



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

MÁRCIO LUAN FERREIRA BARROS

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper*
spp. (Piperaceae)**

Recife
2023

MÁRCIO LUAN FERREIRA BARROS

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper*
spp. (Piperaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Me. Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Barros, Márcio Luan Ferreira.

ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS
DE Piper spp. (Piperaceae) / Márcio Luan Ferreira Barros. - Recife, 2023.
71 : il., tab.

Orientador(a): Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes

Cooorientador(a): Rafael Matos Ximenes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

1. produtos naturais. 2. óleos essenciais. 3. Candida albicans. 4. Galleria
mellonella. I. Mendes, Raudiney Franklin Vasconcelos . (Orientação). II.
Ximenes, Rafael Matos. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MÁRCIO LUAN FERREIRA BARROS

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper*
spp. (Piperaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 19/03/2023

BANCA EXAMINADORA

Me. Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Bárbara de Azevedo Ramos
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado e me agradecer com oportunidades incríveis. Além de ter agregado à minha vida pessoas incríveis que também fizeram parte dessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Propesqi pelo apoio financeiro durante minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador, Me. Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes, pela paciência de me ensinar e explicar metodologias diversas vezes. E também por todo o apoio, conselhos, companhia, ensinamentos e piadas no laboratório, sempre me dando mais forças para continuar o trabalho e tentar novamente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes, por ter me acolhido no Laboratório de Etnofarmacologia e Fitoquímica - ETNO e por ter confiado em mim na execução de diversos projetos. Sou muito grato por todos os aprendizados e oportunidades concedidas.

A banca composta por Me. Raudiney Franklin, Dra. Kêsia Sena e Dra. Bárbara Ramos pelas contribuições no meu trabalho e disponibilidade para avaliá-lo.

As professoras Eulália Ximenes, Adriane Wandeness e Patrícia Vieira, as quais estiveram comigo durante quatro períodos e me ajudaram a crescer como pesquisador e como pessoa. Ao professor Sergio Schenkman por ter tido paciência e compreensão no meu período de estágio. E a todos os outros professores do curso de Biologia que contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais, Márcio Leandro e Eliana Bezerra que se esforçaram bastante para me auxiliar na conquista dos meus objetivos, sem medir esforços para incentivar na minha educação. A minha madrinha Helena da Luz, minha segunda mãe, que sempre está tão próxima a mim me apoiando de todas as formas possíveis. As minhas tias Helba da Luz, Halba da Luz e Hilma da Luz que também me ajudam e torcem por mim. Ao meu irmão Miguel Ferreira que deixa meus dias mais leves. E a toda minha família que não caberia nesse espaço.

À Bárbara Ramos que me ensinou muito do que sei sobre microbiologia e me recebeu tão bem no ETNO. A Henrique Costa Júnior que me ensina desde o primeiro dia que pisei no laboratório e que sempre me ajudou da melhor maneira

possível. A Jackelyne Scherf, Felipe Santana, Betty Dorvigny e Alane Oliveira por tantas conversas descontraídas e científicas, geralmente acompanhadas de café.

Dedico um pedaço especial a todos os meus amigos que compartilharam comigo diversos momentos na faculdade que tornaram a caminhada mais leve, em especial a Ágata Vieira, Alana Rayanne, Bruna Santos, Maria Eduarda, Maria Vitória, Priscyla Leite, Carolina Paiva, Maria Júlia, Igor César, Caio César, Arthur Ivan, Assíria Maria, Atílio Vinicius, João Neto, Rafael Melo e Rafael Padilha. E as amizades que apesar da distância física estão sempre ao meu lado como Eduarda Bandeira, Camila Colombari, Gabriela Pasini, Maria Helena, Marília Gabriela e Mayara Moreira.

Agradeço a todos os professores que tiveram um papel fundamental na minha vida e que têm uma função tão importante na sociedade. Obrigado por fazer esse trabalho árduo de uma maneira exemplar que me motiva a me tornar profissional melhor.

RESUMO

A infecção causada pelo fungo *Candida albicans* é um problema crescente nos últimos anos devido ao aumento da resistência desse patógeno aos antifúngicos utilizados na prática clínica. Uma alternativa nesse tratamento são extratos e óleos essenciais de plantas do gênero *Piper spp.* que são utilizadas pela medicina popular para tratar diversos tipos de infecções. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e a atividade anti-*Candida* do óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* (pimenta-matco), *Piper arboreum* (fruto-de-morcego) e *Piper crassinervium* frente a *Candida albicans* (ATCC MYA-2876). A análise química dos óleos essenciais foi realizada a partir de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sua atividade anti-*Candida* foi avaliada *in vitro* pelo teste de microdiluição seriada e *in vivo* no modelo alternativo de infecção em larvas de *Galleria mellonella*, a partir da avaliação da mortalidade, índice de saúde, melanização, número de hemócitos e de unidades formadoras de colônia. Como controle de tratamento foi utilizado o fluconazol. O composto majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* foi o dilapiol (81%), enquanto em *P. arboreum* foi o germacreno D (18,6%) e o α -pineno (14%) em *P. crassinervium*. O valor da Concentração Inibitória Mínima foi de 64 $\mu\text{g/mL}$ para todos os óleos essenciais e da Concentração Fungicida Mínima de 128 $\mu\text{g/mL}$. Nos experimentos *in vivo*, o inóculo fúngico capaz de matar a maior quantidade de larvas de *Galleria mellonella* em 5 dias foi 9×10^6 UFC por larva, os óleos foram capazes de manter a sobrevivência das larvas em 100% após a infecção por *C. albicans* na concentração de 64 μg por larva. A melanização da hemolinfa e a contagem das unidades formadoras de colônia das larvas tratadas com os óleos essenciais e fluconazol foram menores do que as larvas apenas infectadas. A densidade de hemócitos foi maior nos grupos tratados e menor no grupo não tratado. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. crassinervium* apresentam atividade anti-*Candida*.

Palavras-chave: produtos naturais; óleos essenciais; *Candida albicans*; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Infection caused by the fungus *Candida albicans* is a growing problem in recent years, as resistance of this pathogen to antifungal drugs used in clinical practice is increasing. An alternative in this treatment are extracts and essential oils from plants of the genus *Piper spp.* which are used in folk medicine to treat various types of infections. The aim of this study was to evaluate the chemical composition and anticandidal activity of essential oil from the leaves of *Piper aduncum* (pimenta-matico), *Piper arboreum* (fruto-de-morcego) and *Piper crassinervium* against *Candida albicans* (ATCC MYA-2876). The chemical analysis of the essential oils was carried out using gas chromatography–mass spectrometry, their anticandida activity was evaluated in vitro by the serial microdilution test and in vivo in the alternative infection model of *Galleria mellonella*, based on the evaluation of mortality, health index, melanization, number of hemocytes and colony forming units. Fluconazole was used as treatment control. The major compound in the essential oil of *P. aduncum* was dillapiole (81%), in *P. arboreum* germacrene D (18.6%) and α -pinene (14%) in *P. crassinervium*. The Minimum Inhibitory Concentration value was 64 $\mu\text{g/mL}$ for all essential oils and the Minimum Fungicide Concentration was 128 $\mu\text{g/mL}$. The fungal inoculum capable of killing the highest amount of *Galleria mellonella* larvae in 5 days was 9×10^6 CFU per larvae, the essential oils were able to maintain larval survival at 100% after infection by *C. albicans* at a concentration of 64 μg per larva. Hemolymph melanization and colony-forming unit counts of larvae treated with essential oils and fluconazole were lower than those of larvae that were just infected. Hemocyte density was higher in the treated groups and lower in the untreated group. From the obtained results it is possible to conclude that the essential oils of *P. aduncum*, *P. arboreum* and *P. crassinervium* presents anticandidal activity.

Keywords: natural products; essential oils; *Candida albicans*; *Galleria mellonella*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ciclo de vida de <i>Galleria mellonella</i> .	30
Figura 2 –	Esquema dos grupos de larvas	35
Figura 3 –	Curva de sobrevivência de larvas após infecção com diferentes concentrações de <i>Candida albicans</i> .	43
Figura 4 –	Curva de sobrevivência de larvas após infecção com <i>Candida albicans</i> e tratamentos.	44
Figura 5 –	Curva de sobrevivência de larvas após infecção com <i>Candida albicans</i> e tratamentos.	45
Figura 6 –	Curva de sobrevivência de larvas após infecção com <i>Candida albicans</i> e tratamentos.	45
Figura 7 –	Gráfico de melanização da hemolinfa das larvas 24 horas após infecção.	49
Figura 8 –	Gráfico de contagem de hemócitos por larva 24 horas após infecção.	50
Figura 9 –	Gráfico de contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de <i>Candida albicans</i> das larvas 24 horas após infecção.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Receita da ração utilizada na alimentação das larvas de <i>G. mellonella</i> .	34
Tabela 2 –	Tabela de pontuação atribuída a cada característica para a avaliação do Índice de saúde	36
Tabela 3 –	Composição química dos óleos essenciais das espécies de <i>Piper</i> spp.	38
Tabela 4 –	Sensibilidade da <i>Candida albicans</i> (ATCC MYA-2876) aos óleos essenciais de <i>Piper aduncum</i> , <i>Piper arboreum</i> e <i>Piper crassinervium</i> .	41
Tabela 5 –	Índice de saúde das larvas durante 8 dias após infecção.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm – centímetros

FLUCO – fluconazol

g – grama

h – horas

McF – McFarland

µg – micrograma

mg – miligrama

µL – microlitro

mL – mililitro

OEs – Óleos essenciais

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UTIs – Unidades de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Infecções fúngicas	18
3.1.1	<i>Epidemiologia</i>	18
3.1.2	<i>Candida spp.</i>	19
3.1.3	<i>Terapêutica</i>	21
3.2	Gênero <i>Piper</i> L.	22
3.2.1	<i>Piper aduncum</i>	23
3.2.2	<i>Piper arboreum</i>	26
3.2.3	<i>Piper crassinervium</i>	27
3.3	Produção e desenvolvimento de fármacos antifúngicos	27
3.3.1	<i>Modelos alternativos de infecção para triagem de novos antifúngicos</i>	28
3.3.2	<i>Galleria mellonella</i>	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Material vegetal	33
4.2	Extração dos Óleos Essenciais	33
4.3	Análise química dos Óleos Essenciais	33
4.4	Microrganismos e condições de crescimento	34
4.5	Avaliação da sensibilidade a substâncias antimicrobianas	34
4.6	Larvas de <i>Galleria mellonella</i>	35
4.6.1	<i>Padronização da infecção em larvas de G. mellonella</i>	35
4.6.2	<i>Padronização do tratamento em larvas de G. mellonella</i>	36
4.6.3	<i>Avaliação do Índice de Saúde</i>	37
4.6.4	<i>Avaliação da melanização</i>	37
4.6.5	<i>Quantificação de hemócitos</i>	38

4.6.6	<i>Contabilização das Unidades Formadoras de Colônia</i>	38
4.6.7	<i>Análises estatísticas</i>	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Análise química dos óleos essenciais	39
5.2	Avaliação da sensibilidade a substâncias antimicrobianas	41
5.3	Padronização da infecção em larvas de <i>G. mellonella</i>	43
5.4	Padronização do tratamento em larvas de <i>G. mellonella</i>	44
5.5	Avaliação do Índice de Saúde	46
5.6	Avaliação da melanização	48
5.7	Quantificação de hemócitos	49
5.8	Contabilização das Unidades Formadoras de Colônia	50
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são seres vivos eucariontes que apresentam uma grande variedade no seu ciclo de vida, eles podem ser saprófagos, predadores ou parasitas. Dentre os gêneros com espécies patogênicas, o gênero *Candida* é um de grande importância médica pois representa o equivalente a 65,3% dos isolados de infecções fúngicas no mundo (ROCHA *et al.*, 2021). Nele, se sobressai *Candida albicans*, um microrganismo que reside de maneira comensal nas mucosas humanas, porém, em condições adversas se torna um perigoso patógeno humano. Tais perturbações podem ser causadas por antibióticos, mudanças na microbiota, anormalidades no sistema imune e alterações na integridade da barreira muco-cutânea dos locais habitados por esse microrganismo (LOPES *et al.*, 2022).

As infecções fúngicas causadas por *Candida spp.* são as doenças micóticas invasivas mais comuns entre pessoas imunocomprometidas, pacientes que passaram por procedimentos médicos invasivos ou que precisaram ser internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). *Candida albicans* é uma espécie que se destaca pois representa aproximadamente 51,8% dos isolados de infecções associadas ao ambiente hospitalar na América Latina (ROCHA *et al.*, 2021). Nos Estados Unidos, esse patógeno causa uma mortalidade bruta de aproximadamente 40%, apesar da intervenção medicamentosa (LEE *et al.*, 2021).

Devido ao uso indiscriminado de antifúngicos e a plasticidade gênica de *C. albicans* é crescente o número de isolados fúngicos resistentes a fármacos utilizados na prática clínica. Assim, é urgente a descoberta de novos fármacos antifúngicos, sendo as substâncias de origem vegetal uma opção de partida viável (BEYDA *et al.*, 2012).

O gênero *Piper* é um dos maiores pertencentes à Família Piperaceae, com 2264 espécies distribuídas de maneira pantropical (WFO, 2022). Grande parte das espécies de *Piper* apresenta compostos voláteis, sendo por isso classificadas como plantas aromáticas. Devido a essas características, são bastante utilizadas na culinária e principalmente na medicina popular como analgésico, antitérmico, antiinflamatório e tratar diversas doenças, incluindo infecções gastrointestinais (DA SILVA *et al.*, 2017).

Dentre as espécies desse gênero, a que mais se destaca é a *Piper aduncum* L., pois é a mais utilizada pela medicina popular e já foram comprovadas diversas atividades biológicas como bactericida, fungicida, antiparasitária, moluscicida,

inseticida, repelente, acaricida, antioxidante, antiviral, gastroprotetora, e contra o câncer (DURANT-ARCHIBOLD *et al.*, 2018). Outras espécies utilizadas tradicionalmente são *Piper arboreum* Aubl. e *Piper crassinervium* Kunth que apresentam também atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (LAGO *et al.*, 2004; VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002). Diante disso, os óleos essenciais dessas plantas podem representar uma possível opção no tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação anti-candida dos óleos essenciais das folhas de *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. crassinervium*.
- Determinar as concentrações inibitórias e fungicidas mínimas dos óleos essenciais frente a *Candida albicans*;
- Padronizar a infecção por *Candida albicans* em larvas de *Galleria mellonella*;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vivo* dos óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. crassinervium* utilizando as larvas de *G. mellonella* como hospedeiro;
- Determinar o efeito dos tratamentos com os óleos essenciais nas alterações fisiológicas e fenotípicas ocasionadas pela infecção larvas de *G. mellonella*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Infecções fúngicas

Os fungos são seres vivos eucariontes e quimio-heterotróficos, ou seja, usam compostos orgânicos como fonte de energia e carbono (TORTORA *et al.*, 2017). Estima-se que existam mais de 6 milhões de espécies de fungos no mundo, destas, menos de 1% pode causar infecções em humanos, algumas de maneira superficial, enquanto outras podem levar até a morte (NAGLIK, 2011).

Os fungos patogênicos são extremamente adaptados ao seu alvo de infecção, seja ele um animal vertebrado, invertebrado, planta, ou até microrganismo unicelular, como uma ameba (KÖHLER, 2015). Porém, devido à evolução da homeotermia e endotermia, os mamíferos são altamente resistentes à fungos (CASADEVALL, 2012).

Existem diversas maneiras da infecção ser causada, a depender da maneira de transmissão e mecanismos de virulência, porém, para que ele possa parasitar os humanos ele precisa cumprir alguns requisitos, como crescer na temperatura corporal (37°C), alcançar o tecido que irá se hospedar e ser capaz de absorver os nutrientes, e por fim, resistir ao sistema imune do hospedeiro. Os mecanismos de virulência são formas fisiológicas que permitem aos fungos cumprir os requisitos ditos anteriormente. Na febre, resposta imune do hospedeiro em que há o aumento da temperatura, patógenos pouco resistentes ao calor como *Fusarium spp.* migram para a pele, órgão mais frio do corpo, enquanto fungos adaptados como *Candida spp.* migram em sua fase leveduriforme pela corrente sanguínea para colonizar outros órgãos (KÖHLER, 2015).

Outra característica importante para a patogenicidade é a sua morfologia, a maioria dos fungos infectam tecidos humanos por meio de hifas, porém a habilidade de assumir várias formas é relevante e torna o patógeno mais virulento, além da secreção de enzimas digestivas específicas do tecido onde está hospedado e a eficiência na absorção. Apesar disso, existem fungos que apresentam todas essas características citadas, e ainda assim não suportam a atuação do sistema imune de um hospedeiro imunocompetente (KÖHLER, 2015). Porém, esses mesmos fungos podem causar infecções graves em pessoas imunossuprimidas, como por exemplo pacientes que fazem quimioterapia e pessoas com HIV (PEYCLIT *et al.*, 2021).

3.1.1 Epidemiologia

Todos os anos, os fungos infectam milhões de pessoas e causam a morte de aproximadamente 1,5 milhão de indivíduos, número que pode ser comparado à taxa de mortalidade de outras doenças mais evidentes, como tuberculose e malária (FISHER *et al.*, 2018). Apenas nos Estados Unidos, estima-se que mais de 7,2 bilhões de dólares são gastos anualmente no tratamento de infecções fúngicas (BENEDICT *et al.*, 2019). Apesar desse grande impacto na saúde humana mundial, eles continuam sendo relativamente negligenciados. Nas últimas décadas houve um crescimento na prevalência de infecções sérias causadas por fungos devido ao aumento no número de pessoas imunossuprimidas, como pacientes com câncer, pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), receptores de órgãos transplantados e a população idosa (ENOCH *et al.*, 2017).

