas CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4 da superfamília do Citocromo P450 e de glucuronidação pelas enzimas 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 1A8, 1A10, 2B7 e 2B15 pelas Glucuronosiltransferases.
- Toxidez: sensibilização respiratória ou da pele, biodegradação no ambiente, toxidade aguda letal em camundongos, carcinogenicidade em camundongos, toxicidade reprodutiva, mutagenicidade e hepatotoxicidade.

Para a comparação de dados, também foi traçado o perfil ADMET da anfotericina B, droga de escolha para o tratamento de criptococose (Iyer *et al.*, 2021) e vancomicina, droga de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA (McGuinness, Malachowa e DeLeo, 2017).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração mínima inibitória

O potencial antimicrobiano da triptantrina foi avaliado através de teste de microdiluição em caldo, buscando quantificar sua CMI frente a uma variedade de microrganismos patogênicos de interesse (**Tabela 1**). As concentrações variaram de 125 – 1,56 µg/mL, com a menor CMI contra a cepa 10697 de *C. gattii*, um isolado clínico. No grupo de cepas do gênero *Cryptococcus*, foi encontrado faixa de CMI entre 6,25 – 1,56 µg/mL. Para as três cepas de *C. albicans*, foi encontrado valor de CMI de 125 µg/mL. As cepas ATCC 46428 de *F. pedrosoi* e MRSA BMB 9393 de *S. aureus* tiveram CMI de 6,25 µg/mL. Não foi observada atividade antimicrobiana da triptantrina na concentração máxima contra nenhuma das bactérias gram-negativas testadas, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

Tabela 1 – Valores de concentração mínima inibitória da triptantrina encontrados para os microrganismos testados

Microrganismo	CMI ^a (µg/mL)
<i>C. neoformans</i> Δgrasp	6,25
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125
<i>C. neoformans</i> Cap67	3,125
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	3,125
<i>C. gattii</i> 10697	1,56
<i>C. albicans</i> ATCC 36801	125
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	125
<i>C. albicans</i> res. ^b a fluconazol	125
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	6,25
<i>S. aureus</i> MRSA BMB 9393	6,25
<i>E. coli</i>	NA ^c
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	NA ^c
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	NA ^c
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	NA ^c

^aCMI – Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

^bRes. – Resistente.

^cNA – Nenhuma Atividade.

5.2 Determinação da concentração mínima bactericida/fungicida

Para determinar se a atividade antimicrobiana da triptantrina possui ação bactericida/fungicida ou bacteriostática/fungistática, foram transferidas alíquotas de 10µL dos poços referentes à 0,5x CMI, CMI e 2x CMI após o teste de microdiluição em caldo para meio de cultura sólido livre da presença de antimicrobianos. Todas as cepas tiveram seu crescimento retomado após a transferência das células a partir de meio com a presença da triptantrina no teste de microdiluição para um meio de cultura livre de antimicrobiano, com a possibilidade de observação de formação de colônias no meio de cultura sólido. A retomada do crescimento celular após a transferência indica ação fungistática/bacteriostática da triptantrina (**Figura 6**).

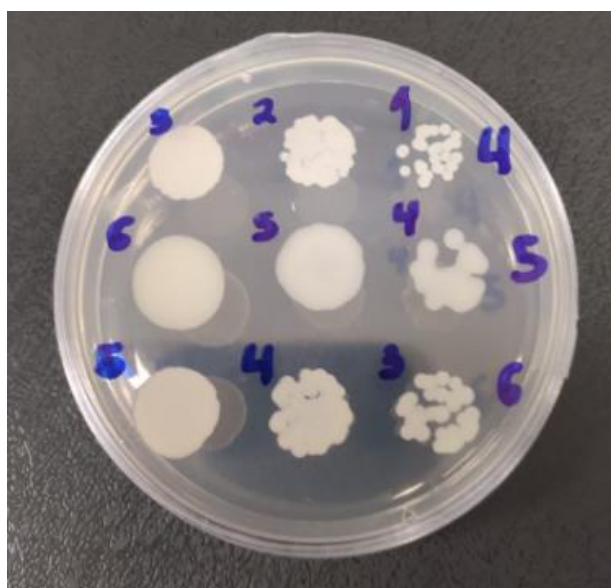


Figura 6 - Foto de crescimento celular de *C. neoformans* e *C. gattii* após transferência de alíquotas de poços de teste de microdiluição em caldo para meio de cultura sólido livre da presença de antimicrobianos. A placa está dividida em três linhas, identificadas de 4-6 no canto direito da placa. Cada um desses números representa uma das cepas testadas, onde: 4- *C. gattii* R265 (cepa retirada do trabalho por contaminação), 5- *C. gattii* 10697 e 6- *C. neoformans* 24067. Foram retiradas três alíquotas de cada cepa testada, com seus poços de origem assinalados, referentes a 0,5x CMI, CMI e 2x CMI da esquerda para a direita.

Após a determinação das CMIs e da ação fungistática/bacteriostática da triptantrina, os testes seguintes investigando associações sinérgicas da triptantrina com outros antimicrobianos e buscando alterações nas estruturas de membrana e parede celular, para a sugestão de um

mecanismo de ação, foram realizados utilizando os modelos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Cepas do gênero *Cryptococcus* foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho por sua expressiva sensibilidade à triptantrina observada nos testes *in vitro*.

5.3 Avaliação de associação sinérgica

A metodologia de *checkerboard* tem como objetivo investigar o efeito sinérgico entre antimicrobianos diferentes, buscando reduzir a CMI para ambas as drogas testadas quando utilizadas em associação. Foram realizadas associações entre a triptantrina e anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina. Após feita a leitura do crescimento na placa, foram calculadas as CMIs em associação e feito o cálculo do ICIF, possibilitando analisar se a associação entre antimicrobianos se mostrou sinérgica, aditiva, indiferente ou antagônica (**Tabelas 2, 3 e 4**).

Tabela 2 – Valores de ICIF obtidos para a associação entre a triptantrina e anfotericina B.

Microrganismo	CMI ^a Triptantrina	CMI ^a Anfotericina B	ICIF ^b Anfotericina B	Resultado da associação
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125	0,098	1,375	Indiferente
<i>C. neoformans</i> Δgrasp	6,25	0,195	1,375	Indiferente
<i>C. gattii</i> 10697	1,56	0,098	1,375	Indiferente

^aCMI – Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

^bICIF – Índice de concentração inibitória fracionada, onde valores <0,5 caracterizam associação sinérgica, 0,5 – 1 associação aditiva, 1 – 4 associação indiferente e >4 associação antagônica.

Tabela 3 – Valores de ICIF obtidos para a associação entre a triptantrina e fluconazol.

Microrganismo	CMI ^a		ICIF ^b	Resultado da associação
	Triptantrina	Fluconazol		
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125	1,56	0,71875	Aditivo
<i>C. neoformans</i> Δ grasp	6,25	3,125	1,375	Indiferente
<i>C. gattii</i> 10697	1,56	0,39	1,375	Indiferente

^aCMI – Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

^bICIF – Índice de concentração inibitória fracionada, onde valores <0,5 caracterizam associação sinérgica, 0,5 – 1 associação aditiva, 1 – 4 associação indiferente e >4 associação antagônica.

Tabela 4 – Valores de ICIF obtidos para a associação entre a triptantrina e 5-fluorocitosina.

Microrganismo	CMI ^a		ICIF ^b 5-FC	Resultado da associação
	Triptantrina	5-FC		
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125	1,56	1,375	Indiferente
<i>C. neoformans</i> Δ grasp	6,25	3,125	1,375	Indiferente
<i>C. gattii</i> 10697	1,56	0,39	1,375	Indiferente

^aCMI – Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

^bICIF – Índice de concentração inibitória fracionada, onde valores <0,5 caracterizam associação sinérgica, 0,5 – 1 associação aditiva, 1 – 4 associação indiferente e >4 associação antagônica.

Os resultados demonstram que em nenhum caso a associação da triptantrina à anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina se mostrou sinérgica, obtendo ICIF >1 e <4 em 8 dos 9 modelos utilizados, sendo observada uma associação indiferente na maioria dos modelos. O único caso em que o ICIF se mostrou aditivo foi no tratamento de *C. neoformans* T₁ 444 com a associação entre a triptantrina e fluconazol, atingindo ICIF de aproximadamente 0,72. A associação da triptantrina com os antifúngicos testados não se mostrou sinérgica em nenhum dos casos.

5.4 Ensaio de osmoproteção do sorbitol

O ensaio de osmoproteção do sorbitol busca evidenciar desestabilização e danos na estrutura de parede celular do fungo causado por tratamento com antimicrobiano. São realizados dois testes de microdiluição em caldo, um na presença de sorbitol a 0,8 mol/L e outra em sua ausência. Caso os valores de CMI em ambos os casos permaneçam os mesmos, é possível interpretar que o antimicrobiano testado não atua na parede celular fúngica, mantendo a concentração inibitória mesmo com a presença de um osmoprotetor no meio líquido. Caso seja observado um aumento na CMI no grupo com a presença de sorbitol, é indicada atuação do antimicrobiano na parede celular, aumento esse causado pelo impedimento da lise celular causada pelo efeito osmoprotetor do sorbitol, permitindo a manutenção da viabilidade celular.

