



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



CÁSSIO ILAN SOARES MEDEIROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL SOBRE *Candida albicans* DE SECREÇÕES VULVOVAGINAIS

**JOÃO PESSOA-PB
2023**

CÁSSIO ILAN SOARES MEDEIROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL SOBRE *Candida albicans* DE SECREÇÕES VULVOVAGINAIS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador(a): Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Coorientador(a): Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

**JOÃO PESSOA-PB
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488a Medeiros, Cássio Ilan Soares.

Avaliação da atividade antifúngica do linalol sobre
Candida albicans de secreções vulvovaginais / Cássio
Ilan Soares Medeiros. - João Pessoa, 2023.

164 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Biofilme. 2. Candidíase. 3. Docking molecular.
4. mecanismo de ação. 5. Resistência antifúngica.
6. Sinergismo. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II.
Oliveira Filho, Abrahão Alves de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

Elaborado por MAGNOLIA FELIX DE ARAUJO - CRB-15/883

CÁSSIO ILAN SOARES MEDEIROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL SOBRE *Candida albicans* DE SECREÇÕES VULVOVAGINAIS

Aprovado em: 26/05/2023

Banca Examinadora



Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos-PB)
Coorientador



Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno (Titular)



Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno (Titular)



Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Externa (Titular)



Dr. Gregório Fernandes Gonçalves
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo (Titular)

Dedicatória

Dedico esta conquista às pessoas mais importantes e preciosas da minha vida:

A Deus, por me proporcionar o privilégio de conhecer um pouco, talvez um pequeno parágrafo do livro das obras de suas mãos.

A minha esposa, Mabelle de Sousa Almeida e a minha filha Zoe Constance Soares Almeida, por todo amor, dedicação, apoio e compreensão que foram essenciais para que eu conquistasse esta grande vitória.

A minha mãe, Inês Soares Rodrigues, por sempre me incentivar a seguir em frente procurando o melhor, mas sempre mantendo a humildade por todos que estão a minha volta.

Aos meus avós Antônio Soares Sobrinho & Ninfa Rodrigues Soares in memoriam, por todo apoio carinho e participação na minha criação.

Agradecimientos

*A **Deus** por ter me concedido o privilégio e a oportunidade de realizar um sonho que jamais eu poderia ter concretizado sozinho. Obrigado por ter aberto a minha mente e o meu coração, para compreender e contribuir com a ciência do meu país com mais uma pequena etapa no conhecimento.*

Foram anos difíceis, muito trabalho e mais trabalho. Uma pandemia de COVID 19 que nos trouxeram grandes perdas de pessoas queridas, obscurantismos, fascismos, em fim pseudociência. Mas não perdemos a esperança, continuamos a lutar um dia por vez, e nesse momento resta o sentimento de gratidão e reflexão sobre tudo que aprendi nos últimos tempos.

*Sou grato a minha esposa **Mabelle de Sousa Almeida** e a minha filha **Zoe Constance Soares Almeida** pelo carinho, cuidado e compreensão para comigo. São a fonte inspiradora e a razão para que eu pudesse continuar. Pois apesar da vida acadêmica ser um sacerdócio, em várias ocasiões desta, há grandes dificuldades onde nossa família é um porto seguro.*

*Aos meus colegas de turma, e do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos; agradeço pela cumplicidade, companheirismo, amizade e respeito durante esses quatro anos. Em especial a **Francisco Júnior e Rawny G. Gouveia**.*

*A **Alexandra Elbakyan**, apesar das controvérsias, tem lutado pelo acesso igualitário à informação científica de alta qualidade.*

*A minha orientadora, **Profª. Drª. Edeltrudes de O. Lima** pela oportunidade, orientação e confiança em me depositada. E ao meu coorientador **Profº. Drº. Abrahão Alves de O. Filho** que pacientemente me instruiu na escrita e em toda estética dos artigos frutos desse trabalho. Com certeza levarei vocês na minha vida como exemplos de um bom caráter e de profissionais.*

*Ao **Profº. Drº. Ulrich Vasconcelos**, deixo meu carinho e gratidão, sobretudo no que diz respeito aos experimentos e entendimento na formação e combate ao biofilme bacteriano e fúngico que me foram repassados.*

Aos **Profº. Drº. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Hilzeth de Luna Freire Pessôa e Gregório Fernandes Gonçalves**, deixo minha gratidão por avaliarem e contribuírem de forma significativa para o aprimoramento dessa tese de doutorado.

À **Coordenação** e aos **funcionários(as)** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em destaque **Caroline Medeiros** e **Nilmar Níncia** pela competência, seriedade e apoio.

A **UFPB** pelo acolhimento, apoio e a estrutura para o desenvolvimento deste estudo.

Por fim, quero agradecer ao **Presidente da República Federativa do Brasil, Luiz Inácio Lula da Silva**, o presidente que mais investiu nas Universidades Federais e Estaduais nesse país, que construiu a oportunidade de o pobre das classes sociais mais baixas, conseguir um diploma universitário e conquistar seu emprego digno, por mais uma vez, com a força do povo brasileiro e em especial ao povo nordestino começar a reconstruir a democracia do Brasil.

Viva o Brasil, viva Luiz Inácio Lula da Silva, viva a democracia e viva as Universidades brasileiras!

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)



Resumo e Abstract

RESUMO

Medeiros, C. I. S.; Avaliação da atividade antifúngica do linalol sobre *Candida albicans* de secreções vulvovaginais, 2023. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

Candida albicans é o patógeno fúngico oportunista mais comumente isolado em seres humanos, sendo responsável por mais de 90% dos casos de infecções fúngicas graves. É também a causa mais frequente de candidíase vulvovaginal (CVV), que representa de 70-90% dos casos de vulvovaginite. O uso generalizado de um número limitado de agentes antifúngicos, particularmente fármacos azólicos como o fluconazol, levou ao desenvolvimento de resistência microbiana no tratamento de infecções por *Candida*, um problema de importância crescente. Portanto, há uma necessidade urgente de novos agentes antifúngicos para o manejo eficiente dessas infecções. Sendo assim, as pesquisas sobre os constituintes ativos de produtos naturais podem ser uma alternativa promissora a essa problemática. Nesse sentido, destaca-se o linalol, molécula com várias bioatividades e oriunda de várias plantas como *Lavandula angustifolia*, *Lippia alba*, *Coriandrum sativum* L, entre outras. No entanto, não há muitos estudos na literatura sobre o mecanismo de ação do linalol em células fúngicas, a toxicidade, sinergismo com antifúngicos licenciados, ação sobre biofilme e a estabilidade do complexo receptor-ligante. Portanto, esse estudo teve por objetivo investigar o potencial farmacológico do linalol frente a cepas de *C. albicans* de secreções vulvovaginais. Para este propósito, foram aplicadas técnicas *in vitro* de microdiluição para determinar a concentração inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM), bem como ensaios com sorbitol e ergosterol para verificar mecanismos de ação sobre a parede e a membrana celular fúngica respectivamente, além do estudo de associação (*checkerboard*). Para avaliar a formação de biofilme e a interferência do linalol nesse processo, foi realizado o ensaio do cristal violeta. Além disso, o linalol foi submetido aos softwares online (pkCSM e Osiris) para realizar a previsão de parâmetros de drogabilidade e toxicidade. Outrossim, o docking molecular foi realizado no AutoDock 4.2 com as proteínas envolvidas com a síntese e manutenção da parede e membrana celular de *C. albicans* (1,3- β -glucano sintase, lanosterol 14 α -demetilase e Δ 14-esterol redutase), e por fim foi realizado a análise de trajetória por dinâmica molecular (DM) no GROMACS 2022.3 do complexo (1,3- β -glucano sintase – linalol) com 30ns de simulação. Os principais resultados desse estudo indicaram que o linalol foi bioativo frente as cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol com uma CIM₅₀ de 64 μ g/mL e de natureza fungicida. Ademais, o aumento da CIM do linalol na presença de sorbitol e ergosterol revelaram que esta molécula possivelmente afeta a integridade da parede e da membrana plasmática de *C. albicans*. O linalol associado ao fluconazol, exibiu efeito sinérgico frente as cepas de *C. albicans*, mas teve efeito indiferente quando associado a nistatina. O linalol também interferiu no processo de formação do biofilme de *C. albicans*, diminuindo em 74.65% a sua formação. A análise farmacocinética *in silico* mostrou que o linalol tem significativa biodisponibilidade oral teórica, baixo potencial tóxico e alta similaridade a fármacos licenciados. Adicionalmente, o linalol interagiu quimicamente através de ligações de hidrogênio, van der Waals, e entre outras; com as enzimas chave da biossíntese da parede e da membrana plasmática de *C. albicans* com melhor interação com a 1,3- β -glucano sintase ($\Delta G = -6.0$ kcal/mol) no qual formaram um complexo receptor-ligante estável ao longo de 30ns de simulação, indicando provável inibição enzimática. Tomando em conjunto, os achados deste estudo indicaram que o linalol provavelmente causa danos à parede celular e à membrana plasmática de *C. albicans*, diretamente ou possivelmente pela interação com importantes enzimas envolvidas na biossíntese dessas estruturas fúngicas, agiu sinergicamente com o fluconazol, reduziu significativamente a formação de biofilme, além de ter apresentado baixo potencial toxicológico *in silico*.

Palavras-chave: Biofilme; candidíase; docking molecular; mecanismo de ação; resistência antifúngica; sinergismo.

ABSTRACT

Medeiros, C. I. S.; Evaluation of the antifungal activity of linalool on *Candida albicans* from vulvovaginal secretions, 2023. Thesis (Doctor in Natural and Synthetic Products Bioactive, area of concentration: Pharmacology) CCS/UFPB, João Pessoa-PB, Brazil.

Candida albicans is the most commonly isolated opportunistic fungal pathogen in humans, accounting for more than 90% of cases of serious fungal infections. It is also the most frequent cause of vulvovaginal candidiasis (VVC), which accounts for 70-90% of vulvovaginitis cases. The widespread use of a limited number of antifungal agents, particularly azole drugs such as fluconazole, has led to the development of microbial resistance in the treatment of *Candida* infections, a problem of increasing importance. Therefore, there is an urgent need for new antifungal agents for the efficient management of these infections. Therefore, the researches about the active constituents of natural products can be a promising alternative to this problem. In this sense, it stands out the linalool, molecule with several bioactivities and originated from several plants such as *Lavandula angustifolia*, *Lippia alba*, *Coriandrum sativum* L, among others. However, there are not many studies in the literature about the mechanism of action of linalool on fungal cells, toxicity, synergism with licensed antifungal drugs, action on biofilm and the stability of the receptor-ligand complex. Therefore, this study aimed to investigate the pharmacological potential of linalool against *C. albicans* strains from vulvovaginal secretions. For this purpose, *in vitro* microdilution techniques were applied to determine the minimum inhibitory and fungicidal concentration (MIC and MFC), as well as assays with sorbitol and ergosterol to verify mechanisms of action on the fungal cell wall and membrane respectively, besides the association study (checkerboard). To evaluate biofilm formation and the interference of linalool in this process, the crystal violet assay was performed. In addition, the linalool was submitted to online softwares (pkCSM and Osiris) to perform the prediction of parameters of druggability and toxicity. Furthermore, molecular docking was performed in AutoDock 4.2 with the proteins involved with the synthesis and maintenance of the cell wall and cell membrane of *C. albicans* (1,3- β -glucan synthase, lanosterol 14 α -demethylase and Δ 14-sterol reductase), and finally molecular dynamics (MD) trajectory analysis was performed in GROMACS 2022.3 of the complex (1,3- β -glucan synthase - linalool) with 30ns of simulation. The main results of this study indicated that linalool was bioactive against fluconazole-resistant *C. albicans* strains with an MIC₅₀ of 64 μ g/mL and fungicidal in nature. Furthermore, the increase in the MIC of linalool in the presence of sorbitol and ergosterol revealed that this molecule possibly affects the integrity of the wall and plasma membrane of *C. albicans*. The linalool associated with fluconazole, exhibited synergistic effect against strains of *C. albicans*, but had an indifferent effect when associated with nystatin. Linalool also interfered in the biofilm formation process of *C. albicans*, reducing its formation by 74.65%. *In silico* pharmacokinetic analysis showed that linalool has significant theoretical oral bioavailability, low toxic potential and high similarity to licensed drugs. Additionally, linalool chemically interacted via hydrogen bonds, van der Waals, and among others; with key enzymes of *C. albicans* wall and plasma membrane biosynthesis with best interaction with 1,3- β -glucan synthase ($\Delta G = -6.0$ kcal/mol) in which they formed a stable receptor-ligand complex over 30ns of simulation, indicating likely enzyme inhibition. Taken together, the findings of this study indicated that linalool probably causes damage to the cell wall and plasma membrane of *C. albicans*, directly or possibly by interaction with important enzymes involved in the biosynthesis of these fungal structures, acted synergistically with fluconazole, significantly reduced biofilm formation, and showed low toxicological potential *in silico*.

Keywords: Biofilm; candidiasis; molecular docking; mechanism of action; antifungal resistance; synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da imunopatogênese da vaginite por <i>C. albicans</i>	35
Figura 2. Mecanismos de ação dos antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares	38
Figura 3. Estruturas químicas de alguns antifúngicos azóis	39
Figura 4. Estruturas químicas dos antifúngicos poliênicos	41
Figura 5. Estrutura química do antifúngico flucitosina	42
Figura 6. Antifúngicos equinocandinas	44
Figura 7. Estruturas moleculares da caspofungina (esquerda) e ibrexafungerp (direita)	47
Figura 8. Local e mecanismo de ação do ibrexafungerp	47
Figura 9. Diferentes mecanismos de multirresistência de células fúngicas	49
Figura 10. Estrutura química do linalol	63

Article 1. Antifungal activity of linalool against fluconazole resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action

Figure 1. Overlapping castanospermine ligand from 1,3- β -glucan synthase with a better conformation of redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions	82
Figure 2. Overlapping VT-1161 (oteseconazole) ligand from lanosterol 14 α -demethylase with best conformation in redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking	82
Figure 3. Overlapping NADPH ligand from Δ 14-sterol reductase with best conformation of redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions	82
Figure 4. Molecular docking analysis. A , Two-dimensional interactions. B , Three-dimensional representation of linalool interactions in the 1,3- β -glucan synthase active site. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions	83
Figure 5. Molecular docking analysis. A , Two-dimensional interactions. B , Three-dimensional representation of linalool interactions in the lanosterol 14 α -demethylase active site	83
Figure 6. Molecular docking analysis. A , Two-dimensional interactions. B , Three-dimensional representation of linalool respective interactions in the Δ 14-sterol reductase active site. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions	83

Figure 7. Summary representation of the predictive mechanism of action of linalool against four molecular targets of *C. albicans* strains based on in vitro test results and molecular docking. The linalool molecule appears to interfere with fungal cell wall maintenance involving 1,3- β -glucan synthase. Linalool can also interfere with fungal cell membrane integrity, altering the ergosterol content of these cells through interactions with lanosterol 14 α -demethylase, Δ 14-sterol reductase, and/or formation of permeability pores and consequent lysis of the fungal cell membrane88

Article 2. Effects of the association of linalool with nystatin and fluconazole against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Article 3. Docking prediction, molecular dynamics and anti-biofilm effect of linalool against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Figure 1. Validation process for molecular docking by redocking. **A**, Best overlap of castanospermine after redocking (blue) with respect to the PDB cocrystal (green). **B**, Two-dimensional interactions of castanospermine with the amino acids of the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC)113

Figure 2. Flexible molecular docking analysis of linalool in the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC). **A**, 2D interactions of linalool with the amino acids of the active site of the enzyme under study. **B**, 3D interactions of linalool with the amino acids of the active site of the enzyme under study with emphasis on the binding distances. **C**, 3D surface model of hydrogen bonds. **D**, 3D surface model of hydrophobicity114

Figure 3. Total energy values during MD simulation for the 1,3- β -glucan synthase - linalool complex115

Figure 4. RMSD values between 0ns and 30ns of MD simulation where protein, ligand and protein-ligand complex are represented116

Figure 5. RMSF values per residue of the protein when complexed to the ligand linalool117

Figure 6. Regions of the protein 1,3- β -glucan synthase with the highest fluctuation of RMSF. **A**, Side chain posterior (blue) to the enzyme active site. **B**, Side chain (blue) in the vicinity of the entrance to the active site of the enzyme117

Figure 7. Average values of the radius of gyration (Rg) of the protein when in complex with the ligand linalool118

Figure 8. H-bonds established during MD simulation between 1,3- β -glucan synthase and linalool over time	119
Figure 9. 3D model of the H-bond interactions of linalool to residues in the active site of 1,3- β -glucan synthase. A , H-bonds between 0 and 5ns. B , H-bond interactions from 6.8 to 15ns. C , H-bonds between 15.1 and 27.3ns	119

LISTA DE TABELAS

Article 1. Antifungal activity of linalool against fluconazole resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action

Table 1. MIC values and MFC ($\mu\text{g/mL}$) of linalool, fluconazole and nystatin against <i>C. albicans</i> strains by broth microdilution	79
Table 2. Effect of linalool against <i>C. albicans</i> LM 129 and <i>C. albicans</i> ATCC 76485 in the absence and presence of 0.8M sorbitol	80
Table 3. Effect of linalool and amphotericin B against <i>C. albicans</i> LM 129 and <i>C. albicans</i> ATCC 76485 in the absence and presence of ergosterol at 400 $\mu\text{g/mL}$	80
Table 4. Binding energies of PDB enzymes and tested compound	81
Table 5. <i>In silico</i> physicochemical and pharmacokinetic parameters of the linalool	85
Table 6. Toxicological properties of the linalool assessed using Osiris property explorer	85

Article 2. Effects of the association of linalool with nystatin and fluconazole against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Table 1. MIC of linalool and the effects of the combination with the antifungal nystatin (NYS) against <i>C. albicans</i> LM 129 and <i>C. albicans</i> ATCC 76485	97
Table 2. MIC of linalool and the effects of the combination with the antifungal fluconazole (FLU) against <i>C. albicans</i> LM 129 and <i>C. albicans</i> ATCC 76485	98

Article 3. Docking prediction, molecular dynamics and anti-biofilm effect of linalool against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Table 1. Percentages of reduction and classification of cell adhesion in the <i>in vitro</i> biofilm formation assay	112
Table 2. Values of binding energy (ΔG) and affinity constant (K_i) of linalool and castanospermine against the enzyme 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC)	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC Fluorocitosina

ADMET Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

AIDS Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMB Anfotericina B

ASD Ágar Saboraud Dextrose

ATCC *American Type Culture Collection*

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CSD Caldo Saboraud Dextrose

CVV Candidíase vulvovaginal

CVVR Candidíase vulvovaginal recorrente

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucleico

FLZ Fluconazol

ICIF Índice de concentração inibitória fracionada

NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NY Nistatina

OMS Organização Mundial de Saúde

PgPNSB Programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

q.s.p Quantidade suficiente para

RNA Ácido Ribonucleico

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

UFC Unidade Formadora de Colônia

UFPB Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE SÍMBOLOS

% Percentual

°C Grau Celsius

µg Micrograma

µg/mL Micrograma por mililitro

mL Mililitro

µL Microlitro

UFC/mL Unidade Formadora de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	26
2 REFERENCIAL TEÓRICO	30
2.1 O GÊNERO <i>Candida</i>	30
2.2 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL.....	32
2.3 PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	32
2.4 TRATAMENTO DA CANDIDÍASE.....	36
2.4.1 Azóis	38
2.4.2 Polienos.....	40
2.4.3 Flucitosina.....	42
2.4.4 Equinocandinas	43
2.4.5 Triterpenóides (Ibexafungerp).....	45
2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	48
2.5.1 Resistência aos azóis.....	49
2.5.2 Resistência aos polienos	50
2.5.3 Resistência à flucitosina	50
2.5.4 Resistência às equinocandinas	51
2.6 LIMITAÇÕES NA UTILIZAÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS	51
2.7 PLANTAS MEDICINAIS	52
2.8 TERPENOS	54
2.8.1 Linalol.....	55
3 OBJETIVOS	60
3.1 OBJETIVO GERAL	60
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	60
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 LOCAL DA PESQUISA	62
4.2 CEPAS FÚNGICAS	62
4.3 MEIOS DE CULTURA.....	62
4.4 SUBSTÂNCIAS	63
4.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	63
4.5.1 Inóculo	63

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	64
4.5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	65
4.5.4 Ação do linalol na parede celular fúngica – ensaio com sorbitol	65
4.5.5 Ação do linalol na membrana celular fúngica – ensaio com ergosterol	66
4.5.6 Estudo de associação – <i>checkerboard</i>	66
4.5.7 Potencial de inibição da formação de biofilme.....	67
4.6 ENSAIOS <i>in silico</i>	68
4.6.1 Previsões farmacocinéticas e toxicológicas	68
4.6.2 <i>Docking</i> molecular.....	68
4.6.3 Dinâmica molecular.....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal <i>Candida albicans</i> and its predictive mechanism of action	72
5.2 Effects of the association of linalool with nystatin and fluconazole against <i>Candida albicans</i> strains from vulvovaginal secretions	93
5.3 Docking prediction, molecular dynamics and anti-biofilm effect of linalool against <i>Candida albicans</i> strains from vulvovaginal secretions	106
6 CONCLUSÕES.....	126
REFERÊNCIAS	128
ANEXO A.....	148

Introdução



1 INTRODUÇÃO

Até o momento, foram identificadas mais de 8,7 milhões de espécies eucarióticas, das quais aproximadamente 611.000 pertencem ao reino fungi, correspondendo a 7% de todas as espécies eucarióticas conhecidas (MORA et al., 2011). Os fungos estão mais estreitamente relacionados aos seres humanos do que às bactérias no nível celular, e são classificados como organismos quimio-heterotróficos do grupo Eumycota. Entretanto, aproximadamente 600 espécies de fungos têm a capacidade de causar infecções em seres humanos (KHAN et al., 2010; MORA et al., 2011).

Existem mais de 200 espécies dentro do gênero *Candida*, porém muitas delas são endossimbiontes em seres humanos e causam infecções principalmente em hospedeiros imunossuprimidos. *Candida albicans* é responsável por cerca de 80% das infecções, embora as infecções por outras espécies, como *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) e *Candida dubliniensis*, estejam se tornando cada vez mais comuns (ASKUN; ASKUN, 2022; BORMAN; JOHNSON, 2021; KIDD; ABDOLRASOULI; HAGEN, 2023).

C. albicans é um microrganismo membro residente da microbiota em humanos, que pode causar infecções em pacientes saudáveis e imunocomprometidos. A candidíase pode ser superficial (por exemplo, oral, vaginal, mucocutânea) ou profunda (por exemplo, miocardite, septicemia) (MOLERO et al., 1998).

As infecções invasivas por espécies de *Candida* são consideradas entre as principais causas de morbidade e mortalidade (42%) em pacientes hospitalizados, mesmo em uso de terapias antifúngicas (FORD et al., 2015; PAPPAS et al., 2003). Além disso, a infecção por *C. albicans* é considerada a quarta infecção oportunista mais comum em hospitais (RIERA et al., 2022).

No contexto das infecções superficiais, em destaque para a candidíase vulvovaginal (CVV), documentada pela primeira vez por Wilkinson em 1849 e que continua a ser um problema debilitante que afeta a qualidade de vida de muitas mulheres (STUART WILKINSON, 1849). Esta é a manifestação clínica mais comum da infecção por *Candida*, estimando-se que afete aproximadamente 75% das mulheres em algum momento da vida e 85-95% das infecções sintomáticas é causada por *C. albicans* (BROWN et al., 2012; DENNING et al., 2018). Além disso, cerca de 5-9% (138 milhões de mulheres anualmente) sofrem pelo menos quatro episódios de CVV em um ano, e isso é caracterizado como candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) (SOBEL, 2016). Outrossim, a maior incidência de CVV

causada por *C. albicans* no Brasil foi relatada por estudos epidemiológicos em 92,3%, na Argentina, 85,95% e no Paquistão, 47,7% (CARVALHO et al., 2021; GAMARRA et al., 2014; KHAN et al., 2018).

As opções de tratamentos farmacológicos disponíveis para a CVV são limitadas principalmente à classe azólica de agentes fungistáticos. Tais opções incluem cursos curtos de formulações tópicas de vários agentes (imidazóis: clotrimazol, miconazol) ou (triazóis: itraconazol, posaconazol e fluconazol oral, administrado em regime de dose única ou múltipla) (JEANMONOD; JEANMONOD, 2022; PAAVONEN; BRUNHAM, 2020; WORKOWSKI, 2015). No entanto, existem limitações significativas com esses tratamentos, incluindo intolerância aos medicamentos, eventos adversos, risco potencial de aborto espontâneo e danos fetais associados ao uso de fluconazol (BÉRARD et al., 2019; MØLGAARD-NIELSEN; PASTERNAK; HVIID, 2013; VAN SCHALKWYK et al., 2015). Ademais, uma outra limitação preocupante é a prevalência crescente de resistência ao fluconazol e resistência intrínseca ou baixa tolerância de espécies de *Candida* a antifúngicos azólicos (MARCHAIM et al., 2012). E associado a esses fenômenos biológicos, também é reportado a formação de biofilmes em que numerosos estudos foram realizados para caracterizar esse processo, a virulência e os perfis de suscetibilidade antifúngica em isolados clínicos de pacientes com CVV e CVVR (PAIVA et al., 2012; SHERRY et al., 2017).

Atualmente no Brasil não há opções de tratamentos farmacológicos por via oral com antifúngicos não azólicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponíveis para pacientes com CVV. Essa ausência impacta negativamente as opções de tratamentos da CVV para pacientes com microrganismos resistentes aos azóis, aquelas que não respondem ou não toleram o fluconazol ou para os quais seu uso é contraindicado. Os novos agentes farmacológicos, portanto, devem idealmente, ter cobertura fúngica mais ampla, efeitos adversos mínimos, nenhum risco de danos fetais e interações medicamentosas limitadas.