Os principais patógenos de infecções fúngicas graves são espécies dos gêneros *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Fusarium spp.* (SILVA *et al.*, 2020). Dentre eles, as espécies de *Candida* são as principais causas de infecções micóticas invasivas em pacientes imunocomprometidos que passaram por procedimentos médicos invasivos ou que precisaram ser internados em UTIs (PFALLER *et al.*, 2019). Na América Latina, *C. albicans* representa 51,8% dos isolados, seguido por *C. tropicalis* com 13,2% e *C. glabrata* com 7,2% (ROCHA *et al.*, 2021).

A candidíase é um termo generalista, que engloba desde infecções superficiais, até infecções invasivas causadas por *Candida spp.* (HANI *et al.*, 2015; PAPPAS *et al.*, 2018). As infecções superficiais, como por exemplo a oral, genital, anal, e intrauterina representam 70% das infecções que atingem humanos, e apesar de geralmente não causarem mortalidade, elas configuram um nível considerável de morbidade (LEMOS *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2014). Já a candidemia ocorre quando a infecção causada por esse patógeno atinge a corrente sanguínea, ela apresenta um índice de mortalidade de 60% em 30 dias, quando causada por choque séptico esse valor chega a 90%, porém essa taxa depende de diversos fatores, como idade, presença de cateter e a escolha do tratamento adequado (KLINGSPOR *et al.*, 2015).

3.1.2 *Candida spp.*

Dentre os filos do Reino Fungi, o Ascomycota é o que apresenta a maior quantidade de espécies e contém os patógenos mais bem-sucedidos em infectar humanos. O gênero *Candida* é responsável pela maioria das infecções fúngicas em humanos, nele destaca-se o causador de doenças oportunistas, *Candida albicans*, as espécies emergentes *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e os fungos multirresistentes a drogas, *C. glabrata*, e *C. auris* (LOPES e LIONAKIS, 2022).

C. albicans é um fungo pleomórfico, ou seja, apresenta a habilidade de mudar sua morfologia de maneira reversível entre a forma leveduriforme e filamentosa (JUNG *et al.*, 2017). A transição de hifa para levedura ocorre a fim de colonizar outras áreas do seu hospedeiro, enquanto o oposto, para penetrar as barreiras de defesa e ganhar acesso a tecidos mais profundos (DESAI, 2018).

Ele é normalmente encontrado em superfícies mucosas da cavidade oral e trato gastrointestinal, urogenital e respiratório (DADAR *et al.*, 2018). Ele está presente nesses locais de uma maneira comensal, porém após perturbações em sua integridade ou ação do sistema imunológico eles podem migrar pelo epitélio em regiões profundas e causar infecções graves (WHALEY *et al.*, 2017). Além disso, alterações no sistema imunológico como prematuridade, envelhecimento e doenças degenerativas são capazes de causar desequilíbrio entre o organismo e esses microrganismos, ocasionando uma infecção (PEREIRA *et al.*, 2020).

A parede celular desse fungo é constituída por glicanas, quitina e proteínas, e é responsável por proteger o patógeno em diversas condições, como por exemplo mudança na pressão osmótica e na temperatura, desidratação e proteção contra o sistema imune do hospedeiro, além de apresentar proteínas essenciais para a adesão no tecido (TALAPKO *et al.*, 2021). A membrana celular é uma estrutura importante para a comunicação entre células e com o exterior, nela, estão presentes os esteróis que concedem rigidez, estabilidade e resistência contra estresses físicos (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020). Dentre eles, o mais característico presente na membrana fúngica é o ergosterol, e por isso é o principal alvo de alguns antifúngicos (JORDÁ e PUIG, 2020).

A infecção causada por esse fungo só é possível devido à sua característica pleiomórfica, visto que a ocorrência da candidíase está atrelada a uma toxina produzida apenas na fase hifal, a candidalisina (HANAOKA; DOMAE, 2021). Esse peptídeo contribui com a instalação de uma infecção sistêmica e mortalidade, pois é capaz de afetar a membrana epitelial do tecido por meio da intercalação,

permeabilização e criação de poros nas células teciduais, levando à apoptose (KÖNIG, 2020). Outro fator que contribui para a patogenicidade de *C. albicans* é a expressão de proteínas importantes para a adesão, invasão em tecidos e a formação de biofilme.

A maioria das infecções causadas por *C. albicans* estão relacionadas com a criação de biofilme em superfícies abióticas, como implantes e cateteres, ou teciduais que levam à uma alta morbimortalidade (TSUI *et al.*, 2016). O biofilme é uma estrutura complexa caracterizada como o aglomerado de microrganismos numa superfície que produzem uma substância polimérica extracelular (EPS), essa matriz extracelular funciona como uma barreira física, dificultando a ação do sistema imune do hospedeiro e de drogas, além de facilitar o suprimento de água, ar e nutrientes (MCCALL *et al.*, 2019). Apesar disso, mesmo que as infecções sejam associadas à biofilme, ainda são tratadas de forma convencional na clínica, onde se faz o uso de antifúngicos padrões.

3.1.3 Terapêutica

Os polienos são os fármacos mais antigos utilizados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, dentre eles destaca-se a anfotericina B, que atua em um amplo espectro de fungos, inclusive espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (ROBBINS *et al.*, 2016). Ela forma agregados extramembranares que extraem o ergosterol, um constituinte chave das membranas celulares fúngicas. Apesar disso, atualmente ela não é muito utilizada, visto que apresenta baixa biodisponibilidade oral e efeito tóxico de uma maneira dose dependente devido à similaridade entre ergosterol e colesterol (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2010).

Na década de 1980 foram introduzidos os azóis, classe fungistática mais popular nas práticas clínicas no tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida spp.* Eles são compostos sintéticos que atuam inibindo a esterol 14- α -demetilase, bloqueando a síntese de ergosterol, por consequência causando instabilidade na membrana celular e alterando sua permeabilidade e a função de algumas enzimas (PERFECT, 2017; NOCUA-BAÉZ *et al.*, 2020).

Em contraste às outras classes de antifúngicos, a maioria dos azóis podem ser administrados via intravenosa ou oral. No entanto, eles possuem alto potencial de interação com outros fármacos e podem inibir as citocromo P450, enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos (ROEMER e KRYSAN, 2014). Apesar

disso, já estão sendo desenvolvidos novos antifúngicos dessa classe com maior especificidade por enzimas fúngicas (WIEDERHOL *et al.*, 2018).

Além disso, elas apresentam atividade fungistática, ou seja, apenas inibem o crescimento desses patógenos sem matá-los, promovendo a resistência a esses fármacos (LEE *et al.*, 2021). O antifúngico que se destaca nesse grupo é o fluconazol, que geralmente é capaz de tratar infecções causadas por *C. albicans*, porém, devido a sua característica fungistática ele tende a permanecer no organismo por longos períodos em concentrações subterapêuticas, levando a um aumento na resistência dessa espécie a esse fármaco (SOBEL *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2021). Devido ao uso desnecessário em combinações de medicamentos e sua utilização por longos períodos de tempo, há um aumento nas taxas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol e outros triazóis, como voriconazol e itraconazol.

Nos últimos anos, uma classe de antifúngicos que passou a fazer parte da prática clínica foram as equinocandinas, fármacos que atuam de maneira fungicida contra *C. albicans* (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022). Elas inibem a β -1,3-d-glucana sintase, enzima importante na construção da parede da celular fúngica, causando um desbalanceamento na pressão osmótica (LETSCHER-BRU e HERBRECHT, 2003).

Elas são fármacos seguros, com atividade seletiva contra fungos e apresentam um baixo potencial de interação com outros medicamentos (PATIL; MAJUMDAR, 2017). Entretanto, sua administração é restrita à via intravenosa, visto que sua absorção pela via oral é muito baixa (DENNING, 2003). Além disso, *C. albicans* vem demonstrando um alto nível de resistência cruzada a essa classe de fármacos devido a plasticidade genômica dessa espécie de fungo (PRISTOV *et al.*, 2019). Portanto, é essencial a descoberta de novos compostos capazes de tratar a infecção causada por *C. albicans*.

Devido ao potencial de interação com as membranas fúngicas e a grande diversidade química, as plantas medicinais, representam uma fonte de substâncias que podem ser utilizadas no tratamento dessas infecções (KHAN *et al.*, 2017). Os óleos essenciais apresentam diversas qualidades, como por exemplo, baixa toxicidade, facilidade de biodegradação, e são mais ecológicos quando comparados a fármacos utilizados na prática clínica, além disso já apresentaram diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, o que os

torna uma opção viável no tratamento de diversos patógenos, incluindo *C. albicans* (SHALA *et al.*, 2022).

3.2 Gênero *Piper* L.

Piper L. é um gênero importante de angiospermas basais que pertence à família Piperaceae (SOLTIS *et al.*, 1999). Ele apresenta 2264 espécies aceitas, cuja a mais conhecida é a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) (COSTA *et al.*, 2021). Elas podem ser subarbustos, arbustos ou arvoretas, variando entre 1 e 10 metros de altura, apresenta folhas alternas com morfologia e tamanhos variáveis e inflorescências em espigas, racemo ou umbela (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Esse grupo é amplamente distribuído na região neotropical e tem apresentam um elevado valor de riqueza nas encostas da Cordilheira dos Andes, nas planícies da América Central e na Amazônia Central (MARTÍNEZ *et al.*, 2015). As plantas que fazem parte desse gênero são classificadas como plantas aromáticas devido à presença de compostos voláteis em suas folhas, substâncias que evaporam facilmente em condições normais de pressão e temperatura (GUTIERREZ *et al.*, 2013). Tais compostos estão presentes na maioria das espécies de *Piper* spp. em células especializadas que armazenam óleo em seus tecidos (GREIG, 2004).

Devido a essa característica, são utilizadas como condimento, além de estarem presente em rituais místicos e culturais e fazer parte da medicina tradicional de diversos grupos (DA SILVA *et al.*, 2017). Seu vasto uso na medicina popular dá-se à presença de diversos metabólitos identificados nesse gênero, como alcaloides, flavonoides, terpenos, ácidos benzoicos e outros (PEREIRA *et al.*, 2020).

A partir de estudos farmacológicos, diversas atividades biológicas de extratos provenientes de plantas desse gênero já foram comprovadas cientificamente, como por exemplo atividade antibacteriana e antifúngica de *P. nigrum* L., *P. wallichii* (Miq.) Hand. -Mazz., *P. sancti-felicitis* Trel., *P. reticulatum* L., *P. casapiense* (Miq.) C. DC. (ZAHIN *et al.*, 2021; NONGMAI *et al.*, 2022; RUIZ-VÁSQUEZ, *et al.*, 2022), antiprotozoários de *P. angustifolium* Ruiz & Pav., *P. lucaeanum* Kunth., *P. claussonianum* (Miq.) (BOSQUIROLI *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2015) e anti-inflamatória de *P. gaudichaudianum* Kunth., *P. mikanianum* Kunth. e *P. crocatum* Ruiz & Pav. (SOARES *et al.*, 2022; GONG *et al.* 2021).

3.2.1 *Piper aduncum*

Conhecida popularmente como aperta-ruão, erva-de-jaboti, erva-de-soldado, jaborandi-do-mato, matico, matico-falso, pimenta-de-folha-larga, pimenta de fruto-ganchoso, pimenta-matico e tapa-buraco, *Piper aduncum* L. é uma planta nativa do Brasil (PECKOLT; PECKOLT, 2016). Ela apresenta forma de vida de arbusto ou arvoreta e tem entre 1,5 e 8 metros de altura, suas folhas têm morfologias diversas e sua nervação é do tipo eucamptódroma, a espiga apresenta curvatura, suas flores tem 4 estames e ovário com estilete diminuto ou ausente, o fruto é obovoide, tri ou tetragonal e não é achatado lateralmente (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Ela está distribuída em todos estados brasileiros, com exceção de Sergipe e está presente nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (GUIMARÃES *et al.*, 2020). Dentre as espécies do gênero, *P. aduncum* é a mais usada com fins medicinais, estando presente na medicina popular de diversos países (DURANT-ARCHIBOLD *et al.*, 2018).

Na Nova Guiné, seus extratos são utilizados para tratar picadas de insetos, cortes, dor de dente, diarreia, problemas respiratórios, dor de cabeça e infecções fúngicas (SIGES *et al.*, 2005), enquanto na Indonésia, ela é usada no tratamento de queimaduras (LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT *et al.*, 2002). No Peru, é empregada como antisséptico, adstringente e no tratamento de doenças reumáticas, febre e infecções generalizadas (KLOUCEK *et al.*, 2005), além de ser utilizada para disenteria na Colômbia (DIAZ *et al.*, 1984).

Seu uso na medicina popular brasileira é bastante vasto, suas folhas são utilizadas no tratamento de dores intestinais, estomacais, inflamações ginecológicas e renais, erisipela, cistite e na cicatrização de feridas (VIEIRA *et al.*, 1991; VANDERBERG *et al.*, 1993; COIMBRA *et al.*, 1994; DE ALMEIDA *et al.*, 2009). Seu fruto também é usado como hemostático e antimicrobiano no Brasil (SCHULTES e RAFFAUF *et al.*, 1990), enquanto em Honduras como analgésico, no tratamento de distúrbios ginecológicos, problemas digestivos e na limpeza de pele (LENTZ *et al.*, 1998).

Estudos já comprovaram diversas atividades de extratos, óleos ou compostos isolados de *P. aduncum*, como a ação gastroprotetora e antissecretória de extratos etanólicos da folha (ARROYO *et al.*, 2013), antioxidante do óleo essencial (RODRÍGUEZ *et al.*, 2013), citoprotetora de extratos metanólicos de suas folhas (HERRERA-CALDERON *et al.*, 2019), anti-inflamatória do dilapiol, principal

composto do óleo essencial dessa planta, (PARISE-FILHO *et al.*, 2011; THAO *et al.*, 2016). Além disso, já foi desenvolvido um hidrogel carreador de dilapiol para a transferência da substância para a pele (CARNEIRO *et al.*, 2022) e um método para quantificar o dilapiol em amostras de pele (CARNEIRO *et al.*, 2023).

A atividade dessa planta contra parasitas também é bastante evidente, o extrato das suas folhas utilizando diclorometano apresentou atividade contra *Schistosoma mansoni* (CARRARA *et al.*, 2014). Acardamonina, uma chalcona extraída de *P. aduncum*, foi eficaz na inibição da ATP difosfohidrolase, enzima envolvidas na virulência deste trematódeo (DE CASTRO *et al.*, 2015). O linalool, um constituinte do óleo essencial dessa planta, apresenta atividade contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (VILLAMIZAR *et al.*, 2017), e os ácidos benzoicos prenilados derivados dela foram eficientes contra *Leishmania braziliensis* e moderadamente eficientes contra *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum* (FLORES *et al.*, 2009), seu óleo essencial apresentou uma boa atividade contra uma cepa de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (VALADEAU *et al.*, 2009) e contra ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, nematoda que causa uma verminose que afeta ovinos e caprinos, sensíveis e resistentes a benzimidazol e ivermectina (GAÍNZA *et al.*, 2016).

A 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC), substância purificada do extrato diclorometano de inflorescências de *P. aduncum*, apresentou toxicidade seletiva contra as fases promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis* (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999), esse efeito foi ainda maior após a encapsulação utilizando nanopartículas poliméricas (TORRES-SANTO *et al.*, 1999). O dilapiol e dois derivados fenilpropanólicos também foram eficazes contra *L. amazonenses* (PARISE-FILHO *et al.*, 2012), o nerolidol, constituinte do óleo essencial dessa planta foi capaz de inibir o crescimento de *L. braziliensis* em sua fase promastigota por meio da redução do tamanho celular, perda do potencial de membrana em suas mitocôndrias e degradação do DNA (CEOLE *et al.*, 2017).

Outra atividade apresentada por essa planta é sua utilização como agente antiviral, seu extrato metanólico foi ativo contra Poliovírus, vírus causador da poliomielite (LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT *et al.*, 2002), porém apresentou atividade considerada fraca contra o vírus da dengue (SILVA-TRUJILLO *et al.*, 2022). Cápsulas contendo extrato etanólico de *P. aduncum* foram capazes de diminuir o adenocarcinoma e a incidência de metástase em gânglios linfáticos em ratos com o

câncer de mama induzido por dimetilbenzantraceno (ARROYO-ACEVEDO *et al.*, 2015).

Essa planta também foi ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, seu óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* multirresistente e teve efeito sinérgico com os antibióticos (DA SILVA *et al.* 2020), o extrato bruto apresentou uma forte atividade bactericida contra células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (RUIZ *et al.*, 2013) e o extrato das folhas usando 50% de etanol foi ativo contra cepas clínicas de *Neisseria gonorrhoeae* (CÁCERES *et al.*, 1995).

A sua atividade antifúngica foi comprovada a partir de estudos que utilizaram extratos metanólicos das folhas de *P. aduncum* contra *Candida albicans* e obtiveram o valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1.25 mg/mL (BRAGA *et al.*, 2007), o extrato metanólico das folhas apresentou inibição na formação de micélio de *Fusarium oxysporum* (CÁRDENAS-LAVERDE *et al.*, 2021). O óleo essencial das folhas e inflorescência desta planta também apresentou inibição contra a formação do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo fitopatogênico que causa o mofo branco (VALADARES *et al.*, 2018).