O experimento foi executado com três modelos fúngicos, com as cepas T₁ 444 e ATCC 24067 de *C. neoformans* e 10697 de *C. gattii* (**Tabela 5**). Em todos os modelos foi observada manutenção da CMI na ausência e na presença de sorbitol. O dado aponta que provavelmente a triptantrina não atua de forma específica na parede celular fúngica, onde a presença do efeito osmoprotetor do sorbitol não agiu impedindo a lise osmótica causada por possíveis danos à parede celular.

Tabela 5 – Valores de concentração mínima inibitória da triptantrina com a presença e ausência de sorbitol em meio líquido

Microrganismo	CMI ^a Triptantrina	CMI ^a Triptantrina + sorbitol
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125	3,125
<i>C. gattii</i> 10697	1,56	1,56
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	3,125	3,125

^aCMI – Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL

5.5 Ensaio de avaliação da permeabilidade de membrana celular

Para investigar uma possível ação da triptantrina na estrutura de membrana celular de microrganismos, foi analisada a marcação por PI. O PI é um agente fluorescente com capacidade de se ligar a ácidos nucleicos, mas que não consegue permear a membrana celular quando ela se encontra íntegra, caracterizando uma célula em estado saudável. Através da marcação com PI e análise em citômetro de fluxo, é possível diferenciar células saudáveis, com pouca ou nenhuma marcação, de células necróticas, com elevada marcação por PI em um cenário de perda de integridade de membrana. Após tratamento das células de *C. neoformans* T₁ 444 por um período de 24h, seguido de lavagem e ressuspensão em PBS, as células foram incubadas no escuro a 37°C por um período de 30 minutos em contato com PI, seguindo a análise do material através de citometria de fluxo.

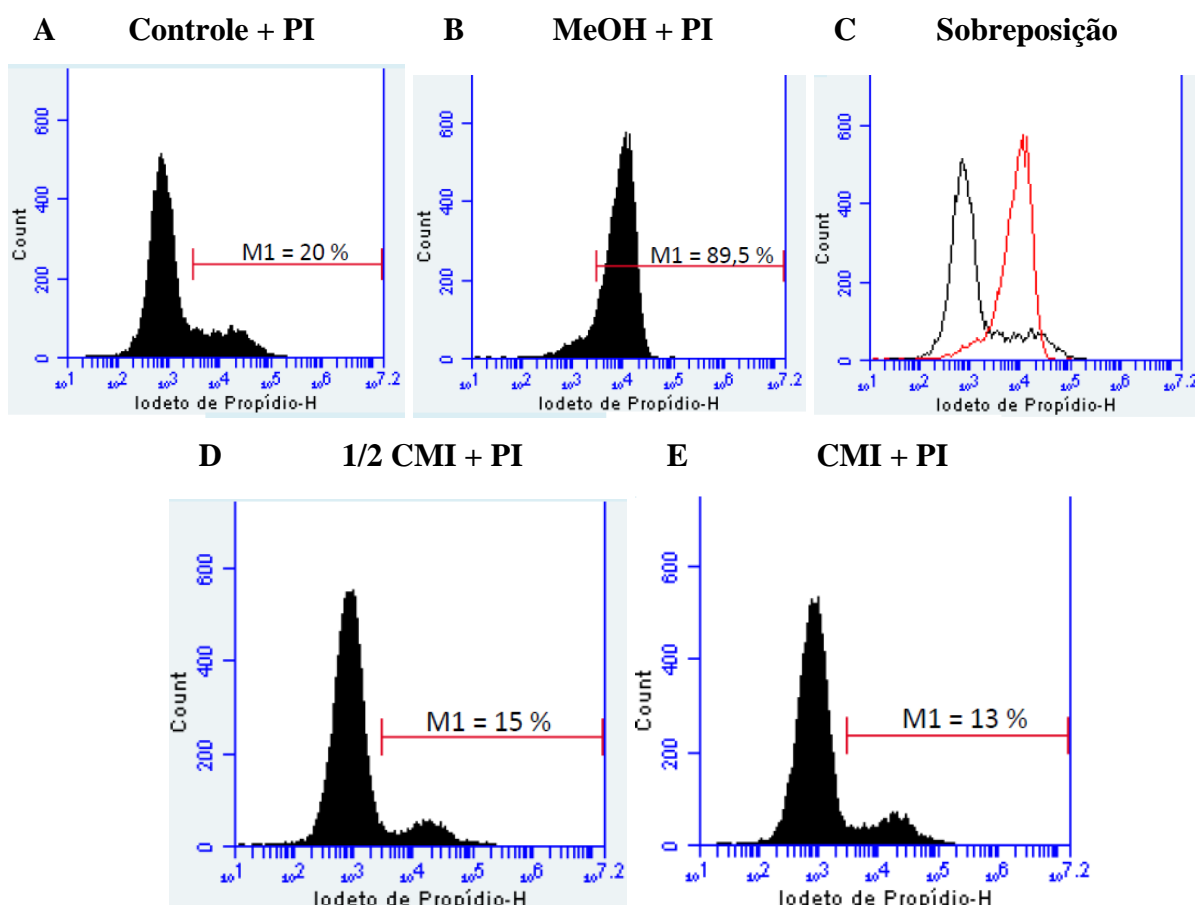


Figura 7 - Histograma mostrando marcação com iodeto de propídio de células de *C. neoformans* T₁ 444 após tratamento com 0,5x CMI e CMI de triptantrina. **A.** Grupo de células controle, sem tratamento com triptantrina e marcada com PI. **B.** Grupo controle de lise celular, células tratadas com metanol e marcadas com PI. **C.** Sobreposição dos picos gerados pelas leituras dos grupos A e B, comparando os controles. **D.** Grupo de células tratadas com 1/2 CMI da triptantrina e marcadas com PI. **E.** Grupo de células tratadas com a CMI da triptantrina e marcadas com PI.

Os dados obtidos foram interpretados com auxílio de software conforme descrito na metodologia, expressando o número de contagem de células para diferentes graus de detecção do comprimento de onda emitido pela fluorescência do PI (**Figura 7**). No grupo **A**, representando o controle celular, foi observada uma marcação de aproximadamente 20% de todas as células contadas por PI. O grupo **B** consiste em um controle de lise celular, utilizando a característica de solvente orgânico poderoso do metanol para lisar a membrana das células, onde foi possível observar alta taxa de marcação de PI, em torno de 90%. O grupo **C** compara os picos de leitura observados nos controles de crescimento celular em células saudáveis e em células com a membrana lisada, evidenciando a maior intensidade de detecção de fluorescência do PI no grupo **B**, causada pelo maior número de ligações entre o PI e ácido nucleico, disponível para a interação uma vez que a membrana celular não se encontra íntegra. Os grupos **D** e **E** mostram a marcação com PI por células tratadas com 1/2 CMI e CMI, respectivamente. No grupo **D** foi observada marcação de cerca de 15% de todas as células contadas e no grupo **E**, cerca de 13%. Segundo os resultados, não foi observada mudança no perfil de permeabilidade de membrana nas células tratadas, indicando que a triptantrina não atua desestabilizando essa estrutura celular.

5.6 Avaliação de alteração na síntese de ergosterol

Foi avaliado potencial da triptantrina de interferir na síntese de ergosterol pela cepa 24067 de *C. neoformans* através da metodologia descrita por Skaggs *et al.*, 1999, determinando a porcentagem de ergosterol e de DHE em relação ao peso total do *pellet* de células obtido após o tratamento com a CMI da triptantrina em comparação com um controle de crescimento celular. Foi obtido o seguinte gráfico (**Figura 8**), onde não é possível observar diferença na síntese de ergosterol após o tratamento com triptantrina comparando com o controle de crescimento celular. O resultado sugere que a triptantrina não atua na inibição da síntese de ergosterol pela célula fúngica.

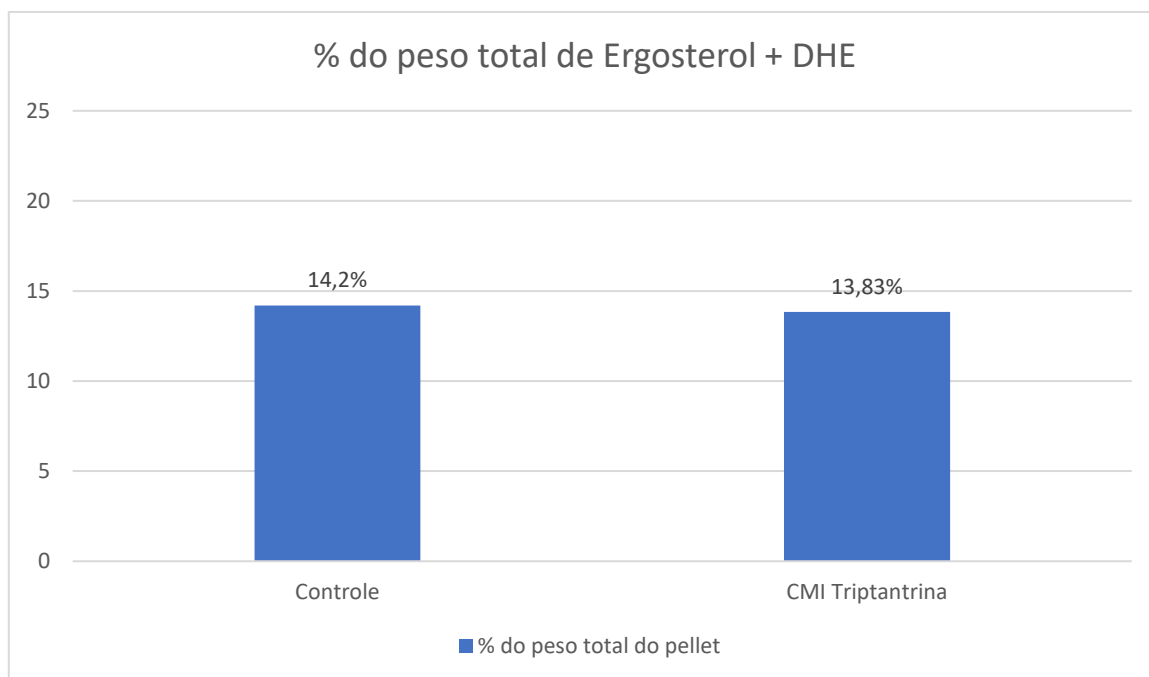


Figura 8 – Gráfico demonstrando a comparação das porcentagens do peso total do *pellet* de células atribuído ao ergosterol e DHE entre controle de crescimento celular e células tratadas com a CMI da triptantrina em modelo de *C. neoformans* 24067.