Nesse sentido, os produtos naturais derivados de plantas têm desempenhado um papel significativo como fonte de descoberta de medicamentos e na melhoria do sistema de saúde. Portanto, a procura por antimicrobianos naturais com amplo espectro de atividade e potencial terapêutico tem despertado o interesse científico, especialmente as moléculas de origem vegetal, já que as plantas possuem grande capacidade de sintetizar substâncias químicas diversificadas como defesa contra agentes patogênicos (AHMADI et al., 2022; KEBEDE; GADISA; TUFA, 2021).

Sendo assim, o monoterpeneo linalol, uma importante molécula proveniente do metabolismo secundários de várias espécies de plantas como: *Lavandula angustifolia*, *Lippia*

alba e *Coriandrum sativum* L. tem ganhado notoriedade devido as várias aplicações na indústria de cosméticos como aromatizante e suas propriedades farmacológicas; anti-inflamatória, antioxidante, antiaterosclerótica, neuroprotetor, anticancerígeno etc, além de atividades antibacteriana e antifúngica (AN et al., 2021; APROTOSOAIE et al., 2014). Nesse último aspecto, o linalol tem sido bastante estudado e é bioativo contra uma variedade de microrganismos e apresenta baixo potencial toxicológico *in vitro* e *in vivo* (AN et al., 2021; API et al., 2015; MEESTERS; DUISKEN; HOLLENDER, 2007; PARK et al., 2012). No entanto, não se conhece bem a farmacodinâmica desse composto em células fúngicas, bem como os efeitos farmacológicos da associação do linalol com antifúngicos já licenciados e aplicados nos tratamentos da CVV.

Portanto, sabendo-se da importância e grande potencial farmacêutico que os produtos naturais apresentam, aliados aos poucos investimentos em pesquisas científicas com o linalol, este estudo teve como objetivo principal investigar as propriedades farmacológicas desse monoterpeno com ênfase na atividade antifúngica em isolados clínicos de *C. albicans* vulvovaginais resistentes ao fluconazol, elucidar o mecanismo de ação por meio de ensaios *in vitro* e docking molecular, bem como determinar os efeitos das interações do linalol com antifúngicos de uso clínico na CVV.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O GÊNERO *Candida*

Os fungos são organismos vivos eucarióticos, apresentam uma membrana nuclear que envolve o material genético de DNA dupla fita que compõe os cromossomos e o nucléolo. Podem ser unicelulares, como as leveduras; ou multicelulares como os fungos filamentosos e os cogumelos. São organismos aclorofilados e desprovidos de celulose, o que os tornam incapazes de realizar fotossíntese, comportando-se, portanto, como seres heterotróficos. As paredes celulares dos fungos contêm um polissacarídeo denominado quitina. Além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol (RICHARDS; LEONARD; WIDEMAN, 2017; RUGGIERO et al., 2015).

A parede celular fúngica é uma estrutura altamente dinâmica e importante para a viabilidade do organismo, protegendo o fungo das alterações na pressão osmótica imposta pelo ambiente. Além de conferir a plasticidade adequada para o crescimento e divisão celular, mantendo a forma e a integridade da célula fúngica. Esta parede celular é formada por uma complexa rede de polissacarídeos, sendo constituída principalmente de quitina e glicanos. Estes polímeros da parede são sintetizados a partir de substratos intracelulares, por meio de reações catalisadas por enzimas específicas (AIMANIANDA et al., 2017; GARCIA-RUBIO et al., 2020). Alterações na organização ou perturbação funcional da parede celular provocada por agentes antifúngicos estão envolvidas na morte dos fungos (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

A membrana plasmática das células fúngicas é uma estrutura constituída basicamente de lipídios e proteínas. Os componentes lipídicos formam uma barreira de permeabilidade enquanto que as proteínas, intercaladas aos lipídios, formam um sistema seletivo de transporte de substâncias entre os ambientes intra e extracelular (ATHANASOPOULOS et al., 2019). O ergosterol é o principal esterol presente na membrana plasmática dos fungos, e desempenha a mesma função nas membranas fúngicas que o colesterol desempenha nas membranas celulares de mamíferos, realizando a manutenção da fluidez (BECERRA-RODRÍGUEZ et al., 2021; DUTTA; FLIEGEL, 2018).

O interesse pelo estudo dos fungos tem sido motivado pela sua biologia única, seus muitos produtos úteis (incluindo vinhos, queijos e antibióticos), a sua utilização como base para a biologia experimental e sua importância como patógenos de animais e vegetais. Podem interagir com plantas, animais ou seres humanos de várias maneiras, estabelecendo relações simbióticas, latentes, comensais ou patogênicas (BRODA, 2020).

Várias espécies de fungos são patogênicas para o homem. Entre os mais importantes fungos oportunistas que causam doenças humanas, destacam-se as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (KÖHLER et al., 2017). Esse gênero é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Macroscopicamente, em culturas de ágar Sabouraud dextrose, as colônias são geralmente de cor creme ou esbranquiçada e a textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca (CHEN et al., 2020).

Taxonomicamente, *Candida* pertence ao filo Ascomycota, visto que, a reprodução sexuada é caracterizada pela produção de ascos. São enquadrados dentro da classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales, família Cryptococcaceae e gênero *Candida*, que apresenta mais de 200 espécies (HIBBETT et al., 2007; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). No entanto, uma minoria dessas espécies tem sido implicada na candidíase humana, pois cerca de 65% das espécies de *Candida* são incapazes de crescer a uma temperatura de 37°C, o que as impede de serem bem sucedidas como agentes patogênicos ou comensais de seres humanos (CRUZ et al., 2019).

As principais espécies de leveduras do gênero *Candida* de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*) e *C. auris* (COLOMBO; JÚNIOR; GUINEA, 2017; DABIRI; SHAMS-GHAHFAROKHI; RAZZAGHI-ABYANEH, 2018; FAKHIM et al., 2018; KIDD; ABDOLRASOULI; HAGEN, 2023).

Espécies de *Candida* podem viver como microrganismos comensais em indivíduos saudáveis. A colonização inicia nos primeiros dias após o nascimento e persiste durante toda a vida. Vivem na pele e em várias membranas mucosas, incluindo a boca, vagina, uretra, tubo digestivo e área respiratória superior do corpo humano sem causar danos (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). No entanto, em algumas circunstâncias, esses organismos são capazes de causar infecções se houver condições predisponentes inerentes ao hospedeiro, tais como diabetes, AIDS, doenças do sistema nervoso central, neutropenia, leucemias, linfomas e outros tipos de cânceres, transplantes de órgãos, procedimentos invasivos (cateterização e implantação de próteses), quimioterapia, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de agentes corticosteroides por período prolongado, uso de anticoncepcionais orais de alta dosagem, imunossupressores, citostáticos, e alguns estados fisiológicos do hospedeiro (gravidez, período menstrual, estado nutricional e idade) (JENKS et al., 2020; LEE; LAU, 2017).

Nos últimos anos, *C. albicans* tem sido o organismo mais frequentemente isolado nas infecções fúngicas oportunistas (80%), causando desde infecções superficiais a infecções sistêmicas (CIUREA et al., 2020).

2.2 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

C. albicans faz parte da microbiota normal de pessoas saudáveis, mas pode causar infecções e desconforto em indivíduos susceptíveis (NOBILE; JOHNSON, 2015). Infecções por *Candida* sp. apresenta várias manifestações clínicas, desde distúrbios mucocutâneos superficiais a infecção invasiva podendo afetar vários órgãos (TALAPKO et al., 2021).

Diante disso, será apresentado aqui as manifestações clínicas resultantes do supercrescimento de *C. albicans* no trato reprodutor feminino.

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção comum da mucosa do trato reprodutivo feminino inferior, causada principalmente pelo fungo oportunista e polimórfico *C. albicans*. Um membro da microbiota humana normal, *C. albicans* comumente coloniza o lúmen vaginal de forma assintomática (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). No entanto, a infecção sintomática pode resultar em inflamação da mucosa causada principalmente por crescimento excessivo de fungos na vagina e subsequente invasão epitelial e produção de fatores de virulência. Os sintomas comuns da doença incluem irritação, edema, coceira, ardor ao urinar, dor durante o sexo, fissuras na vulva e no períneo e vermelhidão vaginal. Frequentemente, eles são acompanhados por um corrimento vaginal que consiste em epitélio descamado, células do sistema imunológico, leveduras e fluido vaginal anormal (VENUGOPAL et al., 2021). Ademais, há um risco aumentado de infecção vaginal por fungos no momento da primeira relação sexual regular. Existem também algumas evidências de que esta infecção pode estar ligada ao contato boca-órgão genital (sexo oral-genital). Além do mais, o ânus está próximo à vagina anatomicamente, proporcionando maior conveniência para a migração de organismos intestinais, incluindo *Candida*, para a vagina (HOLLAND, 2003).

A CVV é uma das causas mais comuns de vaginite causada por *Candida* sp. Em 80% - 95% das mulheres, a CVV é causada por *C. albicans* com menos infecções remanescentes causadas por outras espécies desse microrganismo, incluindo *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) entre outros (MENDLING, 2015).

Aproximadamente 75% das mulheres terão ≥ 1 episódio de CVV em suas vidas, e 40% -45% das mulheres terão ≥ 2 episódios (MENDLING, 2015). Aos 25 anos, cerca de 50% de

todas as mulheres terão experimentado ≥ 1 episódio de CVV após o início da atividade sexual (MAKANJUOLA; BONGOMIN; FAYEMIWO, 2018). Outrossim, a CVV recorrente (CVVR, definida como > 3 episódios por ano) afeta quase 8% das mulheres em todo o mundo (DENNING et al., 2018). Frequentemente, a CVVR requer terapia de manutenção antifúngica com drogas azólicas para atenuar a reemergência da doença (ACHKAR; FRIES, 2010). A atividade fungistática dos medicamentos azólicos e a eliminação imunomediada inadequada dos patógenos são os principais responsáveis pela recorrência da doença (NYIRJESY et al., 2012).

Em contraste com a candidíase invasiva e oral, CVV/R é uma doença de mulheres imunocompetentes e saudáveis (FIDEL, 2002). Assim, a carga global de doenças é muito maior para CVV do que para outras infecções. Usando estimativas aproximadas de populações globais suscetíveis e taxas de incidência para cada uma dessas manifestações clínicas de doença, a candidíase invasiva causa ~700.000 casos por ano, a candidíase oral resulta em ~15,5 milhões de infecções por ano, a CVVR sozinha causa aproximadamente 140 milhões de casos por ano. A taxa de incidência de CVV aguda é praticamente impossível de estimar, visto que é subnotificada aos médicos devido às opções de tratamentos sem prescrição eficaz (FOXMAN et al., 2000). Embora a CVV não seja letal, a enorme carga de doenças resulta em ~US\$ 1,8 bilhões em custos médicos a cada ano e o impacto econômico devido às horas de trabalho perdidas foi recentemente extrapolado, aproximando-se de um adicional de US\$ 1 bilhão por ano apenas nos EUA (DENNING et al., 2018; FOXMAN et al., 2000).

2.3 PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA

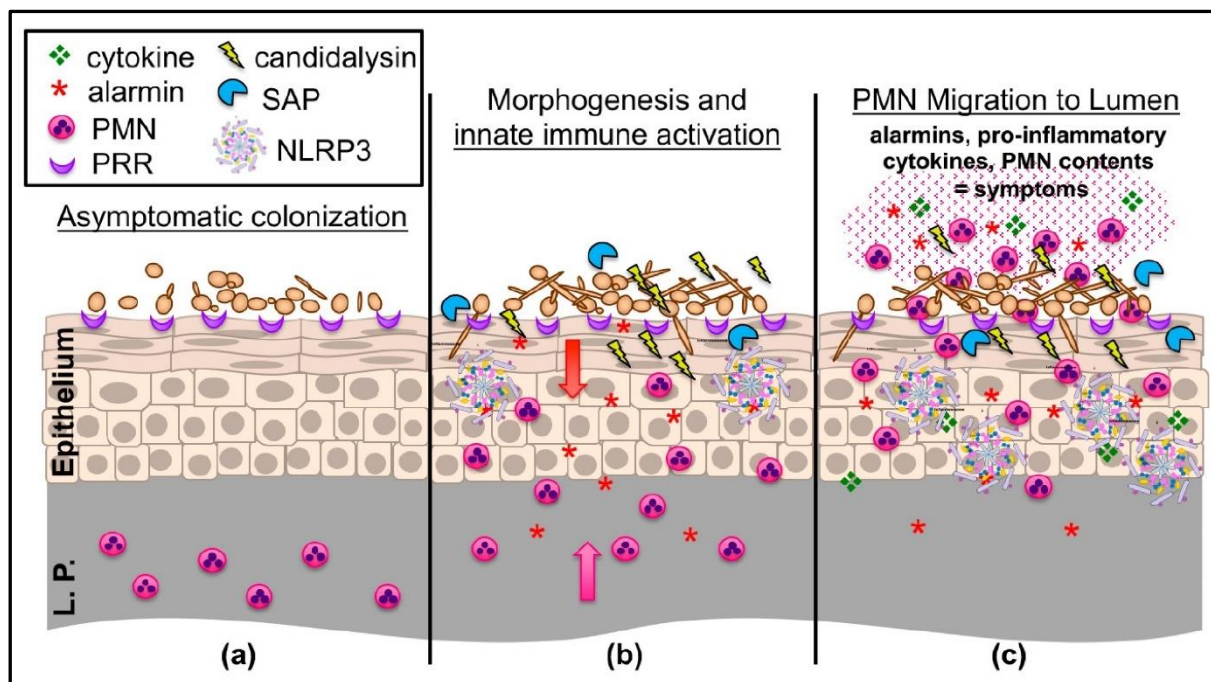
Por décadas, a CVV foi considerada como o resultado de uma resposta imune adaptativa defeituosa. No entanto, vários estudos clínicos revelaram que mulheres HIV + (com contagens reduzidas de células T CD4 +) não tinham maior risco de desenvolver CVV em comparação com controles saudáveis (FIDEL et al., 1993; FIDEL; LYNCH; SOBEL, 1995; FONG; MCCLEARY; READ, 1992). Juntamente com dados de modelos animais que não demonstram nenhum papel robusto para respostas imunes mediadas por células ou humorais, apontou claramente para um mecanismo explicativo alternativo (FIDEL; LYNCH; SOBEL, 1995). Um estudo inovador no qual utilizou-se de voluntários humanos saudáveis desafiados por via intravaginal com *C. albicans* revelaram que a CVV era na verdade mediada por meio de respostas imunes inatas, nas quais o recrutamento de neutrófilos para o lúmen vaginal estava positivamente correlacionado com os sintomas da doença relatados (FIDEL et al., 2004;

ROSATI et al., 2020). Devido ao impacto negativo da imunidade do hospedeiro na progressão da doença, a CVV foi considerada uma imunopatologia. O reconhecimento da importância da resposta imune inata em impulsionar as respostas inflamatórias associadas com a CVV levou a muitos *insights* recentes sobre a patogênese dessa doença.

C. albicans é polimórfica, adotando duas formas morfológicas principais: a levedura ovoides e a hifa alongada (SUDBERY, 2011). Há muito tempo foi observado que a capacidade de transição entre essas morfologias é o atributo de virulência primário desse fungo, já que cepas incapazes de passar por essas mudanças são severamente atenuadas em patogenicidade ou colonização (LO et al., 1997). Interessantemente, o uso de hifas mutantes deficientes em reguladores transcricionais (por exemplo, Δ/Δ *efg1* e Δ/Δ *efg1/cph1*) em um modelo murino de CVV revelou colonização elevada em comparação com hifas competentes (PETERS et al., 2014a). No entanto, a capacidade de induzir o recrutamento de neutrófilos, danos à mucosa (medido pela liberação de LDH), citocina inflamatória inata (por exemplo, IL-1 β) ou alarminas (por exemplo, S100A8) foi significativamente reduzida com esses mutantes. Esses resultados levaram a duas questões: “Os neutrófilos ajudam a eliminar o fungo?” e “Os próprios neutrófilos recrutados são agentes causadores de danos ao hospedeiro (como é observado em outras imunopatologias comuns, como artrite e asma)?” No entanto, a depleção de neutrófilos com anticorpos neutralizantes não reduziu a carga fúngica nem os níveis de LDH vaginal durante a infecção, sugerindo que os neutrófilos não são protetores sob tais condições e que os danos à mucosa são mediados pelo fungo (PETERS et al., 2014a). Esses resultados foram observados em um estudo anterior que demonstrou que a depleção de neutrófilos de fato reduziu a inflamação vaginal durante a CVV em modelos murino, mas em última análise não influenciou na colonização e o curso da infecção (BLACK et al., 1998). Sendo assim, *C. albicans* é capaz de provocar inflamação vaginal.

No entanto, antes do início de uma resposta imune, *C. albicans* deve primeiramente ser detectada na interface da mucosa. Primeiramente, isso é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que existem na superfície celular das células epiteliais e imunes inatas. A ligação desses receptores a seus ligantes cognatos (tipicamente constituintes da parede celular de *C. albicans*) induz a sinalização de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células imunes inatas e adaptativas para focos infecciosos via ativação de cascatas de sinalização (Figura 1) (CHENG et al., 2012; MIRAMÓN; KASPER; HUBE, 2013).

Figura 1. Modelo da imunopatogênese da vaginite por *C. albicans*.



(a) Formas de leveduras de *C. albicans* colonizando de maneira assintomática o epitélio vaginal, apesar da presença de numerosos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) na superfície epitelial. (b) *C. albicans* começa a sofrer a mudança de levedura para hifa sob condições indutoras de morfogênese (por exemplo, aumentos de estrogênio, pH vaginal elevado e ruptura do microbioma). O reconhecimento aumentado por PRRs, biomassa aumentada de hifas, expressão de fatores de virulência associados a hifas (candidalysina, aspartil proteinases secretadas (SAPs)) ativa a sinalização pelo inflamassoma NLRP3, induzindo a expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas (por exemplo, IL-1 β , S100A8/9 alarminas) no epitélio vaginal, resultando na migração inicial de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) da lâmina própria (LP) para o lúmen vaginal. (c) A falha em reduzir adequadamente os gatilhos imunopatológicos resulta na expressão contínua de efetores imunes inatos pelo epitélio vaginal. Esses sinais iniciais, juntamente com a amplificação secundária de efetores imunes por PMNs recrutados, contribuem para a infecção sintomática e imunopatologia característica. Fonte: figura adaptada de: *PLoS Pathog.*, (PETERS et al., 2014b).

Além da sinalização por meio dos PRRs, a capacidade de *C. albicans* de provocar danos aos tecidos simultaneamente é outra peça fundamental para compreender a ativação total das respostas imunes celulares (JABRA-RIZK et al., 2016). *C. albicans* exerce seus danos teciduais principalmente por meio de dois mecanismos principais: invasão direta por filamentos das hifas ou a secreção de efetores de virulência (Figura 1). As hifas são cruciais para romper as barreiras da mucosa e causar danos aos tecidos. As membranas do hospedeiro podem ser enfraquecidas por enzimas degradativas secretadas pela ponta da hifa e a pressão exercida pelo filamento alongado é então suficiente para penetrar na célula hospedeira (LEW, 2011). Wächter e colegas demonstraram que *C. albicans* se liga e começa a invadir as células epiteliais vaginais dentro de 3h e esse crescimento contínuo de hifas é necessário para produzir danos (WÄCHTLER; WILSON; HUBE, 2011). Uma série de adesinas associadas a hifas também ajudam a ancorar *C. albicans* ao epitélio da mucosa e são importantes para a formação de biofilmes maduros na vagina, pois a deleção do regulador principal de adesinas *BCR1* prejudicou a formação de

biofilme *in vivo* (HARRIOTT et al., 2010). Além de se ligar à caderina-E do hospedeiro (e outros receptores epiteliais), a sequência semelhante à aglutinina 3 (Als3p) também atua como uma invasina que induz endocitose dependente de clatrina de *C. albicans* em células epiteliais, contribuindo ainda mais para sua invasão (ALMEIDA et al., 2008).

A candidalisina produzida por *C. albicans* foi estabelecida como um determinante de virulência crucial que conduz a CVV em modelos murinos usando o isolado de referência SC5314. Essa enzima exibe atividade lítica semelhante as citolisinas bacterianas e a capacidade de desencadear vias inflamatórias inatas (por exemplo, MAPK) em células epiteliais e endoteliais. A interrupção da liberação de candidalisina reduz significativamente os marcadores imunopatológicos de infecção (neutrófilos, citocinas pró-inflamatórias, alarminas) e dano tecidual durante a CVV experimental (MOYES et al., 2016; RICHARDSON et al., 2018).

Além disso, o inflamassoma NLRP3 desempenha um papel importante durante a patogênese da candidíase, uma vez que os genes da via do IL-1R foram aumentados durante a CVV. Os inflamassomas são uma coleção de receptores de reconhecimento de padrão inato citosólico (PRR) que respondem por meio de um processo de ativação de duas etapas envolvendo a iniciação da resposta por meio da ligação de PRRs da superfície celular e detecção de sinais de perigo endógenos e exógenos. A indução de danos acaba por conduzir a oligomerização do inflamassoma e ativação da Caspase-1, levando à clivagem e secreção de IL-1 β , o principal efetor do inflamassoma (BRUNO et al., 2015; MATZINGER, 2002).

Os papéis da sinalização do inflamassoma durante a infecção em culturas de células de CVV são claros e um número crescente de estudos destacam a relevância desta via durante a infecção humana. Um estudo clínico em grande escala revelou que mulheres com CVVR exibiram níveis significativamente mais elevados de IL-1 β e níveis mais baixos de IL-1RA (antagonista de IL-1R) no fluido de lavagem vaginal em comparação com controles saudáveis, sugerindo que o inflamassoma NLRP3 pode ser mais ativo nas populações com CVVR conduzindo a imunopatologia exacerbada (BORGHI et al., 2015; ROSELLETTI et al., 2017).

2.4 TRATAMENTO DA CANDIDÍASE

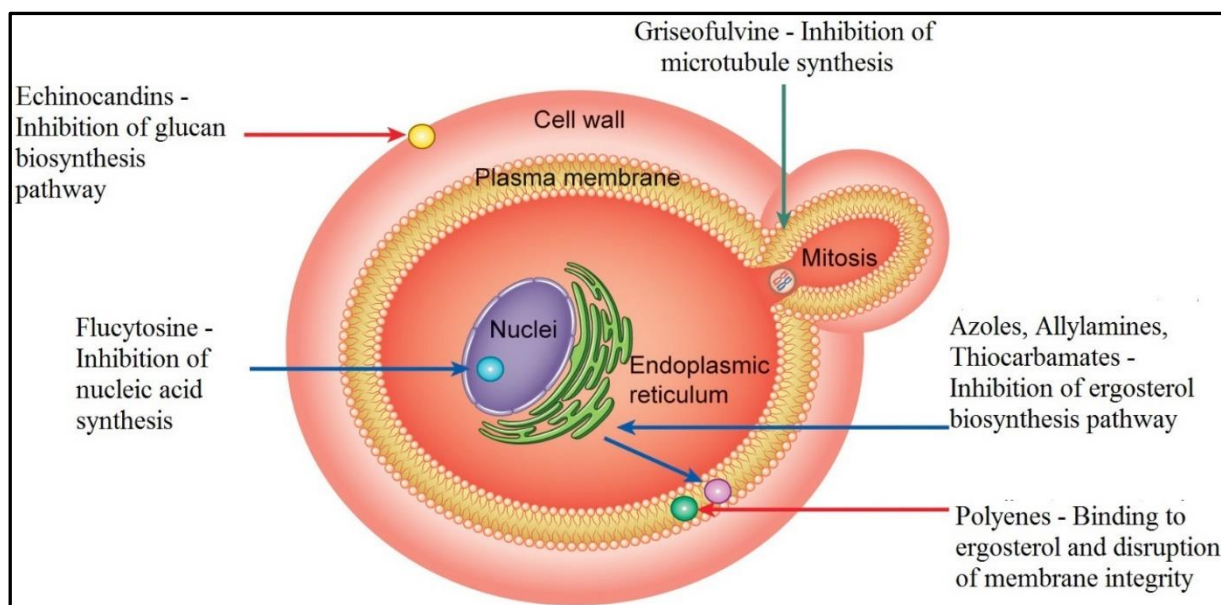
As infecções fúngicas são extremamente comuns no mundo. Isso se deve em parte ao uso disseminado de antibióticos de amplo espectro na prática médica, imunossupressores e outros grupos de medicamentos. Em termos de frequência, taxa de propagação e globalidade, as infecções fúngicas se aproximam das infecções respiratórias agudas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; CAPOCI et al., 2019; LEWIS, 2011). Além disso, seu número

continua a crescer devido ao aumento na quantidade de pacientes imunocomprometidos, à expansão da terapia imunossupressora e à disseminação de infecções pelo HIV. As taxas de mortalidade em pacientes neutropênicos por infecções fúngicas ainda são inaceitavelmente altas, e o tempo para implementação do antifúngico ideal tem um impacto significativo nos resultados dos pacientes (MAKSIMOV et al., 2021). Portanto, o aumento da frequência das micoses é um dos problemas médicos e sociais significativos da atualidade.

Os antimicóticos são drogas com efeitos fungicidas ou fungistáticos. Para o tratamento de doenças fúngicas, são utilizados vários grupos de compostos que se diferenciam em sua origem (natural, sintético ou semissintético), alvos moleculares e mecanismo de ação, efeito antifúngico (fungicida ou fungistático), indicações de uso (infecções locais ou sistêmicas) e métodos de administração (parenteral, oral, externo etc) (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020; MAZU et al., 2016).

Atualmente, existem poucas classes de agentes antifúngicos estruturalmente distintos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas no geral. Como tanto as células fúngicas quanto as células de mamíferos são eucarióticas, os alvos de drogas anti-infecciosas específicas para fungos são poucas. A estratégia mais amplamente explorada para o desenvolvimento de antifúngicos faz uso das diferenças na biossíntese de esterol e tem como alvo a via de biossíntese desse esterol ou o próprio ergosterol, que é incorporado à membrana celular do fungo. Outras estratégias incluem a inibição da síntese de RNA e DNA por compostos que são transportados seletivamente para a célula fúngica e a inibição da síntese da parede celular do fungo (Figura 2) (GREEN; GOLDMAN, 2021; MAKSIMOV et al., 2021).