3.2.2 *Piper arboreum*

Piper arboreum Aubl. é um arbusto terrícola que é conhecido popularmente como fruto-de-morcego, jaborandi-do-rio, jaborandi-falso, nhaborandi, pahim, pani, pimenta-do-mato, pimenta-dos-índios ou pimenteira (PIO CÔRREA, 1984). Seus arbustos apresentam entre 1 e 4 metros e suas folhas têm formato variado de nervação do tipo eucamptódroma ou broquidódroma, tem espiga ereta e flores com 4 estames, estilete curto ou ausente, e fruto oblongo, glabro e lateralmente achatado (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Ela é endêmica no Brasil e apresenta uma distribuição nos domínios: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e está presente em todos os estados brasileiros, com exceção do Maranhão e Rio Grande do Norte (GUIMARÃES *et al.*, 2020). Seu uso na medicina tradicional é vasto, sendo utilizado para tratar infecções sexualmente transmissíveis, bronquite, dores hepáticas, infecção urinária, problemas reumáticos e é empregado como antifisético, sedativo e antiofídico (DURANT-ARCHIBOLD *et al.*, 2018).

Os extratos dessa planta já demonstraram atividade anti-inflamatória (FINATO *et al.*, 2018), citotóxica contra células de carcinoma oral (MACEDO *et al.*, 2019) e citostática contra 6 linhagens de células tumorais (TAYLOR *et al.*, 2013), e foi capaz de neutralizar a hemorragia causada pelo veneno da serpente *Bothrops atrox* em 25% (OTERO *et al.*, 2000). Ele também apresentou atividade antiparasitária contra larvas, cercárias e vermes adultos de *S.mansoni* (DA SILVA ALVES *et al.*, 2020).

Sua atividade antimicrobiana foi comprovada contra *S. aureus*, *Escherichia coli* (SILVA *et al.*, 2019) e apresentou efeito sinérgico com antibióticos contra *S. aureus* resistente à meticilina (VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002), amidas extraídas das suas folhas apresentaram efeito antifúngico contra *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002). Devido a essas características, foi realizada uma caracterização química que apontou óxido de cariofileno como composto majoritário (30,5%), e testado o potencial antimicrobiano de um enxaguante bucal utilizando o óleo essencial de *P. arboreum* (MATIAS *et al.*, 2022).

3.2.3 *Piper crassinervium*

Piper crassinervium Kunth é um arbusto terrícola nativo do Brasil que varia entre 1 e 3 metros de altura, apresenta folhas com formatos variados, nervação eucamptódroma, espiga ereta na área de frutificação com brácteas triangulares e subpeltadas, flores com 4 estames, ovário e estilete longos e fruto globoso-obovoide (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Essa espécie é nativa do Brasil e está distribuída por todas as regiões, ela está presente nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (GUIMARÃES *et al.*, 2020).;

O caule e as folhas dessa espécie são utilizados na medicina popular para tratar diabetes, gastrite e problemas prostáticos (VALAREZO *et al.*, 2020). O extrato metanólico das folhas apresentou atividade de inibição da α -amilase, porém não contra a α -glicosidase, ambas enzimas digestivas relacionadas com a Diabetes Mellitus tipo II (JARAMILLO-FIERRO; OJEDA-RIASCOS, 2018). Além disso, também foi comprovada sua atividade antioxidante a partir de hidroquinonas preniladas isoladas do fruto dessa planta (YAMAGUCHI *et al.*, 2006).

Ela também apresentou um amplo espectro no combate à parasitas, como o *T. cruzi* (LOPES *et al.*, 2008), causador da Doença de Chagas, *P. falciparum*, o causador da malária, e as espécies *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. donovani*

(VÁSQUEZ-OCMÍN *et al.*, 2022), causadoras da Leishmaniose. O ácido crassinérvico, ácido benzóico, compostos análogos a eles, e os flavonoides naringenina 4'-metil éter e sakuranetina derivados das folhas também foram capazes de inibir o crescimento de fungos como *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (LAGO *et al.*, 2004; DANELUTTE *et al.*, 2003; CHAKOR *et al.*, 2012).

3.3 Produção e desenvolvimento de fármacos antifúngicos

O número de compostos que apresentam atividade antifúngica é menor quando comparados com os antibacterianos visto que os fungos são seres eucarióticos que parasitam outros eucariotos. Devido a essas características há uma dificuldade na produção de novos fármacos que sejam seguros e que apresentem um amplo espectro de atividade (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Um dos maiores problemas relacionados à antifúngicos é a prevalência da resistência cruzada aos fármacos, ou seja, o fungo apresenta resistência a 2 ou mais fármacos diferentes. Isso acontece porque os fármacos apresentam o mesmo alvo celular, geralmente esse alvo é o ergosterol, um esteroide análogo ao colesterol, ou a biossíntese de 1,3- β -D-glucana, um polissacarídeo específico da parede celular dos fungos (ROBBINS *et al.*, 2016). Devido a isso, já foi documentado em laboratório e em isolados clínicos cepas resistentes a todos os antifúngicos usados na prática clínica (SHAPIRO *et al.*, 2011).

A produção e o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos é desafiante, e por isso não houve avanços significativos recentemente na terapêutica contra fungos, desde o início do século XXI apenas as equinocandinas e o isavuconazol (um triazol) foram aprovadas no tratamento de infecções fúngicas (CUI *et al.*, 2022). No entanto, nos últimos anos ocorreram diversas descobertas de compostos e preparações botânicas que apresentam atividade contra fatores de virulência de *Candida albicans*, por isso, representam uma possível alternativa no tratamento dessas infecções (BU *et al.*, 2022).

3.3.1 Modelos alternativos de infecção para triagem de novos antifúngicos

Devido à característica pleiomórfica da *Candida albicans*, a realização de experimentos *in vitro* não são o suficiente para caracterizar um composto como viável no tratamento de infecção visto que nesses experimentos ela tende a se manter na sua forma leveduriforme, enquanto no organismo há também a forma de hifa (HOHL, 2014). O modelo murino é o padrão ouro nos experimentos *in vivo*

envolvendo fungos, porém sua utilização apresenta diversas desvantagens, como problemas éticos, custo de manutenção elevado e treinamento especializado. Além disso, alguns modelos de infecção podem causar sepse aguda e alterações fisiológicas nesses animais, provocando dor e desconforto, dessa forma é fundamental a utilização de modelos alternativos de infecção (JORJÃO *et al.*, 2018; MOYA-ANDÉRICO *et al.*, 2021; SCORZONI *et al.*, 2017).

Dentre os principais modelos alternativos estão presentes a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), o nematóide *Caenorhabditis elegans*, e larvas de *Galleria mellonella*, conhecidas popularmente como traça-da-cera (SEGAL; FRENKEL, 2018). A mosca-das-frutas, ou *Drosophila melanogaster*, é o modelo não mamífero mais antigo a ser utilizado em pesquisas biológicas e médicas. É um inseto de aproximadamente 3 mm de comprimento, que apresenta um ciclo de vida de apenas duas semanas e representa um modelo acessível, fácil de ser mantido em grandes quantidades e que já possui o genoma completamente sequenciado (LIONAKIS, 2011).

Sua utilização em experimentos de virulência e de atividade antifúngica de compostos contra *C. albicans* é bastante evidente pois estudos mostraram que diversas cepas apresentaram virulências similares no modelo alternativo e no modelo murino, o que torna possível a sua comparação (GLITTENBERG *et al.*, 2011). Apesar disso, esse modelo apresenta limitações visto que ele não apresenta sistema imune adaptativo, anticorpos, células NK, dendríticas e citocinas que apresentam uma tarefa primordial na resposta imune humana, dessa forma, *D. melanogaster* não pode ser utilizada para infecções teciduais fúngicas específicas em humanos (ARVANITIS *et al.*, 2013).

Em experimentos, são utilizadas moscas deficientes para o gene Toll, visto que as selvagens apresentam resistência a maioria das infecções fúngicas, essas moscas podem ser infectadas por meio de microinjeção, borrifamento direto de esporos e ingestão (JUNQUEIRA, 2012). Já a administração de compostos antifúngicos pode ocorrer via oral ou por microinjeção, porém a via injetável necessita de equipamento especial e técnica (HAMILOS *et al.*, 2012).

Outro modelo alternativo bastante utilizado é o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, ele apresenta aproximadamente 1 mm de comprimento e é encontrado no solo de ambientes temperados, sendo estudado desde 1974 (SULSTON e BRENNER, 1974). Ele já foi utilizado na descoberta de substâncias

antimicrobianas (EWBANK; ZUGASTI, 2011), estudos de defesa imune contra fungos (PUKKILA-WORLEY *et al.*, 2014) e eficiência de fármacos antifúngicos contra diversas espécies de leveduras (SCORZONI *et al.*, 2013).

Ele apresenta diversas vantagens, como ter um ciclo de vida curto, e uma fisiologia simples, gerar descendência idêntica, por ser hermafrodita auto-fertilizante, tem o genoma completamente sequenciado e já foram feitos mutantes. Além disso, é um modelo barato e de fácil manutenção que pode ser armazenado congelado por longos períodos de tempo sem perder a sua viabilidade (FIRE *et al.*, 1998). Apesar disso, ele só possui sistema imune inato e não consegue crescer na temperatura corporal humana (37°C), o que impossibilita a substituição do modelo mamífero (EWBANK; PUJOL, 2016).

Esse nematoide geralmente é crescido em placas de Petri contendo meio de cultivo com *Escherichia coli* OP50, sua fonte de alimento. Em experimentos essa bactéria é substituída por fungos para que a infecção ocorra (MUHAMMED *et al.*, 2012). Devido a essa forma de infecção não é possível calcular quanto de inóculo cada verme ingeriu, porém é inviável injetar o fungo com uma seringa devido a seu tamanho reduzido (ARVANITIS *et al.*, 2013).

3.3.2 *Galleria mellonella*

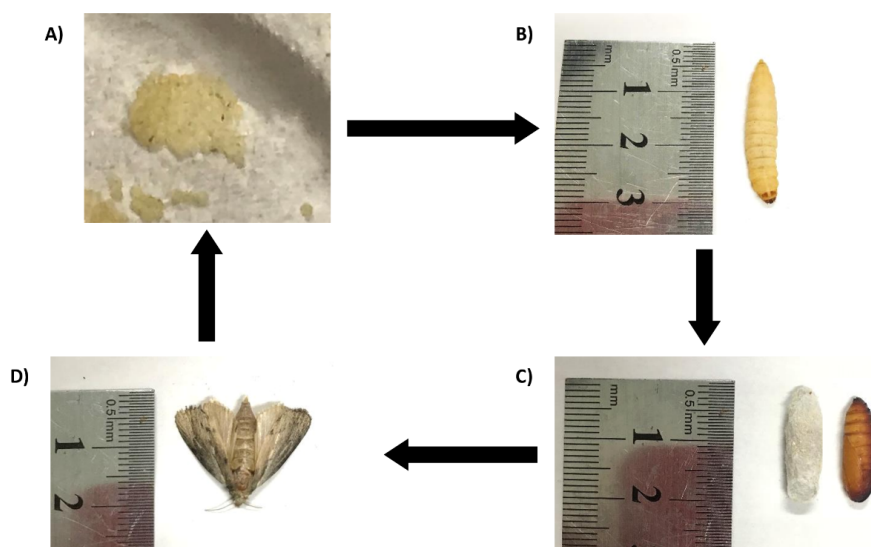
Galleria mellonella é um inseto da ordem Lepidoptera que faz parte da família Pyralidae. Essa mariposa é conhecida popularmente como traça-da-cera ou traça da colmeia, visto que é considerada uma peste que destrói colmeias de abelha devido à sua rápida reprodução e consumo de cera, pólen e mel (KWADHA *et al.*, 2017). Apesar disso, ela vem sendo cada vez mais utilizada pela comunidade científica em estudos preliminares envolvendo toxicidade de substâncias, avaliação de virulência de fungos e bactérias e atividade antimicrobiana de compostos que apresentam atividade *in vitro* (SEGAL; FRENKEL, 2018).

Esse modelo apresenta baixo custo e facilidade de manutenção, o que o torna bastante atrativo quando comparado com o modelo murino. Além disso, elas suportam um amplo espectro de temperatura, inclusive 37 °C, a temperatura que representa as condições ótimas de virulência de patógenos humanos, e por ser um modelo invertebrado não envolve questões éticas (SINGULANI *et al.*, 2018). Sua população apresenta dimorfismo sexual e quatro estágios de vida: ovos, larva, pupa e mariposa (Figura 1), seu ciclo de vida pode durar de semanas a meses,

dependendo de fatores como temperatura, umidade e qualidade da ração (KRAMS *et al.*, 2015).

Em experimentos utilizando patógenos, como fungos e bactérias, as larvas podem ser infectadas como inóculo por via oral, porém a mais comum é a partir da injeção de 10 microlitros do inóculo na última protopata utilizando uma seringa KAVANAGH; SHEEHAN, 2018). Dessa forma, o patógeno se difunde pela hemolinfa e penetra os tecidos da larva, estimulando o seu sistema imune.

Figura 1: Ciclo de vida de *Galleria mellonella*..



Fonte: o autor (2023). A) fase de ovos; B) fase larval; C) fase de formação de casulo e pupa; D) mariposa (fase reprodutiva).

Os hemócitos são as células envolvidas no mecanismo de defesas contra patógenos e são capazes de reconhecer as ameaças ao organismo e atuar por meio da fagocitose, encapsulação ou formação de nódulos (BROWNE *et al.*, 2013). Seis tipos de hemócitos estão presentes em *G. mellonella* (pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, coagulócitos, esferulócitos e oenocitóides) e agem de maneira similar às células imunes humanas contra patógenos. Além disso, essas larvas também produzem melanina a fim de encapsular o patógeno, causando a coagulação da hemolinfa e opsonização, levando ao surgimento de pontos pretos ou causando a completa pigmentação da larva (TSAI *et al.*, 2016).

Devido a isso, suas larvas já foram utilizadas como modelo alternativo de infecção para diferentes fungos, como *Candida albicans* (LU *et al.*, 2019; WANI *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2020), *Candida glabrata* (AMES *et al.*, 2017), *Cryptococcus neoformans* (DE CASTRO SPADARI *et al.*, 2020) e *Aspergillus fumigatus*

(GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2014; LE PAPE *et al.*, 2019). Entretanto, os detalhes dos genes envolvidos na resposta imune de *Galleria mellonella* ainda não são bem estabelecidos, visto que a primeira sequência genômica desse inseto só foi publicada recentemente (LANGE *et al.*, 2018). Além disso, ainda não há geração de cepas mutantes, o que já foi possível em outros insetos que também são modelos alternativos (YAMAMOTO *et al.*, 2014; KAWAMURA; MARUYAMA, 2019) e seu curto período de vida impossibilita o estudo de processos associados a infecções crônicas (JORJÃO *et al.*, 2018)

Na última década houve um aumento expressivo no uso de *Galleria mellonella* como modelo alternativo de infecções fúngicas numa ordem entre 5-10 vezes no PubMed, plataforma de busca da National Library of Medicine. Enquanto nos últimos 5 anos o principal foco foi validar a virulência e seus fatores associados à fungos de importância médica, outras áreas que se destacaram foram a investigação de funções imunes antifúngicas e a descoberta e avaliação de novos agentes farmacêuticos com capacidade antifúngica (SMITH *et al.*, 2021). Isso demonstra que apesar de alguns mecanismos ainda serem desconhecidos, as larvas são um modelo alternativo de infecção viável para o entendimento de fatores de virulência de diferentes cepas e espécies de fungos de importância médica, além de analisar a eficiência de substâncias antifúngicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

No período de janeiro a junho de 2018 foram coletadas, no Campus da Universidade de São Paulo, as folhas das três plantas pertencentes ao gênero *Piper*: *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium* por pesquisadores do Laboratório de Química da Universidade de São Paulo (USP). As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade de São Paulo (USP) para a identificação sob os números de tombamento: K-0057, K-0053, K-0091 para *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium*, respectivamente. Todas as coletas foram realizadas sob a licença nº 59161-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade-SISBIO.

4.2 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) foram extraídos por parceiros do Laboratório de Química da USP utilizando folhas frescas de cada espécie. Foi realizada uma hidrodestilação no aparelho de Clevenger por 4 h, utilizando entre 300-500 g de folhas frescas em 500 mL de água destilada (GHAVAM *et al.*, 2021; KHRUENGSAI *et al.*, 2021). Os OEs foram coletados e combinados com sulfato de sódio anidro para a remoção de água e armazenados em frascos âmbar no refrigerador a 4°C até a execução dos experimentos.

4.3 Análise química dos óleos essenciais

As amostras de OEs foram diluídas 20 vezes em acetato de etila e analisadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, equipado com uma coluna HP-5ms (comprimento 30 m, ID 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) usando hélio como um gás de arraste (1,55 mL/min) e 1 µL de cada amostra foi injetado a 250 °C em modo split (1:20). A temperatura do detector foi ajustada em 260 °C com energia de ionização por impacto de elétrons de 70 eV e uma faixa de varredura de m/z 35-400 Da e 2500 espectros por segundo. A temperatura do forno foi ajustada em 40 °C por 2 min, e em seguida aumentada em 5 °C/min até 260 °C e mantida por 2 min. Os picos de compostos voláteis individuais foram identificados usando traços de íons extraídos de três íons de referência específicos e quantificados pela área de pico do traço de íons mais abundante por composto usando um método de análise personalizado no software GC-MS Postrun

Analysis (Shimadzu). A % relativa de cada composto foi calculada comparando a % da área do pico em relação à soma total das áreas dos picos dentro de uma amostra. A identificação dos compostos foi realizada pelo cálculo dos índices de retenção aritmética (RIs) em relação a uma série de padrões de n-alcenos (C8-C40, Supelco) injetados usando o mesmo método utilizado para amostras (Van Den Dool ; Kratz, 1963). Os espectros de massa dos compostos e os RIs foram comparados com os disponíveis nas bases de dados de Adams e Wiley (Adams, 2007), em estudos anteriores destas espécies de *Piper*, e confirmados por comparação com padrões autênticos, quando disponíveis.