5.7 Avaliação da capacidade de ligação da Triptantrina ao ergosterol

Para investigar se a triptantrina consegue se ligar ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, foram realizados dois grupos de teste de microdiluição em placa seguindo os protocolos já citados, com o tratamento das células fúngicas com a triptantrina em ambos, mas com a adição de ergosterol exógeno ao meio líquido de um dos grupos. Caso o antimicrobiano se ligue diretamente ao ergosterol, a CMI encontrada no grupo com adição do mesmo será maior do que a no grupo com sua ausência, aumento esse causado por uma competição entre a ligação da triptantrina no ergosterol presente na membrana fúngica e o ergosterol exógeno presente no meio, reduzindo o número de moléculas de triptantrina livres para atuar nas células fúngicas.

No experimento, foram testadas as cepas T₁ 444 e Δ grasp de *C. neoformans* (Tabelas 6 e 7). No teste com a triptantrina, as CMIs se mantiveram as mesmas em todas as concentrações de ergosterol exógeno testadas. O teste controle utilizando a anfotericina B se mostrou eficaz, onde mesmo na menor concentração de ergosterol utilizada, (50 μ g/mL) a CMI teve um aumento expressivo, não sendo possível observar inibição do crescimento celular até a maior concentração de anfotericina B testada (12,5 μ g/mL). Como não houve alteração nas CMIs da

triptantrina frente as cepas de microrganismos testados quando em contato com ergosterol exógeno presente no meio líquido, o resultado indica que a triptantrina não atua se ligando diretamente ao ergosterol da membrana fúngica.

Tabela 6 – Valores de concentração mínima inibitória da **triptantrina** com a presença e ausência de ergosterol em meio líquido

Microrganismos	CMI ^a (µg/mL)			
	Ausente	Ergosterol 50 µg/mL	Ergosterol 75 µg/mL	Ergosterol 100 µg/mL
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	3,125	3,125	3,125	3,125
<i>C. neoformans</i> Δgrasp	6,25	6,25	6,25	6,25

^aCMI - Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

Tabela 7 – Valores de concentração mínima inibitória da **anfotericina B** com a presença e ausência de ergosterol em meio líquido

Microrganismos	CMI ^a (µg/mL)			
	Ausente	Ergosterol 50 µg/mL	Ergosterol 75 µg/mL	Ergosterol 100 µg/mL
<i>C. neoformans</i> T ₁ 444	0,098	>12,5	>12,5	>12,5
<i>C. neoformans</i> Δgrasp	0,195	>12,5	>12,5	>12,5

^aCMI - Concentração Mínima Inibitória, expressa em µg/mL.

5.8 Análise de citotoxicidade in silico

Foram analisadas as propriedades farmacocinéticas ADMET da triptantrina, anfotericina B e vancomicina, simuladas em pH fisiológico do sangue de 7.4 (Kellum, 2000) seguindo os parâmetros descritos na metodologia. Os modelos de predição gerador por software resultaram nos seguintes resultados (**Quadros 1 e 2**), onde segundo o modelo preditivo a triptantrina possui de forma geral propriedades farmacocinéticas ADMET mais desejáveis às observadas na anfotericina B e vancomicina:

	Absorção	Distribuição	Metabolismo	Toxicidade
T R I P T A N T R I N A	<ul style="list-style-type: none"> • Alta partição octanol-água. • Alta permeabilidade intestinal e pela BHE. • Solúvel em água. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é inibidor de gp-P. • Não é substrato de gp-P. • Inibidor de OATP1B1. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da CYP 1A2, 2C9, 2C19, 3A4. • É substrato para 2C9 e 3A4. 	<ul style="list-style-type: none"> • Antimutagênico. • É biodegradado no ambiente. • Hepatotoxicidade (53%).
A N F O T E R I C I N A B	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa partição octanol-água. • Baixa permeabilidade intestinal e pela BHE. • Solúvel em água. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor de gp-P. • Substrato de gp-P. • Inibidor de OATP1B1. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor de CYP 1A2 e 3A4. • Glucuronidação pela UGT 1A3. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatotoxicidade (84%). • Mutagênico. • Carcinogênico em camundongos. • Não biodegradado no ambiente. • Toxicidade reprodutiva. • Sensibilizador respiratório e da pele.

Quadro 1 – Quadro apresentando as propriedades ADMET geradas por análise *in silico* comparando a triptantrina e anfotericina B. Análise feita através do software ADMET PredictorTM.

	Absorção	Distribuição	Metabolismo	Toxicidade
T R I P T A N T R I N A	<ul style="list-style-type: none"> • Alta partição octanol-água. • Alta permeabilidade intestinal e pela BHE. • Solúvel em água. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é inibidor de gp-P. • Não é substrato de gp-P. • Inibidor de OATP1B1. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da CYP 1A2, 2C9, 2C19, 3A4. • É substrato para 2C9 e 3A4. 	<ul style="list-style-type: none"> • Antimutagênico. • É biodegradado no ambiente. • Hepatotoxicidade (53%).
V A N C O M I C I N A	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa partição octanol-água. • Baixa permeabilidade intestinal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor de gp-P. • Substrato de gp-P. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor de CYP 1A2, 2C9, 2D6 e 3A4. • Glucuronidação pela UGT 1A3. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatotoxicidade (55%). • Ligação ao receptor de estrogênio. • Ligação ao receptor de tireóide. • Ligação ao receptor de androgênio.

Quadro 2 – Quadro apresentando as propriedades ADMET geradas por análise *in silico* comparando a triptantrina e vancomicina. Análise feita através do software ADMET PredictorTM.

Quanto à absorção, a triptantrina foi avaliada como sendo solúvel em água, característica desejável em fármacos para garantir sua difusão pelo plasma. Além disso, foi indicada como possuindo alta partição octanol-água, indicando alta lipofilicidade, característica também desejada para que a substância atravessasse a membrana fosfolipídica celular, além de possuir alta permeabilidade intestinal e pela BHE, indicando boa absorção através de administração por via oral e habilidade de atingir os tecidos do sistema nervoso central. Em comparação, a anfotericina B foi caracterizada como solúvel em água, apresentou baixa lipofilicidade e baixa permeabilidade intestinal e pela BHE, enquanto a vancomicina foi caracterizada como pouco

solúvel em água, tendo baixa lipofilicidade e baixa permeabilidade intestinal. A triptantrina foi analisada como tendo características de absorção superiores em relação às drogas comparadas.

Quanto à distribuição das substâncias no organismo, foi avaliada interação das mesmas como inibidoras ou substratos da gp-P, uma proteína transportadora transmembrana altamente distribuída nas células do corpo humano que atua no efluxo de xenobióticos (Srivalli e Lakshmi, 2012), assim como inibidoras de OATP1B1, uma proteína transportadora expressa exclusivamente na membrana sinusoidal de hepatócitos que atua na captação de xenobióticos do plasma para o processo de *clearance* (SOLVO Biotechnology, 2021). Foi constatado que a triptantrina não é uma inibidora ou um substrato da gp-P, ambas características desejadas, com a inibição da proteína podendo causar interações adversas com outros fármacos através de acumulação no organismo e tendo baixa absorção, baixa difusão tecidual e sendo mais rapidamente eliminada do plasma caso seja um substrato. A triptantrina foi caracterizada com uma inibidora de OATP1B1, onde substâncias que possuem esse efeito inibitório podem sofrer maior dificuldade para serem excretadas do corpo, característica essa perigosa em casos de interações entre fármacos indesejadas (Srivalli e Lakshmi, 2012). Em comparação, a anfotericina B se mostrou uma inibidora e substrato da gp-P, além de também ser inibidora da OATP1B1. A vancomicina foi caracterizada como inibidora e um substrato da gp-P, mas não uma inibidora de OATP1B1.