Figura 2. Mecanismos de ação dos antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares.



(a) Os azóis inibem a síntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica. Atuam interferindo na enzima lanosterol 14 α -demetilase, envolvida na transformação do lanosterol em ergosterol. As alilaminas e os tiocarbamatos inibem a enzima esqualeno-epoxidase, que participa da síntese do ergosterol. (b) Os polienos atuam na membrana fúngica ligando-se ao ergosterol e causando a ruptura da estrutura da membrana, promovendo o extravasamento dos constituintes intracelulares e, conseqüentemente, a morte celular. (c) A flucitosina inibe a enzima timidilato-sintetase, interferindo no DNA. (d) As equinocandinas inibem a (1,3) β -D-glucano sintase, impedindo a síntese de glucano, que está presente na parede celular dos fungos. (e) A griseofulvina atua interrompendo a produção do fuso mitótico e dos microtúbulos citoplasmáticos, inibindo assim a mitose fúngica. Fonte: (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

2.4.1 Azóis

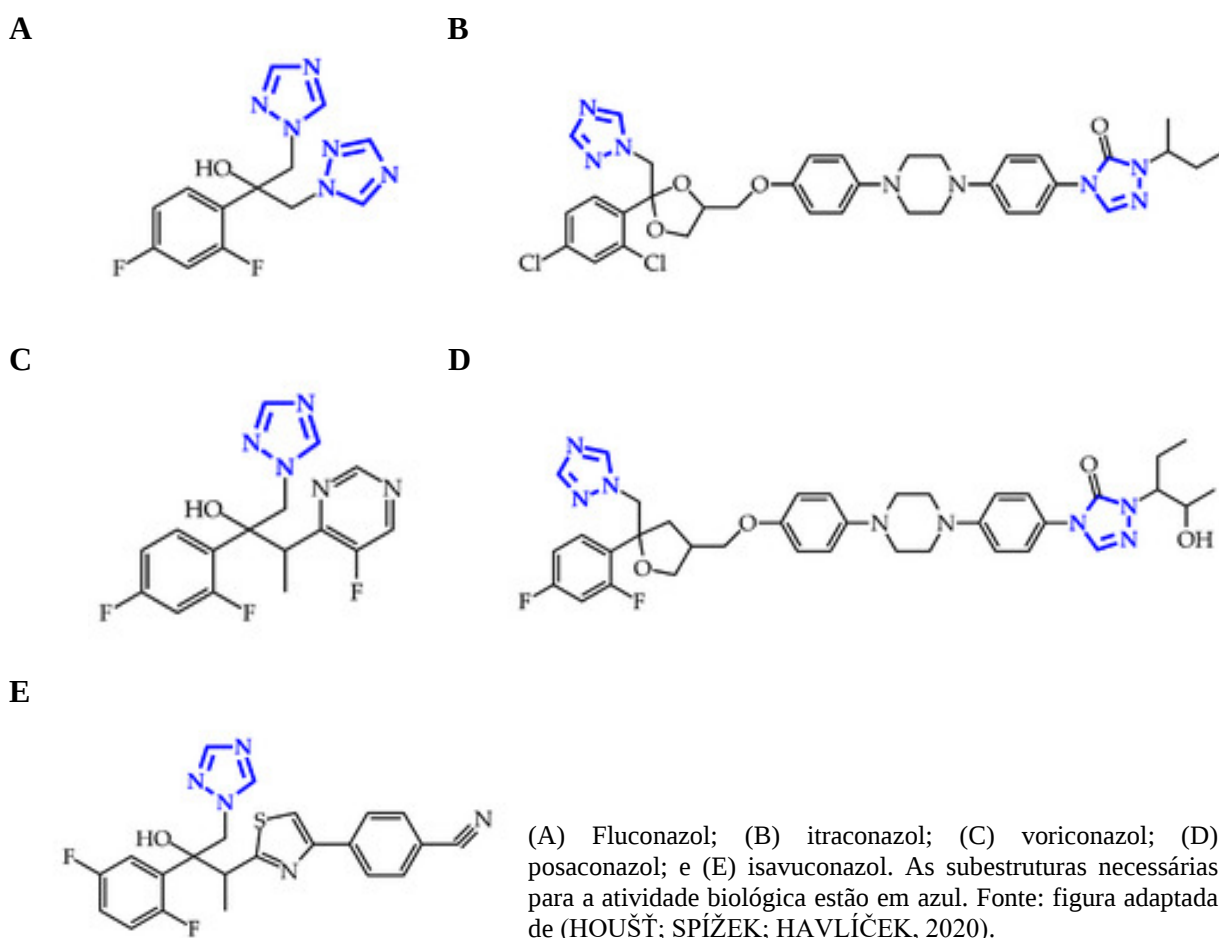
Os medicamentos membros da classe dos azóis são os mais amplamente usados de todos os antifúngicos. Sua utilidade se deve principalmente à sua atividade contra um amplo espectro de patógenos fúngicos e um espectro moderado de efeitos colaterais, especificamente sem a limitação devido a nefrotoxicidade experimentada por pacientes em tratamento com anfotericina B. Existem vários azóis atualmente usados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, como por exemplo (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) e vários outros para infecções diversas. Embora esses agentes sejam todos da mesma classe, eles variam individualmente em relação ao espectro de atividade e aos perfis farmacocinéticos e de toxicidade. A utilização apropriada desses agentes é baseada nessas características únicas (GREEN; GOLDMAN, 2021).

O principal alvo de todos os antifúngicos azólicos é a lanosterol 14 α -demetilase, que é o produto do gene *ERG11*. A lanosterol demetilase é um membro da classe de enzimas do citocromo P450 (CYP450) e é uma enzima crítica na biossíntese do ergosterol. Como o

ergosterol não é encontrado nas membranas das células dos mamíferos, a inibição dessa via é um mecanismo de ação específico do fungo para essa classe de medicamentos. O tratamento com azóis resulta na diminuição do ergosterol celular e leva ao acúmulo de esteróis metilados tóxicos. Em geral, os azóis são considerados fungistáticos para *Candida* e outras espécies de leveduras, mas alguns são fungicidas para espécies de *Aspergillus* (MAZU et al., 2016; SHAFIEI et al., 2020).

Os antifúngicos azóis abrangem duas grandes classes, os imidazóis e os triazóis, que compartilham o mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação. Os mais empregados atualmente nos tratamentos das candidíases incluem os imidazóis (cetoconazol e miconazol), triazóis de primeira geração (fluconazol e itraconazol) e de segunda geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) (Figura 3) (KATHIRAVAN et al., 2012; SU; HAN; HUANG, 2018). Os imidazóis e os triazóis diferem nas suas estruturas químicas, conforme possuem dois ou três átomos de nitrogênio, respectivamente, no anel azólico composto de 5 membros.

Figura 3. Estruturas químicas de alguns antifúngicos azóis.



Os triazóis são geralmente bem tolerados, sendo os efeitos adversos mais comuns os sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia. Elevações das transaminases hepáticas estão associadas ao uso de todos os azóis, mas os casos de hepatotoxicidade fulminante são raros. Casos de prolongamento do intervalo QT e *torsades de points* também foram associados aos azóis; no entanto, essas observações são geralmente em pacientes com comorbidades e em uso de medicamentos concomitantes que também estão associados ao prolongamento do intervalo QT (ALKAN et al., 2004; PHILIPS et al., 2007). O voriconazol foi associado a uma série de efeitos colaterais únicos, como alterações visuais e neurológicas, que estão correlacionados com altas concentrações séricas desse medicamento (ZONIOS et al., 2008).

Além disso, um dos inconvenientes dos azóis é que eles são em geral fungistáticos e não fungicidas contra espécies de *Candida*, o que provavelmente contribui para o desenvolvimento de cepas resistentes (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Dessa forma, foi observado que na última década, a resistência aos azóis sobretudo ao fluconazol foi relatada em mulheres com CVV/R. Estudos epidemiológicos anteriores descobriram que quase todas as mulheres com diagnóstico de *C. albicans* resistente ao fluconazol tiveram exposição anterior a esse fármaco (MARCHAIM et al., 2012; SOBEL; SOBEL, 2018). As taxas de resistência aos azóis são altamente variáveis e podem ser influenciadas pelos padrões de prescrição médica para o tratamento e profilaxia.

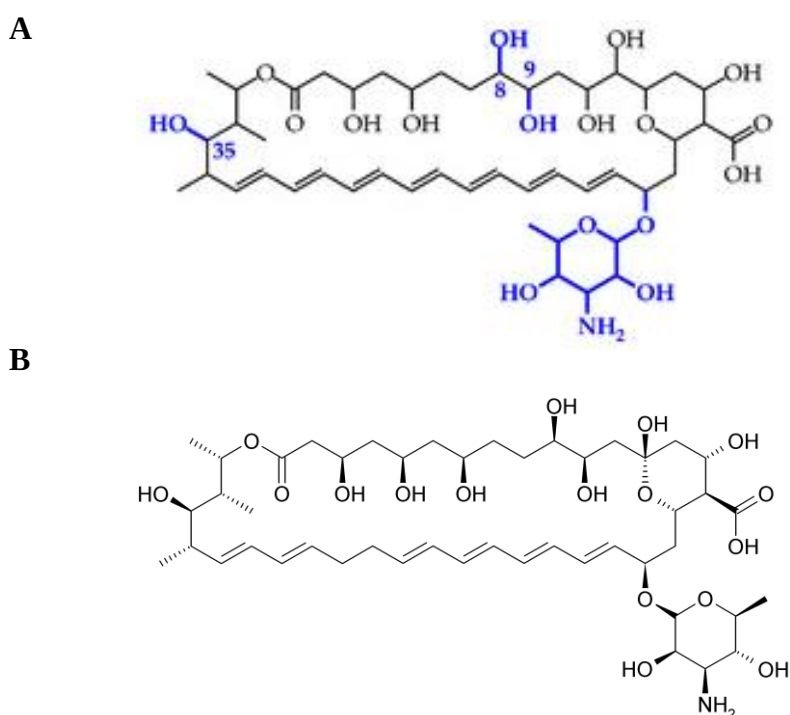
2.4.2 Polienos

Desde a década de 1950, mais de 200 polienos com atividade antifúngica foram descobertos; entretanto, a anfotericina B (AMB) continua sendo a única droga polieno de escolha no tratamento de infecções fúngicas invasivas (BELAKHOV; GARABADZHIU; CHISTYAKOVA, 2019; ZOTCHEV, 2003). A nistatina (NYS) também é um antifúngico polieno com o mesmo mecanismo de ação da AMB, no entanto, não é formulada como medicamento intravenoso. Porém, como não é absorvido pelas membranas mucocutâneas, esse agente pode ser aplicado por via tópica ou oral para tratar infecções como a candidíase orofaríngea com risco mínimo (OMELCHUK; TEVYASHOVA; SHCHEKOTIKHIN, 2018).

A anfotericina B é um heptaeno cíclico (Figura 4) produzido pela bactéria Gram⁺ *Streptomyces nodosus* e possui dois mecanismos de ação. Primeiro, várias moléculas de AMB se incorporam à bicamada lipídica dos fungos e se ligam ao ergosterol. Por sequestro do ergosterol, são formados poros de permeabilidade, e ambos os íons (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cl^-) bem

como a glicose são liberados. O rápido esgotamento dos íons intracelulares resulta na morte das células fúngicas. Em segundo lugar, AMB induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos ao DNA, proteínas, mitocôndrias e membranas (MESA-ARANGO et al., 2014). As partes estruturais dos grupos micosamina e hidroxila nas posições C8, C9 e C35 são críticas para a atividade biológica da AMB (OMELCHUK; TEVYASHOVA; SHCHEKOTIKHIN, 2018).

Figura 4. Estruturas químicas dos antifúngicos poliênicos.



(A) Anfotericina B e (B) nistatina. As subestruturas necessárias para a atividade biológica estão em azul. Fonte: (HOUSŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

Embora mais específica para o ergosterol fúngico, a anfotericina B também pode se ligar a células de mamíferos, causando efeitos tóxicos nos pacientes. O efeito adverso limitante do tratamento mais proeminente é a nefrotoxicidade. A nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B é dependente de dose e é principalmente caracterizada por uma diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG) por vasoconstrição, perda de sódio, potássio e magnésio, bem como acidose tubular renal (PERSONETT et al., 2019). A AMB tem sido o medicamento padrão para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas há décadas, mas os efeitos colaterais citados anteriormente, da sua forma convencional (desoxicolato de anfotericina B) limitam a sua utilização. Formulações lipídicas de AMB apresentam menor toxicidade que a anfotericina B

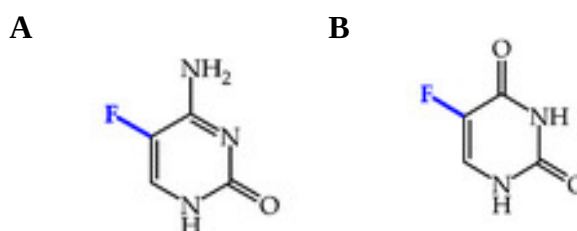
convencional e representam uma alternativa eficaz para determinados pacientes, no entanto apresentam custo muito elevado (FAUSTINO; PINHEIRO, 2020).

Interessantemente, algumas formulações de AMB em nanopartículas e nanofibras tem sido estudada em modelos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento local da CVV como alternativa aos tratamentos orais e vaginais com fármacos azóis que já apresentam eficácia limitada, principalmente devido a crescente resistência da *Candida* a esses medicamentos. No entanto, estudos de farmacocinética, farmacodinâmica, bem como a existência de efeitos tóxicos dessas formulações precisam ser realizados (MELO et al., 2020; SOUZA et al., 2018). Além disso, cepas fúngicas de *C. albicans* podem apresentar mutações em genes envolvidos na via de biossíntese do ergosterol, especificamente *ERG3* e *ERG6*, foram identificadas em isolados de *C. albicans* resistentes à anfotericina B, levando à diminuição dos níveis de ergosterol na membrana celular (KELLY et al., 1997; MARTEL et al., 2010).

2.4.3 Flucitosina

A 5-Flucitosina (5-FC) (Figura 5A) é um análogo sintético da citosina. Após a administração, a 5-FC é absorvida pela citosina-permease na célula fúngica e desaminada em 5-fluorouracila (Figura 5B) pela citosina desaminase. A 5-fluoruracila é subsequentemente convertido em trifosfato de 5-fluoruridina. Ao contrário do ácido uridílico, este composto é incorporado ao ácido ribonucleico (RNA) fúngico, resultando na inibição da síntese de proteínas. Além disso, a 5-fluoruracila pode ser metabolizado em monofosfato de 5-fluordeoxiuridina pela uridina monofosfato pirofosforilase. Este composto inibe a fonte primária de timidina na biossíntese de DNA, a timidilato sintetase, devido à incapacidade da enzima de remover o átomo de flúor (PARKER, 2009).

Figura 5. Estrutura química do antifúngico flucitosina.



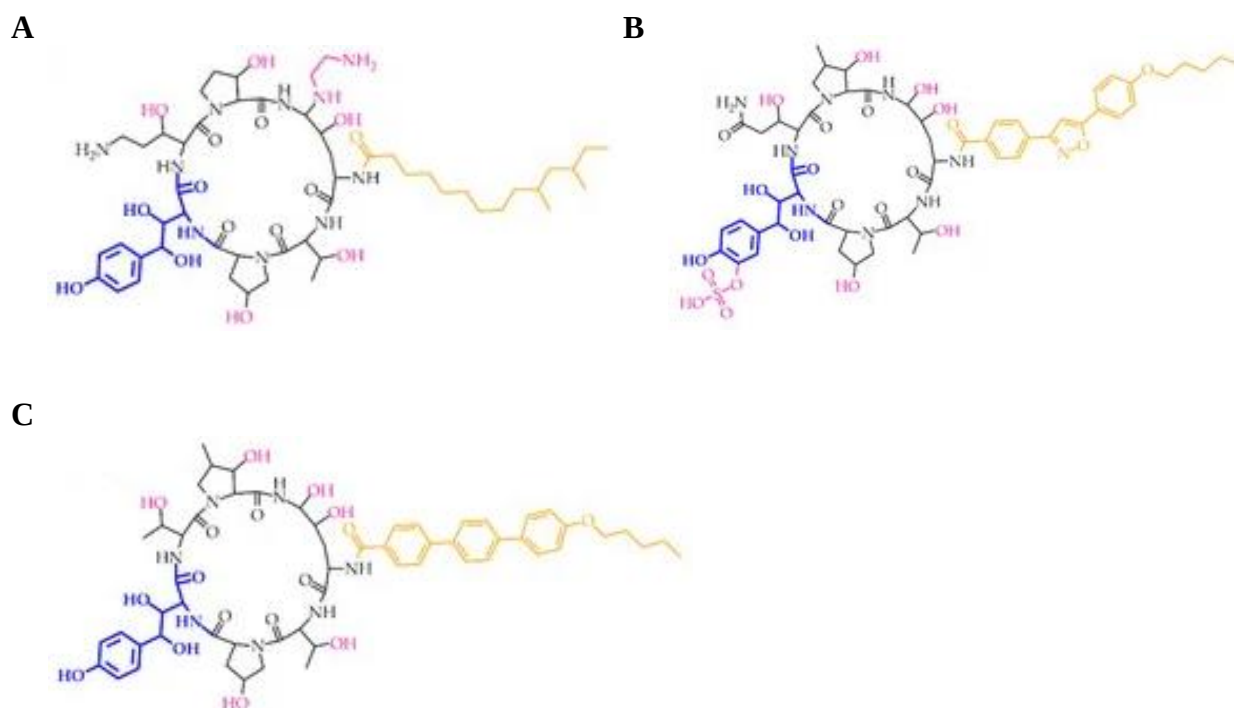
(A) Flucitosina, e seu produto desaminado (B) 5-fluoruracila. As subestruturas necessárias para a atividade biológica estão em azul. Fonte: figura adaptada de (HOUSŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

A 5-FC é um agente antifúngico oral de limitado espectro antifúngico, foi adicionada ao arsenal antifúngico em 1971, e devido ao rápido desenvolvimento de resistência antifúngica, esse composto raramente é usado em monoterapia. Em um modelo murino de candidíase disseminada, o tempo acima da CIM foi o melhor parâmetro farmacocinético e farmacodinâmico correlacionado com a eficácia desse medicamento (ANDES; VAN OGTRON, 2000). Embora as Diretrizes de Práticas Clínicas para o Manejo da Candidíase recomendem 5-FC em combinação com anfotericina B ou fluconazol para uma variedade de tipos de infecções, preocupações com relação à toxicidade, como supressão da medula óssea e elevação das transaminases hepática, muitas vezes impedem seu uso (PAPPAS et al., 2009). Sua utilidade atual é principalmente limitada ao tratamento de infecções por leveduras do gênero *Candida* (DELMA et al., 2021), e da meningite criptocócica (SAAG et al., 2000).

A utilização da 5-FC na CVV, sobre tudo como monoterapia parece não ser interessante, pois em estudos que verificaram a suscetibilidade de várias espécies de *Candida* a esse fármaco constataram elevada prevalência de resistência primária, todas elas mediada pelo gene *FUR1* mutante (ANH et al., 2021; GOPINATHAN, 2013).

2.4.4 Equinocandinas

As equinocandinas são análogos modificados das pneumocandinas e são produtos da fermentação de uma variedade de microrganismos. Nomeadamente, a anidulafungina é derivada da equinocandina B₀ (*Aspergillus nidulans*), a caspofungina da pneumocandina B₀ (*Glarea lozoyensis*) e a micafungina da pneumocandina A₀ (*Coleophoma empetri*). As equinocandinas são direcionadas contra a 1,3-β-D-glucano sintase, o complexo enzimático composto pelas subunidades catalítica transmembrana Fksp e regulatória Rho1p intracelular. O primeiro é inibido não competitivamente; portanto, 1,3-β-D- glucano sintase não pode converter uridina difosfato glicose em β-D-glucano, e a parede celular do fungo torna-se altamente permeável (LIU; BALASUBRAMANIAN, 2001). As equinocandinas são hexapeptídeos cíclicos com cadeias laterais N-acetiladas lipofílicas (Figura 6A–C). Seu núcleo determina suas propriedades físico-químicas - a homotirosina inibe a 1,3-β-D-glucano sintase; os resíduos de prolina aumentam a potência antifúngica; e a substituição com um grupo hidroxila, etilenodiamina e porções sulfatadas melhoram a solubilidade em água (HÜTTEL, 2021; YAO et al., 2012).

Figura 6. Antifúngicos equinocandinas.

(A) Caspofungina, (B) micafungina e (C) anidulafungina. O resíduo de aminoácido homotirosina (azul) é obrigatório para a inibição da subunidade catalítica Fks da 1,3- β -D-glucano sintase. O núcleo do aminoácido (preto) contribui para a potência antifúngica e determina as propriedades físico-químicas. Além disso, os grupos etilenodiamina, sulfato e hidroxila (rosa) contribuem para a solubilidade em água. Fonte: figura adaptada de (HOUSŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

As equinocandinas são usadas para o tratamento da candidíase invasiva com base nos resultados de três ensaios clínicos definidores nos quais a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina foram mostradas como não inferiores à anfotericina B, anfotericina B lipossomal e ao fluconazol, respectivamente (KUSE et al., 2007; MORA-DUARTE et al., 2002; REBOLI et al., 2007). Esses agentes são caracterizados por seu amplo espectro de atividade, baixa incidência de interações medicamentosas e uma relativa ausência de efeitos adversos (ZAAS; ALEXANDER, 2005).

Todos os três agentes equinocandinas são fungicidas dependente da dose contra as espécies de *Candida*, incluindo aqueles isolados resistentes a antifúngicos azólicos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; PFALLER et al., 2003, 2005). Ao contrário da classe de antifúngicos azólicos, observou-se que as equinocandinas apresentam atividade contra o biofilme fúngico e a formação de biofilme (PRAŽYŇSKA; BOGIEL; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, 2018; SOUSTRE, 2004).

Todos os agentes da classe das equinocandinas estão disponíveis apenas como formulação parenteral. A caspofungina não requer ajuste de dosagem em pacientes com insuficiência renal; no entanto, esse fármaco requer uma redução da dosagem em pacientes com insuficiência hepática moderada. A micafungina e a anidulafungina não requerem ajuste de dosagem para insuficiência hepática ou renal. As equinocandinas são geralmente bem toleradas; no entanto, casos de hepatotoxicidade e reações relacionadas à infusão estão associados a essa classe (KOFLA; RUHNKE, 2011).

As equinocandinas atualmente licenciadas, como dito anteriormente são aprovadas para uso apenas como formulação parenteral. No entanto, recentemente alguns estudos com uma nova equinocandina designada de CD101 tem sido conduzida contra *Candida* spp. nos casos agudos de candidíase vulvovaginal e comparada com o fluconazol. Nesse ensaio clínico randomizado, as formulações em gel e pomada de CD101 mostraram-se seguras e bem toleradas. Ambas as formulações resultaram em taxas semelhantes de curas clínicas, micológicas e terapêuticas na CVV, embora não tenha poder para mostrar superioridade sobre o fluconazol. As taxas de cura em todas as categorias foram numericamente, mas não estatisticamente, menores do que o padrão atual, de fluconazol 150mg por via oral. Adicionalmente, verificou-se que a maioria dos indivíduos com leveduras do gênero *Candida*, diferentes da *C. albicans*, não obteve sucesso no tratamento em todas as coortes (BOIKOV et al., 2017; NYIRJESY et al., 2019).

Ademais, a CD101 como uma nova equinocandina com meia-vida longa em desenvolvimento clínico para o tratamento de candidemia/candidíase invasiva e CVV, tem sido alvo de surgimento de cepas de *Candida* resistentes a esse fármaco, apesar da resistência as equinocandinas ser relativamente rara (LOCKE et al., 2016).

2.4.5 Triterpenóides (Ibrexafungerp)

O ibrexafungerp, é um agente experimental no tratamento de doenças fúngicas, é o primeiro membro da classe dos antifúngicos triterpenóides, atuando no mesmo alvo que as equinocandinas, e está disponível por via oral com evidência de boa penetração tecidual em muitos locais no corpo humano (WRING et al., 2019).

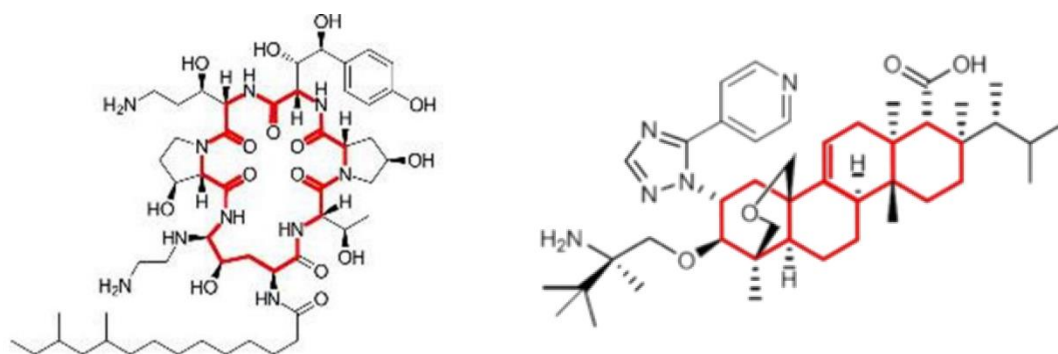
Em 2021, o ibrexafungerp foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento da candidíase vulvovaginal (CVV), com base em dois estudos clínicos de Fase 3, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo. Em ambos os ensaios clínicos (VANISH 303 e VANISH 306), o ibrexafungerp 300mg por dia foi comparado com um placebo. Os pacientes

que receberam ibrexafungerp tiveram taxas significativamente mais altas de cura clínica. As taxas de cura foram de 50,5% para ibrexafungerp e 28,6% para o placebo; $p < 0,001$, 63,3% vs. 44,0%, $p = 0,007$ em VANISH 303 e VANISH 306; respectivamente, erradicação micológica (49,5% para ibrexafungerp vs. 19,4% para o placebo, $p < 0,001$ e 58,5% vs. 29,8%, $p < 0,001$ em VANISH 303 e VANISH 306, respectivamente) e sucesso terapêutico geral (36,0% para ibrexafungerp vs. 12,6% para o placebo, $p < 0,001$ e 46,1% vs. 28,4%, $p = 0,022$ em VANISH 303 e VANISH 306, respectivamente) (SCHWEBKE et al., 2022; SOBEL et al., 2022). Além disso, no acompanhamento com ibrexafungerp, houve resolução dos sintomas e melhora significativa em comparação com o placebo. Os estudos indicaram que o ibrexafungerp foi bem tolerado, com efeitos adversos predominantemente gastrointestinais e de gravidade leve a moderada, incluindo diarreia (17%), náusea (12%) (MCCARTHY, 2022).