4.4 Microrganismo e condições de crescimento

Foi utilizado o fungo dimórfico *Candida albicans* (ATCC MYA-2876). A cultura foi crescida em Ágar Sabouraud a 37 °C por 24 h e armazenada a 20 °C negativos em Caldo Sabouraud com glicerol (15%) para a manutenção da cepa. Para a reativação, ela foi crescida em caldo Sabouraud com adição de glicose a 5% por 24 h a 37 °C.

4.5 Avaliação da sensibilidade às substâncias antimicrobianas

A avaliação da sensibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em série, conforme descrito pelo EUCAST (2017). A sensibilidade da cepa de *C. albicans* foi avaliada para as seguintes substâncias: fluconazol, óleo essencial de *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium*. Foram feitas soluções estoque de fluconazol e dos óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. crassinervium* diluídas em DMSO (100%) e em seguida em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com MOPS e suplementado com glicose (2%), nas concentrações de 128; 64; 32; 16; 8; 4 e 2 µg/mL para o fluconazol e 256; 128; 64; 32; 16; 8 e 4 µg/mL para os óleos essenciais. Ao final da diluição em série, as concentrações de DMSO nos poços foi menor que 1%.

A suspensão fúngica de 3×10^5 UFC/mL foi ajustada a partir da diluição em 250 vezes do inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em caldo RPMI 1640. Então, foram adicionados 50 µL das concentrações da substância a ser testada na placa de 96 poços de fundo chato junto a 50 µL do inóculo fúngico. Para o controle de crescimento fúngico, a substância a ser testada (fluconazol ou óleo essencial) foi substituída por RPMI e para o controle de esterilidade do experimento houve uma

coluna contendo apenas o meio de cultura RPMI 1640, sem adição dos inóculos. As placas foram incubadas a 37 °C e após 24 horas foi adicionado 10 µL de Resazurina em cada poço e a placa foi incubada novamente por 4 h para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir da redução da resazurina para resorufina, observável pela mudança de coloração de azul para rosa. Nos poços onde houve inibição de crescimento, o conteúdo foi plaqueado em ágar Sabouraud e crescidos por 24h a 37°C para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

4.6 Larvas de *Galleria mellonella*

Todo o ciclo de *G. mellonella* foi mantido no Laboratório de Etnofarmacologia e Fitoquímica - ETNO, localizado no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco a 25 °C. Os insetos foram alimentados com uma dieta artificial adaptada de Jorjão e colaboradores (2018) (Tabela 1) (JORJÃO *et al.*, 2018).

Tabela 1: Receita da ração utilizada na alimentação das larvas de *G. mellonella*.

Ingrediente	Quantidade (g)
Fubá em flocos finos	50
Pólen apícola desidratado	30
Levedo nutricional	30
Farinha de aveia	20
Leite em pó desnatado	20
Glicerol	40
Mel de abelha	40
Metilparabeno	0,4

Fonte: adaptado de Jorjão *et al.*, 2018.

4.6.1 Padronização da infecção em larvas de *G. mellonella*

As larvas de *G. mellonella* (~ 280 mg) foram distribuídas aleatoriamente em grupos (n = 10) e infectadas com diferentes suspensões de inóculos da espécie *C. albicans* (ATCC MYA-2876). Dez microlitros dos inóculos de 3×10^8 , 6×10^8 e 9×10^8 UFC/mL (o equivalente a 1, 2 e 3 na escala de McFarland) foram injetados com seringas tipo Hamilton na última protopata esquerda. Larvas inoculadas com veículo

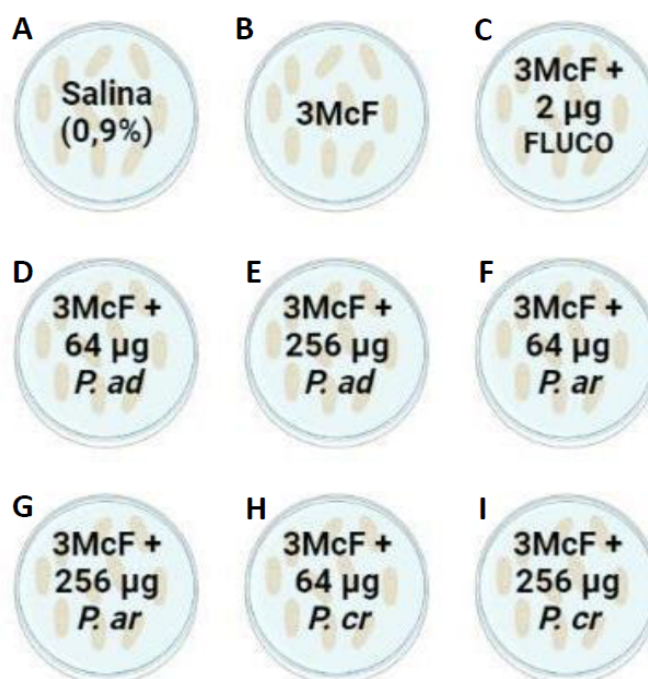
(solução salina 0,9%) foram utilizadas como controle positivo e todos os grupos foram incubados a 37 °C. A mortalidade foi registrada em 24, 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação, com a morte definida como a perda completa da mobilidade, inclusive após um estímulo físico utilizando uma ponteira de plástico.

4.6.2 Padronização do tratamento em larvas de *G. mellonella*

Após a padronização do inóculo o teste foi repetido apenas com a concentração fúngica que causou a maior mortalidade. Novamente as larvas de *G. mellonella* (~ 280 mg) foram distribuídas aleatoriamente em 9 grupos (n = 10). O primeiro grupo foi injetado apenas a solução salina (0,9%), enquanto os outros foram infectados com 10 microlitros do inóculo de 3 McFarland. Destes, um não recebeu tratamento, outro foi tratado com 10 µL de fluconazol na concentração de 2 µg por larva e o restante com 64 ou 256 µg por larva de óleo essencial de *Piper aduncum*, *Piper arboreum*, ou *Piper crassinervium* (Figura 2).

Todos os grupos foram incubados a 37 °C. Para confirmação do modelo de infecção foi contabilizada a taxa de mortalidade diariamente por 8 dias. Para a quantificação da melanização, e avaliação da densidade dos hemócitos foi realizado esse mesmo experimento com cinco larvas por grupo por 24h.

Figura 2: Esquema dos grupos de larvas (n=10).



Fonte: o autor (2023) – criado com BioRender.com A– larvas injetadas apenas com solução salina (0,9%); B- Larvas inoculadas com 3 McFarland (3McF) de *Candida albicans*; C, D, E, F, G, H, I- larvas inoculadas com 3 McF de *C. albicans* e tratadas com 2 µg por larva de fluconazol, 64 µg por larva de Óleo essencial (OE) de *Piper aduncum*, 256 µg por larva de OE de *P. aduncum*, 64 µg por larva de OE de *P. arboreum*, 256 µg por larva de OE de *P. arboreum* ; 64 µg por larva de OE de *P. crassinervium* e 256 µg por larva de OE de *P. crassinervium*, respectivamente.

4.6.3 Avaliação do Índice de Saúde

As larvas dos grupos citados no item 4.6.2 foram monitoradas e avaliadas diariamente por 8 dias após a infecção de acordo com sua atividade, formação de casulo, melanização e sobrevivência (LOH *et al.*, 2013). Uma pontuação diferente foi concedida a cada atributo de acordo com as características de saúde a fim de gerar uma média de índice de saúde do grupo (Tabela 2). Uma pontuação alta (entre 9 e 10) normalmente é obtida por larvas não infectadas ou saudáveis, já uma larva infectada e morta recebe uma pontuação baixa (entre 1 e 0).

Tabela 2 – Tabela de pontuação atribuída a cada característica para a avaliação do Índice de Saúde.

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade	Sem atividade	0
	Atividade mínima sem estimulação	1
	Atividade quando estimulada	2
	Atividade sem estímulo	3
Formação do casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo total	1
Melanização	Melanização completa	0
	Pontos escuros em larva marrom	0
	≥3 pontos em larva bege	2
	<3 pontos em larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

4.6.4 Avaliação da melanização

Na avaliação da melanização e quantificação de hemócitos foi repetido o experimento do item 4.6.2 com 5 larvas por grupo. Após 24 horas de infecção a eutanásia foi realizada para a coleta da hemolinfa. As larvas foram imobilizadas em placas de Petri refrigeradas por 20 minutos, após isso, foi utilizado um bisturi estéril para realizar uma incisão na parte ventral entre as duas últimas protopatas. Em seguida foram coletados 20 µL da hemolinfa para a sua diluição em 80 µL de *Insect Physiological Saline* (IPS) e em seguida adicionados na placa de 96 poços. Após 5 minutos as densidades ópticas dos poços foram lidas em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 405 nm.

4.6.5 Quantificação de hemócitos

Para a quantificação de hemócitos, 20 µL da hemolinfa foi diluído em tampão fosfato salino (PBS) e em seguida foi adicionado 20 µL de Azul de Tripan na concentração de 0,02%. Então, as células foram contabilizadas utilizando a câmara de Neubauer.

4.6.6 Contabilização das Unidades Formadoras de Colônia

Para a contabilização das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) a hemolinfa foi diluída 10 vezes em tampão fosfato salino (PBS). Após isso, 10 µl de cada uma das diluições foram semeadas com alça de Drigalski em ágar Sabouraud, em triplicata, e deixadas para secar. As colônias foram contadas manualmente após 24 horas de incubação a 37 °C sendo calculada a carga microbiana de UFC/mL.

4.7 Análises estatísticas

A curva de sobrevida e a estimativa das diferenças de sobrevida foram determinadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). As análises do Índice de Saúde foram feitas pelo teste de Kruskal Wallis. Os resultados da melanização da hemolinfa, contagem de hemócitos e de unidades formadoras de colônia foram analisados estatisticamente por ANOVA,. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p \leq 0,05$). Todas as estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise química dos óleos essenciais

A partir da extração dos óleos essenciais foram obtidos os valores de rendimento de 2,5% para *Piper aduncum*, 1,8% para *Piper crassinervium* e 0,74% para *Piper arboreum*. A partir da análise realizada pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram encontrados 24 metabólitos secundários no óleo essencial de *P. aduncum*, nele os compostos majoritários foram o dilapiol (81%), (E)- β -ocimeno (3,4%) e germacreno D (2,7%), em *P. arboreum* foram encontrados 24, entre eles se destacaram: germacreno D (18,6%), δ -elemeno (14,5%), (Z)- β -ocimeno (8,5%) e (E)- β -cariofileno (8,1%), já *P. crassinervium* apresentou 30 compostos, o α -pineno representou 14% do óleo, enquanto o β -pineno 12,1% e o (E)- β -cariofileno 8% (tabela 3). O óleo essencial de *P. aduncum* teve como composição principal fenilpropanóides (82%), representado apenas pelo Dilapiol, enquanto *P. arboreum* obteve 58,8% de sesquiterpenos, já em *P. crassinervium* foram encontrados valores similares entre monoterpenos e sesquiterpenos, com 48,5 e 49,6%, respectivamente.

Tabela 3: Composição química dos óleos essenciais das espécies de *Piper spp.*

Compostos	RI	<i>P. ad</i>	<i>P. ar</i>	<i>P. cr.</i>
α -Pineno ^S	932	0,2	1,5	14
β -Pineno ^S	975	0,3	-	12,1
6-Metil-5-hepten-2-ona	989	-	-	6,2
β -Mirceno ^S	992	-	-	0,6
α -Felandreno ^S	1004	0,1	3,7	0,5
2-Careno ^S	1010	0,1	-	1,5
α -Terpineno	1016	-	-	0,1
p-Cimeno ^S	1024	0,1	1,5	0,5
Limoneno ^S	1039	0,1	2,1	1,2
(Continua)				

Compostos	RI	<i>P. ad</i>	<i>P. ar</i>	<i>P cr.</i>
(Z)- β -Ocimeno ^S	1039	1,6	8,5	0,1
(E)- β -Ocimeno ^S	1049	3,4	5	0,1
γ -Terpineno	1059	0,2	-	0,1
α -Terpinoleno ^S	1088	0,4	-	0,2
Linalool ^S	1100	-	0,6	2,4
δ -Elemeno	1339	0,1	14,5	2,1
α -Cubebeno	1352	-	0,3	0,7
α -Copaeno ^S	1378	0,2	1,4	2,9
(E)- β -Cariofileno ^S	1422	0,8	8,1	8
β -Gurjuneno	1432	0,2	1	2,2
α -Humuleno ^S	1457	0,9	4,9	2,8
Alloaromadendreno	1464	-	-	0,4
Deidro-Aromadendreno	1466	-	-	0,4
Germacreno D	1484	2,7	18,6	-
β -Selineno	1490	0,1	2,4	-
α -Selineno	1500	1,4	2,4	-
Bicyclogermacreno	1500	2,3	3,8	4,3
α -Muuroleno	1503	0,1	1,3	3
α -Bulneseno	1510	0,2	2,1	-
γ -Cadineno	1517	0,1	1,2	5,1
(E) Cadina-1,4-dieno	1527	-	-	4,3
Germacreno B	1561	0,2	2,1	0,4
Guaiol	1601	-	-	5,2
Dilapiol ^S	1632	81	2,2	1,7

(Continua)

Compostos	RI	<i>P. ad</i>	<i>P. ar</i>	<i>P. cr.</i>
Torreiol	1650	-	0,6	3,3
α -Cadinol	1659	-	2,9	-
Monoterpenos		6,8	39	48,5
Sesquiterpenos		10,3	58,8	49,6
Fenilpropanóides		82,9	2,2	1,9
Composição total encontrada		97,7	99,1	87,4

Fonte: o autor (2023). RI- índice de retenção na coluna, *P. ad*- *Piper aduncum*, *P. ar*- *Piper arboreum*, *P. cr*- *Piper crassinervium*, ^s- compostos identificados utilizando um padrão autêntico, os outros foram identificados a partir da comparação do IR e espectro de massa utilizando o banco de dados de Adams e Wiley (2007).

A concentração de dilapiol encontrada nos óleos essenciais de *P. aduncum* no presente estudo foi similar à encontrada por Almeida e colaboradores (76%), Gaínza e *et al.* em 2016 (76,2%), e Souto *et al.* em 2012 (64,4%). Porém essas análises diferem das realizadas por Valadares e colaboradores (2020) que obteve apenas 6,3% de dilapiol e apresentou 23,4% de Piperitona como composto majoritário, já Oliveira e *et al.* (2013) obteve o 1,8-cineol (53,9%), seguido de α -pineno (12,7%), e β -pineno (8,5%), enquanto de Souza e colaboradores (2020) constataram que o composto majoritário foi o germacreno B (19,8%), no mesmo estudo, o principal composto encontrado em *P. crassinervium* foi o 7-epi- α -eudesmol que representou 11,12% do seu óleo essencial. Matias e colaboradores (2022) identificaram como compostos majoritários do óleo essencial de *P. arboreum*: óxido de cariofileno (30,5%), seguido por miristicina (7%), espatulenol (6,2%) e (E)- β -cariofileno que teve concentração próxima à encontrada no presente estudo (5,1%). Apesar desses autores utilizarem as folhas dessas plantas e a mesma metodologia de extração e análise de compostos a diferença nas concentrações de compostos nos óleos essenciais pode ser explicada por diferenças no horário de coleta, localidade e época do ano que a planta foi coletada (FERREIRA *et al.*, 2020)

5.2 Avaliação da sensibilidade a substâncias antimicrobianas

Nos experimentos para a avaliação da sensibilidade da *Candida albicans* (ATCC MYA-2876) foram realizadas diluições em série do fluconazol e dos óleos

essenciais, e a partir da mudança de coloração da resazurina foi possível identificar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), após isso o subcultivo das concentrações inibitórias foi realizado a fim de verificar a Concentração Fungicida Mínima (CFM). Foram obtidos os valores de CIM de 2 µg/mL para o fluconazol e de 64 µg/mL para os óleos essenciais (OE) de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. crassinervium*, e 128 µg/mL como CFM do fluconazol e dos OE (tabela 4).

Tabela 4: Sensibilidade da *Candida albicans* (ATCC MYA-2876) aos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium* substâncias antimicrobianas.

Substâncias antimicrobianas	CIM	CFM
OE de <i>Piper crassinervium</i>	64 µg/mL	128 µg/mL
OE de <i>Piper aduncum</i>	64 µg/mL	128 µg/mL
OE de <i>Piper arboreum</i>	64 µg/mL	128 µg/mL
Fluconazol	µg/mL	128 µg/mL

Fonte: o autor (2023). CIM- Concentração Inibitória Mínima, CFM- Concentração Fungicida Mínima, OE- óleo essencial.

Apesar da diferença nas concentrações inibitórias mínima do fluconazol e o dos óleos essenciais, os valores encontrados indicam eficiência dos OEs na inibição dessa cepa de *C. albicans*. O valor encontrado de inibição com o fluconazol indica sensibilidade da cepa a esse fármaco, visto que é considerada suscetível quando a concentração é menor ou igual a 2 (CLSI, 2022; EUCAST, 2022), essa concentração é similar à encontrada por Yan *et al.* (2019) e Jafri e Ahmad (2019). A inibição utilizando o óleo essencial de *P. aduncum* foi melhor do que a obtida por Braga *et al.* (2007) utilizando o extrato metanólico das folhas dessa planta contra *C. albicans* que apresentou um CIM de 1,25 mg/mL.