Em relação à capacidade das drogas de serem metabolizadas pelo organismo, foram avaliadas a função de inibição e substrato pelas principais enzimas da superfamília do citocromo P450, as principais enzimas responsáveis por metabolizar fármacos no corpo humano, envolvidas no processo de *clearance* (Lynch e Price, 2007), e se são alvos das glucuronosiltransferases, enzimas produzidas principalmente no fígado responsáveis pelo processo de glucuronidação, que facilita a excreção de drogas através do aumento de sua solubilidade no sangue, permitindo que fármacos sejam eliminados mais rapidamente do organismo (Rowland, Miners e Mackenzie, 2013). A triptantrina foi caracterizada como uma inibidora das enzimas CYP 1A2, 2C9, 2C19 e 3A4, além de ser substrato das enzimas CYP 2C9 e 3A4, demonstrando inibir algumas das enzimas do citocromo P450, inclusive as enzimas 2C9 e 3A4, as quais têm a triptantrina como substrato. A inibição de enzimas do citocromo P450 influenciam no retardamento de processo de *clearance* de uma substância, podendo gerar interações indesejadas quando a substância é administrada com outros fármacos. A triptantrina não foi caracterizada como sendo alvo do processo de glucuronidação, reduzindo a velocidade com que a substância é excreta pelo corpo. A anfotericina B foi apontada como inibidora das enzimas CYP 1A2 e 3A4, assim como alvo de glucuronidação pela enzima UGT 1A3, enquanto

a vancomicina foi apontada como inibidora das enzimas CYP 1A2, 2C9, 2D6 e 3A4, assim como alvo de glucuronidação pela UGT 1A3. Todas as três substâncias interagiram com enzimas do citocromo P450, enquanto a triptantrina não se mostrou alvo de glucuronosiltransferases, indicando que provavelmente demora mais tempo para ser eliminada do corpo em comparação com as outras duas drogas.

Foram analisados diversos fatores quanto à toxicidade das substâncias, sendo eles a indução de sensibilização respiratória ou da pele, capacidade de biodegradação no ambiente, toxicidade aguda letal em camundongos, carcinogenicidade em camundongos, toxicidade reprodutiva, capacidade de induzir mutações e hepatotoxicidade. Os resultados apontam a triptantrina como sendo uma substância não causadora de sensibilização respiratória e da pele, capaz de ser biodegradada no ambiente, sem indícios de causar toxicidade aguda letal e ser carcinogênica em camundongos, além de não apresentar toxicidade reprodutiva, ser antimutagênica e possuir estimativa de interação hepatotóxica de 53%. A anfotericina B foi caracterizada com uma sensibilizadora respiratória e da pele, não biodegradada no ambiente, sem indícios de causar toxicidade aguda letal em camundongos, carcinogênica em camundongos, além de apresentar toxicidade reprodutiva, ser mutagênica e possuir estimativa de interação hepatotóxica de 84%. A vancomicina foi caracterizada como uma substância não causadora de sensibilização respiratória e da pele, não capaz de ser biodegradada no ambiente, sem indícios de causar toxicidade aguda letal e ser carcinogênica em camundongos, sem apresentar toxicidade reprodutiva, não ser mutagênica e possuir estimativa de interação hepatotóxica de 55%. A vancomicina foi a única apontada entre os compostos testados a ter interação com receptores de estrogênio, androgênio e receptores da tireoide. Pela avaliação conduzida pelo software em relação às propriedades de toxidez das substâncias testadas, a triptantrina foi apontada como tendo o melhor perfil de toxidez, comparada às demais drogas analisadas.

6 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, o debate sobre a necessidade de se discutir medidas práticas para combater o avanço da ameaça emergente de microrganismos resistentes e multirresistentes vem ganhando força (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022), com diversas organizações de saúde e membros da comunidade científica trabalhando para alertar líderes mundiais sobre o problema e discutir formas efetivas de combater essa ameaça.

Uma das formas mais importantes de se combater microrganismos resistentes a antimicrobianos é através do investimento em pesquisas focadas na busca de novas substâncias que possuam atividade antimicrobiana promissora. Essas propriedades podem ser indicadas à comunidade científica para que esforços se somem no estudo e avaliação do potencial real dessas substâncias, buscando encontrar compostos que se tornem candidatos a novas drogas, utilizando-as para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas nas clínicas.

Os produtos naturais se mostram uma preciosa fonte de pesquisa com objetivo de encontrar novas moléculas com atividade biológica (Igarashi, 2019). Segundo Newman e Cragg, 2016, entre os anos de 1981 e 2014, produtos naturais foram a fonte de origem de 26% de todos os fármacos aprovados para uso e de 33% de fármacos compostos por moléculas pequenas durante esse período de tempo. O trabalho ressalta a importância de produtos naturais como fonte direta para a produção de novas drogas antimicrobianas ou seu uso como base em alterações estruturais de moléculas para intensificar seus efeitos inibitórios.

A triptantrina é um produto natural que vem atraindo atenção de pesquisas em diversas frentes, descrita na literatura como possuidora de atividade antimicrobiana, antiprotozoária, anti-inflamatória e antitumoral (Onambele *et al.*, 2015). Possui atividade antimicrobiana contra espécies do gênero *Mycobacterium* e *Trichophyton* amplamente descritas, entre outros gêneros de bactérias e fungos. Apesar disso, o mecanismo de ação pelo qual a triptantrina consegue inibir o crescimento desses microrganismos é desconhecido.

O presente trabalho buscou investigar a triptantrina como uma substância com potencial antimicrobiano promissor, testando sua capacidade de inibir o crescimento de uma gama diversa de microrganismos. Para isso, foram selecionados microrganismos de interesse para a realização dos testes de inibição, alguns com sensibilidade à triptantrina já descrita na literatura e outros nunca avaliados, com o efeito inibitório causado pelo tratamento da substância sendo quantificado através do valor de CMI. Foram selecionadas metodologias que investigam

alterações em duas das principais estruturas celulares em fungos, a parede celular e a membrana celular, buscando algum direcionamento ou indicação de uma estrutura que possa ser afetada pelo tratamento com triptantrina, sendo mais um passo em direção ao entendimento do mecanismo de ação dessa substância e contribuindo para a produção de pesquisas em torno desse alcaloide.

Como ponto de partida, foram determinadas as CMI's da triptantrina frente a várias cepas de diferentes microrganismos. Segundo Krochmal e Wicher, 2021, a determinação de CMI de uma substância frente a microrganismos patogênicos de interesse é uma prática comum e confiável na avaliação inicial de substâncias com propriedades antimicrobianas, onde se pode ter uma perspectiva da atividade *in vitro* da substância. Foram testadas cepas das espécies de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

Para as diferentes cepas das duas espécies do gênero *Cryptococcus* testadas, foram obtidos valores de CMI entre as faixas de 6,25 – 1,56 µg/mL, com o menor valor de CMI encontrado para a cepa 10697 de *C. gattii*. O trabalho “*Natural alkaloid tryptanthrin exhibits novel anticryptococcal activity*” (Lin *et al.*, 2021), recentemente publicado, relatou pela primeira vez na literatura a atividade antimicrobiana da triptantrina contra espécies de *Cryptococcus*. Foram encontradas CMI's na faixa de 4 – 2 µg/mL contra as cepas de *Cryptococcus* testadas pelo trabalho, com valores de CMI semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Foi obtida a CMI de 125 µg/mL para as três cepas de *C. albicans* testadas, valores muito superiores aos encontrados para *C. neoformans* e *C. gattii*. No trabalho de (Lin *et al.*, 2021) a susceptibilidade de três espécies do gênero *Candida* foram avaliadas, sendo encontrada CMI não específica de >64 µg/mL, expressa dessa forma pelo grupo não ter utilizado uma concentração inicial de triptantrina alta o suficiente para ser observada inibição de crescimento. Como não foi obtido um valor exato, os mesmos não podem ser comparados. Apesar disso, tanto no estudo citado quanto neste trabalho, foram obtidos valores de CMI elevados para representantes do gênero *Candida*. Um dos primeiros trabalhos relatando a atividade antimicrobiana da triptantrina (Honda, Tabata e Tsuda, 1979) também testou a sensibilidade de espécies do gênero *Candida*, obtendo valores de CMI também inexatos de >400 µg/mL. A CMI para o gênero também se mostrou bastante elevada, com valores de concentração superiores aos 125 µg/mL encontrados como resultado, diferença essa provavelmente causada pelo uso de cepas diferentes e pelo fato do trabalho de Honda, Tabata e Tsuda não ter seguido os protocolos recomendados do CLSI para o teste de microdiluição. É possível constatar uma resistência do gênero *Candida* à triptantrina, perfil de susceptibilidade bem diferente do encontrado para o

gênero *Cryptococcus*. Curiosamente, a literatura descreve o isolamento de triptantrina a partir de culturas de *Yarrowia lipolytica* quando crescida em meio de cultura suplementado com L-triptofano (Schindler e Zähler, 1971). Considerado a proximidade filogenética entre *Y. lipolytica* e o gênero *Candida* (Butler, Rasmussen e Cuomo, 2009; (Pryszcz *et al.*, 2015), além da já relatada capacidade de *Y. lipolytica* de produzir triptantrina, pode-se extrapolar uma possível resistência intrínseca à substância por parte de ambos os gêneros. Microrganismos que produzem substâncias com propriedades antimicrobianas geralmente apresentam certo nível de resistência a elas, uma vez que precisam se proteger de seus efeitos inibitórios (Fabbretti *et al.*, 2019). O estudo do perfil de susceptibilidade de *Y. lipolytica* assim como a determinação da CMI da triptantrina contra ela seria de grande interesse para buscar mais informações sobre essa possibilidade.