Além do mais, devido a estudos pré-clínicos em animais nos quais foi relatada teratogenicidade, ibrexafungerp é contraindicado na gravidez. A contracepção deve ser usada durante o tratamento e por pelo menos 4 dias após a conclusão da última dose em mulheres com possibilidade de gravidez (PHILLIPS; ROCKTASHEL; MERJANIAN, 2023). No entanto, como o fluconazol foi o único azólico oral aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para CVV, enquanto os antifúngicos orais polieno (nistatina, não é absorvido e, portanto, não trata a CVV) e as equinocandinas que não são aprovados para esta condição, o ibrexafungerp parece ser uma importante alternativa (CAROLUS et al., 2020; GROVER, 2010).

O ibrexafungerp é estruturalmente distinto das equinocandinas (Figura 7) e é um derivado semissintético do glicosídeo triterpeno hemiacetal de ocorrência natural enfumafungina que incorpora uma piridina triazol na posição 15 do núcleo do sistema de anéis de ácido fenantropirano carboxílico e um 2-amino-2,3,3-trimetil-butil éter na posição 14 para melhorar a potência antifúngica e as propriedades farmacocinéticas. Comparado com as equinocandinas, o ibrexafungerp tem as vantagens de biodisponibilidade oral, um maior volume de distribuição e sua ligação à glucano sintase parece distinta daquela das equinocandinas, levando à retenção da atividade contra a maioria dos isolados de *Candida* spp. resistentes à equinocandinas (DAVIS et al., 2020; WRING et al., 2017).

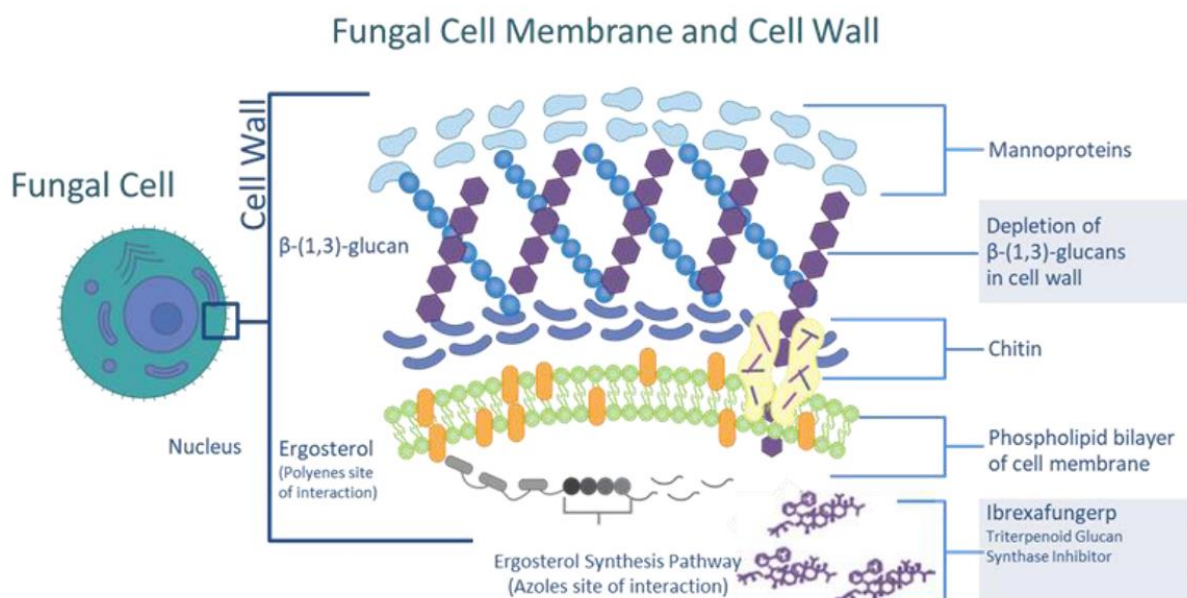
Figura 7. Estruturas moleculares da caspofungina (esquerda) e ibrexafungerp (direita).



Estruturas vermelhas indicam componentes estruturais centrais. Fonte: (ANGULO et al., 2022).

O ibrexafungerp interrompe a síntese da parede celular fúngica através da inibição da 1,3- β -D-glucano sintase (MCCARTHY, 2022). A inibição da glucano sintase também é o mecanismo de ação das equinocandinas e demonstrou resultar em um efeito clinicamente significativo no tratamento de infecções fúngicas. Como o ibrexafungerp tem como alvo uma via enzimática que não é encontrada em células humanas, ele apresenta um baixo risco de efeitos adversos farmacodinâmicos (Figura 8).

Figura 8. Local e mecanismo de ação do ibrexafungerp.



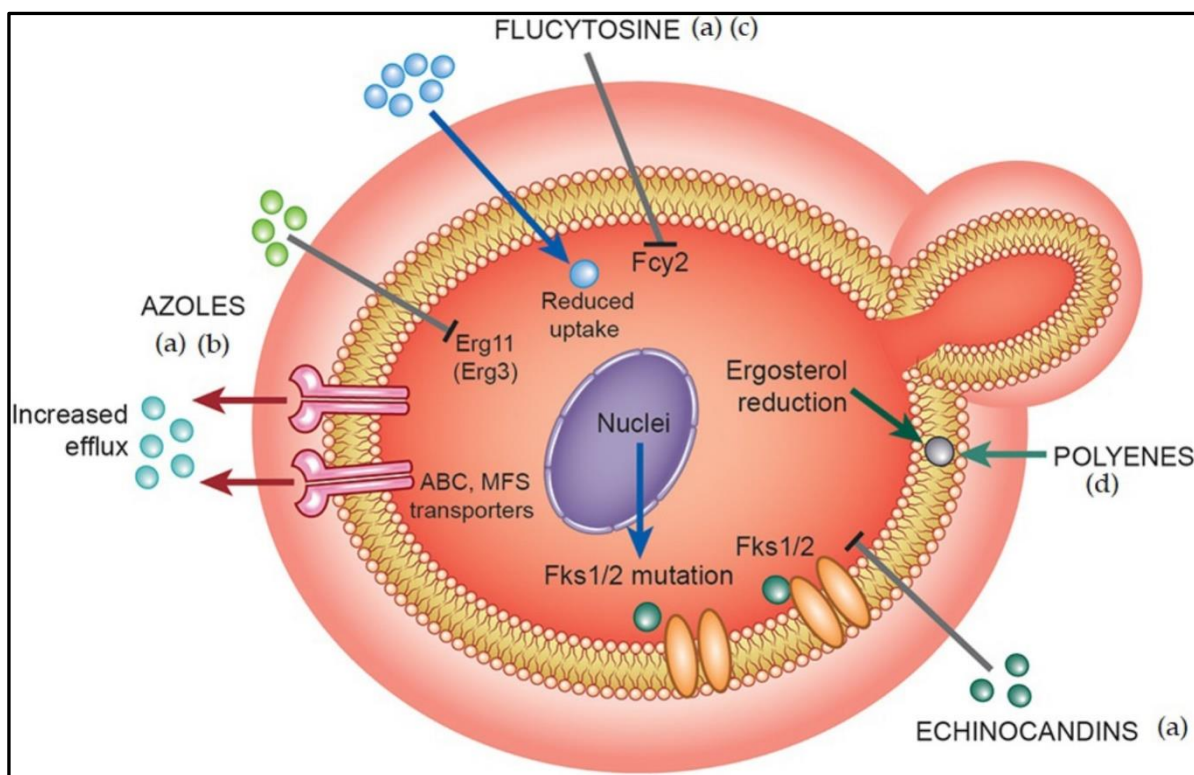
Fonte: (ANGULO et al., 2022).

2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

O termo resistência pode ser definido como uma cepa que possui uma concentração inibitória mínima (CIM) para um determinado antifúngico acima de um certo limite ou *breakpoint* específico; a resistência também pode ser usada de forma mais ampla para indicar uma cepa com um aumento na CIM a um medicamento antifúngico em relação a uma cepa de controle ou referência (BERMAN; KRYSAN, 2020).

A resistência microbiana às drogas antifúngicas é resultado de múltiplos fatores e surge por uma série de mecanismos moleculares (Figura 9). Considerando que alguma resistência intrínseca ou primária (presente em organismos que nunca foram expostos à drogas de interesse) foi encontrada naturalmente, por exemplo, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*) e *Aspergillus* spp. resistentes ao fluconazol (BEARDSLEY et al., 2018; MORIO et al., 2017; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015), a resistência adquirida ou secundária (que surge somente após a exposição do organismo à droga e é caracterizada por uma alteração na expressão gênica, quando em presença do agente antifúngico) tem sido uma consequência de terapias de longo prazo, profilaxia generalizada, ou uso de antifúngicos na agricultura, especialmente no caso dos triazóis (VERWEIJ et al., 2016). A exposição ambiental de *A. fumigatus* a fungicidas triazólicos pode explicar sua resistência em pacientes antes nunca expostos a essa classe farmacológica (BERGER et al., 2017). Além disso, a resistência secundária pode ocorrer após a transmissão vertical e horizontal em animais e humanos (BLISS et al., 2008; CUTLER et al., 2011).

Figura 9. Diferentes mecanismos de multirresistência de células fúngicas.



Os principais mecanismos de resistência aos fármacos azólicos, polienos, equinocandinas e flucitosina incluem: (a) alteração do alvo enzimático (genes que codificam enzimas da via biossintética do ergosterol – AZÓIS, glucano sintases – EQUINOCANDINAS, citosina desaminase ou uracil fosforribosiltransferase – FLUCITOSINA) levando a má ligação de drogas tóxicas aos seus sítios-alvo enzimáticos, (b) superexpressão de proteínas de efluxo de drogas levando ao aumento do efluxo – AZÓIS, (c) mudanças na propriedade/composição da membrana afetando a importação normal de drogas – FLUCITOSINA, (d) Redução de esteróis na membrana plasmática – POLIENOS. As bolinhas coloridas indicam moléculas de antifúngicos. Fonte: (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

2.5.1 Resistência aos azóis

A elevada resistência aos azóis é principalmente resultado de sua natureza fungistática e não fungicida (REVIE et al., 2018; SANGLARD; COSTE, 2016). Alguns mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos foram elucidados para *Candida* spp. e podem ser classificadas principalmente como: 1) alterações na parede celular ou na membrana plasmática, levando à má absorção do fármaco; 2) alterações na afinidade do alvo do medicamento (isto é, gene *ERG11*), devido a mutações ou ainda superexpressão deste; 3) efluxo de fármacos mediado por proteínas transportadoras de membrana pertencentes aos transportadores ATP-binding cassette (ABC), a saber CDR1 e CDR2 ou o *major facilitator superfamily* (MFS), CaMDR1; e 4) formação de biofilme (FLOWERS et al., 2015; PEREIRA et al., 2021; RYBAK et al., 2019, 2020). Frequentemente a resistência antifúngica descrita em cepas de *C. albicans*

geralmente é uma combinação dos mecanismos mencionados acima, tornando o tratamento ainda mais difícil (IVANOV et al., 2020).

2.5.2 Resistência aos polienos

Isolados clínicos de fungos resistentes à anfotericina B são raros e os mecanismos de resistência são pouco compreendidos. Mutações em genes envolvidos na via de biossíntese do ergosterol, especificamente *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11*, foram identificados em isolados de *C. albicans* resistentes à anfotericina B, levando a níveis diminuídos de ergosterol na membrana celular. Dessa forma, a diminuição do conteúdo de ergosterol na membrana da célula fúngica diminui a interação anfotericina B-ergosterol e resulta na diminuição da atividade dos polienos (ELLIS, 2002; JENSEN et al., 2015; MARTEL et al., 2010). Isolados de *Candida* e *Cryptococcus* resistentes aos polienos apresentam menor teor de ergosterol do que em isolados suscetíveis (ESPINEL-INGROFF, 2008). Além das alterações genéticas, o tratamento com azóis também tem sido atribuído ao aumento da resistência aos polienos em espécies de *Candida*, como consequência da redução dos níveis de ergosterol celular mediada por essa classe farmacológica. Isolados de *C. albicans*, o agente etiológico mais comum das infecções fúngicas invasivas, foram documentados para desenvolver resistência à anfotericina B, mas isso só foi observado em combinação com resistência a antifúngicos azólicos (CAROLUS et al., 2020; KELLY et al., 1997; MARTEL et al., 2010).

2.5.3 Resistência à flucitosina

A 5-FC é conhecida por seu rápido desenvolvimento de resistência; portanto, é usada apenas em terapia combinada com AMB e triazóis. Resistência primária e secundária em *Candida spp.* clinicamente relevantes surgiram como consequência de alterações nos genes *FCY2*, *FCY1* e *FUR1* responsáveis pela captação de 5-FC e sua conversão, respectivamente (COSTA et al., 2015; DELMA et al., 2021).

A resistência intrínseca à flucitosina é resultado de mutações na purina citosina permease (Fcy2), que prejudica a captação celular do fármaco. A resistência secundária geralmente se correlaciona com mutações na enzima uracil fosforibosiltransferase (Fur1) ou na citosina desaminase (Fca1), impedindo assim a conversão de 5-fluorouracil em sua forma ativa (KANAFANI; PERFECT, 2008; VANDEPUTTE et al., 2011; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

2.5.4 Resistência às equinocandinas

Isolados de *Candida* resistentes as equinocandinas são raros, mas como esses fármacos estão sendo usados com mais frequência, a incidência de resistência certamente aumentará. Ao contrário dos antifúngicos azólicos, não foi documentado que as bombas de efluxo contribuam para a resistência a esses medicamentos (LEE et al., 2021).

A diminuição da suscetibilidade à equinocandinas ocorre por meio de 3 mecanismos principais: (1) respostas adaptativas ao estresse, que resultam em conteúdo elevado de quitina na parede celular fúngica e crescimento paradoxal *in vitro* na concentração do fármaco acima da CIM; (2) mutações adquiridas no gene *FKS1*, que conferem sensibilidade diminuída à 1,3- β -D-glucano sintase e CIMs elevadas estão frequentemente associadas a falha clínica; e (3) mutações intrínsecas no gene *FKS1*, que são mutações de ocorrência natural em *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* que conferem níveis elevados de CIM, mas sensibilidade relativamente maior à 1,3- β -D-glucano sintase em comparação com mutações adquiridas da *FKS1* (GARCIA-EFFRON; PARK; PERLIN, 2009; SANGLARD, 2016).

Alguns estudos também relataram que mutações no gene *FKS1* produzem alterações na morfologia da parede celular de *C. albicans*, observando-se uma diminuição nos níveis de 1,3- β -D-glucano sintase em contraste com o aumento da quantidade de quitina em resposta à exposição às equinocandinas. Os dados sugerem que o aumento da quitina na parede celular de *C. albicans* pode fornecer maior oportunidade para adquirir mutações no *FKS1*, mesmo sem exposição a esses fármacos (GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014; WIEDERHOLD et al., 2011).

2.6 LIMITAÇÕES NA UTILIZAÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS

Atualmente há várias moléculas com potencial antifúngico significativo em pesquisa, tais como: derivados de triterpenoides, enfumafugina, nicomicinas proveniente de *Streptomyces*, entre outros. No entanto, ainda existe um repertório muito limitado de drogas antifúngicas para o tratamento dessas infecções, em parte devido à estreita relação evolutiva entre esses patógenos eucarióticos e seus hospedeiros. O que aumenta as dificuldades para desenvolver antifúngicos específicos, que afetem sobremaneira as células fúngicas e não do hospedeiro (BOUZ; DOLEŽAL, 2021; NICOLA et al., 2019).

O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois a recorrência é comum, o que evidencia a limitada eficácia dos fármacos antifúngicos disponíveis, os quais apresentam

também importante toxicidade. Além disso, o desenvolvimento de espécies resistentes tem sido bastante expressivo (BERMAN; KRYSAN, 2020; FIDEL et al., 1993; PAPPAS et al., 2009).

Nesse aspecto, há uma preocupação com a crescente resistência a novos agentes antifúngicos. A eficácia terapêutica da maioria das drogas antifúngicas é comprometida pelo surgimento de cepas resistentes a drogas e superinfecção com cepas multirresistentes. Assim, o combate às infecções por *Candida*, particularmente aquelas que são devido a cepas resistentes, continuam a ser um grande desafio para os clínicos (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; REVIE et al., 2018).

O surgimento e a diversidade de cepas resistentes às drogas clássicas, a sua toxicidade, os custos do tratamento, interações medicamentosas significativas e biodisponibilidade insuficiente, tem incentivado uma busca contínua por novos antifúngicos mais efetivos e sobretudo, mais seguros que os já existentes (BERMAN; KRYSAN, 2020; PERSONETT et al., 2019; RYBAK et al., 2019).

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de drogas antifúngicas estão nas similaridades compartilhadas entre os fungos e o hospedeiro. Para desenvolver novas drogas, é necessário ter em mente que um eficiente antifúngico deve atuar com máxima especificidade nos fungos apresentando baixa toxicidade para o hospedeiro (SALCI et al., 2018). Sendo assim, alguns critérios devem ser considerados na perspectiva de selecionar alvos para intervenção de novos produtos antifúngicos. Primeiramente, eles precisam ser seletivos, (i. e), os alvos devem ser únicos nos fungos ou suficientemente diferentes do hospedeiro. Em seguida, os alvos precisam necessariamente ser essenciais para o crescimento e viabilidade dos fungos em estudo. E em terceiro lugar, os alvos devem ser bem caracterizados, onde seu papel fisiológico e natureza bioquímica devem ser compreendidos (FUENTEFRÍA et al., 2018; IVANOV; ĆIRIĆ; STOJKOVIĆ, 2022).

Moléculas bioativas provenientes de plantas medicinais e ervas têm se tornado de grande interesse devido às suas aplicações e versatilidade. Nesse sentido, desempenham um papel importante como fonte de inovação de agentes terapêuticos para várias condições médicas, incluindo doenças infecciosas (ATANASOV et al., 2021; CALIXTO, 2019; HOWES et al., 2020; YUAN et al., 2016).

2.7 PLANTAS MEDICINAIS

O ser humano sempre conviveu com uma grande variedade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de explorá-las para diferentes finalidades. Entre elas,

destaca-se a utilização de plantas para fins terapêuticos. Desde os tempos pré-históricos, as populações humanas têm utilizado plantas para tratar e prevenir diversas enfermidades. Em todo o mundo, o uso de plantas medicinais contribui significativamente com os primeiros cuidados com a saúde, embora seus constituintes químicos nem sempre sejam conhecidos (FERREIRA et al., 2014; PETROVSKA, 2012; SILVA et al., 2012; SURESH KUMAR, 2015).

Plantas medicinais e aromáticas são amplamente empregadas na “medicina popular” e têm sido extensivamente estudadas por cientistas a fim de encontrar compostos mais eficazes e menos tóxicos. Estas constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos, contendo uma série de substâncias que podem ser usadas para o tratamento de diferentes doenças infecciosas (ANAND et al., 2019; SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo. Possui mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. A grande biodiversidade de espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidades terapêuticas (CAIQUE BARBOSA DOS SANTOS, 2020).

É provável que a intensa pressão seletiva exercida pelos microrganismos sobre as plantas resultou na evolução de uma ampla variedade de compostos fitoquímicos com atividade antifúngica, conforme tem sido demonstrado pelas pesquisas de isolamento de componentes antifúngicos ativos provenientes dos extratos brutos das plantas (DERBYSHIRE, 2020; HOWLETT et al., 2017).

Os produtos naturais constituem uma fonte privilegiada e insubstituível de compostos químicos com várias funções terapêuticas. Inúmeros compostos derivados de plantas medicinais têm sido utilizados como protótipos para a síntese de novos fármacos antimicrobianos menos tóxicos e mais eficazes. Isso se deve às características únicas das moléculas antimicrobianas naturais, ou seja, a sua imensa diversidade molecular, permeabilidade celular intrínseca, e especificidade bioativa (CALIXTO, 2019; DZOBO, 2022; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, denominados metabólitos primários ou macromoléculas, são essenciais a todos os seres vivos. Incluem os lipídeos, proteínas e carboidratos, que têm funções vitais

bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, por meio de rotas biossintéticas diversas, originam às custas de energia, o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas - que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas, e diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020; OBATA; OBATA, 2019).

Os metabólitos secundários garantem vantagens para sobrevivência dos vegetais e para a perpetuação de sua espécie em seu ecossistema. Apresentam várias funções, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra os raios UV e a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes. Os vegetais possuem elevada capacidade biossintética de metabólitos secundários, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto à sua diversidade numa mesma espécie (BÖTTGER et al., 2018; KABERA et al., 2014).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Em que muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (AKHTAR; SWAMY; SINNIHA, 2019). Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, no entanto estes últimos predominam (DE GROOT; SCHMIDT, 2016).

2.8 TERPENOS

Os terpenos fazem parte da composição dos óleos essenciais, os quais têm diversas aplicações na indústria, como na produção de perfumes e cosméticos, além de apresentarem várias propriedades farmacológicas (COX-GEORGIAN et al., 2019).

Os terpenoides são formados quando moléculas de isopreno se unem por meio de uma condensação. Essas moléculas de isopreno, por sua vez, são sintetizadas a partir do ácido mevalônico. Os compostos terpênicos são classificados com base no número de átomos de carbono em suas moléculas. Existem os hemiterpenos ou isoprenos (5 carbonos), monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), sesterpenos (25 carbonos), triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e poli-isoprenoides (n carbonos) (GALATA; SARKER; MAHMOUD, 2014; SOBRAL et al., 2014).

Os monoterpenos e sesquiterpenos são os terpenos mais comuns encontrados em óleos essenciais, com os monoterpenos representando cerca de 90% dos óleos voláteis. Os monoterpenos podem ser classificados em três subgrupos com base em sua estrutura: acíclicos, que incluem compostos como mirceno, linalol e geraniol; monocíclicos, que incluem alfa-terpineol e terpinoleno; e bicíclicos, que incluem alfa-pineno, tujona, cânfora e fenchona (DE GROOT; SCHMIDT, 2016).

2.8.1 Linalol

O linalol, é um álcool terciário monoterpeno acíclico que possui um mercado global de produção avaliado em US\$ 9,980 milhões em 2019, com expectativa de alcançar US\$ 12,300 milhões em 2024. Atualmente é predominantemente produzido por meio de síntese química. Esse composto aromático é utilizado em uma variedade de aplicações, como perfumes, loções, sabonetes, xampus, detergentes e produtos de limpeza não cosméticos (CAPUTI; APREA, 2011; FERRAZ et al., 2021).

O linalol como produto natural é encontrado em muitas plantas, sendo um componente chave de suas frações voláteis. Dentre estas, pode-se citar: *Lavandula latifolia* (lavanda-portuguesa ou alfazema-brava), *Lippia alba* (melissa ou falsa-melissa, ou ainda erva-cidreira), *Lavandula angustifolia* (lavanda-verdadeira ou lavanda-inglesa), *Coriandrum sativum* L. (coentro), *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa) etc (AN et al., 2021).

O linalol apresenta várias outras atividades biológicas além de sua atividade antimicrobiana:

- **Anti-inflamatória** (PEANA et al., 2003);
- **Antioxidante** (LIU et al., 2012);
- **Antiaterosclerótica *in vivo*** (CHO et al., 2011);
- **Neuroprotetor na doença de Parkinson e Alzheimer** (DE LUCENA et al., 2020; SABOGAL-GUÁQUETA; OSORIO; CARDONA-GÓMEZ, 2016);
- **Anticancerígeno** (ELBE et al., 2022; SILVA et al., 2021);
- **Sedativo, ansiolítico, anticonvulsivante e antidepressivo** (KASPER et al., 2010);
- **Desempenha efeito cardioprotetor no infarto do miocárdio em modelos de ratos** (MOHAMED et al., 2021);
- **Efeito anti-hipertensivo** (LIANG et al., 2021);

O linalol tem efeito antimicrobiano conhecido contra uma vasta variedade de bactérias e fungos:

Bactérias Gram-positivas

Micrococcus flavus, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (SOKOVIĆ et al., 2010) e *Listeria innocua* (ZENGIN; MOLECULES; 2014, 2014);

Bactérias Gram-negativas

Salmonella enterica (SOKOVIĆ et al., 2010), *Vibrio fluvialis*, *Escherichia coli* (GHOSH et al., 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (SOKOVIĆ et al., 2010), *Pseudomonas fluorescens* (GUO et al., 2021), *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* (SOKOVIĆ et al., 2010), *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* (DUARTE et al., 2016), *Serratia liquefaciens* (ZENGIN; MOLECULES; 2014, 2014), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (PARK et al., 2012).

Fungos

Candida albicans, *Candida glabrata* (HSU et al., 2013), *Candida tropicalis* (SOUZA et al., 2016), *Trichophyton rubrum* (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2017), *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea* (*Microsporum gypseum*) (SILVA et al., 2017).

Embora o linalol em si não seja alergênico e não cause sensibilização da pele, sua auto-oxidação pela exposição atmosférica pode levar à formação de óxidos de linalol, incluindo hidroperóxidos, óxidos de furano, piranóxidos, álcoois e linalil aldeído. Esses compostos demonstraram apresentar propriedades de sensibilização da pele em ensaios como o teste de linfonodo local e estudos de aplicação repetida (ANDERSCH BJÖRKMAN et al., 2014; APROTOSOAIÉ et al., 2014; TER BURG et al., 2014). O nível de efeito adverso não observado (NOAEL) e o nível de efeito adverso observado mais baixo (LOAEL) para exposição dérmica humana ao linalol foram 250mg/kg de peso corporal/dia e 1000mg/kg peso corporal/dia, respectivamente (BELSITO et al., 2008).