Já a concentração fungicida mínima, ou seja, a concentração da substância capaz de matar o patógeno, dos óleos foi o dobro do MIC. Enquanto a concentração fungicida do fluconazol foi 64 vezes maior que o MIC, essa diferença ocorre porque os azóis apresentam maior capacidade fungistática do que fungicida (BERKOW; LOCKHART, 2017).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais se dá pela permeabilização da parede celular a partir da mudança no fluxo de elétrons que afeta também a ação das ATPases da membrana fúngica, levando a perda de componentes celulares

seguida de apoptose (TARIQ *et al.*, 2019). Além disso, eles são capazes de inibir a síntese de proteínas, açúcares e ácidos nucleicos dos microrganismos e afetar a expressão de genes relacionados à fatores de virulência, como adesão, dimorfismo e crescimento (D'AGOSTINO *et al.*, 2019).

O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta como composto majoritário o dilapiol (81%) e isso pode explicar a sua atividade anti-candida, visto que o dilapiol isolado do óleo essencial de *P. holtonii* apresentou atividade contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricaceae) (SALAZAR *et al.*, 2020). Além disso, o óleo essencial obtido de *Deverra triradiata* Hochst. ex Boiss. apresentou em sua composição aproximadamente 82% de dilapiol e apresentou atividade contra *Malassezia spp.* e *Candida krusei* (GUETAT *et al.*, 2022).

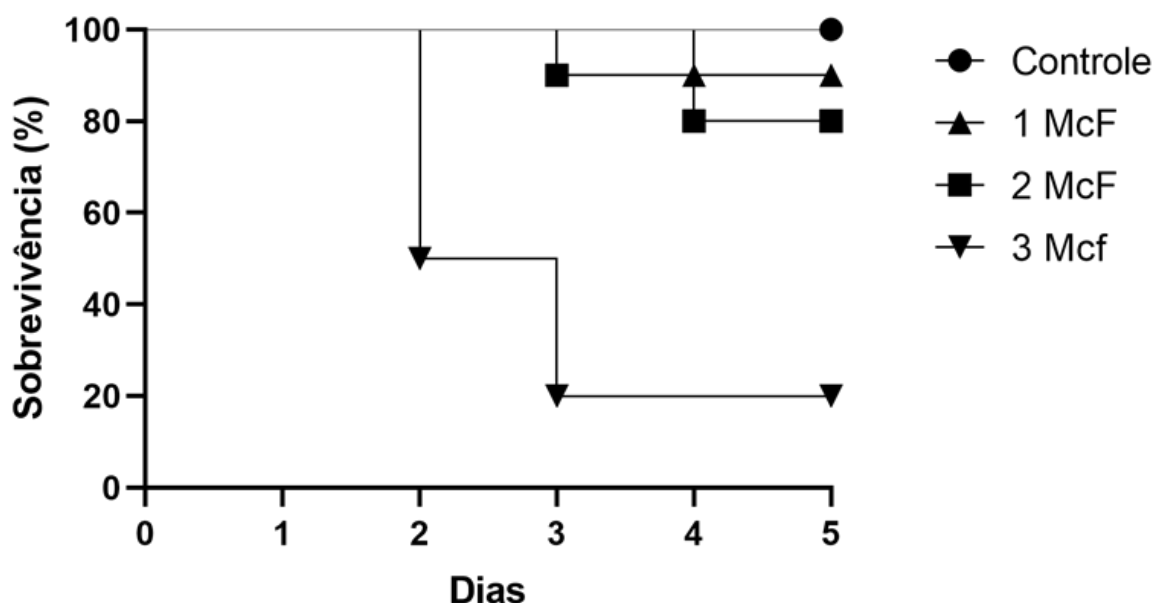
Já na análise de componentes do óleo essencial de *P. arboreum* o seu composto majoritário foi o germacreno D com 18,6% de sua composição, um valor similar (15,6%) foi encontrado na composição do óleo essencial de *Artemisia annua* que apresentou um CIM de 0,2 mg/mL contra *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* (RASOOLI *et al.*, 2003). Ele também foi encontrado na composição dos OEs de *Duguetia gardneriana* (28,1%) e *Duguetia moricandiana* (44,3%), porém apresentaram fraca atividade inibitória no experimento de difusão em disco contra *Candida guilliermondii* e *C. albicans*, respectivamente (SILVA ALMEIDA *et al.*, 2010).

O α -pineno foi o principal componente do óleo essencial de *P. crassinervium*, porém o α -pineno obtido do OE das folhas de *Ferulago capillaris* obteve valores de inibição contra *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (0,3-1,25 μ L/mL) (PINTO *et al.*, 2013). Dessa forma, a atividade anti-candida dos óleos essenciais de *P. arboreum* e *P. crassinervium* podem estar relacionadas aos compostos majoritários presentes nesses óleos.

5.3 Padronização da infecção em larvas de *G. mellonella*

O teste de padronização de inóculo foi realizado a fim de encontrar a concentração fúngica de *C. albicans* capaz de infectar e matar a maioria das larvas de *G. mellonella* ao fim das 120 horas de experimento. O grupo controle com salina não apresentou mortalidades e o inóculo que causou a maior mortalidade foi o de 3 McFarland (figura 3)

Figura 3: Curva de sobrevivência de larvas após infecção com diferentes concentrações de *Candida albicans*.



Fonte: o autor (2023). Controle positivo- salina (não infectadas), 1 McF- infectadas com 3×10^8 UFC/mL, 2 McF- infectadas com 6×10^8 UFC/mL, 3 McF- infectadas com 9×10^8 UFC/mL.

A partir dos resultados obtidos foi visto que a mortalidade das larvas está ligada à concentração do inóculo de uma maneira dose-dependente, de forma que quanto maior o inóculo maior foi a mortalidade ao final do quinto dia. Deste modo, a concentração escolhida para a utilização nos experimentos utilizando tratamento foi de 3 McFarland, o equivalente a 9×10^6 UFC por larva.

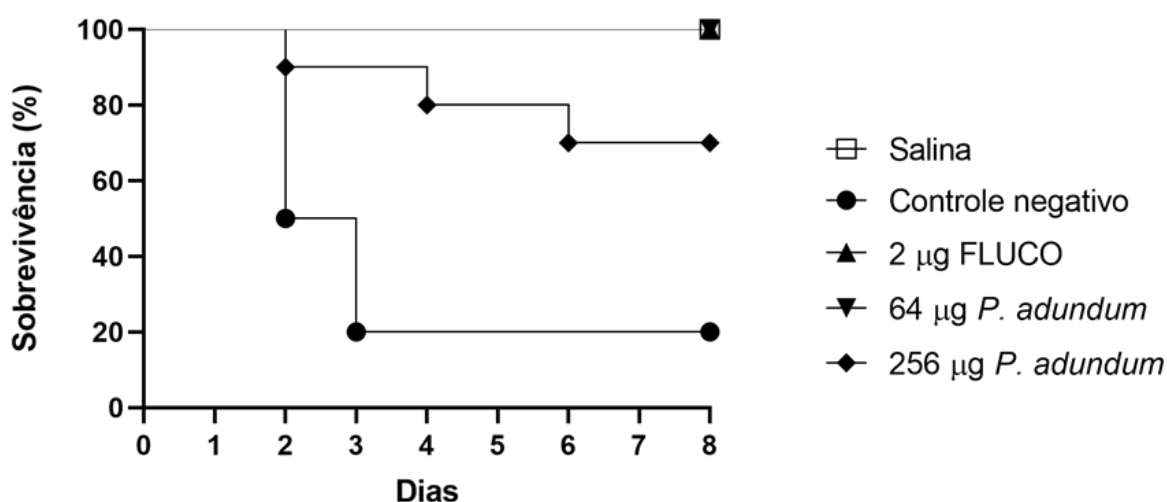
Diversos autores já padronizaram a infecção por *Candida albicans* nas larvas de *Galleria mellonella*, com concentrações por larva de 2×10^5 UFC (VERTYPOROKH *et al.*, 2019), 5×10^5 UFC (KAVANAGH; SHEEHAN, 2018), 5×10^6 UFC (GU *et al.*, 2018), 3×10^8 UFC (KASKATEPE *et al.*, 2022). Essa variação da concentração capaz de matar a maioria das larvas pode ocorrer devido a diferenças na virulência das cepas testadas ou da alimentação das larvas que está diretamente relacionada com o seu sistema imunológico (JORJÃO *et al.*, 2018).

5.4 Padronização do tratamento em larvas de *G. mellonella*

Nos testes de sobrevivência frente a infecção por *C. albicans* utilizando tratamentos o grupo controle positivo (injetado apenas salina) não apresentou

mortalidade ao fim do experimento, todos os outros grupos foram infectados com o inóculo de 9×10^6 UFC. O grupo sem tratamento foi o que apresentou a maior taxa de mortalidade (80%) e o grupo tratado com 2 µg de fluconazol por larva apresentou sobrevivência de 100% (figuras 4, 5 e 6). Os grupos foram avaliados por 8 dias visto que o teste foi realizado em conjunto com o de avaliação do Índice de Saúde.

Figura 4: Curva de sobrevivência de larvas após infecção com *Candida albicans* e tratamentos.

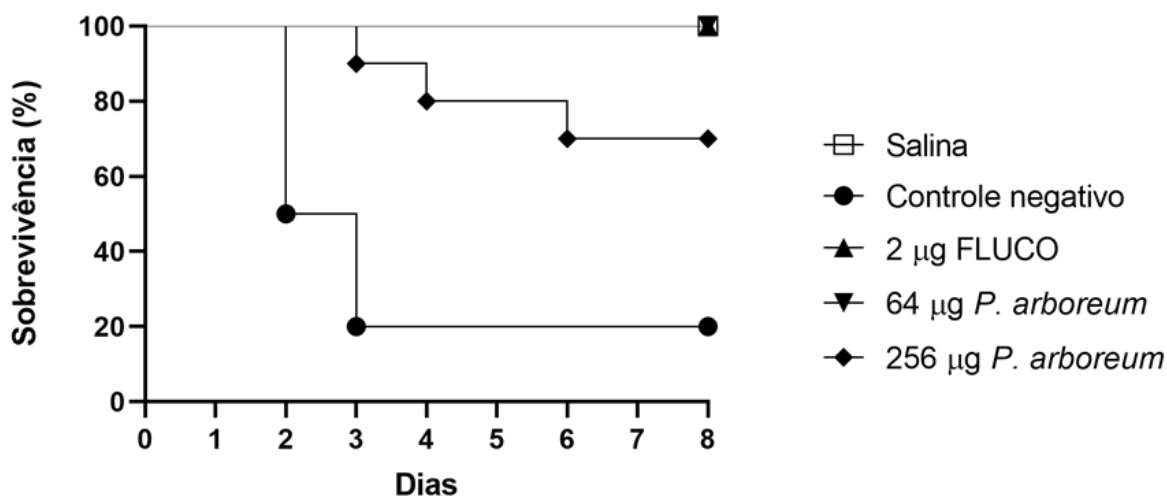


Fonte: o autor (2023). Salina - controle positivo (não infectadas), controle negativo- infectadas com 9×10^6 UFC por larva (sem tratamento), 2 µg FLUCO - tratadas por 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. aduncum*- tratadas por 64 µg de OE de *P. aduncum*, 256 µg *P. aduncum*- tratadas por 256 µg de OE de *P. aduncum*.

Nos grupos tratados por *P. aduncum* foi visto que a concentração do óleo de 64 µg por larva foi capaz de manter todas as larvas vivas, já utilizando 256 µg a sobrevivência foi de 70% ao final dos 8 dias (figura 4). Isso indica que apesar de haver atividade na menor concentração testada, a maior pode apresentar certa toxicidade que explicaria a menor sobrevivência utilizando-a. Porém, para que seja possível afirmar isso, seria necessário testes de toxicidade.

O tratamento utilizando os óleos essenciais de *P. arboreum* apresentou os mesmos índices de mortalidade ao fim dos 8 dias, porém houve um atraso no início da mortalidade no grupo tratado com 256 µg de OE (figura 5). Enquanto isso, as larvas tratadas com 64 µg de OE não foram mortas. Apesar dos valores finais serem iguais aos apresentados pelo tratamento com *P. aduncum*, as análises do Índice de Saúde, quantificação da melanização e densidade de hemócitos apresentaram diferenças.

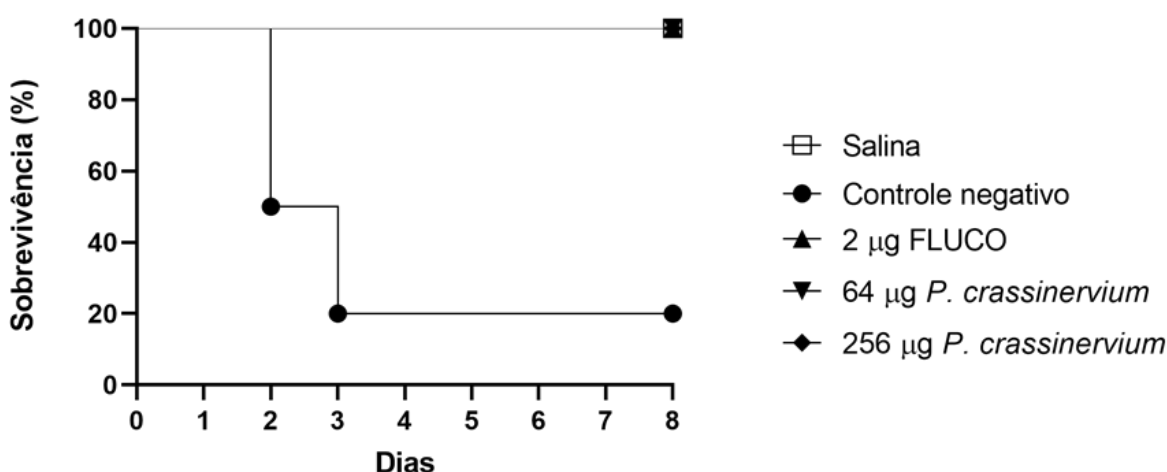
Figura 5: Curva de sobrevivência de larvas após infecção com *Candida albicans* e tratamentos.



Fonte: o autor (2023). Salina - controle positivo (não infectadas), controle negativo- infectadas com 9×10^6 UFC por larva (sem tratamento), 2 µg FLUCO - tratadas por 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. arboreum*- tratadas por 64 µg de OE de *P. arboreum*, 256 µg *P. arboreum*- tratadas por 256 µg de OE de *P. arboreum*.

Já os grupos utilizando o óleo essencial de *P. crassinervium* não apresentaram mortalidade após serem tratadas utilizando 64 e 256 µg por larva (figura 6). Esses valores representam um tratamento promissor nas infecções causadas por *C. albicans*.

Figura 6: Curva de sobrevivência de larvas após infecção com *Candida albicans* e tratamentos.



Fonte: o autor (2023). Salina - controle positivo (não infectadas), controle negativo- infectadas com 9×10^6 UFC por larva (sem tratamento), 2 µg FLUCO - tratadas por 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. crassinervium*- tratadas por 64 µg de OE de *P. crassinervium*, 256 µg *P. crassinervium*- tratadas por 256 µg de OE de *P. crassinervium*.

Outros autores já utilizaram óleos essenciais no tratamento de infecções por espécies de *Candida spp.* em *Galleria mellonella*. Kaskatepe *et al.* (2022) atestou que o óleo essencial de *Origanum majorana* na concentração de 32 µg por larva foi capaz de manter 100% das larvas infectadas por *C. albicans*. Já Di Vito *et al.* (2023) observou o efeito sinérgico do OE de *Cinnamomum zeylanicum* com o fluconazol em larvas infectadas com *Candida auris*.

5.5 Avaliação do Índice de Saúde

Na avaliação de Índice de saúde as larvas foram avaliadas por 8 dias de acordo com a mobilidade, melanização, formação de casulo e sobrevivência, a partir das pontuações atribuídas foram realizadas comparações utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para observar diferenças significativas entre os grupos. Os valores do grupo salina foi igual ao grupo tratado com 2 µg de fluconazol até o sexto dia (tabela 5).

Tabela 5 – Quadro de Índice de saúde das larvas durante 8 dias após infecção.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Salina	10(10- 10)	10(10- 10)	10(10- 10)	10(0 - 10)	10(10- 10)	10(10- 10)	10(10- 10)	10(10- 10)
Controle -	8,5(6 -10)	0 (0 - 8) #	0 (0 - 8) #	0 (0 - 9) #	0(0- 8,5) #	0(0- 7,5) #	0(0- 7,5) #	0(0- 7,5) #
2 µg Fluco	10(10- 10)	10(10-10)*	10(10-10)*	10(10-10) *	10(10-10)*	10(10-10)*	10(9-10) *	10(9 -10) *
64 µg <i>P. ad</i>	9,5(9 - 10)	9(8,5 - 10)	9(8 - 9)	8(7-8,5) #	9 (9- 9,5) *	9 (8,5-10)*	8,5 (8-10)*	9(7,5 - 10)
256µg <i>P. ad</i>	9 (8 - 10)	8,5(0-8,5)#	8(0- 9) # *	7 (0- 8) #	8 (0 - 9)	9 (0 - 9)	8 (0 - 9) #	7 (0 - 10)
64 µg <i>P. ar</i>	10 (9 - 10)	8,5 (8,5- 9)	8,5(7,5-10)	8 (8 - 9)	8,5(8,5- 9)	8,5 (7 - 9)	8 (8 - 9)	9 (7 - 9)
256 µg <i>P. ar</i>	9,5 (8- 10)	10(8,5-10)*	9 (0 - 10)	8 (0 - 9)	8,5(0- 9) #	7,5(0- 9) #	7 (0 - 8)	6 (0 - 8) #
64 µg <i>P. cr</i>	9,5(9 - 10)	9 (8,5 - 10)	9,5(7,5-10)*	9 (8,5 - 9)	9 (8 - 10) *	9 (8 - 10)	9(7,5-10) *	9(7,5-10) *
256 µg <i>P. cr</i>	10 (9 - 10)	10 (9 - 10)	10(9- 10) *	8 (8 - 10)	9 (8 - 10)	9 (8,5-10)*	9 (7,5- 10)	8 (7 - 10)

Fonte: o autor (2023). Salina- grupo controle (sem infecção e sem tratamento), Controle - - grupo apenas infectado (sem tratamento), 2 µg Fluco- tratado com 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. ad*- tratado com 64 µg de *P. aduncum*, 256 µg *P. ad*- tratado com 256 µg de *P. aduncum*, 64 µg *P. ar*- tratado com 64 µg de *P. arboreum*, 256 µg *P. ar*- tratado com 256 µg de *P. arboreum*, 64 µg *P. cr*- tratado com 64 µg de *P. crassinervium*, 256 µg *P. ar*- tratado com 256 µg de *P. crassinervium*. Valores representados como “ valor da mediana (valor mínimo-valor máximo), # - diferente significativamente da salina, *- diferente significativamente do controle negativo.