Foi observada a capacidade da triptantrina de inibir o crescimento de *F. pedrosoi*, inibição essa nunca relatada na literatura. Foi obtida a CMI de 6,25 µg/mL. A atividade *in vitro* da triptantrina encontrada para *F. pedrosoi*, associada à propriedade já descrita na literatura da substância como agente anti-inflamatório (Recio *et al.*, 2006; Obafemi *et al.*, 2021), demonstram um interessante potencial para novas pesquisas explorando o uso da triptantrina em modelos de infecção causados por *F. pedrosoi*, considerando o perfil de inflamação exacerbado observado em infecções causadas pelo fungo (Ogawa *et al.*, 2019).

A determinação da CMI da triptantrina para a cepa MRSA BMB 9393 de *S. aureus* gerou o valor de 6,25 µg/mL, o mesmo valor de CMI encontrado pelo estudo de Costa *et al.*, 2017, ponto de partida para o estudo da triptantrina no Laboratório de Estrutura de Superfície de Microrganismos. A inibição de *S. aureus* pela triptantrina também é abordada em outros estudos, com valor de IC₅₀ para *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 12228 de 31 e 17 µg/mL, respectivamente, no trabalho de Chiang *et al.*, 2013, e CMI de 0,5 µg/mL para MRSA (cepa não especificada) no estudo de Kawakami *et al.*, 2011. Em conjunto, os três estudos relatam atividade da triptantrina frente cepas de *S. aureus*, com alguma discrepância nos valores de CMI obtidos, com certa diferença numérica entre os valores de CMI obtidos nos diferentes trabalhos. Essa diferença pode ter sido encontrada pelo fato de diferentes cepas terem sido utilizadas nos estudos além de diferentes metodologias terem sido empregadas para a determinação da CMI.

Não foi observada atividade antimicrobiana contra as cepas testadas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, indicando uma possível resistência por partes de bactérias gram-negativas à triptantrina. Bactérias gram-negativas possuem tendência a serem mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as gram-positivas em decorrência de suas diferenças estruturais, com

as gram-positivas possuindo uma única membrana citoplasmática envolta por uma espessa parede celular, composta por peptidoglicano, enquanto gram-negativas possuem uma membrana celular, seguida de uma parede celular e uma membrana externa à parede (Beveridge, 1999). A membrana externa adicional que as gram-negativas possuem confere a elas um maior controle na entrada de substâncias exógenas ao meio citoplasmático (Epanand *et al.*, 2016). Além disso, gram-negativas também são conhecidas por possuírem uma variedade de bombas de efluxo, alterando a permeabilidade da membrana externa e prevenindo a entrada de antimicrobianos, impedindo que atuem intracelularmente (Amaral *et al.*, 2014; Blair, Richmond e Piddock, 2014). O resultado entra em conflito com o apresentado no trabalho “*Antimicrobial Activity of Tryptanthrins in Escherichia coli*” (Bandekar *et al.*, 2010), pois o mesmo aponta sensibilidade à triptantrina por *E. coli*, o que não foi observado nos testes de microdiluição em caldo realizados no presente trabalho. No estudo citado, são encontrados pelos autores faixas de valores de CMI entre 0,6 – 2,25 µg/mL pela triptantrina e algumas substâncias análogas. É importante citar que a cepa utilizada pelo trabalho de Bandekar *et al.*, 2010, é a cepa AS19 de *E. coli*, obtida através de mutagênese química a partir da cepa B REL606 e que apresenta um perfil de sensibilidade aumentada a diferentes antimicrobianos, causado por sua hiper permeabilidade de membrana (Liu e Douthwaite, 2002; Avalos *et al.*, 2018), o que indica a possibilidade da atividade antimicrobiana da triptantrina observada contra a espécie seja causada exclusivamente pela escolha de uma cepa com mutações que alteram o perfil de permeabilidade celular da bactéria, tornando-a dessa forma sensível à ação da triptantrina.

A atividade antimicrobiana da triptantrina como fungicida/bactericida ou fungistática/bacteriostática foi avaliada, através da transferência de células tratadas dos microrganismos que se mostraram sensíveis para um meio de cultura livre da presença de antimicrobianos. Foi possível observar a retomada do crescimento celular onde antes o ele se encontrava inibido, com a clara visualização do crescimento de colônias em placa contendo meio de cultura livre de antimicrobianos. A retomada do crescimento das culturas celulares após essa transferência indica ação bacteriostática/fungistática da triptantrina, evidenciando seu efeito inibitório sobre o crescimento celular, sem matar ou inviabilizar as células após serem tratadas com a substância nos valores de concentração próximos à CMI. Os trabalhos de Lin *et al.*, 2021, Bandekar *et al.*, 2010, e Mitscher e Baker, 1998, possuem dados que concordam com os achados no presente trabalho, onde mesmo estudando diferentes microrganismos sensíveis à triptantrina, todos apontam a atividade da substância como sendo bacteriostática e fungistática, sendo capaz de inibir o crescimento dos microrganismos sem causar morte celular.

A administração de antimicrobianos com atuação sinérgica traz benefícios terapêuticos através da redução de suas CMI's individuais contra determinado microrganismo, causado pelo seu uso em associação. O uso de antimicrobianos com ação sinérgica pode contribuir para que os antimicrobianos sejam eficazes em concentrações menores, reduzindo a CMI que ambos precisem atingir nos tecidos biológicos para combaterem infecções e reduzindo a concentração que antimicrobianos com algum grau de toxidez precisem ser administrados, diminuindo assim seus efeitos colaterais. Foi testada a interação da triptantrina com três dos principais fármacos utilizados na clínica para o tratamento de infecções fúngicas, a anfotericina B, o fluconazol e a 5-fluorocitosina. A avaliação da interação sinérgica entre antimicrobianos se dá pelo cálculo o ICIF, o qual já teve sua fórmula explorada na sessão de metodologia, onde valores inferiores a 0,5 indicam interação sinérgica, entre 0,5 – 1 indicam interação aditiva, entre 1 – 4 indicam interação indiferente e valores superiores a 4 indicam interação antagônica entre as substâncias. Foi obtido ICIF de 1,375 para a maioria dos testes, caracterizando associação indiferente da triptantrina com os fármacos citados. O único resultado diferente foi na associação da triptantrina com fluconazol no modelo de *C. neoformans* T₁ 444, onde foi obtido um ICIF de aproximadamente 0,72, caracterizando um efeito aditivo na associação das duas substâncias. O trabalho de Lin *et al.*, 2021 também investigou a associação sinérgica da triptantrina com anfotericina B e fluconazol, obtendo ICIF das associações para todos as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* testadas em um faixa de 1 – 1.5, caracterizando associação indiferente da triptantrina com os antifúngicos testados, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Apesar de ter a atividade antimicrobiana relatada na literatura, o mecanismo de ação pelo qual a triptantrina inibe o crescimento de microrganismos segue indeterminado. Conforme abordado na introdução do trabalho, alguns estudos tentaram investigar indícios de um possível mecanismo de ação para a substância, embora nenhum tenha obtido uma resposta concreta para a questão. O trabalho “*Docking studies on novel alkaloid tryptanthrin and its analogues against enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis*” (Tripathi *et al.*, 2012) aponta uma possível interação entre a molécula de triptantrina e a enzima InhA de micobactérias, importantes para a síntese do ácido micólico presente na parede celular das mesmas, através de ensaios de *docking* realizados com auxílio de software, um mecanismo de ação que só faria sentido para as micobactérias, possivelmente gerando alterações na parede celular desses organismos. O trabalho “*Natural alkaloid tryptanthrin exhibits novel anticryptococcal activity*” (Lin *et al.*, 2021) também busca encontrar alguma sugestão de mecanismo de ação para a triptantrina, onde foram realizados testes para confirmar o efeito na inibição do processo de divisão celular em *Cryptococcus*, com a manutenção das células

tratadas na fase G₁ e o aumento da expressão de genes associados a essa fase do ciclo celular. O trabalho não propõe um mecanismo direto, apontando que a triptantrina provavelmente possui atuação na fisiologia geral da célula, alterando vias de sinalização celulares envolvidas com a resposta a estresse.

Dessa forma, foram realizados experimentos seguindo o modelo de microrganismo que mostrou sensibilidade *in vitro* mais promissora, cepas de *Cryptococcus neoformans*, buscando investigar alterações em duas das principais estruturas celulares de células fúngicas que são alvos de antifúngicos clássicos, a parede celular e a membrana celular.

A parede celular fúngica é uma estrutura essencial na manutenção da sua integridade e viabilidade celular, protegendo a célula de estresse osmótico e mecânico, ajudando também no controle de permeabilidade de substâncias que podem adentrar o meio intracelular (Rubio *et al.*, 2020). Os antifúngicos da classe das equinocandinas possuem mecanismo de ação direcionado à parede celular fúngica, inibindo a síntese de β -glucana e interferindo na formação dessa estrutura, gerando desestruturação da parede celular e causando lise osmótica (Sucher, Chahine e Balcer, 2009). Para avaliar se a triptantrina também atua causando alterações na parede celular fúngica, foi testada metodologia da osmoproteção do sorbitol, capaz de identificar efeito inibitório causado por substâncias que atuem gerando desequilíbrio osmótico na célula (Frost *et al.*, 1995). O resultado obtido demonstrou que a presença do sorbitol como osmoprotetor no meio de cultura durante tratamento com a triptantrina não foi capaz de reduzir o efeito inibitório da substância, apontando ser pouco provável que a triptantrina atue desestabilizando a estrutura de parede celular, seja ligando-se ou interferindo na síntese de algum de seus componentes.