O linalol não é fototóxico nem genotóxico. Vários modelos *in vitro* (bactérias, células fibroblásticas, entre outras) e estudos *in vivo* com (ratos *Sprague-Dawley*) foram usados para testar a genotoxicidade do linalol e confirmaram que esse monoterpene não induz modificações no material genético (API et al., 2015; MARNETT et al., 2014). Adicionalmente, Silva et al. (2020) analisaram a genotoxicidade do *Ocimum basilicum* L. e do seu fitoconstituente majoritário, o linalol. Nesse estudo, conduzido em camundongos Swiss (*Mus musculus*), foi administrado via gavagem o óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. e o linalol em doses de 100 e 200mg/Kg do peso do animal, e dessa forma através de testes de micronúcleos em células de sangue periférico, contataram a ausência de efeitos genotóxicos.

Ainda é importante relatar que o linalol em ensaios *in vitro* conduzidos com eritrócitos humanos, células de carcinoma epidermóide (HEP2) e câncer de próstata (PC3), demonstraram potente atividade antioxidante nos ensaios de peroxidação lipídica e alta atividade inibitória nos ensaios de hemólise, bem como baixo potencial citotóxico em células HEP2 e PC3 (ELGENDY; SEMEIH, 2019; SILVA, 2015).

Os possíveis efeitos adversos do linalol na função reprodutiva humana ainda estão sendo estudados. No entanto, em estudos realizados com ratas *Sprague-Dawley*, os valores de NOAEL materno e de desenvolvimento fetal foram estabelecidos em 500mg/kg de peso corporal/dia e 1.000mg/kg de peso corporal/dia, respectivamente (APROTOSOAIE et al., 2014; MARNETT et al., 2014).

Sendo assim, com base em estudos *in vivo* em ratos e camundongos, o linalol apresenta baixa toxicidade aguda, por via oral e cutânea. Portanto, o linalol é aprovado e geralmente reconhecido como seguro (*generally recognized as safe*) (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) (LAPCZYNSKI; LETIZIA; API, 2008).

Embora o linalol tenha vários efeitos benéficos no corpo humano, poucos dados estão disponíveis sobre seu metabolismo em humanos. As biotransformações do linalol foram realizadas usando CYP2D6 e CYP2C19 recombinantes humanos. Ambas as isoformas CYP estão presentes na pele humana. O produto majoritário foi o *cis*- e *trans*-8-hidroxilinalol (MEESTERS; DUISKEN; HOLLENDER, 2007).

Em animais, as primeiras tentativas de estudar o metabolismo do linalol *in vivo* foram feitas no início do século XX, quando em 1904 Hildebrandt realizou pesquisas em coelhos. Ele mostrou que o linalol é excretado como glicuronídeo (ROFFEY; WALKER; GIBSON, 1990). No ano de 1974, uma pesquisa realizada por Parke; Rahman e Walker, (1974), investigaram a distribuição do composto [^{14}C] linalol em ratos. Os resultados indicaram que, após uma única dose oral, aproximadamente 58% do linalol administrado foi eliminado na urina, sendo que

25% foi liberado como $^{14}\text{CO}_2$ no ar expirado e 16% foi encontrado nas fezes após 72 horas. Além disso, cerca de 10% da dose administrada foi excretada na forma de [^{14}C] ureia na urina. Estudos subsequentes revelaram que o linalol é inicialmente metabolizado pelas isoenzimas do citocromo P-450 (CYP) em di-hidrolinalol, tetra-hidrolinalol e 8-hidroxilinalol, este último sendo então oxidado a 8-carboxilinalol. O composto final é, então, transformado em um conjugado de glicuronídeo e excretado do organismo (CHADHA; MADYASTHA, 1984).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o potencial antifúngico do linalol frente a cepas de *Candida albicans* oriundas de secreções vulvovaginais.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas *in silico* (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade – ADMET) do linalol;
- Determinar a concentração inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM) do linalol frente as cepas de *C. albicans*;
- Explorar as interações do linalol na célula fúngica (mecanismos de ação), com ênfase na parede e membrana plasmática;
- Estabelecer os tipos de interações do linalol em associação com o fluconazol e a nistatina frente as cepas de *C. albicans*;
- Examinar o potencial inibitório do linalol na formação de biofilme de *C. albicans* de secreções vulvovaginais;
- Estudar as interações moleculares do linalol com as enzimas fúngicas (1,3- β -glucano sintase, lanosterol 14 α -demetilase (ERG 11 ou CYP51) e Δ 14-esterol redutase (ERG 24) através do docking molecular;
- Descrever as interações, trajetórias e energia livre do complexo (1,3- β -glucano sintase – linalol) por meio da dinâmica molecular.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 CEPAS FÚNGICAS

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 14 cepas fúngicas de *Candida albicans*. Destas, 12 linhagens são clínicas de secreções vulvovaginais (LM 37, LM 41, LM 74, LM 129, LM 157, LM 160, LM 165, LM 207, LM 230, LM 240, LM 246, LM 319) e 2 são padrão (*C. albicans* ATCC® 76485 e *C. albicans* SC 5314 (ATCC® MYA-2876™)). Todas as cepas são oriundas da coleção do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos. As linhagens fúngicas foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda), a uma temperatura de 4°C. Foram utilizadas para os ensaios, repiques de 48 horas incubados à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO, 2010; GARY et al., 2018).

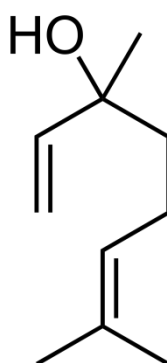
4.3 MEIOS DE CULTURA

Para a manutenção das linhagens fúngicas, bem como a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, foram utilizados Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (peptona 5g, caseína 5g, dextrose 40g, ágar 15g e água destilada q.s.p. 1000 mL) e o meio líquido RPMI 1640-L-glutamina (*Roswell Park Memorial Institute*) (sem bicarbonato de sódio), ambos adquiridos da Difco (Difco Laboratories Ltda, USA), os quais foram preparados conforme as instruções dos fabricantes. Antes de sua utilização, os meios de cultura foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave à 121°C por 15min (DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO, 2010; GARY et al., 2018).

4.4 SUBSTÂNCIAS

Para o estudo da atividade antifúngica foi utilizado como produto-teste o monoterpreno sintético linalol [3,7-dimetil octa-1,6-dienol-3] (Figura 1) (pureza: 98,7%) adquirido comercialmente da Quinari[®] (Ponta Grossa, PR, Brasil). A solução de trabalho foi preparada no momento de execução dos ensaios, utilizando 10µL do linalol devidamente solubilizado em 150µL (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO) adicionados de 50µL (1%) de tween 80. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 5mL) para obtenção de uma emulsão na concentração inicial de 1024µg/mL (HOOD et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2007). Analogamente, os fármacos utilizados como controles na execução das metodologias foram os antifúngicos fluconazol (FLU), nistatina (NYS) e anfotericina B (AMB). Estes fármacos foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo-SP, Brasil) e preparados segundo as especificações dos fabricantes e nas concentrações adequadas para cada ensaio.

Figura 10. Estrutura química do linalol.



Fonte: autor (2023).

4.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.5.1 Inóculo

A preparação dos inóculos foram realizadas a partir de culturas recentes de cada uma das 14 cepas selecionadas de *C. albicans*, previamente cultivadas em tubos esterilizados contendo ASD inclinado e incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h para atingirem o crescimento satisfatório. No preparo das suspensões das linhagens fúngicas, as colônias recentes foram diluídas em 5mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). Em seguida, essas suspensões

foram agitadas por 15s com auxílio do aparelho vórtex (Fanem), comparando-se e ajustando-se, posteriormente sua turbidez com uma suspensão de sulfato de bário, tubo nº 0.5 da escala de McFarland, o qual corresponde à um inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) (CLSI, 2012; HADACEK; GREGER, 2000).

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Hadacek, Greger (2000) e o documento M27 do CLSI (2012) com pequenas modificações.

A determinação da CIM do linalol sobre as cepas de *C. albicans* foi realizada através da técnica de microdiluição em placas para cultura de células de 96 poços (Kasvi, Kasvi Imp e Dist. Prod/Laboratório LTD, Curitiba, Brasil). Inicialmente foram adicionados 100µL de RPMI-1640-L-glutamina e sem bicarbonato duplamente concentrado nos orifícios da placa. Em seguida, 100µL da emulsão do linalol duplamente concentrado foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de 2, foram obtidas concentrações de 1024 à 4µg/mL. Por fim, foram adicionados 10µL dos inóculos fúngicos ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica.

O controle de crescimento dos microrganismos foi realizado colocando-se nas cavidades da placa 100µL do RPMI-1640 duplamente concentrado, 100µL de água destilada estéril e 10µL do inóculo de cada linhagem. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio de cultura, no qual foram colocados 200µL do RPMI-1640 em um orifício da placa, na ausência da suspensão fúngica. De maneira semelhante foi realizado o controle com os solventes DMSO e tween 80, afim de verificar possíveis interferência destes na viabilidade das leveduras.

Os mesmos procedimentos foram realizados para os antifúngicos FLU, NYS (100UI/mL) e AMB. Em seguida as placas foram assepticamente seladas e incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h. As CIMs para o linalol e os antifúngicos foram definidas como a menor concentração que inibi visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios da placa, quando comparados com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética das CIMs obtidas nos três ensaios.

A atividade antifúngica do linalol foi interpretada através de sua CIM conforme os seguintes critérios: ($< 100\mu\text{g/mL}$) forte atividade; (> 100 a $500\mu\text{g/mL}$) moderada atividade; (> 500 a $1000\mu\text{g/mL}$) fraca atividade e ($> 1000\mu\text{g/mL}$) produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; SVETAZ et al., 2010; MORALES et al., 2008).

4.5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura da CIM, alíquotas de 10µL do sobrenadante dos poços onde ocorreu inibição completa do crescimento fúngico (CIM, CIM × 2 e CIM × 4) foram subcultivadas em 100µL de RPMI-1640 em novas placas de 96 poços. O sistema foi então, assepticamente selado e incubado à 35 ± 2°C por 24-48h. A CFM foi definida como a menor concentração no qual não houve evidência de crescimento das leveduras. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média aritmética das CFMs obtidas nos três ensaios. Analogamente, os mesmos procedimentos foram realizados com os antifúngicos padrões (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

A atividade fungicida ou fungistática do linalol foi interpretada através dos seguintes critérios: (CFM/CIM ≥ 4) fungistático ou (CFM/CIM ≤ 4) fungicida (SIDDIQUI et al., 2013).

4.5.4 Ação do linalol na parede celular fúngica – ensaio com sorbitol

Para os ensaios subsequentes, foram escolhidas duas cepas representativas com base na CIM₅₀ de 64µg/mL (*C. albicans* LM 129 e ATCC 76485).

A determinação da CIM do linalol na presença de sorbitol (um protetor osmótico dos protoplastos fúngicos) foi realizado por microdiluição em placas de 96 poços. A cada poço foram adicionados 100µL de RPMI-1640 suplementado com sorbitol de massa molecular 182,17g (Vetec Química Fina LTDA - Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ambos duplamente concentrados. Posteriormente, 100µL da emulsão do linalol foram dispensados aos poços da primeira linha da placa. Usando diluição em série na razão de dois, as concentrações necessárias dos produtos foram obtidas em cada poço com uma concentração final de sorbitol de 0,8mol/L. Por fim, foram adicionados aos poços da placa 10µL dos inóculo das cepas *C. albicans* (LM 129 e ATCC 76485), em que cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica específica (DAVID; FROST; KIM; BRANDT, 1995; ESCALANTE et al., 2008; GEORGOPAPADAKOU, 2001).

O controle fúngico foi realizado pela adição do meio de cultura com 200µL de sorbitol 0,8mol/L e 10µL do inóculo de cada espécie em cada poço. Um controle de esterilidade também foi realizado onde 200µL do meio de cultura foram inseridos em um poço sem inóculo fúngico. As placas foram então, assepticamente seladas e incubadas à 35 ± 2°C por 24-48h. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos três experimentos.

4.5.5 Ação do linalol na membrana celular fúngica – ensaio com ergosterol

A determinação CIM do linalol frente as cepas de *C. albicans* (LM 129 e ATCC 76485) na presença do ergosterol exógeno, foi realizada por microdiluição, conforme descrito anteriormente no item (4.5.2) (ESCALANTE et al., 2008). Neste caso, foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 previamente adicionado de 400µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve a interação com o ergosterol da membrana celular fúngica, para servir como controle positivo dos resultados, e o controle do crescimento dos microrganismos foram realizados com 100µL do meio de cultura e o ergosterol em iguais concentrações e 10µL de cada inóculo fúngico. As placas foram então, assepticamente seladas e incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos três ensaios. Dessa maneira, foi possível comparar os valores da CIM do linalol frente às cepas de *C. albicans* na ausência e na presença de ergosterol exógeno.

4.5.6 Estudo de associação – checkerboard

As combinações do linalol com os antifúngicos comerciais (nistatina e fluconazol) foram testadas em triplicata frente as cepas de *C. albicans* (LM 129 e ATCC 76485), utilizando a técnica de microdiluição (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; LEWIS et al., 2002; MULYANINGSIH et al., 2010). Inicialmente, 100µL de caldo RPMI-1640 foram adicionados nos poços da microplaca. Em seguida, foi adicionado o linalol (50µL) no sentido vertical e o antifúngico (nistatina ou fluconazol) (50µL) no sentido horizontal da placa. O linalol foi testado em diferentes concentrações ($\text{CIM} \times 8$, $\text{CIM} \times 4$, $\text{CIM} \times 2$, CIM, $\text{CIM}/2$, $\text{CIM}/4$ e $\text{CIM}/8$). Por fim, foi adicionado 20µL das suspensões fúngicas, e em seguida as placas foram então, assepticamente seladas e incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h.

O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado através da soma do $\text{CIF}_{(A)} + \text{CIF}_{(B)}$, em que A representa o antifúngico e B o composto em teste. A $\text{CIF}_{(A)}$, por sua vez, foi calculado pela relação $\text{CIM}_{(A)} \text{ combinado} / \text{CIM}_{(A)} \text{ sozinho}$, analogamente para o $\text{CIF}_{(B)}$ (eq. 1). Este índice foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo ($\leq 0,5$), aditividade ($> 0,5$ e < 1), indiferença (≥ 1 e < 4) e antagonismo ($\geq 4,0$) (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; LEWIS et al., 2002).

(eq. 1)

$$ICIF = CIF_A + CIF_B = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ testado sozinho}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ testado sozinho}}$$

4.5.7 Potencial de inibição da formação de biofilme

Para avaliar o efeito do linalol na inibição da formação de biofilme de cepas de *C. albicans*, foi empregado o teste do cristal violeta (NewProv, Pinhais-PR, Brasil). Em que, tubos de microdiluição de poliestireno com capacidade para 1,5mL foram preenchidos com 800μL de caldo RPMI-1640, 100μL da emulsão do linalol (concentração da CIM = 64μg/mL) e 100μL das suspensões das cepas de *C. albicans* LM 129 e ATCC 76485. Esse mesmo procedimento foi realizado com o antifúngico nistatina (concentração da CIM = 4μg/mL). Em seguida, os microtubos foram incubados à 35±2°C por um período de 48h. Posteriormente, o caldo foi descartado e as paredes dos microtubos lavadas de 3-5 vezes com água destilada para remover qualquer célula planctônica depositada, então os tubos foram deixados para secar à temperatura ambiente por 1h. Após esse período, foram transferidos 1000μL da solução do cristal violeta a 1% e após 20 min o corante foi descartado e o excesso foi removido com água destilada. Em seguida, adicionou-se 1000μL de etanol a 95% (Química Moderna, Barueri-SP, Brasil) e a densidade óptica da solução de cristal violeta-etanol foi medida a 590nm (Kasvi, 4NM). O controle do teste foi realizado com as cepas inoculadas em caldo RPMI-1640. Os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de adesão celular nas paredes dos microtubos foram calculadas usando a fórmula: $[(DOC - DOT) / DOC \times 100]$, em que DOC é a média da densidade óptica do controle em caldo nutriente e DOT, a média da densidade óptica do tratamento com as substâncias testadas (GOMES et al., 2020). O percentual de redução da adesão foi calculado pela relação entre as densidades ópticas obtidas no teste do cristal violeta, do tratamento e do controle. As células foram classificadas como fracamente aderidas (se $\leq 40\%$), moderadamente aderidas (entre 40,01 e 79,99%) ou altamente aderidas (se $\geq 80\%$) (CHARLTON, 2008). O grau de inibição da formação do biofilme foi classificado como forte ($\geq 80\%$), moderado (entre 40,01 e 79,99%) ou fraco (se $\leq 40\%$) (RODRIGUES et al., 2010).

4.6 ENSAIOS *in silico*

4.6.1 Previsões farmacocinéticas e toxicológicas

O linalol foi submetido a ferramenta online *pkCSM-pharmacokinetics* (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) para prever suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas mais importantes. As propriedades ADMET incluem parâmetros de **absorção**: solubilidade em água, permeabilidade Caco-2, absorção intestinal, permeabilidade a pele, substrato ou inibição das glicoproteínas P I e II; **distribuição**: volume de distribuição no estado estacionário (VDss), fração não ligada a proteínas plasmáticas, *blood-brain barrier* (BBB) (permeabilidade da barreira hematoencefálica), permeabilidade ao sistema nervoso central (SNC); **metabolismo**: substrato ou inibidores de isoformas do citocromo P450; **excreção**: depuração total da droga; **toxicidade**: toxicidade de AMES e hepatotoxicidade (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Além disso, as propriedades de semelhança do linalol a fármacos licenciados foram previstas usando as ferramentas online *Osiris Property Explorer* (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) e o *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>). E com base nas **Regras do cinco de Lipinski**. Os softwares realizam os cálculos de propriedades moleculares importantes, como cLogP, cLogS, área de superfície polar, números de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, entre outras. O cálculo do cLogP é baseado na fórmula que satisfaz a lipofilicidade, hidrofobicidade e polaridade do composto, que também mede a capacidade da substância de se ligar aos sítios hidrofóbicos de proteínas alvo. Ademais, efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritabilidade e possíveis implicações sobre o sistema reprodutor também são previstas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; KUJAWSKI et al., 2012; LIPINSKI et al., 2001).

4.6.2 *Docking* molecular

O docking molecular é um método computacional essencial no processo de projeto de medicamentos auxiliado por computador. O principal objetivo do docking molecular é estimar a provável orientação das ligações químicas provenientes das interações fármaco receptor. Nesse sentido, procedeu-se da seguinte maneira: a estrutura química do linalol foi obtida do banco de ligantes PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato input ‘.sdf’ e após a análise do estado de protonação no software Marvin Sketch 18.08.0, o arquivo foi

carregado e em seguida pré-otimizado no software Avogadro 1.2.0 em pH 7.4, utilizando o campo de força MMFF94 indicado para moléculas orgânicas. Após a pré-otimização, foi criado um input ‘.mop’ para otimização no programa Mopac2012 no nível PM7 com output ‘.pdb’ e em seguida foram adicionadas as cargas de Gasteiger com o software UCSF Chimera 1.16 e o arquivo foi salvo no formato ‘.mol2’ (MARCUS et al., 2012; STEWART, 2016; PETTERSEN et al., 2004).

As proteínas foram obtidas do Protein Data Bank (www.rcsb.org), juntamente com seus ligantes cocrystalizados, apresentando os respectivos códigos: 1,3- β -glucano sintase (1EQC) (1.85 Å) cristalizada com castanospermina, lanosterol 14 α -demetilase (5TZ1) (2.00 Å) cristalizada com VT-1161 (oteseconazol) e Δ 14-esterol redutase (4QUV) (2.74 Å) cristalizada com o NADPH. A resolução de estruturas cristalográficas depositada no PDB consideradas ideais está entre os valores de 1.8 - 3.2 Å) (XIAO et al., 2013).

O docking molecular foi realizado usando o software AutoDock vina (Vina, The Scripps Institute). As etapas de preparação das proteínas incluíram remoção de heteroátomos (água e íons), adição de hidrogênios polares e atribuição de cargas. Os locais ativos foram delineados em torno dos ligantes cocrystalizados ligados usando Grid Box de tamanhos apropriados no software MGLTools 1.5.6. O processo de validação do docking foi baseado no redocking, que consiste em refletir a posição e orientação do ligante encontrado na estrutura cristalográfica. Dessa forma, o valor do desvio quadrático médio (RMSD) deve ser ≤ 2.0 Å. Portanto, o procedimento adotado foi o de ancoramento com a proteína rígida (sem mudanças nas posições dos átomos) e ligantes flexíveis (OLEG TROTT, 2010; WESTERMAIER; BARRIL; SCAPOZZA, 2015).

A visualização e a preparação das estruturas cristalográficas das proteínas e dos ligantes para o redocking e o docking foram realizados nos softwares PyMOL™ 2.0 (Schrödinger LLC), e Discovery Studio (DS) Visualizer (v.4.1) (Accelrys Software Inc., USA).

4.6.3 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas usando o GROMACS versão 2022.3 (HESS et al., 2008). Cada complexo molecular selecionado para as simulações, tiveram inicialmente seus ligantes separados das respectivas proteínas utilizando o software PyMol 2.5.3, além disso foram removidas as moléculas de água e qualquer outro artefato de cristalografia. Os arquivos de topologia e coordenadas da proteína também foram gerados usando o GROMACS com o campo de força CHARMM36 e, em seguida, foram gerados os arquivos de topologia dos ligantes no CGenFF e por conseguinte construído os complexos e

gerados os arquivos de coordenadas e topologia para o sistema proteína-ligante (HUANG; MACKERELL, 2013; VANOMMESLAEGHE et al., 2010). Em seguida o sistema foi confinado e centrado em uma caixa cúbica sob condições periódicas de contorno. A distância mínima soluto-caixa foi fixado em 1,5nm para garantir uma distância de pelo menos 3,0nm entre a proteína e sua imagem periódica, evitando artefatos durante as simulações de DM e resultando em um volume de caixa de 589.682nm³. A caixa foi preenchida com aproximadamente 17.230 moléculas de água SPC216 (JORGENSEN et al., 1998) para reproduzir os efeitos do solvente, e contra-íons foram adicionados para neutralizar a carga do sistema.

As simulações de DM começaram com duas etapas de minimização de energia (ME) de 100ps realizadas em sequência. A primeira ME foi realizada com restrição de posição (RP) da proteína e do ligante para que as moléculas de água pudessem se acomodar dentro da caixa. Em seguida, uma segunda etapa de ME foi realizada sem RP para atingir um mínimo local na superfície de energia potencial do sistema. Ambas as etapas de ME foram conduzidas usando o algoritmo *steepest descent* e a força máxima foi definida para 100,0 kJ/mol/nm como critério de convergência. Em sequência, o equilíbrio de temperatura e pressão foi alcançado realizando duas etapas de equilíbrio de 100ps, primeiro sob um conjunto isotérmico-isocórico (NVT) e, depois, sob um conjunto isotérmico-isobárico (NPT), para levar o sistema à temperatura de 300K e 1 bar de pressão. Tanto a temperatura quanto a pressão foram mantidas usando o termostato de reescala de velocidade (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) e os métodos de acoplamento de pressão de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1998), respectivamente. Finalmente, uma etapa de produção de DM de 30ns foi conduzida a 300K e 1 bar de pressão usando 2.0fs como tempo de integração, um corte de 1,2nm para interações de curto alcance (Lennard-Jones e Coulomb) e o algoritmo integrador *leap-frog*; as coordenadas dos complexos foram armazenadas a cada 10ps. As simulações de DM foram analisadas usando o software Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e o Grace (TURNER, 2005).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Impact Factor 2022	2.904
Impact Factor – SJR 2020	0.613
Qualis	A3

5.1 Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action

Artigo publicado

Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action

CIS Medeiros ^{1,2*}, MNA de Sousa ², GGA Filho ¹, FOR Freitas ², DPL Uchoa ¹, MSC Nobre ², ALD Bezerra ³, LADMM Rolim ², AMB Moraes ², TBSS Nogueira ¹, RBSS Nogueira ¹, AAO Filho ³, EO Lima ¹

¹ Departamento de ciências farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

² Centro Universitário UniFIP, Paraíba, Brasil

³ Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil

Abstract

Candida albicans is the most frequently isolated opportunistic pathogen in the female genital tract, with 92.3% of cases in Brazil associated with vulvovaginal candidiasis (VVC). Linalool is a monoterpene compound from plants of the genera *Cinnamomum*, *Coriandrum*, *Lavandula*, and *Citrus* that has demonstrated a fungicidal effect on strains of *Candida* spp., but its mechanism of action is still unknown. For this purpose, broth microdilution techniques were applied, as well as molecular docking in a predictive manner for this mechanism. The main results of this study indicated that the *C. albicans* strains analyzed were resistant to fluconazole and sensitive to linalool at a dose of 256 µg/mL. Furthermore, the increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool in the presence of sorbitol and ergosterol indicated that this molecule possibly affects the cell wall and plasma membrane integrity of *C. albicans*. Molecular docking of linalool with proteins that are key in the biosynthesis and maintenance of the cell wall and the fungal plasma membrane integrity demonstrated the possibility of linalool interacting with three important enzymes: 1,3-β-glucan synthase, lanosterol 14α-demethylase, and Δ 14-sterol reductase. *In silico* analysis showed that this monoterpene has theoretical but significant oral bioavailability, low toxic potential, and high similarity to pharmaceuticals. Therefore, the findings of this study indicated that linalool probably causes damage to the cell wall and plasma membrane of *C. albicans*, possibly by interaction with important enzymes involved in the biosynthesis of these fungal structures, in addition to presenting low *in silico* toxic potential.