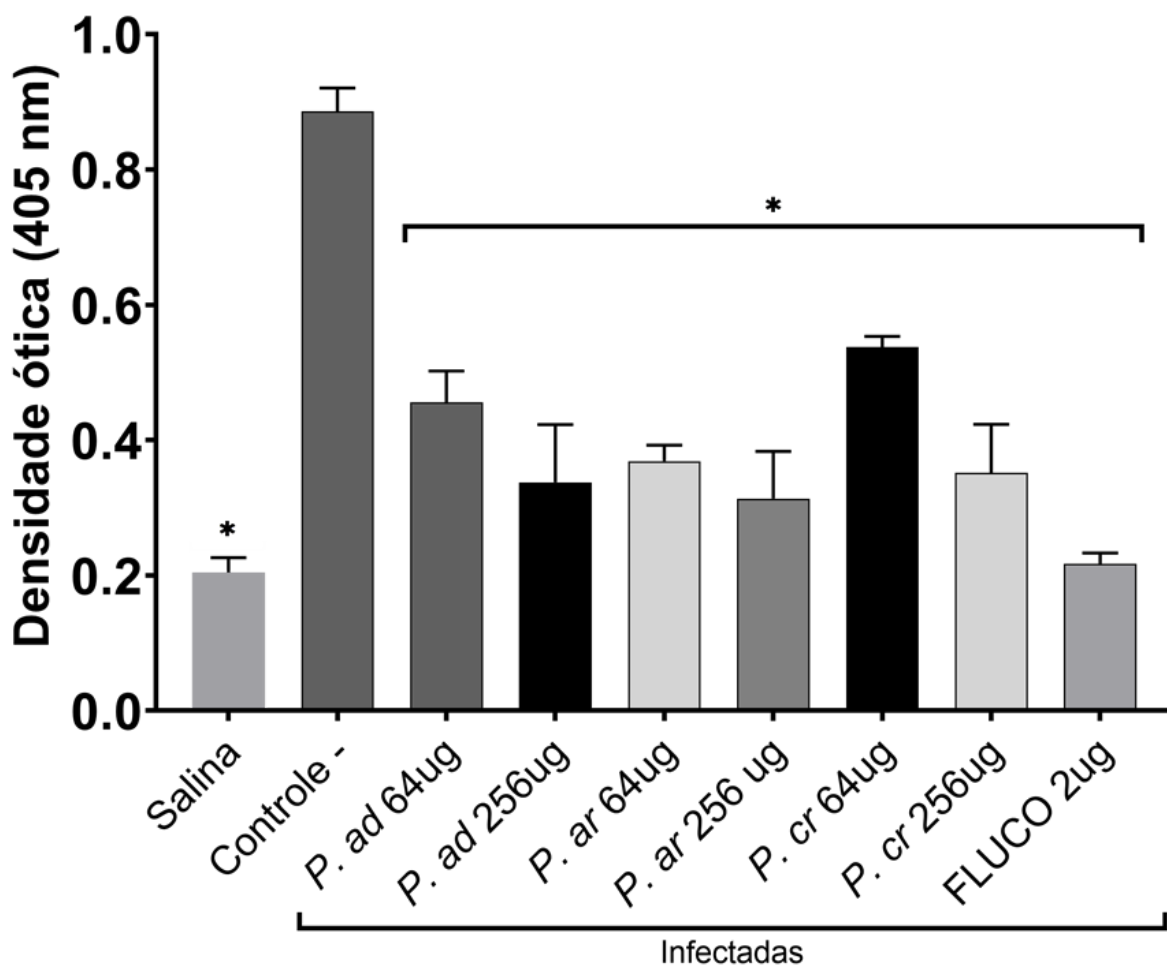
A partir disso, é possível concluir que as melhores pontuações obtidas foram do grupo tratado com 64 µg de *P. crassinervium*, que ao final dos 8 dias de infecção continuou sendo significativamente diferente do infectado, o que significa que além não haver mortalidade nesse grupo, as larvas também permaneceram fisiologicamente saudáveis. Os grupos tratados com 64 µg de *P. aduncum* e 256 µg de *P. crassinervium* apresentaram alta pontuação no Índice de Saúde. Já as larvas tratadas com 256 µg de *P. aduncum* e 256 µg de *P. arboreum* tiveram uma pontuação de Índice de Saúde baixa, visto que houve mortalidades nesses grupos.

Passos *et al.* (2020) também realizaram esse experimento para avaliar o tratamento de larvas infectadas com *C. albicans* e *Sporothrix brasiliensis*. Eles observaram que larvas tratadas com nanocarreadores lipídicos contendo itraconazol apresentaram valores do Índice de Saúde maiores quando comparado ao grupo apenas infectado.

5.6 Avaliação da melanização

No experimento de avaliação da melanização da hemolinfa o grupo infectado apresentou altos valores, chegando próximo a 0,9 de absorbância, enquanto as larvas do grupo salina e tratadas com fluconazol obtiveram apenas 0,2 (figura 7). A melanização é um processo natural nas larvas de *G. mellonella* a fim de conter a infecção por microrganismos. Esse processo ocorre a partir da encapsulação desses patógenos com a hemolinfa contendo melanina, seguida de coagulação e opsonização (SERRANO *et al.*, 2023). Dessa forma, os resultados indicam que as larvas infectadas e não tratadas foram mais afetadas pelo patógeno e por isso apresentam uma melanização maior, enquanto o valor das larvas tratadas com os óleos essenciais são mais próximos do controle sem infecção e do tratado com fluconazol.

Figura 7 – Gráfico de melanização da hemolinfa das larvas 24 horas após infecção.



Fonte: o autor (2023). Salina- grupo controle (sem infecção e sem tratamento), Controle - - grupo apenas infectado (sem tratamento), 2 µg FLUCO- tratado com 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. ad*- tratado com 64 µg de *P. aduncum*, 256 µg *P. ad*- tratado com 256 µg de *P. aduncum*, 64 µg *P. ar*- tratado com 64 µg de *P. arboreum*, 256 µg *P. ar*- tratado com 256 µg de *P. arboreum*, 64 µg *P. cr*- tratado com 64 µg de *P. crassinervium*, 256 µg *P. ar*- tratado com 256 µg de *P. crassinervium*. *- significativamente diferente do controle negativo.

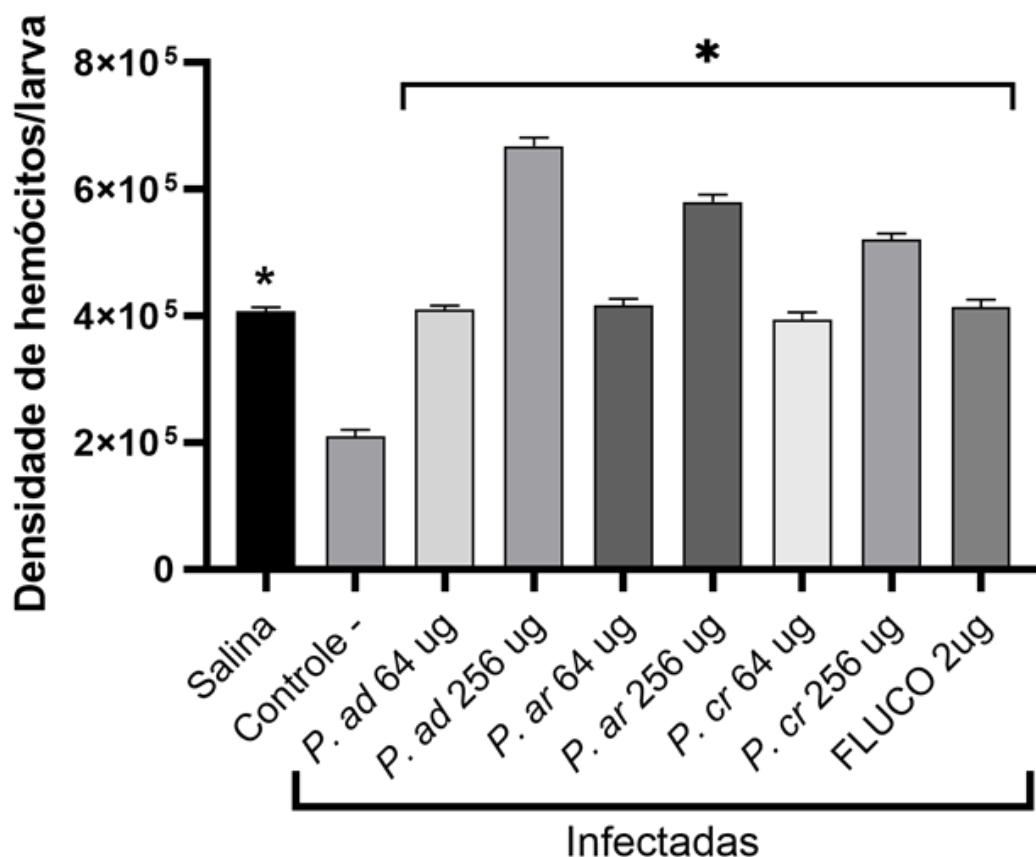
Dentre os grupos tratados com os óleos essenciais, todos apresentaram melanização menor que o grupo infectado, porém foram maiores que o grupo salina e o tratado com fluconazol. Apesar disso, esses resultados em conjunto com os índices de sobrevivência indicam que apesar de haver uma melanização maior que nas larvas tratadas com o fármaco, ela foi o suficiente para combater a infecção sem causar a mortalidade das larvas nos grupos tratados com 64 µg de *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. crassinervium* e com 256 µg de *P. crassinervium*. Souza dos Santos *et al.* (2019) observaram que o tratamento de infecções causadas por

Staphylococcus aureus utilizando óleos essenciais de *Syagrus coronata* também foi capaz de diminuir a melanização causada pela infecção.

5.7 Quantificação de hemócitos

Na contagem da densidade de hemócitos foi obtido o valor de 4×10^5 , representando as larvas não infectadas, enquanto nas infectadas sem tratamento esse valor foi de 2×10^5 , essa diminuição já era esperada, visto que o inóculo fúngico se espalha pela hemolinfa causando uma redução dos hemócitos viáveis (figura 8). Os hemócitos são células encontradas livremente na hemolinfa das larvas de insetos, eles atuam de diversas formas e são capazes de fagocitar, encapsular e criar nódulos dos patógenos, por isso podem ser utilizados como indicadores de infecção nas larvas de *G. mellonella* (BERGIN *et al.*, 2003), logo, quanto menor sua densidade na hemolinfa, mais infectada a larva está.

Figura 8 – Gráfico de contagem de hemócitos por larva 24 horas após infecção.



Fonte: o autor (2023). Salina- grupo controle (sem infecção e sem tratamento), Controle - - grupo apenas infectado (sem tratamento), 2 µg FLUCO- tratado com 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. ad*- tratado com 64 µg de *P. aduncum*, 256 µg *P. ad*- tratado com 256 µg de *P. aduncum*, 64 µg *P. ar*- tratado com

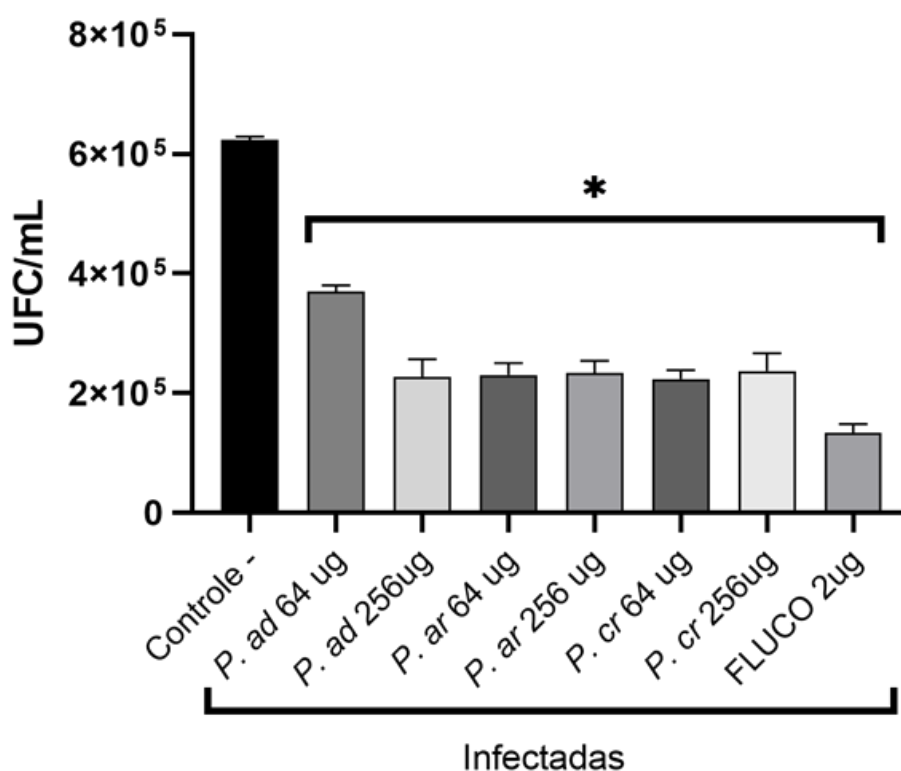
64 µg de *P. arboreum*, 256 µg *P. ar-* tratado com 256 µg de *P. arboreum*, 64 µg *P. cr-* tratado com 64 µg de *P. crassinervium*, 256 µg *P. ar-* tratado com 256 µg de *P. crassinervium*, *- significativamente diferente do controle negativo.

Já os grupos tratados com 2 µg de fluconazol e 64 µg dos óleos essenciais obtiveram valores similares ao da salina, a partir disso é possível concluir que essas concentrações de óleo obtiveram um efeito benéfico no combate ao patógeno, visto que os hemócitos mantiveram densidade maior que 4×10^5 .

5.8 Contabilização das Unidades Formadoras de Colônia

Para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) a hemolinfa foi coletada e diluída 10 vezes e em seguida crescida em placa de ágar Saboraud a 37°C, após 24 horas de incubação foram contadas as colônias. A partir disso, é possível visualizar que o grupo que apresentou a menor contagem de UFC foi o tratado com 2 µg de fluconazol, enquanto as larvas que não foram tratadas aproximadamente 6×10^5 (figura 9).

Figura 9 – Gráfico de contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Candida albicans* das larvas 24 horas após infecção.



Fonte: o autor (2023). Salina- grupo controle (sem infecção e sem tratamento), Controle - - grupo apenas infectado (sem tratamento), 2 µg FLUCO- tratado com 2 µg de fluconazol, 64 µg *P. ad-* tratado

com 64 µg de *P. aduncum*, 256 µg *P. ad-* tratado com 256 µg de *P. aduncum*, 64 µg *P. ar-* tratado com 64 µg de *P. arboreum*, 256 µg *P. ar-* tratado com 256 µg de *P. arboreum*, 64 µg *P. cr-* tratado com 64 µg de *P. crassinervium*, 256 µg *P. ar-* tratado com 256 µg de *P. crassinervium*. *- significativamente diferente do controle negativo.

Dentre os grupos tratados com os óleos essenciais, todos apresentaram valores próximos a $2,2 \times 10^5$, com exceção do tratado com 64 µg de *P. aduncum* que ficou próximo a 4×10^5 unidades formadoras de colônia por mL. A partir disso, é possível concluir que nos grupos tratados houve a inibição e diminuição do inóculo fúngico nas primeiras 24 horas de tratamento em comparação com o grupo não tratado.

De uma maneira geral, todas as larvas tratadas com óleos essenciais de *Piper spp.* obtiveram resultados melhores de sobrevivência, Índice de saúde, melanização, densidade de hemócitos e contagem de UFC quando comparadas às larvas apenas infectadas. Isso demonstra que esses óleos podem ser uma possível opção no tratamento de infecções fúngicas, porém outros estudos são necessários para a descoberta do mecanismo de ação e avaliação da toxicidade em células humanas.