A membrana celular possui extrema importância estrutural para as células, atuando também na regulação da permeabilidade de substâncias presentes no meio intra e extracelular, na compartimentalização de organelas no caso de células eucarióticas e também participando de inúmeros processos biológicos necessários para a viabilidade celular (Serna *et al.*, 2016). A membrana celular é um dos alvos clássicos para antifúngicos, sendo exemplos de classes de antimicrobianos com atuação direta ou indireta nessa estrutura os polienos, azóis e alilaminas. Para investigar alterações na estrutura de membrana celular, foi empregada a metodologia e incorporação de PI, um fluoróforo que se liga a ácidos nucleicos, mas não consegue permear a membrana celular a não ser que a estrutura não se encontre íntegra. Para comparação dos resultados, foi feito um controle de crescimento celular sem a presença de antimicrobianos e um controle de lise de membrana, com células tratadas com metanol. Os resultados apontam para a não atuação da triptantrina interferindo na integridade de membrana celular, onde os

percentuais de células marcadas por PI nos grupos tratados com a triptantrina foram bastantes semelhantes ao grupo de controle de crescimento celular. É pouco provável que a triptantrina atue de forma específica na membrana celular, causando desestabilização na mesma e ocasionando em extravasamento de conteúdo intracelular.

O ergosterol é o esterol presente em maior quantidade na membrana celular fúngica, com funções semelhantes ao colesterol, encontrado nas células de mamífero, de regular a permeabilidade e fluidez de membrana. Por serem uma das principais diferenças na composição das membranas de fungos e células de mamífero, ambos organismos eucarióticos, o ergosterol é um importante alvo para drogas antifúngicas (Rodrigues, 2018). Foram avaliadas duas possíveis formas de interação da triptantrina com o ergosterol, sendo: 1- a capacidade da substância de interferir na síntese de ergosterol, causando alterações na estrutura de membrana e podendo gerar acúmulo de intermediários tóxicos do ergosterol no meio intracelular, mecanismo do efeito inibitórios dos azóis (Manavathu, Cutright e Chandrasekar, 1998); 2- a capacidade da triptantrina de se ligar de forma direta ao ergosterol, principal mecanismo do efeito inibitório de polienos, que se ligam ao ergosterol presente na membrana e formam poros em sua superfície, ocasionando no extravasamento de conteúdo intracelular (Serhan *et al.*, 2014). Semelhante à triptantrina, os azóis também possuem ação fungistática em sua maioria, sendo de grande interesse a avaliação de possíveis interações entre a triptantrina e essa classe de esteróis. Foi comparada a síntese de ergosterol entre um controle de crescimento celular e células de *C. neoformans* tratadas com 0,5x CMI de triptantrina, seguindo a metodologia descrita por Skaggs *et al.*, 1999. A comparação entre o grupo tratado com triptantrina e o grupo controle mostrou leve aumento da síntese de ergosterol por parte do grupo tratado, onde é possível interpretar que muito provavelmente a triptantrina não atua interferindo na síntese de ergosterol pela célula fúngica. Para investigar a capacidade da triptantrina a se ligar de forma direta no ergosterol, foi seguida a metodologia descrita por Escalante *et al.*, 2008, que consistiu na adição de ergosterol exógeno no meio de cultura líquido em células tratadas com triptantrina, onde caso a substância atue se ligando ao ergosterol de membrana em fungos, será observado um aumento na CMI causado pela competição de substrato entre o ergosterol de membrana e o exógeno presente no meio. Foi também realizado um experimento com a anfotericina B como controle positivo para uma substância capaz de se ligar ao ergosterol como mecanismo de ação. Através dos resultados foi possível observar que a CMI da triptantrina contra as cepas testadas se mantiveram sem alterações, enquanto a CMI da anfotericina B foi expressivamente aumentada. O resultado aponta que a atividade antimicrobiana da triptantrina não possui como

mecanismo de ação a ligação direta com moléculas de ergosterol presentes na membrana fúngica.

Além de demonstrar boa atividade inibitória *in vitro*, é importante que substâncias candidatas para a formulação de novos fármacos apresentem baixa citotoxicidade para células de mamíferos, com ação seletiva para microrganismos patogênicos no caso de antimicrobianos, além de outras características desejáveis, como alta biodisponibilidade para atingir concentrações altas o suficiente nos tecidos humanos para desempenharem as funções biológicas de interesse e boa solubilidade em água, aumentando as chances de difusão pelo corpo (Yang *et al.*, 2018). Ensaios para avaliação de citotoxicidade podem ser feitos de várias formas. A mais confiável é através de modelos *in vivo*, com o teste de substâncias em animais de laboratório, o padrão ouro para ensaios farmacocinéticos, mas que são muito trabalhos e requerem grande quantidade de tempo. Testes *in vitro* também são utilizados, realizados através de cultura de células de mamíferos. São menos precisos que testes *in vivo*, mas sendo uma forma confiável e mais rápida de avaliação inicial. Recentemente, testes de citotoxicidade através de análises *in silico* vêm ganhando espaço, que consistem em utilizar ferramentas de bioinformática para realizar modelos de predições, obtendo relatórios de características que uma substância pode possuir com base na análise de sua estrutura (Raies e Bajic, 2016). A análise *in silico*, embora não seja tão confiável quanto modelo *in vivo*, pode ser utilizada para avaliações iniciais substâncias, permitindo obter informações gerais sobre o perfil de toxidez. A análise *in silico* foi feita através do software ADMET Predictor™ (Simulations Plus, Inc-Versão 7.1, 2014), onde foram analisados os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e toxidez da triptantrina, comparada com a anfotericina b e vancomicina como referências de antimicrobianos utilizados na clínica.

Segundo a análise *in silico*, a triptantrina apresentou propriedades ADMET consideradas desejáveis para uma substância candidata à uso como fármaco, com boas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e baixa toxicidade para células de mamíferos. Em comparação com a triptantrina, a anfotericina B e vancomicina, drogas tradicionalmente utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas e infecções bacterianas, respectivamente, demonstraram não possuir características desejáveis em alguns dos parâmetros analisados, como alta hepatotoxicidade e baixa solubilidade e permeabilidade atribuídas à anfotericina B e interferência com receptores hormonais de mamíferos e baixa solubilidade e permeabilidade atribuídas à vancomicina.

O trabalho “*Study on pharmacokinetics and tissue distribution of single dose oral tryptanthrin in Kunming mice by validated reversed-phase high-performance liquid*

chromatography with ultraviolet detection” (Zhang *et al.*, 2017) é o primeiro estudo a publicar um ensaio de distribuição tecidual da triptantrina em camundongos após administração única por via oral de uma dose de 80 mg/kg de triptantrina, avaliando suas propriedades farmacocinéticas. Foram avaliadas as concentrações de triptantrina presentes em diversos tecidos, como o plasma sanguíneo, fígado, coração, baço, pulmões, rins e cérebro, onde a concentração máxima nos tecidos foi observada após 2,5 horas. O tecido que atingiu a maior concentração de triptantrina foi o plasma sanguíneo, com 3,13 µg/mL. O estudo aponta que a triptantrina foi rapidamente absorvida e eliminada do plasma, indicando boa absorção por administração oral, de acordo com os resultados encontrados através da análise *in silico* de absorção da substância, e distribuição rápida em uma variedade de tecidos. Foi possível detectar a triptantrina no plasma sanguíneo por até 12h e no fígado, coração, baço, pulmões, rins e cérebro por até 4h após administração oral. Não foi observada acumulação da triptantrina, com as concentrações detectáveis nos tecidos reduzindo gradualmente após a sua administração, indicando boa capacidade de ser metabolizada e ter *clearance* efetivo após administração, apesar da substância ter sido apontada como inibidora de algumas enzimas do citocromo P450 segundo a análise *in silico*. O estudo aponta que dos tecidos analisados, a triptantrina atingiu a menor concentração no cérebro, com concentração máxima observada inferior a 1 µg/mL, indicando baixa capacidade da substância de atravessar a BHE, o que conflita com o resultado encontrado na análise *in silico* de que a triptantrina teria boa permeabilidade na BHE, possivelmente desencorajando o seu uso no tratamento de meningite criptocócica. A baixa permeabilidade da triptantrina pela BHE é especialmente não desejada sobre a ótica de um antimicrobiano com atividade contra *C. neoformans* e *C. gattii*, causadores de meningite criptocócica (Firacative *et al.*, 2018). O estudo recomenda o estudo do uso da triptantrina em terapias focando em ação no plasma sanguíneo, fígado, rins e pulmões. Considerando a expressiva atividade antimicrobiana *in vitro* encontrada contra diferentes cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, associada à indicação do trabalho de (Zhang *et al.*, 2017), de estudar o potencial da substância atuando nos pulmões, seria de grande interesse estudos avaliando a viabilidade do uso da triptantrina como antimicrobiano combatendo infecção pulmonar causada por fungos do gênero *Cryptococcus*.

Comparativamente, a literatura corrobora alguns dos resultados obtidos pela análise *in silico* da anfotericina B. A elevada citotoxicidade e baixa permeabilidade desse fármaco motivam diversas pesquisas para a elaboração de diferentes formas de administração da droga que se mostrem mais eficazes (Radwan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). Além disso, seu potencial mutagênico e carcinogênico é apontado no trabalho de (Saturnino *et al.*, 2017), onde células

somáticas mutantes de *Drosophila melanogaster* desenvolveram tumores nas maiores concentrações de anfotericina B testadas.