Key words: Linalool; Antifungal resistance; Fluconazole; Vulvovaginal candidiasis; Mechanism of action

Introduction

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is caused by abnormal yeast-like fungi growth on the female genital tract mucosa as a consequence of a series of endocrine and immunologic dysfunctions and indiscriminate and prolonged use of antibiotics (1,2). In addition, it is one of the most common conditions diagnosed in female gynecological consultations (3). Approximately 75% of this population is affected at least once in their lifetime. *C. albicans* has

been reported to be the cause of symptomatic VVC in 85–95% of cases (4). The highest incidence of VVC caused by *C. albicans* in Brazil has been reported by epidemiological studies to be 92.3% (3), in Argentina, 85.95% (5), and in Pakistan, 47.7% (6).

Antifungal azole class agents are the first drugs of choice for the treatment of VVC, which can be administered orally or topically. Polyenic antifungals, mainly nystatin, are generally used as topical treatment and azoles such as fluconazole are used orally. Currently, topical fluconazole and imidazole drugs are preferred as first-line agents; however, due to the adverse effects, high costs, and strain resistance to the antifungals, alternatives to these treatments should be considered (7). Regarding cellular mechanisms of antifungal resistance to azoles and imidazoles, several studies agree that this phenomenon is mainly due to amino acid substitutions in the pharmacological target and overexpression of the *ERG 11* gene encoding the lanosterol 14 α -demethylase enzyme in *C. albicans* (8). Thus, the pharmacological study of molecules, especially natural ones with antifungal potential, may constitute a possible therapeutic alternative for the treatment of VVC (9).

Linalool is a monoterpene and the major component of the essential oil of *Lavandula angustifolia* (lavender) (24.30%), a plant of the *Lamiaceae* Martinov family native to the Mediterranean coast with known antifungal activity (10). In addition, linalool is used as a food additive and flavoring agent approved by the Food and Drug Administration (FDA), also showing antifungal activity against several species of *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, as well as against biofilms formed by these fungi. Furthermore, this molecule has shown low *in vitro* toxicity and no genotoxicity, but is irritating to the skin and eyes (11).

Given the need for new antifungals against resistant strains of *C. albicans* and with fewer adverse effects, linalool seems to be a viable alternative. Therefore, the effects of this substance on fluconazole-resistant clinical vulvovaginal isolates were studied and insights into the elucidation of the mechanism of action of linalool were obtained through *in vitro* and molecular docking assays.

Material and Methods

Substances

Linalool was commercially obtained from Quinari[®] (Brazil) with a floral scent, molecular weight of 154.25 Da, and water solubility of 1590mg/L at 25°C. The antifungal drugs amphotericin B (AMB), nystatin (NYS), and fluconazole (FLU) were purchased from Sigma-

Aldrich® (Brazil). Linalool was appropriately solubilized in 150µL (3%) dimethyl sulfoxide (DMSO) to which 100µL (2%) of Tween 80 was added. It was then completed with sterile distilled water (5mL qsp) to obtain an emulsion with an initial concentration of 1024µg/mL and serially diluted to 2µg/mL (12,13).

Strains

The clinical isolates of *C. albicans* used in this study belonged to the Mycotheca of the Antibacterial and Antifungal Research Laboratory of the Federal University of Paraiba, Brazil, and were: LM 37, LM 41, LM 74, LM 129, LM 157, LM 160, LM 165, LM 207, LM 230, LM 240, LM 246, and LM 319 (vulvovaginal isolates). The strains of the American Type Culture Collection (*C. albicans* ATCCs 76485 and *C. albicans* SC 5314, ATCC® MYA-2876t) were used as control. For use in the *in vitro* assays, fungal suspensions were prepared in 0.85% saline solution from fresh cultures and the turbidity was equivalent to 0.5 on the McFarland's standard scale, which corresponds to an inoculum of approximately $1-5 \times 10^6$ colony-forming units per milliliter (CFU/mL) (14,15).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

One hundred microliters (100µL) of liquid RPMI-1640 medium was transferred to a 96-well microdilution plate with a U-shaped bottom (Alamar, Brazil). Then, 100µL of the linalool emulsion was dispensed in the first horizontal row of the plate and serial dilutions at a ratio of two were performed, where a 100µL aliquot was taken from the most concentrated well to the next well, resulting in concentrations of 1024–2 mg/mL. Finally, 10µL of the *C. albicans* inoculum suspensions was added to each well of the plate, where each column represented a fungal strain. Sterility controls with AMB, cell viability assay, and assessment of the interference of the medium used in the preparation of the linalool emulsions were also performed. The plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24–48h. After the appropriate incubation time, the presence (or absence) of microbial growth was visually observed (14–16). The MIC was defined as the lowest concentration of linalool that produced visible inhibition of yeast growth. The antimicrobial activity of the phytocompost was interpreted as active or non-active according to the criteria proposed by Morales et al. (17): strong/good activity (MIC: $<100\mu\text{g/mL}$); moderate activity (MIC: >100 to $500\mu\text{g/mL}$); weak activity (MIC: >500 to $1000\mu\text{g/mL}$); and inactive/no antimicrobial effect (MIC: $>1000\mu\text{g/mL}$).

Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The MFC was determined after the MIC reading by taking 1µL aliquots of the MIC, MIC × 2, and MIC × 4 from the wells where there was no visible growth (suprainhibitory concentrations) and inoculating them into new plates containing only RPMI-1640 broth. All controls were then performed and after 24–48h of incubation at 35± 2°C, a reading was taken to assess MFC based on the controls. MFC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of fungal growth after 24–48h at 35±2°C (16,18).

Fungal Cell Wall Effect (Sorbitol Assay)

Based on the previously observed MIC and MFC results, the clinical *C. albicans* strain LM 129 and the standard *C. albicans* strain ATCC 76485 were considered representative for the subsequent assays. Therefore, the determination of the MIC of linalool in the presence of sorbitol (an osmotic protector of fungal protoplasts) was performed by microdilution in 96-well plates. To each well, 100µL of RPMI-1640 supplemented with sorbitol of molecular weight 182.17g (Vetec Química Fina Ltda, Brazil) was added, both at double concentration. Subsequently, 100µL of the linalool emulsion was dispensed into the wells of the first row of the plate. Using serial dilution in the ratio of two, the required concentrations of linalool were obtained in each well with a final sorbitol concentration of 0.8 M. Finally, 10µL of the fungal inoculum ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) of *C. albicans* strains (LM 129 and ATCC 76485) was added to the wells, where each column of the plate referred to a specific fungal strain (19,20). All controls were then performed as already described in the previous sections.

Interaction with Fungal Cell Membrane Ergosterol (Ergosterol Assay)

The determination of the MIC of linalool against *C. albicans* strains (LM 129 and ATCC 76485) in the presence of exogenous ergosterol was performed by microdilution in 96-well plates. If the antifungal activity of linalool is caused by its binding to ergosterol, the exogenous ergosterol will prevent the monoterpene from binding to ergosterol in the fungal cell membrane. In the presence of exogenous ergosterol, linalool forms a complex with it and not with the membrane ergosterol. Consequently, there is an increase in the MIC in the presence of exogenous ergosterol compared to the control. The RPMI-1640 liquid culture medium was used with the addition of 400µg/mL of ergosterol (Sigma-Aldrich®). The same procedure was carried

out with AMB, whose mechanism of action is known and involves interaction with ergosterol of the fungal cell membrane to serve as a positive control of results. Growth control of the microorganism was performed with 100 μ L of culture medium and ergosterol at equal concentrations and 10 μ L of each standard fungal inoculum. The plates were aseptically sealed and incubated at 35 $\pm$ 2°C for 24–48h for later reading. Therefore, it was possible to compare the MIC values of linalool against *C. albicans* strains in the absence and presence of exogenous ergosterol (20).

Molecular Docking

The chemical structure of linalool was obtained from the NCBI PubChem ligand database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) and had its geometry optimized using Avogadro software (v. 1.2.0; USA), using the molecular mechanics method and the MMFF94 force field for organic molecules. The enzymes analyzed in this study were obtained from the Protein Data Bank (PDB) webpage (<https://www.rcsb.org>), together with their cocrystallized ligands and respective codes: 1,3- β -glucan synthase (1EQC) (1.85 Å) crystallized with castanospermine, lanosterol 14 α -demethylase (ERG 11) (5TZ1) (2.00 Å) crystallized with VT-1161 (oteseconazole), and Δ 14-sterol reductase (ERG 24) (4QUV) (2.74 Å) crystallized with NADPH. The resolution of crystallographic structures deposited in PDB considered ideal to be 1.8–3.2 Å (21).

Molecular docking was performed using the free AutoDock Vina software (The Scripps Institute, USA). Protein preparation stages included removal of heteroatoms (water and ions), addition of polar hydrogens, and charge assignment. The active sites of the enzymes were delineated around the cocrystallized ligands using grid boxes of appropriate sizes. The process of docking validation was based on redocking, which consists in reflecting the position and orientation of the ligand found in the crystalline structure. Thus, the value of the root mean square deviation (RMSD) should be $\leq$ 2.0 Å. Therefore, the procedure adopted was that of molecular docking with rigid protein (with no changes in the positions of the atoms) and flexible ligands (22).

Visualization and preparation of the crystallographic structures of proteins and ligands for redocking and molecular docking were performed in PyMOL™ 2.0 software (Schrödinger LLC, USA) and Discovery Studio (DS) Visualizer (v.4.1) (Accelrys Software Inc., USA).

ADMET screening of natural compound

Linalool was submitted to online pharmacokinetics prediction tools (pkCSM-pharmacokinetics) (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) to predict its most important pharmacokinetic and toxicological properties (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxic effects-ADMET). These properties include absorption: Caco-2 permeability, water-solubility, human intestinal absorption, P-glycoprotein substrate, P-glycoprotein I and II inhibitors, and skin permeability; distribution: steady-state volume of distribution (V_{ss}), unbound fraction, blood-brain barrier permeability (BBP), and central nervous system (CNS) permeability; metabolism: a substrate for P-450 isoforms; and excretion: total drug clearance and possible toxic effects (23). The free software Osiris Property Explorer (<https://www.organicchemistry.prog/peo/>) was also used to indicate possible mutagenic effects, tumorigenic effects, irritability, effects on the reproductive system, and to predict the drug-related properties of linalool based on Lipinski's Rule of Five. This rule states that most 'drug-like' molecules have $cLogP \leq 5$, molecular weight ≤ 500 Da, number of hydrogen-bond acceptors ≤ 10 ($nALH \leq 10$), and number of hydrogen-bond donors ≤ 5 ($nDLH \leq 5$). Therefore, molecules that violate more than one of these rules may have bioavailability problems (24,25).

Results

Fungicidal effect of linalool against fluconazole-resistant *C. albicans* strains

The broth microdilution method was applied to determine the MIC and MFC of linalool, fluconazole, and nystatin (26). Linalool acted on fungal cells, interfering with their viability with a MIC of 64 $\mu\text{g/mL}$ and a MFC between 128–256 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). It was also found that 64.28% of the clinical strains were resistant to fluconazole and 35.71% were dose-dependently sensitive to nystatin (S-DD). Together, these results indicated that the fungal strains analyzed are sensitive to linalool and that it has a fungicidal effect. In addition, the strains used were resistant to fluconazole, and decreased sensitivity of *C. albicans* to nystatin can already be observed.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) values and minimum fungicidal concentration (MFC) ($\mu\text{g/mL}$) of linalool, fluconazole, and nystatin against *C. albicans* strains by broth microdilution.

Strains	¹ Linalool				² FLU		³ NYS		GC
	MIC	MFC	MFC/MIC	Effect	MIC	MFC	MIC	MFC	
LM 37	128	256	2	Fungicidal	>1024	>1024	8	32	+
LM 41	64	128	2	Fungicidal	32	128	8	16	+
LM 74	64	256	4	Fungicidal	32	128	8	16	+
LM 129	64	128	2	Fungicidal	>1024	>1024	4	16	+
LM 157	64	128	2	Fungicidal	>1024	>1024	4	8	+
LM 160	64	256	4	Fungicidal	>1024	>1024	4	32	+
LM 165	64	256	4	Fungicidal	>1024	>1024	8	8	+
LM 207	64	128	2	Fungicidal	>1024	>1024	8	8	+
LM 230	64	128	2	Fungicidal	>1024	>1024	4	8	+
LM 240	64	256	4	Fungicidal	>1024	>1024	4	32	+
LM 246	64	256	4	Fungicidal	>1024	>1024	4	16	+
LM 319	128	128	1	Fungicidal	32	128	4	4	+
ATCC 76485	64	128	2	Fungicidal	32	64	4	16	+
SC 5314	64	256	4	Fungicidal	32	64	4	8	+

GC: growth control of the microorganism in RPMI-1640, DMSO (10%), and Tween 80 (2%), without monoterpenes or antifungals. ¹Cutoff points: fungistatic (MFC/MIC >4) and fungicidal (MFC/MIC $\leq$ 4) (Ref. 18). ²Cutoff points: MIC of fluconazole $\leq$ 8 (S); 16–32 (S-DD); $\geq$ 64 (R) $\mu\text{g/mL}$, document M27-A2 (Ref. 15). ³Cutoff points: MIC of nystatin $\leq$ 4 (S); 8–32 (S-DD); $\geq$ 64 (R) mg/mL (Ref. 26). S: susceptible; S-DD: susceptible dose-dependent; R: resistant.

Effect of linalool on the cell wall of *C. albicans*

Based on the previously recorded MIC and MFC results, the clinical *C. albicans* strain LM 129 and the standard *C. albicans* strain ATCC 76485 were considered representative in the analysis of subsequent results.

The *C. albicans* LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485 strains with and without 0.8 M sorbitol (an osmotic protector of fungal protoplasts) were used to verify the possibility of linalool interacting with the fungal cell wall leading to its rupture (Table 2). The MIC of linalool for both strains increased in the presence of sorbitol indicating that this compound interferes in the viability of yeast cells through molecular mechanisms that probably involves the cell wall.

Table 2. Effect of linalool against *C. albicans* LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485 in the absence and presence of 0.8 M sorbitol.

Drug	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>C. albicans</i> LM 129		<i>C. albicans</i> ATCC 76485	
	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol
Linalool	64	>1024	64	>1024

Effect of linalool on the cell membrane of *C. albicans*

Linalool was found to interfere with membrane ergosterol by mechanisms of action not yet fully elucidated (as for example, inhibition of ergosterol synthesis, direct binding of linalool to ergosterol, among other mechanisms) as its MIC increased in the presence of exogenous ergosterol (Table 3).

Table 3. Effect of linalool and amphotericin B against *C. albicans* LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485 in the absence and presence of ergosterol at 400 $\mu\text{g/mL}$.

Drug	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>C. albicans</i> LM 129		<i>C. albicans</i> ATCC 76485	
	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol
Linalool	64	>1024	64	>1024
AMB	0,125	>256	0,125	>256

MIC: minimum inhibitory concentration.

Interactions of linalool with enzymes through molecular docking

Given the possibility that linalool exerts its fungicidal effect by interfering with the cell wall and plasma membrane of fungal cells, a set of molecular docking calculations were performed with the enzymes involved in the process of biosynthesis and maintenance of these structures. Linalool was able to bind to the three enzymes analyzed with slightly different binding energies (Table 4). It can also be seen from the RMSD that the redocking was successful as these were ≤ 2 Å. Furthermore, Figures 1, 2, and 3 show the overlap of crystallized ligands and the redocking ligand, as well as interactions with the amino acids in the active site of each enzyme.

The interactions that linalool established with 1,3- β -glucan synthase via hydrogen bond, van der Waals, Pi-sigma, and Pi-alkyl interactions exhibit binding energy $\Delta E = -5.70$ kcal/mol.

The molecular complementarity of linalool with the 1,3- β -glucan synthase of the *C. albicans* cell wall was verified and, therefore, it is suggested that the inhibition of this enzyme promoted the fragility of the cell wall of these yeasts and, consequently, cell death (Figure 4).

The enzyme lanosterol 14 α -demethylase (ERG 11 or CYP 51) as a target of linalool showed molecular complementarity with binding energy $\Delta E = -5.50$ kcal/mol. The CYP 51 of the fungal cell is essential for the synthesis of ergosterol; therefore, molecular interactions that cause inhibition of this enzyme may decrease the content of this sterol in the plasma membrane of *C. albicans* and cause its death (Figure 5). It was also found that the main interactions of linalool with lanosterol 14 α -demethylase are van der Waals, Pi-sigma, alkyl, and Pi-alkyl interactions.

The second stage of the conversion of lanosterol to ergosterol involves catalysis by the enzyme Δ 14-sterol reductase (ERG 24). In this study, linalool was able to bind to this enzyme with an energy of $\Delta E = -4.70$ kcal/mol through hydrogen bond, van der Waals, alkyl, and Pi-alkyl interactions (Figure 6).

Table 4. Binding energies of Protein Data Bank (PDB) enzymes and tested compound.

Enzyme	Classification	Binding Energies (kcal/mol)	RMSD (Å)	Binding Energies (kcal/mol)
				Linalool
1,3- β -glucan synthesis (1EQC)	Hydrolase	-8.71	0.32	-5.70
Lanosterol 14 α - demethylase (5TZ1)	Oxidoreductase	-10.93	1.30	-5.50
Δ 14-sterol reductase (4QUV)	Oxidoreductase	-13.60	0.97	-4.70

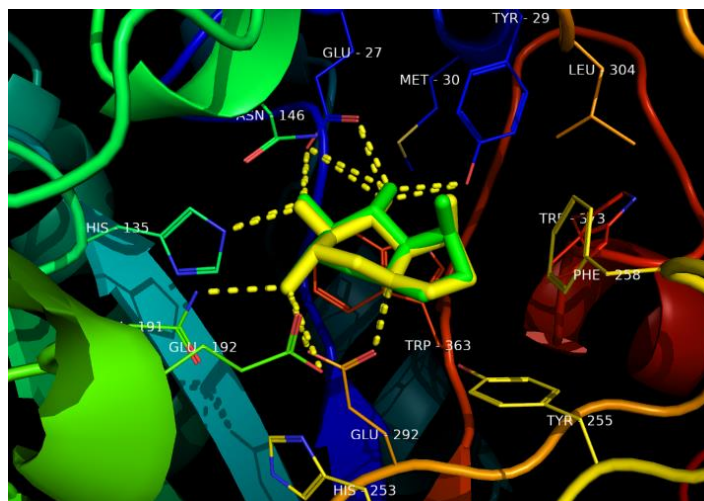


Figure 1. Overlapping castanospermine ligand from 1,3- β -glucan synthase with a better conformation of redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions.

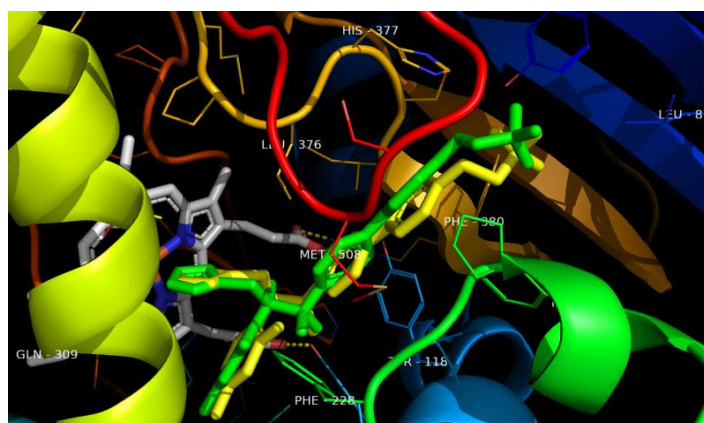


Figure 2. Overlapping VT-1161 (oteseconazole) ligand from lanosterol 14 α -demethylase with best conformation in redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking.

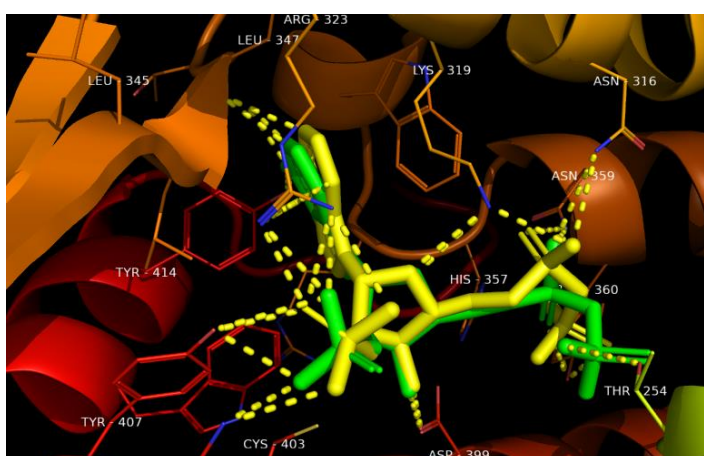


Figure 3. Overlapping NADPH ligand from Δ 14-sterol reductase with best conformation of redocking. Green: Protein Data Bank co-crystal. Yellow: binder conformation after redocking. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions.

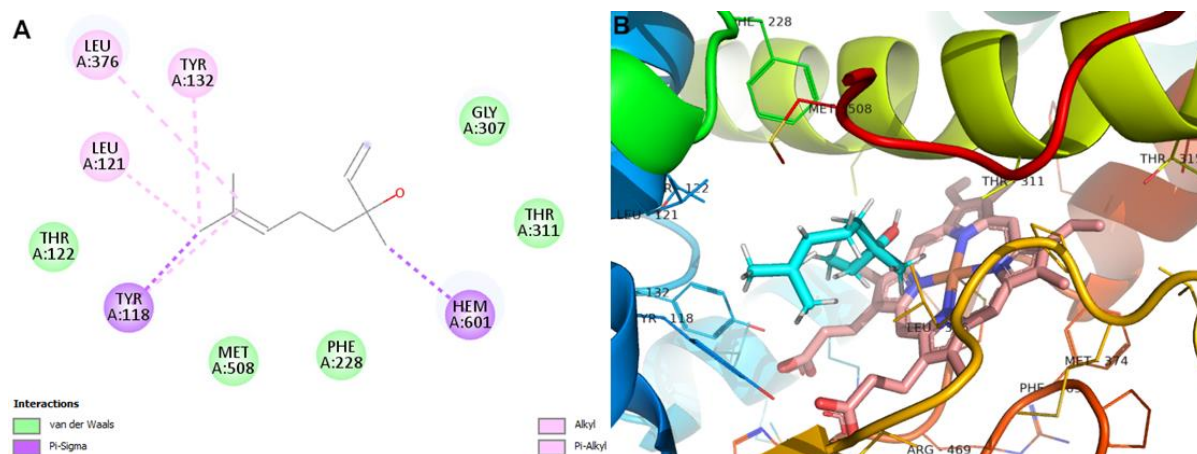


Figure 4. Molecular docking analysis. **A**, Two-dimensional interactions. **B**, Three-dimensional representation of linalool interactions in the 1,3- β -glucan synthase active site. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions.

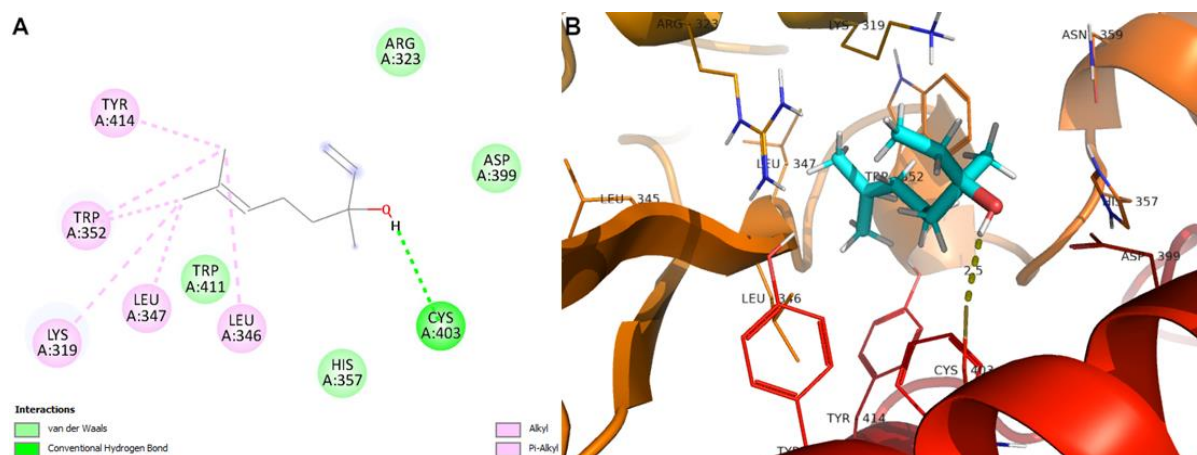


Figure 5. Molecular docking analysis. **A**, Two-dimensional interactions. **B**, Three-dimensional representation of linalool interactions in the lanosterol 14 α -demethylase active site. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions.

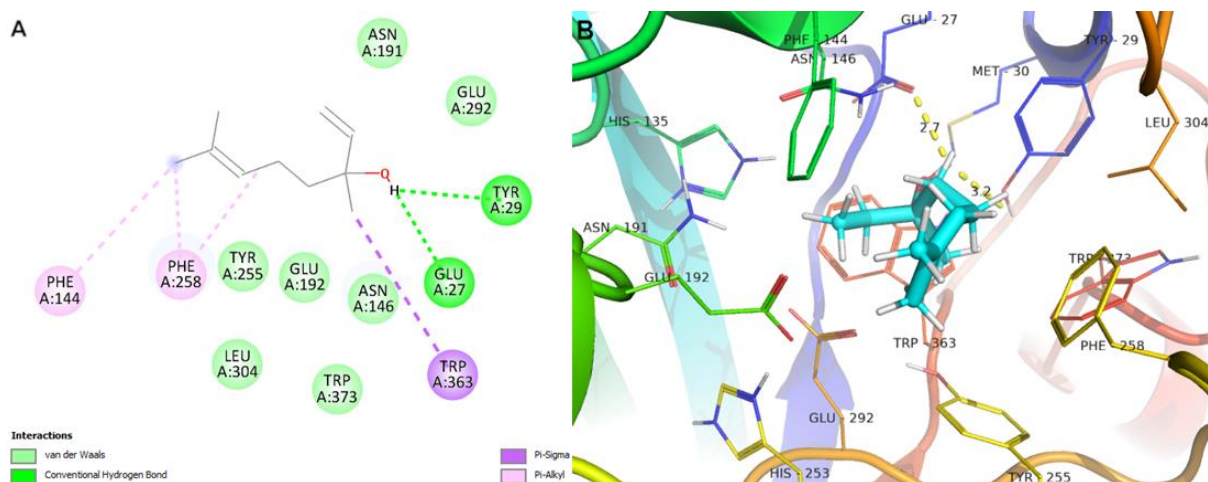


Figure 6. Molecular docking analysis. **A**, Two-dimensional interactions. **B**, Three-dimensional representation of linalool respective interactions in the Δ 14-sterol reductase active site. Dotted yellow: hydrogen-bond interactions.