6 CONCLUSÃO

- O óleo essencial de *P. aduncum* teve como composição principal o dilapiol (81%), *P. arboreum* obteve 18,6 % de germacreno D, já *P. crassinervium* foi o α -pineno (14%);
- Os óleos essenciais apresentaram CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 128 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. albicans* (ATCC MYA-2876);
- Todos os óleos essenciais na concentração de 64 μg por larva e *P. crassinervium* em 256 μg por larva foram capazes de manter a sobrevivência de larvas infectadas em 100%;
- O tratamento da infecção utilizando os óleos essenciais foi capaz de melhorar a pontuação do Índice de Saúde, diminuir a melanização da hemolinfa, manter os números de hemócitos acima de 4×10^5 hemócitos por larva e diminuir a contagem das Unidades Formadoras de Colônia de *C. albicans*.
- Os óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper crassinervium* apresentaram atividade anti-candida *in vitro* e *in vivo* e representam uma possível opção no tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P.. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectrometry.. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, e. 4, 2007.
- ALMEIDA, C. A.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ROSEO DE OLIVEIRA, M.; RODRIGUES, I. A.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Piper Essential Oils Inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, Biofilm Formation, and Rhizopuspepsin Activity. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, n. 5295619, 2018
- AMES, L.; DUXBURY, S.; PAWLOWSKA, B.; HO, H. L.; HAYNES, K.; BATES, S. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1909–1917, 2017.
- ARROYO, J.; BONILLA, P.; MORENO-EXEBIO, L.; RONCEROS, G.; TOMÁS, G.; HUAMÁN, J.; RAEZ, E.; QUINO, M.; RODRIGUEZ-CALZADO, J. Gastroprotective and antisecretory effect of a phytochemical made from matico leaves (*Piper aduncum*). **Revista peruana de medicina experimental y salud publica**, v. 30, n. 4, p. 608-615, 2013
- ARROYO-ACEVEDO, J.; CHÁVEZ-ASMAT, R. J.; ANAMPA-GUZMÁN, A.; DONAIRES, R.; RÁEZ-GONZÁLES, J. Protective Effect of *Piper aduncum* Capsule on DMBA-induced Breast Cancer in Rats. **Breast cancer : basic and clinical research**, v. 9, p. 41–48, 2015.
- ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1832, n. 9, p. 1378–1383, 2013.
- BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, 2022.
- BENEDICT, K.; JACKSON, B. R.; CHILLER, T.; BEER, K. D. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.
- BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in hemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbial Infections**, v. 5, n. 15, p. 1389-1395, 2003
- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S.R. fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infect Drug Resist**, v. 10, p. 237-245, 2017;
- BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **The Annals of pharmacotherapy**, n. 46, n. 7, p. 1086–1096.

BOSQUIROLI, L. S. S.; DEMARQUE, D. P.; RIZK, Y. S.; CUNHA, M. C.; MARQUES, M. C. S.; DE MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C. T.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. P. In vitro anti-leishmania infantum activity of essential oil from *Piper angustifolium*.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, n. 2, p. 124–128, 2015.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; DE O MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396–402, 2007.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, p. 597–603, 2013.

BU, Q. R.; BAO, M. Y.; YANG, Y.; WANG, T. M.; WANG, C. Z. Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. **Foods**, v. 11, n. 19, 2022.

CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B. E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 85–88, 1995.

CAMPOY, S. ADRIO, J. L. Antifungals, **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CÁRDENAS-LAVERDE, D.; BARBOSA-CORNELIO, R.; COY-BARRERA, E. Antifungal Activity against *Fusarium oxysporum* of Botanical End-Products: An Integration of Chemical Composition and Antifungal Activity Datasets to Identify Antifungal Bioactives. **Plants (Basel)**, v. 10, n. 12, 2021.

CARNEIRO, S. B.; KREUTZ, T.; LIMBERGER, R. P.; TEIXEIRA, H. F.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F.; KOESTER, L. S. *Piper aduncum* Essential Oil Rich in Dillapiole: Development of Hydrogel-Thickened Nanoemulsion and Nanostructured Lipid Carrier Intended for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, 2022.

CARNEIRO, S. B.; KREUTZ, T.; LIMBERGER, R. P.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F.; KOESTER, L. S. Development, validation and application of a gas chromatography method for the determination of dillapiole from *Piper aduncum* essential oil in skin permeation samples. **Biomedical chromatography**, v. 37, n. 2, 2023.

CARRARA, V. S.; VIEIRA, S. C.; DE PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L. G.; CORTEZ, D. A.; DA SILVA FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of helminthology**, v. 88, n. 3, p. 321–326, 2014.

CASADEVALL, A. Fungi and the rise of mammals. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 8, e. 1002808, 2012.

CEOLE, L. F.; CARDOSO, M. D. G.; SOARES, M. J. Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-*Leishmania braziliensis* activity. **Parasitology**, v. 144, n. 9, p. 1179–1190, 2017.

CHAKOR, J. N.; MUSSO, L.; SARDI, P.; DALLAVALLE, S. Synthesis and StructureActivity Relationships of Antifungal Crassinervic Acid Analogs. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p.41-47, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. e. 3, 2022.

COIMBRA, R. Manual de Fitoterapia. **Editora CEJUP**, Belém, 1994.

COSTA, K. P.; FONSECA, E. S., ANDRADE, R. E. S.; FERREIRA, G. S.; RODRIGUES, L. I. T.; DA FONSECA, F. S. A.; MARTINS, E. R. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e dos óleos essenciais de *Xylopia aromática* e *Piper nigrum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, e. 3, p. 27904–27912, 2021.

CUI, X.; WANG, L.; LÜ, Y.; YUE, C. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. **Journal of infection and public health**, v. 15,n .9, p. 986–1000, 2022.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128–138, 2018.

D'AGOSTINO, M.; TESSE, N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 20, 2019.

DA SILVA, A. C. A.; MATIAS, E. F. F.; ROCHA, J. E.; ARAÚJO, A. C. J.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. D. S.; SILVA, L. E.; AMARAL, W. D.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; BEZERRA, C. F.; IRITI, M.; COUTINHO, H. D. M. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) characterization and evaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of biosciences**, v. 76, p. 35–42, 2020.

DA SILVA ALVES, R. R.; MENDES RODRIGUES, J. G.; TELES-REIS, A.; ARAÚJO NOGUEIRA, R.; CORREIA LIMA LICÁ, I.; SAMPAIO LIRA, M. G.; DA SILVA ALVES, R.; SILVA-SOUZA, N.; AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE, T. J.; SILVA MIRANDA, G. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1689–1699, 2020.

DA SILVA, J.K.; DA TRINDADE, R.; ALVES, N.S.; FIGUEIREDO, P.L.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W.N. Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, p. 555-559, 2003.

DE ALMEIDA, R.R.P.; SOUTO, R.N.P.; BASTOS, C.N.; DA SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemical Biodiversity**, v. 6, p. 1427–1434, 2009.

DE CASTRO, C. C.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; DE CARVALHO, P. H.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L.; COURI, M. R.; PINTO, P. D. E. F.; DA SILVA FILHO, A. A. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 22, n. 10, p. 921–928, 2015.

DE CASTRO SPADARI, C.; DA SILVA DE BASTIANI, F. W. M.; PISANI, P. B. B.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; ISHIDA, K. Efficacy of voriconazole *in vitro* and in invertebrate model of cryptococcosis. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 4, p. 773–784, 2020.

DENNING D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 2003.

DESAI J. V. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. **Journal of fungi**, v. 4, n. 1, e. 10, 2018.

DE SOUZA, M. T.; SOUZA, M. T.; BERNARDI, D.; KRINSKI, D.; MELO, D. J.; OLIVEIRA, D. C.; RAKES, M.; ZARBIN, P. H. G.; MAIA, B. H. L. N. S.; ZAWADNEAK, M. A. C. Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13056-13065, 2020.

DIAZ, P.P.; MALDONADO, E.; OSPINA, E. El aceite esencial de *Piper aduncum*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, p. 136–138, 1984.

DI VITO, M.; GARZOLI, S.; ROSATO, R.; MARIOTTI, M.; GERVASONI, J.; SANTUCCI, L.; OVIDI, E.; CACACI, M.; LOMBARINI, G.; TORELLI, R.; URBANI, A.; SANGUINETTI, M.; BUGLI, F. A New Potential Resource in the Fight against *Candida auris*: the *Cinnamomum zeylanicum* Essential Oil in Synergy with Antifungal Drug. *Microbiology spectrum*, v. 11, n. 2, e. 0438522, 2023.

DURANT-ARCHIBOLD, A. A.; SANTANA, A. I.; GUPTA, M. P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 63-82, 2018.

ENOCH, D. A.; YANG, H.; ALIYU, S. H.; MICALLEF, C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods in molecular biology**, v. 1508, p. 17–65.

EUCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 2.01. Julho de 2017.

EUCAST. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, v. 3, 2022.

EWBANK, J. J.; PUJOL, N. Local and long-range activation of innate immunity by infection and damage in *C. elegans*. **Current opinion in immunology**, v. 38, p. 1–7, 2016.

EWBANK, J. J.; ZUGASTI, O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. **Disease models & mechanisms**, v. 4, n. 3, p. 300–304, 2011.

FERREIRA, G. K. DOS S.; MARGALHO, J. F.; ALMEIDA, L. Q.; ANJOS, T. O.; DOS, CASCAES, M. M.; NASCIMENTO, L. D. DO; ANDRADE, E. H. DE A). Avaliação sazonal e circadiana do óleo essencial das folhas de *Piper divaricatum* G. Mey. (Piperaceae) / Seasonal and circadian evaluation of the essential oil of *Piper divaricatum* G. Mey. (Piperaceae) Leaves. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 41356–41369, 2020.

FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; DE SOUZA JÚNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PloS one**, v. 13, n. 6, 2018.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FISHER, M. C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621–627, 2009.

GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C.; BIZZO, H. R.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 25, n. 4, p. 383–393, 2016.

GARCIA-RUBIO, R.; DE OLIVEIRA, H. C.; RIVERA, J.; TREVIJANO-CONTADOR, N. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 2993, 2020.

GHAVAM, M.; MANCONI, M.; MANCA, M. L.; BACHETTA, G. Extraction of essential oil from *Dracocephalum kotschyi* Boiss. (Lamiaceae), identification of two active compounds and evaluation of the antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, 2021.

GLITTENBERG, M. T.; SILAS, S.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A.; LIGOXYGAKIS, P. Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. **Disease models & mechanisms**, v. 4, n. 4, p. 504–514, 2011.

GOMES, T. M.; LOPES, J. B.; BARROS, R. F. M.; ALENCAR, N. L.. Plantas de uso terapêutico na comunidade rural Bezerro morto, São João da Canabrava, Piauí, Brasil. **Gaia Scien.**, v.11, n.1, p.253-268, 2017

GOMEZ-LOPEZ, A.; FORASTIERO, A.; CENDEJAS-BUENO, E.; GREGSON, L.; MELLADO, E.; HOWARD, S. J.; LIVERMORE, J. L.; HOPE, W. W.; CUENCA-ESTRELLA, M. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. **Medical mycology**, v. 52, n. 3, p. 311–319, 2014.

GONG, Y.; LI, H. X.; GUO, R. H.; WIDOWATI, W.; KIM, Y. H.; YANG, S. Y.; KIM, Y. R. Anti-allergic Inflammatory Components from the Leaves of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 44, e. 2, p. 245-250, 2021.

GREIG, N. Introduction, *In*: DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*. **Springer**, 2004.

GUETAT, A.; ABDELWAHAB, A. T.; YAHIA, Y.; RHIMI, W.; ALZAHIRANI, A. K.; BOULILA, A.; CAFARCHIA, C.; BOUSSAID, M.. *Deverra triradiata* Hochst. ex Boiss. from the Northern Region of Saudi Arabia: Essential Oil Profiling, Plant Extracts and Biological Activities. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 12, 2022.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M. Piperaceae. *In*: WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E.; ROMANI, R. P.; MELHEM, T. S.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; KIRIZAWA, M.; MELO, M. M. R. F.; CORDEIRO, I.; KINOSHITA, L. S. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 7, p. 263-320, 2012.

GUIMARÃES, E.F.; MEDEIROS, E.V.S.S.; QUEIROZ, G.A. *Piper in Flora do Brasil* 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12765>>. Acesso em: 07 jan. 2023

GUIMARÃES, E.F.; MEDEIROS, E.V.S.S.; QUEIROZ, G.A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12738>>. Acesso em: 26 jan. 2023

GUIMARÃES, E.F.; MEDEIROS, E.V.S.S.; QUEIROZ, G.A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12748>>. Acesso em: 26 jan. 2023

GUTIERREZ, M. P. R.; GONZALEZ, N. A. M.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 163–193, 2013.

GU, W.; YU, Q.; YU, C.; SUN, S. In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 13, p. 74–80, 2018.

HAMILOS, G.; SAMONIS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Recent Advances in the Use of *Drosophila melanogaster* as a Model to Study Immunopathogenesis of Medically Important Filamentous Fungi. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

HANAOKA, M.; DOMAE, E. IL-1 α released from oral epithelial cells upon candidalysin exposure initiates an early innate epithelial response. **International immunology**, v. 33, n. 3, p. 161–170, 2021.

HANI, L.; SHIVAKUMAR, H. G.; VAGHELA, R.; OSMANI, R. A.; SHRIVASTAVA, A. Candidiasis: a fungal infection-current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 15, p. 42-52, 2015.

HERRERA-CALDERON, O.; CHACALTANA-RAMOS, L.; YULI-POSADAS, R. Á. Y.; PARI-OLARTE, B.; ENCISO-ROCA, E.; TINCO-JAYO, J. A.; ROJAS-ARMAS, J. P.; FELIX-VELIZ, L. M. V.; FRANCO-QUINO, C. Antioxidant and Cytoprotective Effect of *Piper aduncum* L. against Sodium Fluoride (NaF)-Induced Toxicity in Albino Mice. **Toxics**, v. 7, e.2, n. 28, 2019.

HOHL, T. .M. Overview of vertebrate animal models of fungal infection. **Journal of Immunological Methods**, v. 410, p. 100–112.

JAFRI, H.; AHMAD, I. Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de mycologie medicale**, v. 30, n. 1, 2020.

JARAMILLO-FIERRO, X.; OJEDA-RIASCOS, S. In vitro hypoglycemic and antioxidante activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Southern Ecuador. **Axioma**, n. 18, p. 23-36, 2018.

JORDÁ, T.; PUIG, S. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 11, n. 7, 2020.

JORJÃO, A. L.; OLIVEIRA, L. D.; SCORZONI, L.; FIGUEIREDO-GODOI, L. M. A.; PRATA, M. C. A.; JORGE, A. O. C.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

JUNG, S. I.; RODRIGUEZ, N.; IRRIZARY, J.; LIBORO, K.; BOGARIN, T.; MACIAS, M.; EIVERS, E.; PORTER, E.; FILLER, S. G.; PARK, H. Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans*. **PloS one**, v. 12, n. 11, e. 0187721, 2017.

JUNQUEIRA J. C. Models hosts for the study of oral candidiasis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 710, p. 95–105, 2012.

KASKATEPE, B.; ASLAN ERDEM, S.; OZTURK, S.; SAFI OZ, Z.; SUBASI, E.; KOYUNCU, M.; VLAINIĆ, J.; KOSALEC, I. Antifungal and Anti-Virulent Activity of *Origanum majorana* L. Essential Oil on *Candida albicans* and In Vivo Toxicity in the *Galleria mellonella* Larval Model. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 3, 2022.

KAWAMURA, K.; MARUYAMA, I. N. Forward Genetic Screen for *Caenorhabditis elegans* Mutants with a Shortened Locomotor Healthspan. **G3**, v. 9, n. 8, p. 2415–2423, 2019.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. **Journal of fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 2018.

KHAN, H. ;KHAN, Z.; AMIN, S.; MABKHOT, Y. N.; MUBARAK, M. S.; HADDA, T. B.; MAIONE, F. Plant bioactive molecules bearing glycosides as lead compounds for the treatment of fungal infection: A review. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 93, p. 498–509, 2017.

KHRUENGSAI, S.; SRIPAHCO, T.; RUJANAPUN, N.; CHAROENSUP, R.; PRIPDEEVECH, P. Chemical composition and biological activity of Peucedanum dhana A. Ham essential oil. **Scientific reports**, v.11, 2021.

KLINGSPOR, L.; TORTORANO, A. M.; PEMAN, J.; WILLINGER, B.; HAMAL, P.; SENDID, B.; VELEGRAKI, A.; KIBBLER, C.; MEIS, J. F.; SABINO, R.; RUHNKE, M.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; SALONEN, J.; DÓCZI, I. Invasive Candida infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2015.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some peruvian medicinal plants used in callería district. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 99, p. 309–312, 2005.

KÖHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, 2015.

KÖNIG, A.; HUBE, B.; KASPER, L. The Dual Function of the Fungal Toxin Candidalysin during *Candida albicans*-Macrophage Interaction and Virulence. **Toxins**, v. 12, n. 8, 2020.

KRAMS, I.; KECKO, S.; KANGASSALO, K.; MOORE, F.R.; JANKEVICS, E.; INASHKINA, I.; KRAMA, T.; LIETUVIETIS, V.; MEIJA, L.; RANTALA, M.J. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 22, p. 431–439, 2015.

KWADHA, C. A.; ONG'AMO, G. O.; NDEGWA, P. N.; RAINA, S. K.; FOMBONG, A. T. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 2, 2017.

LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic Acid Derivatives from Piper Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004.

LANGE, A.; BEIER, S.; HUSON, D. H.; PARUSEL, R.; IGLAUER, F.; FRICK, J. S. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). **Genome announcements**, v. 6, n. 2, 2018.

LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021.

LEMO, P.F.S.; FARIA M.G.A.; KOOPMANS, F.F.; DAHER, D.V.; PIRES, B.M.F.B.; SOUZA, N.V.D.O. Infecções fúngicas cutâneas podais como preditoras de complicações em pessoas com diabetes: uma revisão integrativa. **Rev Enferm Atenção Saúde**, v. 10, n. 2, e. 202121, 2021.

LENTZ, D.L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 253–263, 1998.

LE PAPE, P.; XIMENES, R. M.; ARIZA, B.; IRIARTE, J.; ALVARADO, J.; ROBERT, E.; SIERRA, C.; MONTAÑEZ, A.; ÁLVAREZ-MORENO, C. First case of *Aspergillus caelatus* airway colonization in a Chronic Obstructive Pulmonary Disease patient. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 81, p. 85–90, 2019.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513–521, 2003.