A análise *in silico* quanto a propriedade de absorção da vancomicina também vai de encontro com o exposto na literatura, onde também é apontada baixa permeabilidade intestinal e baixa lipofilicidade (Payne *et al.*, 2011; PubChem, 2022). No entanto, não foi encontrado na literatura relatos que corroborem os achados na análise *in silico* relatando interação entre a vancomicina e receptores da tireoide, androgênio e estrogênio.

Apesar de não obter um direcionamento concreto em relação a possíveis mecanismos de ação da atividade antifúngica da triptantrina, com base nas metodologias utilizadas nesse trabalho focadas em buscar alterações nas estruturas de parede e membrana celulares, o presente estudo foi importante para indicar que essas estruturas muito provavelmente não são alvo da triptantrina, dados não presentes na literatura. É indicado, portanto, que pesquisas futuras investiguem interações intracelulares da triptantrina, como, por exemplo, sua interferência na síntese proteica ou no metabolismo de microrganismos, através da interferência em vias de sinalização celulares, ou alterações no metabolismo energético de microrganismos. Estudos avaliando a participação da triptantrina em vias de síntese e catabolismo de triptofano podem se mostrar especialmente interessantes para melhor compreender a atividade antimicrobiana da triptantrina. (Schindler e Zähner, 1971), apontam que *Y. lipolytica* sintetiza triptantrina quando crescida em meio suplementado com L-triptofano. Além disso, a síntese de triptofano por microrganismos é extensivamente estudada na literatura (Choera *et al.*, 2018; Kaur, Bose e Mande, 2019). Seria interessante a investigação do potencial de microrganismos para avaliar alguma interferência da triptantrina na síntese de triptofano de microrganismos, estudando as propriedades de possíveis intermediários gerados a partir de alterações estruturais da molécula que podem ocorrer no meio intracelular.

7 CONCLUSÕES

- A triptantrina apresentou atividade antimicrobiana expressiva em testes *in vitro* contra cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Staphylococcus aureus*, demonstrando atividade contra fungos leveduriformes, fungos filamentosos e bactérias gram-positivas.
- A capacidade da triptantrina de inibir o crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* não está relatada na literatura.
- O gênero *Candida* demonstrou resistência à triptantrina.
- Nenhuma bactéria gram-negativa testada demonstrou sensibilidade à triptantrina.
- A triptantrina demonstrou atividade bacteriostática e fungistática, em acordo com as informações presentes na literatura.
- As associações testadas entre a triptantrina e a anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina, três dos principais antifúngicos utilizados na clínica, não se mostraram sinérgicas.
- A metodologia de osmoproteção do sorbitol demonstrou que a triptantrina não atua na alteração da estrutura de parede celular fúngica.
- A metodologia de *intake* de iodeto de propídio demonstrou que o tratamento com triptantrina não geral alterações na permeabilidade de membrana.
- A metodologia de extração e quantificação da síntese de ergosterol pelas células fúngicas demonstrou que a triptantrina não atua interferindo na síntese de ergosterol.
- A metodologia de avaliação da ligação direta ao ergosterol demonstrou que a triptantrina não atua se ligando diretamente ao ergosterol presente na membrana fúngica.
- A metodologia de análise *in silico* caracterizou a triptantrina como tendo características ADMET superiores às encontradas em antimicrobianos utilizados na clínica, sugerindo baixa citotoxicidade da substância contra células de mamíferos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L., Martins, A., Spengler, G. e Molnar, J. (2014). Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front. Pharmacol.*
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629-655.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M., Nisar, M., Alvi, R., Aslam, M., Qamar, M., Salamat, M. e Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* 11, 1645-1658.
- Aust, M., Godlinski, F., Travis, G., Hao, X., McAllister, T., Leinweber, P. e Bruhn, S. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut.* 156, 1243-1251.
- Avalos, M., Boetzer, M., Pirovano, W., Arenas, N., Douthwaite e Wezel, G. (2018) Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* AS19, an Antibiotic-Sensitive Variant of *E. coli* Strain B REL606. *Genome Announc.* 6.
- Bandekar, P., Roopnarine, K., Parekh, V., Mitchell, T., Novak, M. e Siden, R. (2010). Antimicrobial activity of tryptanthrins in *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.* 53, 3558-3565.
- Bartlett, J., Gilbert, D. e Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1445-1450.
- Becerra, M., Valdez, A., Martínez, M., Morales, E., Gonzáles, L., Méndez, J., Delgado, G., Espinosa, R., Soto, G., Yanez, M. e Chávez, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 100, 9995-10004.
- Bennani, H., Mateus, A., Mays, N., Eastmure, E., Stärk, K. e Häsler, B. (2020). Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in the Food Chain. *Antibiotics* 9, 49.
- Beveridge, T. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181, 4725-4733.
- Bhattacharjee, A., Skanchy, D., Jennings, B., Hudson, T., Brendle, J. e Werbovets, K. (2002). Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST procedures. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 1979-1989.
- Blair, J., Richmond, G. e Piddock, L. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 9, 1165-1177.
- Blanco, M., Giraldo, C., Blanco, J., Morán, F., Hurtado, C. e García, A. (1992). In Vitro Studies of Activities of Some Antifungal Agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the Turbidimetric Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 898-901.
- Borra, R., Lotufo, M., Barros, F. e Andrade, P. (2009). A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res.* 23, 255-262.
- Butler, G., Rasmussen, M. e Cuomo, C. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-662.
- Chiang, Y., Li, A., Leu, Y., Fang, J. e Lin, Y. (2013). An in vitro study of the antimicrobial effects of indigo naturalis prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore. *Molecules* 18, 14381-14396.
- CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third Edition, 28.
- CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard – Second edition, 28.
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Tenth edition, 35.

- Costa, D., Azevedo, M., Silva, D., Romanos, M., Padrón, T., Alviano, C. e Alviano, D. (2017). In vitro anti-MRSA activity of *Couroupita guianensis* extract and its component Trypantanthrin. *Nat. Prod. Res.* 31, 2077-2080.
- Cox, S., Mann, C., Markham, J., Bell, H., Gustafson, J., Warmington, J. e Wyllie, S. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170-175.
- Davies, J. (2006). Where have All the Antibiotics Gone? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 287-290.
- Dever, L. e Dermody, T. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* 151, 886-895.
- Epand, R., Walker, C., Epand, R. e Magarvey, N. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858, 980-987.
- Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P. e Zacchino, S. (2008). Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products* 71, 1720-1725.
- Fabbretti, A., Çapuni, R., Giuliadore, A., Cimarelli, L., Miano, A., Napolioni, V., Teana, A. e Spurio, R. (2019). Characterization of the Self-Resistance Mechanism to Dityromycin in the *Streptomyces* Producer Strain. *mSphere* 25.
- Franzot, S., Mukherjee, J., Cherniak, R., Chen, L., Hamdan, J. e Casadevall, A. (1998). Microevolution of a Standard Strain of *Cryptococcus neoformans* Resulting in Differences in Virulence and Other Phenotypes. *Infection and Immunity* 66, 89-97.
- Firacative, C., Lizarazo, J., Zaragoza, M. e Castañeda, E. (2018). The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113.
- Frost, D., Brandt, K., Cugier, D. e Goldman, R. (1995). A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J. Antibiot* 48, 306-310.
- Gomes, M. e Resende, M. (1992). *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Canadian Journal of Microbiology* 38.
- Herago, T. e Agonafir, A. (2017). Growth Promoters in Cattle. *Advances in Biological Research* 11, 24-34.
- Holmes, A., Moore, L., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. e Piddock, L. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* 387, 176-187.
- Honda, G., Tabata, M. e Tsuda, M. (1979). The antimicrobial specificity of trypantanthrin. *Planta Med.* 37, 172-174.
- IACG (2019). No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report to the secretary-general of the United Nations.
- Igarashi, M. (2019). New natural products to meet the antibiotic crisis: a personal journey. *J. Antibiot.* 72, 890-898.
- Iyer, K., Revie, N., Fu, C., Robbins, N. e Cowen, L. (2021). Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 454-466.
- Jacobson, E., Ayers, D., Harrell, A. e Nicholas, C. (1982). Genetic and Phenotypic Characterization of Capsule Mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 150, 1292-1296.
- Kaur, R., Manjal S., Rawal, R. e Kumar, K. (2017). Recent synthetic and medicinal perspectives of trypantanthrin. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 4533-4552.
- Kawakami, J., Matsushima, N., Ogawa, Y., Kakinami, H., Nakane, A., Kitahara, H., Nagaki, M. e Ito, S. (2011). Antibacterial and Antifungal Activities of Trypantanthrin Derivatives. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 36, 603-606.
- Kellum, J. (2004). Determinants of blood pH in health and disease. *Crit. Care* 4, 6-14.
- Khan, U., Rahman, H., Niaz, Z., Qasim, M., Khan, J., Tayyaba e Rehman, B. (2013). Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 3, 272-274.
- Kim, K., Owens, G., Kwon, S., So, S., So, K., Lee, D. e Ok, Y. (2010). Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, & Soil Pollution* 214, 163-174.