***In silico* ADMET study**

Structure-based drug delineation is now a fairly common procedure and many potential drugs do not qualify for clinical practice due to problems found in the key pharmacokinetic parameters (ADMET). A very important class of hepatic enzymes responsible for metabolizing orally administered drugs and that have many ADMET problems are the isoforms of cytochrome P-450. Inhibition of these isoforms or the production of unwanted metabolites can result in many adverse drug reactions.

The drug analyzed showed water solubility and significant intestinal absorption, distribution, and elimination. Furthermore, inhibition of several hepatic cytochrome P-450 isoenzymes did not occur, consequently, linalool did not demonstrate hepatotoxicity in the *in silico* tests performed in this study (Table 5).

The results of the Osiris analysis showed that this monoterpene presented a low theoretical risk of toxicity (Table 6) and had considerable drug-likeness values (–6.68) and drug score (0.12). “Drug score” (combining “drug-likeness”, cLogP, cLogS, molecular mass, and toxicity risk) generates a value that infers the potential of a compound to become a future drug. Furthermore, the molecule did not have mutagenic or tumorigenic effects, nor did it have any action on the reproductive system. However, linalool has shown slight irritant potential and it is similar to pharmaceuticals, as can be seen by pharmacokinetic parameters.

Table 5. *In silico* physicochemical and pharmacokinetic parameters of the linalool.

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-2.612	Numeric (log mol/L)
	Caco2 permeability	1.493	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
	Intestinal absorption (human)	93.163	Numeric (% Absorbed)
	Skin Permeability	-1.737	Numeric (log Kp)
	P-glycoprotein substrate	No	Categorical (Yes/No)
	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	0.152	Numeric (log L/kg)
	Fraction unbound (human)	0.484	Numeric (Fu)
	BBB permeability	0.598	Numeric (log BB)
	CNS permeability	-2.339	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	0.446	Numeric (log ml/min/kg)
	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)

Table 6. Toxicological properties of linalool assessed through Osiris property explorer.

Toxicological properties			Pharmacokinetic properties	
Mutagenic	N		Molecular weight (g/mol)	154.25
Tumorigenic	N		Acceptors & donors H	1.0
Irritant	Slightlytoxic		Druglikeness	-6.68
Reproductive effect	N		Drug-Score	0.12
-	-		Calculated lipophilicity	3.23
-	-		Calculated solubility	-2.15

N = No risk.

Discussion

The fungal cell wall has been widely explored as a target for selective antifungal therapy. In addition, there is a significant amount of evidence that linalool exerts a fungicidal effect on *C. albicans* by interfering with its cell wall and plasma membrane (27,28), a unique structure mainly composed of chitin and glucan polymers. The cell wall and plasma membrane protect fungal cells against extracellular stress from the natural environment and the immune

response of the host (29). The last class of drugs approved for clinical use were the echinocandins, which block glucan biosynthesis (30). The three echinocandin antifungal agents caspofungin, anidulafungin, and micafungin inhibit 1,3- β -glucan synthase activity, an enzyme involved in fungal cell wall synthesis. However, these drugs can be costly and require patient hospitalization due to their low bioavailability when administered orally (30). Therefore, based on the *in vitro* results and molecular docking from this study, linalool seems to exert a fungicidal effect on *C. albicans* strains by partially interacting with 1,3- β -glucan synthase.

Ergosterol is the main component of the fungal cell membrane and contributes to a variety of cellular functions, such as fluidity, membrane integrity, and the proper functioning of membrane-bound enzymes (31). Azole antifungals are the most commonly used pharmaceuticals in the clinic for the treatment of VVC and infections of other anatomical sites. They are widely used in the treatment and prevention of mycoses due to their broad-spectrum activity and because they inhibit the cytochrome P-450-dependent enzyme lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) encoded by the *ERG11* gene that converts lanosterol to ergosterol in the cell membrane, inhibiting fungal growth and replication (31). However, the use of these drugs can have some disadvantages, such as the emergence of azole-resistant strains due to selective pressure from frequent use and interaction with the cytochrome P-450 isoenzymes in the mammalian liver, which produces elevated transaminase levels and is characteristic of this class of drugs. In addition, first generation imidazoles and triazoles (clotrimazole, miconazole, cetoconazole, fluconazole, and itraconazole) are fungistatic and not fungicidal against *Candida* (32). In turn, linalool seems to be able to interfere with the ergosterol content of the plasma membrane of *C. albicans*, possibly in a similar way as polyenic antifungals such as amphotericin B and nystatin, by incorporating into membrane lipids and promoting the formation of permeable pores and cell membrane rupture, in addition to oxidative damage and fungal cell death (28,31). However, the *in vitro* results and molecular docking of this study suggested the predictive hypothesis that linalool possibly interferes with ergosterol levels by interacting with lanosterol 14 α -demethylase and Δ 14-sterol reductase, in addition to affecting the cell wall of *C. albicans* by binding to 1,3- β -glucan synthase and consequently affecting cell growth (Table 4, and Figures 4 and 5).

Interestingly, the second stage in the conversion of lanosterol to ergosterol involves catalysis by the enzyme Δ 14-sterol reductase (Erg24). In contrast to Erg11, this enzyme is not a component of cytochrome P-450 in mammalian liver, suggesting that drugs against this fungal enzyme may not produce the adverse drug interactions often seen with azole drugs (31). Thus, the molecular docking of linalool with Δ 14-sterol reductase suggested a possible interaction

releasing -4.70kcal/mol of energy and possibly interfering with fungal viability (Table 4 and Figure 6).

Therefore, linalool was predictively shown to be a promising drug candidate against *C. albicans*, binding to several important targets that compromise fungal viability and exhibiting ADMET pharmacokinetic characteristics with significant theoretical oral bioavailability, low toxicity, and high similarity to pharmaceuticals (28). However, in *in vivo* studies with rabbits and rats, after rapid intestinal absorption, linalool is an enzymatic inducer of the microsomal cytochrome P-450 system, which metabolizes this monoterpene into 8-hydroxy linalool and 8-carbox linalool, which are excreted mainly via the urinary tract (33).

The therapeutic use of phytochemicals extracted from essential oils of plant origin, such as linalool, presents some limitations mainly regarding their solubility and bioavailability. In this sense, drug delivery systems may constitute versatile and alternative platforms to overcome the disadvantages of phytochemical administration, aiming at the improvement of their bioactive effects (34). Some solubilizing agents, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), generally improve the bioavailability of linalool, but can also cause cellular toxicity and undesirable side effects. Furthermore, as a volatile compound, linalool is unstable and has a short half-life, which severely restrict its clinical application (35). Moreover, the lipophilic nature of linalool confers low solubility in water. In order to overcome these limitations, several recent studies have described the complexation of linalool with cyclodextrins (36).

Cyclodextrins are supramolecular structures characterized by the formation of a ring, and β -cyclodextrins are the most common form used in drug delivery. The β -cyclodextrins have a truncated cone shape and are composed of seven glucopyranoside units. In cyclodextrin complexes, the hydrophilic outer surface confers water solubility and the hydrophobic inner cavity allows the inclusion of lipophilic compounds such as linalool (37). Nanoscale delivery systems can also be naturally used to encapsulate linalool.

The scientific literature describes many examples of the use of lipid nanoparticles to overcome the challenges involved in the delivery and release of natural compounds, such as flavonoids, polyphenols, and carotenoids, which promote important health benefits (38). Lipid nanoparticles have a wide range of important characteristics, such as reduced particle size (between 40 and 1000 nm), large surface area, high loading capacity, possibility of controlled release of the active compound, easy large-scale production, and most importantly, a biocompatible and biodegradable nature (35,39). Thus, linalool strongly benefits from its loading into lipid nanoparticles (40), since these particles are able to overcome the physicochemical difficulties of linalool.

In summary, this research indicated that linalool is a fungicidal molecule against clinical strains of *C. albicans* from vulvovaginal secretions that are resistant to fluconazole. Moreover, based on the results of *in vitro* assays with sorbitol and ergosterol, linalool appeared to affect the membrane and cell wall integrity of *C. albicans*, and molecular docking suggested the predictive possibility of linalool interacting with key enzymes in the biosynthesis and maintenance pathways of these fungal structures. Furthermore, linalool showed low toxicological potential *in silico*, but *in vitro* and *in vivo* studies are needed to fully clarify the mechanism of action of this compound and provide more confidence in its use (Figure 7).

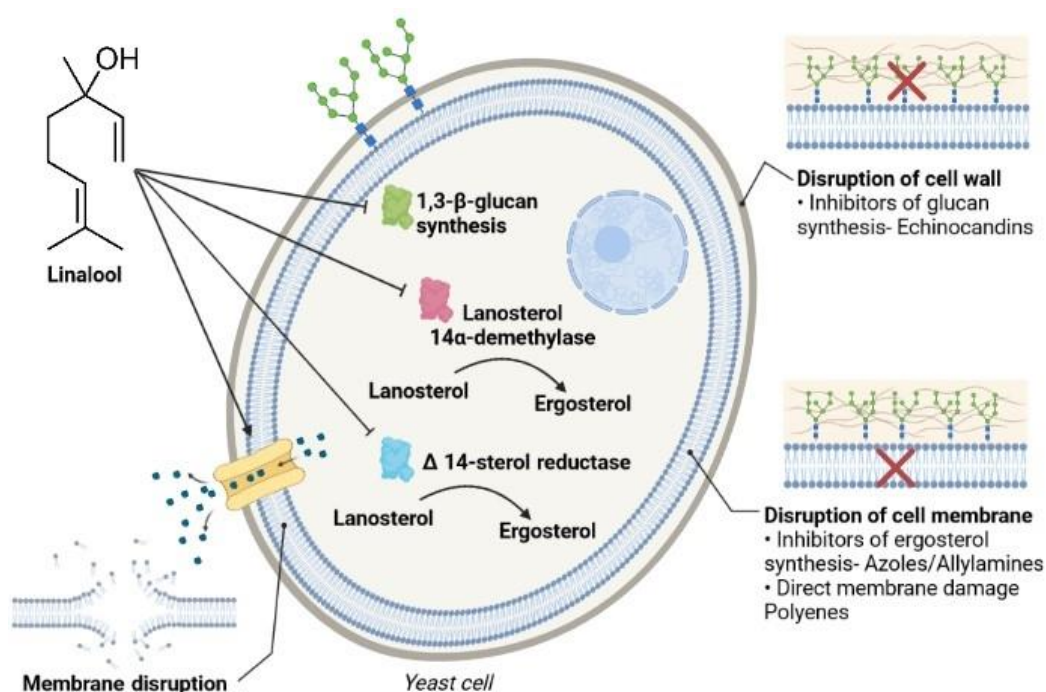


Figure 7. Summary representation of the predictive mechanism of action of linalool against four molecular targets of *C. albicans* strains based on *in vitro* test results and molecular docking. The linalool molecule appears to interfere with fungal cell wall maintenance involving 1,3-β- glucan synthase. Linalool can also interfere with fungal cell membrane integrity, altering the ergosterol content of these cells through interactions with lanosterol 14α-demethylase, Δ 14 sterol reductase, and/or formation of permeability pores and consequent lysis of the fungal cell membrane.

Conflict of interest

There are no conflicts to declare.

References

1. Farage MA, Miller KW, Sobel JD. Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences. *Infectious Diseases: Research and Treatment* 2010; 3: 1-15, doi:10.4137/IDRT.S3903.
2. Sardi JCO, Silva DR, Anibal PC, Baldin JJCMC, Ramalho SR, Rosalen PL, et al. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Curr Fungal Infect Rep* 2021; 15: 32–40, doi: 10.1007/s12281-021-00415-9.
3. Carvalho GC, Oliveira RAP, Araujo VHS, Sábio RM, Carvalho LR, Bauab TM, et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. *Med Mycol* 2021; 59: 946–957, doi: 10.1093/mmy/myab034/6302380.
4. Anh DN, Hung DN, Tien TV, Dinh VN, Son VT, Luong NV, et al. Prevalence, species distribution and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among symptomatic non-pregnant women of reproductive age at a tertiary care hospital, Vietnam. *BMC Infect Dis* 2021; 21:1–10.
5. Gamarra S, Morano S, Dudiuk C, Mancilla E, Nardin ME, de los Angeles Méndez E, et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibilities of Yeasts Causing Vulvovaginitis in a Teaching Hospital. *Mycopathologia* 2014; 178: 251–258, doi: 10.1007/s11046-014-9780-2.
6. Khan M, Ahmed J, Gul A, Ikram A, Lalani FK. Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. *Infect Drug Resist* 2018;11:447–456.
7. Farr A, Effendy I, Tirri BF, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Vulvovaginal Candidosis (Excluding Mucocutaneous Candidosis): Guideline of the German (DGGG), Austrian (OEGGG) and Swiss (SGGG) Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF Registry Number 015/072, September 2020). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2021; 81:398–421, doi: 10.1055/a-1345-8793.
8. Assress HA, Selvarajan R, Nyoni H, Mamba BB, Msagati TAM. Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives—a review. *Rev Environ Sci Bio/Technology* 2021; 20: 1011–1041, doi. 10.1007/s11157-021-09594-w.
9. Peterson B, Weyers M, Steenekamp J, Steyn J, Gouws C, Hamman J. Drug Bioavailability Enhancing Agents of Natural Origin (Bioenhancers) that Modulate Drug

- Membrane Permeation and Pre-Systemic Metabolism. *Pharmaceutics* 2019; 11: 1–46, doi: org/10.3390/pharmaceutics11010033.
10. Chen X, Zhang L, Qian C, Du Z, Xu P, Xiang Z. Chemical compositions of essential oil extracted from *Lavandula angustifolia* and its prevention of TPA-induced inflammation. *Microchem J* 2020; 153: 104–458, doi: org/10.1016/j.microc.2019.104458.
 11. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V De. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceutics* 2017; 10:1–20, doi: org/10.3390/ph10040086.
 12. Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA, Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *J Essent Oil Res* 2003; 15: 428–433, doi: org/10.1080/10412905.2003.9698631.
 13. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli ÂR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17:108–113, doi: org/10.1590/S0102-695X2007000100020.
 14. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 2000; 11: 137–147.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M27-A4. Ref Method Broth Dilution Antifung Suscetibility Test Yeasts. 2017.
 16. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African J Biotechnol* 2008; 7: 1797–1806, doi: org/10.5897/AJB07.613.
 17. Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola L. Antimicrobial Activity of Three Baccharis Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile. *Molecules* 2008; 13: 790–794, doi: org/10.3390/molecules13040790.
 18. Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TNM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J Saudi Chem Soc* 2013; 17: 237–243, doi: org/10.1016/j.jscs.2011.03.016.
 19. Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *J Antibiot* 1995; 48: 306–310, doi: org/10.7164/antibiotics.48.306.
 20. Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*

- 2008; 71: 1720–1725, doi: [org/10.1021/np070660i](https://doi.org/10.1021/np070660i).
21. Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, et al. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun* 2013; 4: 1–10, doi: [org/10.1038/ncomms4017](https://doi.org/10.1038/ncomms4017).
 22. Westermaier Y, Barril X, Scapozza L. Virtual screening: An *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome. *Methods* 2015; 71: 44–57. doi: [org/10.1016/j.ymeth.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.001).
 23. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem* 2015; 58: 4066–4072, doi: [org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104).
 24. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3–26, doi: [org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
 25. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017; 7:1–13, doi: [org/10.1038/srep42717](https://doi.org/10.1038/srep42717).
 26. Falleiros De Pádua RA, Guilhermetti E, Estivalet Svidzinski TI. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta Sci - Heal Sci* 2003; 25: 51–54.
 27. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 2011; 18: 1181–1190, doi: [org/10.1016/j.phymed.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008).
 28. Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, Souto EB. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018; 171: 566–578, doi: [org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001).
 29. Gow NAR, Latge J-P, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. Heitman J, editor. *Microbiol Spectr* 2017; 5: 1–25, doi: [org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016).
 30. Chang CC, Slavin MA, Chen SC-A. New developments and directions in the clinical application of the echinocandins. *Arch Toxicol* 2017; 91: 1613–1621. doi: [10.1007/s00204-016-1916-3](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1916-3).
 31. Dayna S. McManus, Sunish Shah, Antifungal drugs, Sidhartha D. Ray, Side Effects of Drugs Annual, 1ed. Elsevier, 2019, Pages 285-292, doi: [org/10.1016/bs.seda.2019.09.002](https://doi.org/10.1016/bs.seda.2019.09.002).

32. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol* 2018; 45: 70–76, doi: org/10.1016/j.mib.2018.02.005.
33. Chadha A, Madyastha KM. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica* 1984; 14: 365–374, doi: org/10.3109/00498258409151425.
34. Koziol A, Stryjewska A, Librowski T, Salat K, Gawel M, Moniczewski A, et al. An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. *Mini-Reviews Med Chem* 2014; 14: 1156–1168, doi: org/10.2174/1389557514666141127145820.
35. Rodríguez-López MI, Mercader-Ros MT, Lucas-Abellán C, Pellicer JA, Pérez-Garrido A, Pérez-Sánchez H, et al. Comprehensive Characterization of Linalool-HP- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Molecules* 2020; 25: 1–18, doi: org/10.3390/molecules25215069.
36. Bonetti P, de Moraes FF, Zanin GM, de Cássia Bergamasco R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of linalool/ β -cyclodextrin inclusion complex. *Polym Bull* 2016; 73: 279–291, doi: org/10.1007/s00289-015-1486-1.
37. Carneiro S, Costa Duarte F, Heimfarth L, Siqueira Quintans J, Quintans-Júnior L, Veiga Júnior V, et al. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: *In Vivo* and *In Vitro* Approaches. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1–23, doi: org/10.3390/ijms20030642.
38. Al-Nasiri G, Cran MJ, Smallridge AJ, Bigger SW. Optimisation of β -cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. *J Microencapsul* 2018; 35: 26–35, doi: org/10.1080/02652048.2017.1413147.
39. Carbone C, Martins-Gomes C, Caddeo C, Silva AM, Musumeci T, Pignatello R, et al. Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2018; 548: 217–226, doi: org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.064.
40. Pereira I, Zielińska A, Ferreira NR, Silva AM, Souto EB. Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. *Int J Pharm* 2018; 549: 261–270, doi: org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.068.



Acta Scientiarum
Biological Sciences

e-ISSN - 1807-863X

Year wise Impact Score (IS)	0,48
Qualis (Fármacia)	B2

5.2 Effects of the association of linalool with nystatin and fluconazole against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Artigo submetido

Effects of the association of linalool with nystatin and fluconazole against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Cássio I. S. Medeiros^{1*}, Francisco P. A. Júnior¹, Gislaine S. Rodrigues², Abrahão A. O. Filho³, Edeltrudes O. Lima¹

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

2 Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

3 Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos, PB, Brasil

Corresponding author: medeiros cassio4@gmail.com, Orcid: 0000-0002-6413-8303

Abstract: Vulvovaginal candidiasis is one of the most common fungal infections in women, affecting approximately 75% of this population at some point in their lives. It is primarily caused by the fungus *Candida albicans* and can be triggered by various factors, such as antibiotic use, diabetes, pregnancy, and use of hormonal contraceptives. In addition, the large increase in mycotic infections caused by *C. albicans* and the frequent therapeutic failure of conventional antifungals allied to the development of resistance of these microorganisms has led to the need for studies on the antifungal capacity of monoterpenes due to the great microbicidal potential that these molecules present, in addition to the capacity that these compounds demonstrate in combination therapies. Therefore, this work aimed to investigate the effects resulting from the association of the monoterpene linalool with the antifungal drugs nystatin and fluconazole against *C. albicans* strains from vulvovaginal secretions. Therefore, *in vitro* microdilution assays were conducted in RPMI-1640 broth and applied the Checkerboard method, using the antifungal drug amphotericin B as a control. The results of this study indicate that linalool shows strong anti-*C. albicans* activity and synergism with fluconazole, because the fractional inhibitory concentration index was (ICIF = 0.25) for *C. albicans* ATCC 76485. However, the combination of linalool and nystatin resulted in an indifferent effect. Thus, linalool showed antifungal potential, in which its association with fluconazole was able to reverse *C. albicans* resistance in *in vitro* assays.

Keywords: Linalool; *Candida albicans*; Synergism; Fluconazole; Fungal resistance.

INTRODUCTION

Candidiasis is a fungal disease that affects a large number of individuals and is characterized by an exacerbated yeast growth with the potential to affect multiple anatomical sites, and the skin and mucous membranes are the most common sites of infection, especially the mouth and vagina (Ben-Ami, 2018). Thus, vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection caused by several *Candida* species, and in most cases, *Candida albicans* is involved. A total of 75% of women of fertile age develop VVC at least once in their lives (Carvalho et

al., 2021), and this disease brings several discomforts, such as: pruritus, pain, irritation, dyspareunia, abnormal vaginal discharge, among others, thus causing great disorders and impacting the overall health of the female population (Yano et al., 2019).

Standard treatment for VVC consists of therapy with a topical antifungal agent or oral fluconazole (Sarsi et al., 2021; Pappas et al., 2016). Fluconazole is a fungistatic agent that selectively inhibits the fungal enzyme-dependent cytochrome P-450, called lanosterol 14 α -demethylase, encoded by the *ERG11* gene, which converts lanosterol into ergosterol, the main lipid of the fungal cell membrane (Whaley et al., 2017). Since fluconazole is fungistatic rather than fungicidal, there is a greater possibility of fungal cells developing acquired resistance in the presence of this medicinal product (Berkow & Lockhart, 2017).

Therefore, the discovery or development of antifungal molecules with fungicidal properties and fewer adverse effects is important in this context (d'Enfert et al., 2021). Thus, linalool, a lipophilic monoterpene from aromatic plants such as *Lavandula angustifolia* (Lavender) (24.30%), a plant of the *Lamiaceae* Martinov family native to the Mediterranean coast with known antifungal activity, appears to be promising (Chen et al., 2020). In addition, combined pharmacological therapy with more than one substance has been important in fungal infections with resistant pathogens. Because the concomitant administration of two or more drugs enables a better spectrum of action, use of smaller doses and minimisation of the adverse effects of medications (Nidhi, Rolta, Kumar, Dev, & Sourirajan, 2020; Rosata et al., 2021).

Therefore, this study aimed to investigate the effects of combining linalool with the antifungal drugs nystatin and fluconazole against *C. albicans* strains from vulvovaginal secretions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and microorganisms

The monoterpene linalool [3,7-dimethyl octa-1,6-dienol-3] (purity: 98.7%) was purchased commercially from Quinari[®], Ponta Grossa, PR, Brazil. The working solution was prepared at the time of conducting the tests and was duly solubilised in 150 μ L (3%) of dimethyl sulfoxide (DMSO) with 100 μ L (2%) of tween 80. It was then completed with sterile distilled water (q.s.p. 5.0mL) to obtain an emulsion at an initial concentration of 1024 μ g/mL (Nascimento et al., 2007). In addition, the medications used in this study were the antifungal drug fluconazole (FLU), nystatin (NYS) and amphotericin B (AMB). These drugs were

purchased commercially from (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil) and prepared according to manufacturers' specifications and in the desired concentrations.

Fluconazole-resistant clinical strains of *C. albicans* LM 129 originate from vulvovaginal secretions and the strain of *C. albicans* ATCC® 76485 was used as the standard. Both strains belong to the collection of the Research Laboratory of Antibacterial and Antifungal Activity of Natural and/or Synthetic Bioactive Products of the Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil (UFPB). The fungal strains were maintained in test tubes containing Sabouraud dextrose agar (SDA) culture medium (DIFCO Laboratories Ltd), at a temperature of 4°C. For the assays, 48-hour replicates incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ were used.

Checkerboard synergy assays

The combinations of linalool with commercial antifungals (nystatin and fluconazole) were tested in triplicate against *C. albicans* strains (LM 129 and ATCC 76485), using the 96-well plate microdilution method. Where initially, 100µL of RPMI-1640 broth was added to the wells of the plate and then linalool (50µL) was added in the vertical direction and the antifungal agent (nystatin or fluconazole) (50µL) in a horizontal direction. Thus, linalool was tested at different concentrations ($\text{MIC} \times 8$, $\text{MIC} \times 4$, $\text{MIC} \times 2$, MIC, $\text{MIC}/2$, $\text{MIC}/4$ and $\text{MIC}/8$). Finally, 20µL of the fungal suspensions were added with an inoculum of approximately $1-5 \times 10^6$ colony-forming units per millilitre (CFU/mL) standardised according to the 0.5 tube on the McFarland scale. The plates were then aseptically sealed and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 48 hours (Bassolé & Juliani, 2012; CLSI, 2017).

The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated by summing the $\text{FIC}_{(A)} + \text{FIC}_{(B)}$, where A stands for antifungal and B for linalool. The $\text{FIC}_{(A)}$, in turn, was calculated by the relation: minimum inhibitory concentration (combined $\text{MIC}_{(A)} / \text{MIC}_{(A)}$ alone), and analogously for $\text{FIC}_{(B)}$ (eq. 1).

(eq. 1).

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \frac{\text{MIC}_A \text{ in combination}}{\text{MIC}_A \text{ tested alone}} + \frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ tested alone}}$$

This index was interpreted as follows: synergism (≤ 0.5), additivity (> 0.5 and < 1), indifference (≥ 1 and < 4) and antagonism (≥ 4.0) (Lewis, Diekema, Mener, Rfaller, & Klepser, 2002).