LIONAKIS M. S. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521–527, 2011.

LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BAKHTIAR, A.; BÉZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, 400–405, 2002.

LOH, J. M.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, p. 419–428, 2013.

LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; JUNIOR, J. M.; AMBRÓSIO, D. L.; KATO, M. J.; DA SILVA BOLZANI, V.; CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product research**, v. 22, n. 12, p. 1040–1046, 2008.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

LU, H.; SHRIVASTAVA, M.; WHITEWAY, M.; JIANG, Y. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323–337, 2021.

LU, M.; YANG, X.; YU, C.; GONG, Y.; YUAN, L.; HAO, L.; SUN, S.. Linezolid in Combination With Azoles Induced Synergistic Effects Against *Candida albicans* and Protected *Galleria mellonella* Against Experimental Candidiasis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2019.

LU, M.; YAN, H.; YU, C.; YUAN, L.; SUN, S. Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.

MACEDO, A. L.; DA SILVA, D. P. D.; MOREIRA, D. L.; DE QUEIROZ, L. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; ARAUJO, G. F.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, S. S. C.; DE ALMEIDA, E. C. P.; VALVERDE, A. L.; ROBBS, B. K. Cytotoxicity and selectiveness of Brazilian Piper species towards oral carcinoma cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 110, p. 342–352, 2019.

MARQUES, A.; PEIXOTO, A.; DE PAULA, R.; NASCIMENTO, M.; SOARES, L.; VELOZO, L.; GUIMARÃES, E.; KAPLAN, M. Phytochemical investigation of anti-plasmodial metabolites from Brazilian native piper species. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 74–81, 2015.

MARTÍNEZ, C.; CARVALHO, M. R.; MADRIÑÁN, S.; JARAMILLO, C. A. A late cretaceous Piper (Piperaceae) from Colombia and diversification patterns for the genus. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 2, p. 273–289, 2015.

MARTINS, N.; FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, v. 177, n. 5, p. 223–240, 2014.

MATIAS, E. F. F.; PEREIRA, A. P. D.; BRAZ, A. V. O.; RODRIGUES, M. C.; SILVA, J. L.; MAIA, P. A. A.; SANTOS, S. C. D.; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; SILVA, L. E. D.; AMARAL, W. D.; KOWALSKA, G.; ROWIŃSKI, R.; HAWLENA, J.; KOWALSKI, R.; COUTINHO, H. D. M.; ALENCAR, V. R. C. T. Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Piper arboreum* for Development and Improvement of Mouthwash. **Molecules**, v. 27, n. 19, 2022.

MCCALL, A. D.; PATHIRANA, R. U.; PRABHAKAR, A.; CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, 2019.

MOYA-ANDÉRICO, L.; VUKOMANOVIC, M.; CENDRA, M. D. M.; SEGURA-FELIU, M.; GIL, V.; DEL RÍO, J. A.; TORRENTS, E. Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. **Chemosphere**, v. 266, n. 129235, 2021.

MUHAMMED, M., COLEMAN, J. J., & MYLONAKIS, E. *Caenorhabditis elegans*: a nematode infection model for pathogenic fungi. **Methods in molecular biology**, v. 845, p. 447–454, 2012.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D. L.; WÄCHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and infection**, v. 13, n. 12, p. 963–976, 2011.

NOCUA-BÁEZ, L. C.; URIBE-JEREZ, P.; TARAZONA-GUARANGA, L.; ROBLES, R.; CORTÉS, J. A. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, v. 37, n. 3, p. 219–230, 2020.

NONGMAI, C.; KANOKMEDHAKUL, K.; PROMGOOL, T.; PALUKA, J.; SUNWANPHAKDEE, C.; KANOKMEDHAKUL, S. Chemical constituents and antibacterial activity from the stems and leaves of *Piper wallichii*. **Journal of Asian natural products research**, v. 24, n. 4, 2022.

OLIVEIRA, G. L.; CARDOSO, S. K.; LARA, C. R. J.; VIEIRA, T. M.; GUIMARÃES, E. F.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 85, n. 4, p. 1227–1234, 2013.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 2010.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 233–241, 2000.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18026, 2018.

PARISE-FILHO, R.; PASTRELLO, M.; CARMELINGO, C. E. P.; SILVA, G. J.; AGOSTINHO, L. A.; SOUZA, T. S.; MAGRI, F. M. M.; RIBEIRO, R. R.; BRANDT, C. A.; POLLI, M. C. The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. **Pharmaceutical biology**, v. 49, e. 11, p. 1173–1179, 2011.

PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K. F.; MAGRI, F. M.; FERREIRA, A. K.; DA SILVA, B. A.; DAMIÃO, M. C.; TAVARES, M. T.; AZEVEDO, R. A.; AUADA, A. V.; POLLI, M. C.; BRANDT, C. A. Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic

activity and preliminary SAR studies of dillapiole analogues. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, n. 12, p. 934–944, 2012.

PASSOS, J. S.; MARTINO, L. C.; DARTORA, V. F. C.; ARAUJO, G. L. B.; ISHIDA, K.; LOPES, L. B. Development, skin targeting and antifungal efficacy of topical lipid nanoparticles containing itraconazole. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 149, n. 105296, 2020.

PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1635–1660, 2017.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. História das Plantas Úteis e Medicinais do Brasil (título original: Historia das Plantas Medicinaes e Uteis do Brazil). **Fino Traço**, Belo Horizonte (publicação original 1888-1905). e. 1, p. 615-618, 2016.

PEREIRA, L. A.; RODRIGUES, P.; ANDRADE, E.; GUIMARÃES, E. valor de uso, indicações terapêuticas e perfil farmacológico e etnofarmacológico de duas espécies do gênero Piper L. em uma comunidade quilombola na amazônia oriental brasileira. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 52027–52039, 2020.

PEREIRA, L. B.; NEGRO-DELLACQUA, M.; LIMA, K. DE M. Micoses superficiais em imunodeprimidos: aspectos clínicos e importância do exame micológico direto. **Revista Saúde E Desenvolvimento**, v. 13, n. 15, 2020.

PERFECT J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.

PEYCLIT, L.; YOUSFI, H.; ROLAIN, J. M.; BITTAR, F. Drug Repurposing in Medical Mycology: Identification of Compounds as Potential Antifungals to Overcome the Emergence of Multidrug-Resistant Fungi. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 5, 2021.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; TURNIDGE, J. D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997-2016. **Open forum infectious diseases**, v. 6, p. 79–94, 2019.

PINTO, E.; HRIMPENG, K.; LOPES, G.; VAZ, S.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of Ferulago capillaris essential oil against Candida, Cryptococcus, Aspergillus and dermatophyte species. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 1311–1320, 2013.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e IBDF**, v.6, 1984.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

PUKKILA-WORLEY, R.; FEINBAUM, R. L.; MCEWAN, D. L.; CONERY, A. L.; AUSUBEL, F. M. The evolutionarily conserved mediator subunit MDT-15/MED15 links protective innate immune responses and xenobiotic detoxification. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, e. 1004143, 2014.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; MOOSAVI, M. L.; JAIMAND, K. Microbial Sensitivity to and Chemical Properties of the Essential Oil of *Artemisia annua* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 1, p. 59-62, 2003.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 5, 2016.

ROCHA, W. R. V. DA; NUNES, L. E. .; NEVES, M. L. R. .; XIMENES, E. C. P. DE A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. DE A. *Candida* genus - Virulence factors, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

RODRÍGUEZ, E. J.; SAUCEDO-HERNÁNDEZ, Y.; VANDER HEYDEN, Y.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; RAMIS-RAMOS, G.; LERMA-GARCÍA, M. J.; MONTEAGUDO, U.; BRAVO, L.; MEDINILLA, M.; DE ARMAS, Y.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Chemical analysis and antioxidant activity of the essential oils of three Piperaceae species growing in the central region of Cuba. **Natural product communications**, v.8, e. 9, p. 1325–1328, 2013.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, 2014.

RUIZ, S. P.; ANJOS, M. M.; CARRARA, V. S.; DELIMA, J. N.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DE ABREU FILHO, B. A. Evaluation of the antibacterial activity of Piperaceae extracts and nisin on *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Journal of food science**, v. 78, n. 11, 2013.

RUIZ-VÁSQUEZ, L.; MESIA, L. R.; CEFERINO, H. D. C; MESIA, W. R.; ANDRÉS, M. F.; DÍAZ, C. E.; GONZALES-COLOMA, A. Antifungal and Herbicidal Potential of Piper Essential Oils from the Peruvian Amazonia. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 14, 2022.

SALAZAR, L. C.; ORTIZ-REYES, A.; ROSERO, D. M.; LOBO-ECHEVERRI, T. Dillapiol in *Piper holtonii* as an Inhibitor of the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus*

gongylophorus of Leaf-Cutting Ants. **Journal of chemical ecology**, v. 46, n. 8, p. 668–674, 2020.

SCHULTES, R. e RAFFAUF, R. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest. **Dioscorides Press**, Portland, 1990.

SCORZONI, L.; DE LUCAS, M. P.; MESA-ARANGO, A. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; LOZANO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; ZARAGOZA, O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PloS one**, v. 8, n. 3, e. 60047, 2013.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; DE MELO, W. C.; DE OLIVEIRA, H. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 36, 2017.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental in Vivo Models of Candidiasis. **Journal of fungi**, v. 4, n. 1, 2018.

SERRANO, I; VERDIAL, C.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, M. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, 2023.

SHALA, A.; SINGH, S.; HAMEED, S.; KHURANA, S. M. P. Essential Oils as Alternative Promising Anti-Candidal Agents: Progress and Prospects. **Current pharmaceutical design**, v. 28, n. 1, p. 58–70, 2022.

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

SIGES, T.H.; HARTEMINK, A.E.; HEBINCK, P.; ALLEN, B. J. The Invasive Shrub *Piper aduncum* and Rural Livelihoods in the Finschhafen Area of Papua New Guinea. **Human Ecology**, n. 33, p. 875–893, 2005.

SILVA, A. C. A.; DIODATO, J. S.; CASTRO, J. W.; MATIAS, E. F. F.; SILVA, L. E.; DO AMARAL, W.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; SOUZA, A. K.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; COUTINHO, H. D. M. Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 199, 2019.

SILVA ALMEIDA, J. R. G.; FACANALI, R; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; CARNEIRO LÚCIO, A. S. S.; LIMA, E. O.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia*

gardneriana Mart. And *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 3, p. 275-278, 2010.

SILVA, S. L.; LIMA, M. E. DE; SANTOS, R. D. T. DOS; LIMA, E. DE O. Onychomycoses due to fungi of the genus *Candida*: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e560985771, 2020.

SILVA-TRUJILLO, L.; QUINTERO-RUEDA, E.; STASHENKO, E. E.; CONDE-OCAZONEZ, S.; RONDÓN-VILLARREAL, P.; OCAZONEZ, R. E. Essential Oils from Colombian Plants: Antiviral Potential against Dengue Virus Based on Chemical Composition, In Vitro and In Silico Analyses. **Molecules**, v. 27, n. 20, 2022.

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; DE OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. **Journal of fungi**, v. 4, n. 4, 2018.

SMITH, D. F. Q.; CASADEVALL, A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. **Pathogens and disease**, v. 79, n. 3, 2021.

SOARES, K. D.; BORDINGNON, S. A. L.; APEL, M. A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Piper gaudichaudianum* and *Piper mikanianum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 297, 2022.

SOBEL, J. D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971–977, 2018.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E.; CHASE, M. W. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature**, v. 402, p. 402–404, 1999.

SOUTO, R. N.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G. Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical entomology**, v. 41, n. 6, p. 510–517, 2012.

SOUZA DOS SANTOS, B.; BEZERRA FILHO, C. M.; ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR, J. A.; BRUST, F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; LINO DA ROCHA, S. K.; KROGFELT, K. A.; MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO, D.; TEREZA DOS SANTOS CORREIA, M.; NAPOLEÃO, T. H.; NASCIMENTO DA SILVA, L. C.; MACEDO, A. J.; VANUSA DA SILVA, M.; GUEDES PAIVA, P. M. Anti-staphylococcal activity of *Syagrus coronata* essential oil: Biofilm eradication and in vivo action on *Galleria mellonella* infection model. **Microbial pathogenesis**, v. 131, p. 150–157, 2019.

SULSTON, J. E.; BRENNER, S. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 95–104, 1974.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of fungi**, v. 7, n. 2, 2021.

TARIQ, S.; WANI, S.; RASOOL, W.; SHAFI, K.; BHAT, M. A.; PRABHAKAR, A.; SHALLA, A. H.; RATHER, M. A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, n. 103580, 2019.

TAYLOR, P.; ARSENAK, M.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, A.; MILANO, B.; GONTO, R.; RUIZ, M. C.; FRAILE, S.; TAYLOR, S.; ESTRADA, O.; MICHELANGELI, F. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 4, p. 530–539, 2013.

THAO, N. P.; LUYEN, B. T.; WIDOWATI, W.; FAUZIAH, N.; MAESAROH, M.; HERLINA, T.; MANZOOR, Z.; ALI, I.; KOH, Y. S.; KIM, Y. H. Anti-inflammatory Flavonoid C-Glycosides from *Piper aduncum* Leaves. **Planta medica**, v. 82, n.17, p. 1475–1481, 2016.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1234–1241, 1999.

TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M. J.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1776–1778, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. **Artmed**, v. 12, p. 320-330, 2017.

TSAL, C.J.; LOH, J.M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, n. 7, p. 214–229, 2016.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 4, 2016.

VALADARES, A. C. F.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; DE DEUS, I. P. B.; DE OLIVEIRA FILHO, J. G.; DOS SANTOS, T. C. L.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; MIRANDA, M. L. D. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2691–2699, 2018.

VALADEAU, C.; PABON, A.; DEHARO, E.; ALBÁN-CASTILLO, J.; ESTEVEZ, Y.; LORES, F. A.; ROJAS, R.; GAMBOA, D.; SAUVAIN, M.; CASTILLO, D.; BOURDY, G. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413–422, 2009.

VALAREZO, E.; MERINO, G.; CRUZ-ERAZO, C.; CARTUCHE, L. Bioactivity evaluation of the native Amazonian species of Ecuador: *Piper lineatum* Ruiz & Pav. essential oil. **Natural Volatiles & Essential Oils**, v. 7, n. 4, p. 14-25, 2020.

VANDENBERG, M.E. **Plantas Medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**, e. 2 Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 1993.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VASQUES DA SILVA, R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V.DAS.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521–527, 2002.

VÁSQUEZ-OCMÍN, P. G.; COJEAN, S.; ROUNY, V.; MARTI, G.; POMEL, S.; GADEA, A.; LEBLANC, K.; DENNEMONT, I.; RUIZ-VÁSQUEZ, L.; COTRINA, H. R.; MESIA, W. R.; BERTANI, S.; MESIA, L. R.; MACIUK, A. Deciphering anti-infectious compounds from Peruvian medicinal *Cordoncillos* extract library through multiplexed assays and chemical profiling. **Zenodo**, 2022.

VERTYPOROKH, L.; KORDACZUK, J.; MAK, P.; HUŁAS-STASIAK, M.; WOJDA, I. Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*. **Journal of insect physiology**, v. 117, n. 103903, 2019.

VIEIRA, L.S. Manual da Medicina Popular: Fitoterapia da Amazonia. **Faculdade de Ciencias Agrarias do Para, Belém**, 1991.

VILLAMIZAR, L. H.; CARDOSO, M. D.; ANDRADE, J.; TEIXEIRA, M. L.; SOARES, M. J. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 131-139, 2017.

WANI, F. A.; AMADUDDIN, ANEJA, B.; SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K.; AHMAD, R.; ABID, M.; PATEL, R. Synthesis of Novel Benzimidazolium Gemini Surfactants and Evaluation of Their Anti-Candida Activity. **ACS omega**, v. 4, n. 7, p. 11871–11879, 2019.

WFO World Flora Online. WFO Plant List Genus Piper L., 2022. Disponível em: <https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-4000029808-2022-12>. Acesso em: 11 mar. 2023.

WIEDERHOLD, N. P.; PATTERSON, H. P.; TRAN, B. H.; YATES, C. M.; SCHOTZINGER, R. J.; GARVEY, E. P. Fungal-specific Cyp51 inhibitor VT-1598 demonstrates in vitro activity against *Candida* and *Cryptococcus* species, endemic fungi, including *Coccidioides* species, *Aspergillus* species and *Rhizopus arrhizus*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 404–408, 2018.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 2173, 2017.

YAMAGUCHI, L. F.; LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M., MASCHIO, P. D.; KATO, M. J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1838-1843.

YAMAMOTO, S.; JAISWAL, M.; CHARNG, W.L. et al. A drosophila genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. **Cell**. v. 159, n. 1, p. 200-214, 2014.

YAN, L.; WANG, X. D.; SEYEDMOUSAVI, S.; YUAN, J. N.; ABULIZE, P.; PAN, W. H.; YU, N.; YANG, Y. L.; HU, H. Q.; LIAO, W. Q.; DENG, S. W. Antifungal Susceptibility Profile of *Candida Albicans* Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in Xinjiang Province of China. **Mycopathologia**, v. 184, n. 3, p. 413–422, 2019.

ZAHIN, M.; BOKHARI, N. A.; AHMAD, I.; HUSAIN, F. M.; ALTHUBIANI, A. S.; ALRUWAYS, M. W.; PERVEEN, K.; SHALAWI, M. Antioxidant, antibacterial, and antimutagenic activity of *Piper nigrum* seeds extracts. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 9, 2021.