- Kirpotina, L., Schepetkin, I., Hammaker, D., Kuhs, A., Khlebnikov, A. e Quinn, M. (2020). Therapeutic Effects of Tryptanthrin and Tryptanthrin-6-Oxime in Models of Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol.* 11, 1145.
- Kmetzsch, L., Joffe, L., Staats, C., Oliveira, D., Fonseca, F., Cordero, R., Casadevall, A., Nimrichter, L., Schrank, A., Vainstein, M. e Rodrigues, M. (2011). Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Mol. Microbiol.* 81, 206-218.
- Krochmal, B. e Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 10, 165.
- Laborín, R. e Vargas, M. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 26, 223-227.
- Larsen, J., Schonheyder, H., Lester, C., Olsen, S., Porsbo, L., Migura, L., Jensen, L., Bisgaard, M. e Hammerum, A. (2010). Porcine-Origin Gentamicin-Resistant *Enterococcus faecalis* in Humans, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 682-684.
- Merminiaux, N. e Cameron, A. (2018). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology* 65, 34-44.
- Li, J. e Vederas, J. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161-165.
- Lin, C., Chang, Y., Yang, Y. e Chen, Y. (2021). Natural alkaloid tryptanthrin exhibits novel anticryptococcal activity. *Med. Mycol.* 59.
- Liu, M. e Douthwaite, S. (2002). Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. S.A.* 99, 14658-14663.
- Lynch, T. e Price, A. (2007). The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *Am. Fam. Physician.* 76, 391-396.
- Macabata, J., Morgner, B., Elsner, P., Hipler, U. e Wiegand, C. (2020). Tryptanthrin promotes keratinocyte and fibroblast responses in vitro after infection with *Trichophyton benhamiae* DSM6916. *Scientific Reports* 10, 1863.
- Mahajan, G. e Balachandran, L. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes - a review. *Frontiers in Bioscience-Elite* 4, 240-253.
- Manavathu, E., Cutright, J. e Chandrasekar, P. (1998). Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3018-3021.
- Marrakchi, H., Laéelle, M. e Daffé, M. (2014). Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry and Biology* 21, 67-85.
- Marston, H. Dixon, D., Knisely, J., Palmore, T. e Fauci, A. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA* 316, 1193-1204.
- McGuinness, W., Malachowa, N. e DeLeo, F. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J. Biol. Med.* 90, 269-281.
- Melo, M., Carvalho, M., Ferreira, R., Coelho, L., Souza, R., Gobbi, C., Rozenbaum, R., Solari, C., Carvalho, B. e Figueiredo, A. (2004). Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *Journal of Hospital Infection* 58, 276-285.
- Milani, R., Wilt, J., Entwisle, J, Hand, J., Cazabon, P. e Bohan, J. (2019). Reducing inappropriate outpatient antibiotic prescribing: normative comparison using unblinded provider reports. *BMJ Open Quality* 8, 351.
- Mitscher, L. e Baker, W. (1998). Tuberculosis: a search for novel therapy starting with natural products. *Med. Res. Rev.* 18, 363-374.
- Monroe, P. e Polk, R. (2000). Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology* 3, 496-501.
- Nathan, C. e Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *N. Engl. J. Med.* 371, 1761-1763.
- Nature Chemical Biology. (2007). All natural. *Nature Chemical Biology* 3, 351.

- Newman, D. e Cragg, G. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629-661.
- Obafemi, C., Adegbite, O., Fadare, O., Iwalewa, E., Omisore, N., Sanusi, K., Yilmaz, Y. e Ceylan, U. (2021). Tryptanthrin from microwave-assisted reduction of isatin using solid-state-supported sodium borohydride: DFT calculations, molecular docking and evaluation of its analgesic and anti-inflammatory activity. *Heliyon* 1.
- Ogawa, M., Mariano, M., Silva, M., Simões, M., Enokihara, S., Michalany, N., Nishikaku, A., Silvestre, A. e Tomimori, J. (2019). Study of tissue inflammatory response in different mice strains infected by dematiaceous fungi *Fonsecaea pedrosoi*. *An. Bras. Dermatol.* 94.
- Onambele, L., Riepl, H., Fischer, R., Pradel, G., Prokop, A. e Aminake, M. (2015). Synthesis and evaluation of the antiplasmodial activity of tryptanthrin derivatives. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 48-57.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom, 19 de maio de 2016.
- Odonkor, S. e Addo, K. (2011). Bacteria Resistance to Antibiotics: Recent Trends and Challenges. *Int J Biol Med Res.* 2, 1204-1210.
- Payne, C., Thomson, A., Stearns, A., Watson, D., Zhang, T., Kingsmore, D., Byrne, D. e Binning, A. (2011). Pharmacokinetics and tissue penetration of vancomycin continuous infusion as prophylaxis for vascular surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 2624-2627.
- Poudyal, A., Howden, B., Bell, J., Gao, W., Owen, R., Turnidge, J., Nation, R. e Li, J. (2008). In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 1311-1318.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. e Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pantheon. Glob. Health.* 109, 309-318.
- PubChem (2022). National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Compound Summary: Vancomycin. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin>. Acesso em 09/03/2022.
- Pryszcz, L., Németh, T., Saus, E., Ksiezopolska, E., Hegedúsová, E., Nosek, J., Wolfe, K., Gacser, A. e Gabaldón, T. (2015). The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen *Candida metapsilosis*. *PLOS Genetics* 12.
- Radwan M., AlQuadeib, B., Siller, L., Wright, M. e Horrocks, B. (2017). Oral administration of amphotericin B nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. *Drug Deliv.* 24, 40-50.
- Raies, A. e Bajic, V. (2016). In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 6, 147-172.
- Rasheed, J., Anderson, G., Yigit, H., Queenan, A., Sánchez, A., Swenson, J., Biddle, J., Ferraro, M., Jacoby, G. e Tenover, F. (2000). Characterization of the Extended-Spectrum β -Lactamase Reference Strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), Which Produces the Novel Enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44.
- Recio, M., Nicolás, M., Potterat, O., Hamburguer, M. e Ríos, J. (2006) Anti-inflammatory and antiallergic activity in vivo of lipophilic Isatis tinctoria extracts and tryptanthrin. *Planta Med.* 72, 539-546.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavalieri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heuer, O., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., Cerero, L., Macgowan, A., Martins, M., Baño, J., Rolain, J., Segovia, C., Sigauque, B., Tacconelli, E., Wellington, E. e Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 6, 22-29.
- Rodrigues, M., Rozental, S., Couceiro, J., Angluster, J., Alviano, C. e Travassos, R. (1997) Identification of N-Acetylneuraminic Acid and Its 9-O-Acetylated Derivative on the Cell Surface of *Cryptococcus neoformans*: Influence on Fungal Phagocytosis. *Infection and Imunity* 65, 4937-4942.
- Rodrigues, M. (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio* 9.
- Rossoni, R., Barbosa, J., Oliveira, F., Oliveira, L., Jorge, A. e Junqueira, J. (2014). Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 29, 1679-1684.
- Rowland, A., Miners, J. e Mackenzie, P. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 45, 1121-1131.

- Rubio, R., Oliveira, H., Rivera, J. e Contador, T. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.*
- Saturnino, R., Machado, N., Lopes, J. e Nepomuceno, J. (2017). Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Drug Chem. Toxicol.*
- Schelz, Z., Molnar, J. e Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77, 279-85.
- Schindler, F. e Zähler, H. (1971) Metabolic products of microorganisms. 91. Tryptanthrin, a tryptophan derived antibiotic from *Candida lipolytica*. *Arch. Mikrobiol.* 79, 187-203.
- Serhan, G., Stack, C., Perrone, G. e Morton, C. (2014). The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13.
- Serna, J., Schutz, G., Eggeling, C. e Cabecauer, M. (2016). There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front. Cell. Dev. Biol.* 4.
- Skaggs, B., Jradi, H., Desai, T. e Morrison, C. (1999). Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J.Clin. Microbiol.* 37, 3332-3337.
- SOLVO Biotechnology. (2021). Wich transporters to study. In: The transporter book. Tátrai, P., Zolnerciks, J., Gáborik, Z., Wilde, R. e Petró, N., eds. (Budapest, SOLVO Biotechnology), pp. 232-233.
- Srivalli, K. e Lakshmi, P. (2012). Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz. J. Pharm. Sci.* 48.
- Stefanakis, M., Touloupakis, E., Anastasopoulos, Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. e Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. ISSN 34, 539-546.
- Sucher, A., Chahine, E. e Balcer, H. (2009). Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann. Pharmacother.* 43, 1647-1657.
- Tripathi, A., Wadia, N., Bindal, D. e Jana, T. (2012). Docking studies on novel alkaloid tryptanthrin and its analogues against enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 49, 435-441.
- Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics* 40, 277–283.
- Viswanathan, V. (2014). Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes* 5, 3-4.
- Wang, Z., Wu, X., Wang, C., Wang, L., Sun, C., Zhang, D., Liu, J., Liang, Y., Tang, D. e Tang, Z. (2018). Tryptanthrin Protects Mice against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis through Inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 Pathways. *Molecules* 23, 1062.
- Wang, X., Mohammad, I., Fan, L., Zhao, Z., Nurunnabi, M., Sallam, M., Wu, J., Chen, Z., Yin, L. e He, W. (2021). Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 11, 2585-2604.
- Yang, R., Wei, T., Goldberg, H., Wang, W., Cullion, K. e Kohane, D. (2017). Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* 29.
- Zhang, X., Xia, J., Zhang, W., Luo, Y., Sun, W. e Zhou, W. (2017). Study on pharmacokinetics and tissue distribution of single dose oral tryptanthrin in Kunming mice by validated reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Integr. Med. Res.* 6, 269-279.
- Zore, G., Thakre, A., Jadhav, S. e Karuppayil, S. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 18, 1181-1190.