RESULTS

Effects of the combination of linalool and nystatin against *C. albicans*

Firstly, the MIC of linalool alone against the strains analyzed was 64 µg/mL (Table 1). Furthermore, it can be observed that the *C. albicans* strains studied were sensitive to nystatin and that the combination of linalool with the latter resulted in an indifferent interaction, as can be verified through the FIC index. Therefore, linalool has significant antifungal activity, however, its combination with nystatin does not seem interesting from the point of view of multidrug therapy, given that this interaction does not improve and does not impair the sensitivity profile of the microorganism under study.

Table 1. MIC of linalool and the effects of the combination with the antifungal nystatin (NYS) against *C. albicans* LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485.

Substance/ Drug	<i>C. albicans</i> LM 129		<i>C. albicans</i> ATCC 76485	
	MIC (µg/mL)	FIC index (Interaction type)	MIC (µg/mL)	FIC index (Interaction type)
Linalool	64	-	64	-
NYS	4	-	4	-
Linalool/NYS	64/4	3,0 (indifferent)	64/4	2,25 (indifferent)

Cut off points: MIC of Nystatin ≤ 4 (S); 8 – 32 (S-DD); ≥ 64 (R) µg/mL. S: susceptible; S-DD: susceptible dose-dependent; R: resistant (Pádua, Guilhermetti, & Svidzinski, 2003).

Effects of the combination of linalool and nystatin against *C. albicans*

For the drug fluconazole, both strains tested were resistant (Table 2). In addition, linalool was shown to have a better action profile compared to fluconazole, given its lower MIC. It was still possible to verify an indifferent effect in the association of linalool with fluconazole for the strain LM 129 and synergism for the strain ATCC 76485. Thus, it seems that the combination of linalool and fluconazole may be promising because the phytochemical studied was able to improve the sensitivity profile of the microorganism in a combination that generates more than additive effects.

Table 2. MIC of linalool and the effects of the combination with the antifungal fluconazole (FLU) against *C. albicans* LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485.

Substance/ Drug	<i>C. albicans</i> LM 129		<i>C. albicans</i> ATCC 76485	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC index (Interaction type)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC index (Interaction type)
Linalool	64	-	64	-
FLU	>1024	-	32	-
Linalool/FLU	64/>1024	3,0 (indifferent)	64/32	0,25 (synergistic)

Cut off points: MIC of fluconazole ≤ 2 (S); 4 (S-DD); ≥ 8 (R) $\mu\text{g/mL}$, document M60. S: susceptible; S-DD: susceptible dose-dependent; R: resistant (CLSI, 2017).

DISCUSSION

Combination therapy with available antifungal drugs has been recommended and used in the treatment of various mycoses (Hsieh et al., 2018). However, combination therapy with natural products is less explored. The advantages over monotherapy include an increase in the potency of fungal elimination, reduction in the emergence of resistant strains and a minimisation of dose-related toxicity of antifungal drugs (Maurya, Semwal & Semwal, 2020).

Recent studies reported that the combination of different antifungal agents or the combination of natural products and standard drugs can reduce individual MIC values in fungal strains (Herman & Herman, 2021).

Therefore, in this study, the association of the antifungal drug nystatin with the monoterpene linalool was used against strains of *C. albicans* (Table 1) in which they were sensitive to nystatin according to the reference values for interpretation criteria (Pádua et al., 2003). Furthermore, it is observed that the strains tested were sensitive to linalool, which inhibited the fungal growth at 64 $\mu\text{g/mL}$ demonstrating an important pharmacological effect on these strains which Morales et al., 2008 classify as strong antifungal activity (MIC < 100 $\mu\text{g/mL}$). However, linalool when in association with nystatin demonstrated an indifferent effect, and consequently, there are no advantages in their concomitant administration.

The need to search for new alternatives and/or different antifungal therapeutic approaches is validated by the growing incidence of fungal resistance to classical drugs, their toxicity, and the costs of available treatments. In this sense, several studies show the growing incidence of *C. albicans* strains resistant to commonly used antifungals, in particular fluconazole, which this phenomenon is quite common (Awad, Khoury, Geukgeu, & Khalaf, 2021; Sobel & Sobel, 2018). Therefore, the combined use of antifungal drugs with

phytomedicines is one of the effective methods for improving the effectiveness of antifungal drugs (Bhattacharya, Rolta, Dev & Sourisajari, 2021).

In this regard, Houshmandzad, Scharifzadeh, Khosravi & Shokri (2022) observed that linalool showed antifungal activity against *Candida* sp, together with azole-resistant strains, resulting in further research into clinical applications of this compound in the treatment of fungal infections. Table 2 highlights the antifungal activity of linalool alone (MIC = 64µg/mL), as well as the resistance of the fungal strains tested against fluconazole alone (MIC > 1024µg/mL). From another perspective, the synergistic effect of linalool with fluconazole (FICI of 0.25) was observed for the *C. albicans* strain ATCC 76485.

For Mi-Jin Park et al. (2007), synergistic interactions of phytopharmaceuticals with fluconazole may be related to the simultaneous inhibition of different fungal targets by the test molecule and fluconazole. Fluconazole acts by inhibiting the activity of the enzyme lanosterol 14α-demethylase which results in the interruption of ergosterol biosynthesis. Therefore, it appears that the integrity of the cell wall and cell membrane, together with other membranous structures are the target sites for the action of active compounds such as linalool. This effect can be attributed to the lipophilic properties of this molecule and indicates its ability to penetrate the plasma membrane (Tariq et al., 2019). In addition, the fungicidal action of several monoterpenes including linalool has been observed, and they may reduce the usual required dose of fluconazole. As fluconazole is a hydrophilic azole, it is less effectively absorbed compared with lipophilic azoles such as ketoconazole, clotrimazole and itraconazole by the lipid components of the fungal cells (Sheven & Schwegler, 1995).

Therefore, cell wall lysis by lipophilic compounds may result in increased absorption and a more optimal amount available to act on the fungal cells, which leads to better and faster lethality in these microorganisms. This also facilitates the conversion of fluconazole from a fungistatic mode to a fungicidal mode of action. And this combination can be compared to the synergistic interaction of azoles with inhibitors of cell wall synthesis (i.e., echinocandins) (Spitzer, Robbins & Wright, 2016). Therefore, the exact mechanism for cell wall disruption and membrane synthesis by monoterpenes is not yet fully understood, however multiple target sites for action by one antifungal agent are additional advantages in combination therapy.

Importantly, linalool does not exhibit phototoxicity or genotoxicity. Several *in vitro* models, such as bacteria and fibroblast cells, as well as *in vivo* models with (Sprague-Dawley rats), have been used to assess the genotoxicity of linalool, and all have confirmed that this monoterpene does not cause changes in genetic material (Api et al., 2015; Aprotosoie, Hăncianu, Costache & Miron, 2014; Marnett et al., 2014). However, studies in rabbits and rats

in vivo indicate that, after rapid intestinal absorption, linalool functions as an enzymatic inducer of the microsomal cytochrome P-450 system, which metabolizes the monoterpene into 8-hydroxy linalool and 8-carbox linalool, which are mainly excreted by the urinary tract (Chadha & Madyastha, 1984).

Despite their therapeutic properties, the use of phytochemicals extracted from plant essential oils, such as linalool, may be limited due to their low solubility and bioavailability. To overcome these limitations, drug delivery systems can be used as alternative and versatile platforms to enhance the bioactive effects of phytochemical compounds (Koziol, Stryjewska, Librowski, Salat, Gawel, Moniczewski & Lochyński, 2014). Although solubilizing agents, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), can improve the bioavailability of linalool, they can also cause cellular toxicity and undesirable side effects. Furthermore, due to its volatile nature, linalool is unstable and has a short shelf life, limiting its clinical application (Rodríguez-López et al., 2020). In addition, the lipophilicity of linalool results in low water solubility. To overcome these limitations, recent studies have explored the complexation of linalool with cyclodextrins (Paiva-Santos et al., 2022).

In this regard, cyclodextrins are supramolecular structures characterised by ring formation, and β -cyclodextrins are the most common form used in drug delivery. The β -cyclodextrins have a truncated cone shape and are composed of seven glucopyranoside units. In cyclodextrin complexes, the hydrophilic outer surface confers water solubility and the hydrophobic inner cavity allows the inclusion of lipophilic compounds such as linalool. Nanoscale delivery systems can also be naturally used to encapsulate linalool (Carneiro, Duarte, Heimfarth, Quintans, Quintans-Júnior, Júnior & Lima, 2019; Paiva-Santos et al., 2022).

The use of lipid nanoparticles is widely described in the scientific literature as a solution to overcome the challenges associated with the delivery and release of natural health beneficial compounds such as flavonoids, monoterpenes, polyphenols and carotenoids (Al-Nasiri et al., 2018). These nanoparticles exhibit a wide range of important characteristics, such as small particle size (40-1000nm), large surface area, high loading capacity, controlled release of the active compound, ease of large-scale production, as well as being biocompatible and biodegradable (Carbone et al., 2018; Rodríguez-López et al., 2020). Therefore, linalool is widely benefited by its loading in lipidic nanoparticles, because these particles are able to overcome the physicochemical difficulties associated with this compound (Pereira, Zielińska, Ferreira, Silva & Souto, 2018).

CONCLUSIONS

Therefore, phytochemicals have been widely exploited by the pharmaceutical and drug industry, because the various pharmacological properties that these compounds have has been validated by a multitude of experimental studies. The antimicrobial potential of monoterpenes against fungal pathogens that cause disease in humans has been reported by several studies, which implies a high degree of therapeutic value for this class of molecules. Combination therapy, including the synergistic activity of these compounds, has been explored as an alternative to the antimicrobials currently in clinical use that have become ineffective due to microbial drug resistance.

In the present study, it was possible to observe the antifungal activity of linalool and the synergistic effect of this monoterpene with fluconazole against *C. albicans* strains, in which this combination was able to turn these once-resistant strains into susceptible ones.

The scientific literature is also vast regarding the toxicological analysis of linalool, demonstrating that this monoterpene presents pharmacokinetic parameters - Administration, Distribution, Metabolism, Excretion and possible Toxicity (ADMET) - similar to licensed drugs. Moreover, nanoencapsulation in lipidic particles as an intelligent drug delivery system could be used for linalool in order to circumvent the physicochemical difficulties (such as high lipophilicity) characteristic of this molecule. However, the pharmacological evaluation (including pharmacodynamic research) and toxicity studies of synergistic phytochemical/antifungal combinations need to be explored before their studies in humans.

Funding: The author received no specific funding for this study.

Author contributions: Analysis and writing of the original draft: Cássio I. S. Medeiros and Francisco P. A. Júnior. Revision and edition: Gislaíne S. Rodrigues. Supervision: Abrahão A. O. Filho and Edeltrudes O. Lima.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Al-Nasiri, G., Cran, M. J., Smallridge, A. J., & Bigger, S. W. (2018). Optimisation of β -cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. *Journal of microencapsulation*, 35(1):26-35. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1413147>

- Api, A. M., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M. L., ... Wilcox, D. K. (2015). RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalool, CAS registry number 78-70-6. *Food and Chemical Toxicology*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.005>
- Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., & Miron, A. (2014). Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(4):193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Awad, A., Khoury, P. E., Geukgeuzian, G., & Khalaf, R. A. (2021). Cell Wall Proteome Profiling of a *Candida albicans* Fluconazole-Resistant Strain from a Lebanese Hospital Patient Using Tandem Mass Spectrometry—A Pilot Study. *Microorganisms*, 9(6): 1161. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061161>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(4):3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Ben-Ami, R. (2018). Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *Journal of Fungi*, 4(3):97. <https://doi.org/10.3390/jof4030097>
- Berkow, E., & Lockhart, S. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*, 10(1):237-245. <https://doi.org/10.2147/IDR.S118892>
- Bhattacharya, R., Rolta, R., Dev, K., & Sourirajan, A. (2021). Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. *Phytotherapy Research*, 35(11):6089-6100. <https://doi.org/10.1002/ptr.7218>
- Carbone, C., Martins-Gomes, C., Caddeo, C., Silva, A. M., Musumeci, T., Pignatello, R., Souto, E. B. (2018). Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 548(1):217-226. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.064>
- Carneiro, S. B., Duarte, F. Í. C., Heimfarth, L., Quintans, J. S. S., Quintans-Júnior, L. J., Júnior, V. F. V., & Lima, Á. A. N. (2019). Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3):642. <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>
- Carvalho, G. C., Oliveira, R. A. P., Araujo, V. H. S., Sábio, R. M., Carvalho, L. R., Bauab, T. M., ... Chorilli, M. (2021). Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. *Medical Mycology*, 59(10):946-57. <https://doi.org/10.1093/mmy/myab034>
- Chadha, A., & Madyastha, K. M. (1984). Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica*, 14(5):365-374. <https://doi.org/10.3109/00498258409151425>
- Chen, X., Zhang, L., Qian, C., Du, Z., Xu, P., Xiang, Z. (2020). Chemical compositions of essential oil extracted from *Lavandula angustifolia* and its prevention of TPA-induced inflammation. *Microchemical Journal*, 153(1): 104458. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104458>
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2017). Document M60. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts
- d'Enfert, C., Kaune, A. K., Alaban, L. R., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., ... Brown, A. J. P. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans*

infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3): fuaa060. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa060>

Herman, A., & Herman, A. P. (2021). Herbal Products and Their Active Constituents Used Alone and in Combination with Antifungal Drugs against Drug-Resistant *Candida* sp. *Antibiotics*, 10(6):655. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060655>

Houshmandzad, M., Sharifzadeh, A., Khosravi, A., & Shokri, H. (2022). Potential antifungal impact of citral and linalool administered individually or combined with fluconazole against clinical isolates of *Candida krusei*. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 11(2):269-277. <https://doi.org/10.34172/jhp.2022.32>

Hsieh, Y. H., Zhang, J. H., Chuang, W. C., Yu, K. H., Huang, Z. B., Lee, Y. C., & Lee, C-I. (2018). An *in vitro* Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2):337. <https://doi.org/10.3390/ijms19020337>

Kozioł, A., Stryjewska, A., Librowski, T., Salat, K., Gawel, M., Moniczewski, A., & Lochyński, S. (2014). An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(14):1156-68. <https://doi.org/10.2174/1389557514666141127145820>

Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Klepser, M. E. (2002). Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2):345-351. <https://doi.org/10.1093/jac/49.2.345>

Marnett, L. J., Cohen, S. M., Fukushima, S., Gooderham, N. J., Hecht, S. S., Rietjens, I. M. C. M., ... Taylor, S. V. (2014). GRASr2 evaluation of aliphatic acyclic and alicyclic terpenoid tertiary alcohols and structurally related substances used as flavoring ingredients. *Journal of food science*, 79(4). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12407>

Maurya, I. K., Semwal, R. B., & Semwal, D. K. (2020). Combination therapy against human infections caused by *Candida* species. In: *Combination Therapy Against Multidrug Resistance*. Elsevier, 81-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820576-1.00004-7>

Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antonioli, Â. R., Santos, P. O., Júnior, A. M. B., & Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1):108-113. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>

Nidhi, P., Rolta, R., Kumar, V., Dev, K., Sourirajan, A. (2020). Synergistic potential of Citrus aurantium L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 262(1):113-135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113135>

Pádua, R. A. F., Guilhermetti, E., & Svidzinski, T. I. (2003). E. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta sci. Health Science Reports*, 25(1):51-54.

Paiva-Santos, A. C., Ferreira, L., Peixoto, D., Silva, F., Soares, M. J., Zeinali, M., ... Veiga, F. (2022). Cyclodextrins as an encapsulation molecular strategy for volatile organic compounds - Pharmaceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 218: 112758. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112758>

- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 62(4): e1-e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
- Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Choi, W. S., Jo, H. J., Chang, J. W., ... Choi, I-G. (2007). Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *Journal of Microbiology*, 45(5):460-5. PMID: 17978807
- Pereira, I., Zielińska, A., Ferreira, N. R., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2018). Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. *International journal of pharmaceutics*, 549(1-2):261-270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.068>
- Rodríguez-López, M. I., Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Pellicer, J. A., Pérez-Garrido, A., Pérez-Sánchez, H., ... Núñez-Delicado, E. (2020). Comprehensive Characterization of Linalool-HP- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Molecules*, 25(21):5069. <https://doi.org/10.3390/molecules25215069>
- Rosata, A., Altini, E., Sblano, S., Salvagno, L., Maggi, F., Michele, G., ... Fracchiolla, G. (2021). Synergistic Activity of New Diclofenac and Essential Oils Combinations against Different *Candida* spp. *Antibiotics*, 10(6): 688. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060688>
- Sarsi, J. C. O., Silva, D. R., Anibal, P. C., Baldin, J. J. C. M. C., Ramalho, S. R., & Rosalen, P. L., Macedo, M. L. R. & Hofling, J. F. (2021). Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Current Fungal Infection Reports*, 15(1):32-40. <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00415-9>
- Scheven, M., & Schwegler, F. (1995). Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(8):1779-1783. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.8.1779>
- Sobel, J. D., & Sobel, R. (2018). Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opin Pharmacother*, 19(9):971-977. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>
- Spitzer, M., Robbins, N., & Wright, G. D. (2016). Wright Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*, 8(2):169-85. <https://doi.org/10.1080%2F21505594.2016.1196300>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., ... Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134(1):103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7(1):21-73. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
- Yano, J., Sobel, J. D., Nyurjesy, P., Sobel, R., Williams, V. L., Yu, Q., ... Junior, P. L. F. (2019). Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms,

management and post-treatment outcomes. *BMC Women's Health*, 19(1):48.
<https://doi.org/10.1186/s12905-019-0748-8>

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Impact Factor	0,84
Qualis (Fármacia)	B2

5.3 Docking prediction, molecular dynamics and anti-biofilm effect of linalool against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Artigo submetido

Docking prediction, molecular dynamics and anti-biofilm effect of linalool against *Candida albicans* strains from vulvovaginal secretions

Cássio Ilan Soares Medeiros^{1*}, Rawny Galdino Gouveia¹, Victor Targino Gomes², Gislaine da Silva Rodrigues³, Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes², Abrahão Alves de Oliveira Filho⁴, Edeltrudes de Oliveira Lima¹

1 Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

2 Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

3 Department of Microbiology, Estate University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

4 Biological Sciences Academic Unit, Federal University of Campina Grande, Polo: Patos, PB, Brazil

Corresponding author: medeiros cassio4@gmail.com, Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6413-8303>

Abstract

Introduction: Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection caused by the fungus *Candida albicans*, responsible for 90% of cases. Biofilm formation by the fungus is a factor that contributes to the persistence of the infection and protects the fungal cells from antimicrobial treatments. **Objective:** To investigate the anti-biofilm effect of linalool against strains of *C. albicans* from vulvovaginal secretions as well as, the interactions of this compound with the enzyme 1,3- β -glucan synthase which seems to be an important therapeutic target for the treatment of VVC. **Materials and methods:** *In vitro* assays were performed with *C. albicans* strains LM 129 and *C. albicans* ATCC 76485 and crystal violet to evaluate the effect of linalool on biofilm formation in microtubules. In addition, flexible molecular docking simulations were performed in AutoDock 4.2 and molecular dynamics in GROMACS 2022.3. **Results:** Linalool reduced biofilm formation by 74.65% on average for both *C. albicans* strains studied. Nystatin showed low percentage (21.3%) on average in reducing biofilm formation and high adhesion of fungal cells to microtube walls. Furthermore, linalool interacted with the enzyme 1,3- β -glucan synthase of *C. albicans* resulting in free energy release (ΔG) of -6.0 kcal/mol, comparable to that of the control ligand castanospermine (-7.0 kcal/mol), as well as generating a stable receptor-ligand complex in up to 30ns of MD simulation. **Conclusions:** Linalool was bioactive against *C. albicans* biofilm formation. And predictively, this effect is possibly due to the interactions of this monoterpene with the enzyme 1,3- β -glucan synthase.

Keywords: Biofilms; monoterpenes; antifungals; candidiasis vulvovaginal; molecular docking; *Candida albicans*.

Predicción de acoplamiento, dinámica molecular y efecto anti-biopelícula del linalol contra cepas de *Candida albicans* de secreciones vulvovaginales

Introducción. La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección causada por el hongo *Candida albicans*, responsable del 90% de los casos. La formación de biopelículas por parte del hongo es un factor que contribuye a la persistencia de la infección y protege a las células fúngicas de los tratamientos antimicrobianos. **Objetivo.** Investigar el efecto anti-biopelícula del linalol frente a cepas de *C. albicans* de secreciones vulvovaginales, así como las interacciones

de este compuesto con la enzima 1,3- β -glucano sintasa, que parece ser una diana terapéutica importante para el tratamiento de CVV. **Materiales y métodos.** Se realizaron ensayos *in vitro* con las cepas *C. albicans* LM 129 y *C. albicans* ATCC 76485 y cristal violeta para evaluar el efecto del linalol en la formación de biopelícula en microtubos. Además, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular flexible en AutoDock 4.2 y dinámica molecular en GROMACS 2022.3. **Resultados.** Linalol redujo la formación de biopelículas en un 74,65% de media para las dos cepas de *C. albicans* estudiadas. La nistatina mostró un bajo porcentaje (21,3%) en promedio en la reducción de la formación de biopelículas y una alta adherencia de las células fúngicas a las paredes de los microtubos. Además, el linalol interactuó con la enzima 1,3- β -glucano sintasa de *C. albicans*, lo que resultó en una liberación de energía libre (ΔG) de -6,0 kcal/mol, comparable a la del ligando de control castanospemina (-7,0 kcal/mol), además de generar un complejo receptor-ligando estable en hasta 30ns de simulación por DM. **Conclusiones.** Linalol fue bioactivo contra la formación de biopelículas de *C. albicans*. Y de forma predictiva, este efecto posiblemente se deba a las interacciones de este monoterpeno con la enzima 1,3- β -glucano sintasa.

Palabras clave: Biopelículas; monoterpenos; antifúngicos; candidiasis vulvovaginal; acoplamiento molecular; *Candida albicans*.

Introduction

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection caused mainly by the fungus *Candida albicans*, which is responsible for about 90% of cases. This infection can occur in women of all ages and is characterized by symptoms such as itching, burning and vaginal discharge (1, 2). One of the factors contributing to the persistence of infection and the development of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) is the formation of biofilm by the fungus, which adheres strongly to the vaginal mucosa and protects the fungal cells from antimicrobial treatments (3).

Biofilm is a complex structure formed by a community of microorganisms, surrounded by an extracellular matrix composed of proteins, carbohydrates and lipids. Biofilm formation by *C. albicans* is a complex process, which involves the synthesis of glucan by the enzyme 1,3- β -glucan synthase. This enzyme is essential for the integrity of the fungal cell wall and is an important therapeutic target for the treatment of VVC (4, 5).

Linalool is a compound found in essential oils of plants such as Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). This compound has antifungal activity and has been studied as an alternative therapy for the treatment of VVC (6, 7). Recent studies have shown that linalool inhibits *C. albicans* biofilm formation by reducing the adhesion of the fungus to vaginal epithelial cells. In addition, linalool has low toxicity and is well tolerated, making it a promising option for the treatment of VVC (8, 9).

Therefore, this study aimed to investigate the anti-biofilm effect of linalool against *C. albicans* strains from vulvovaginal secretions as well as, the interactions of this compound with

the enzyme 1,3- β -glucan synthase which seems to be an important therapeutic target for the treatment of VVC.

Materials and methods

Substances and microorganisms

The substances used in the assays: Linalool (LIN) [3,7-dimethyl octa-1,6-dienol-3] and Nystatin (NYS), were acquired from Quinari[®] (Ponta Grossa, PR, Brazil) and Sigma-Aldrich[®] (São Paulo-SP) respectively. The working solution was prepared at the time of performing the tests, using 10 μ L of linalool and properly solubilized in 150 μ L (3%) of dimethyl sulfoxide (DMSO) added to 50 μ L (1%) of tween 80. It was then supplemented with sterile distilled water (q.s.p. 80mL) to obtain an emulsion at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 64 μ g/mL (10). The strain of *C. albicans* LM 129 used in this study belongs to the mycobank of the Research Laboratory of Antibacterial and Antifungal Activity of Natural and/or Synthetic Bioactive Products of the Federal University of Paraíba (UFPB). The American Type Culture Collection strain (*C. albicans* ATCC 76485) was used as control. For the *in vitro* assays, fungal suspensions were prepared in 0.85% saline solution from fresh cultures and turbidity was equivalent to 0.5 on McFarland's standard scale, which corresponds to an inoculum of approximately $1-5 \times 10^6$ colony forming units per milliliter (CFU/mL) (11).

Biofilm formation test

To evaluate the effect of linalool in inhibiting biofilm formation of *C. albicans* strains, the crystal violet test (NewProv, Pinhais-PR, Brazil) was employed. In which, polystyrene microdilution tubes with 1.5mL capacity were filled with 800 μ L of RPMI-1640 broth, 100 μ L of the linalool emulsion (MIC concentration = 64 μ g/mL) and 100 μ L of the suspensions of *C. albicans* strains LM 129 and ATCC 76485. This same procedure was performed with the antifungal nystatin (MIC concentration = 4 μ g/mL). Then, the microtubes were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for a period of 48h. Subsequently, the broth was discarded and the walls of the microtubes washed 3-5 times with distilled water to remove any deposited planktonic cells. The tubes were left to dry at room temperature for 1h. After this period, 1000 μ L of the 1% crystal violet solution was transferred and after 20min the dye was discarded and the excess was removed with distilled water. Then 1000 μ L of 95% ethanol (Química Moderna, Barueri-SP, Brazil) was added and the optical density of the crystal violet-ethanol solution was measured at 590nm (Kasvi, 4NM). The test control was performed with the strains inoculated in RPMI-

1640 broth. The assays were performed in triplicate and the cell adhesion rate on the microtube walls were calculated using the formula: $[(\text{ODC} - \text{ODT}) / \text{ODC} \times 100]$, where ODC is the mean of the optical density of the control in nutrient broth and ODT, the mean of the optical density of the treatment with the substances tested (12). The percentage of adhesion reduction was calculated by the ratio between the optical densities obtained in the crystal violet test, the treatment and the control. Cells were classified as weakly adhered (if $< 40\%$), moderately adhered (between 40.01 and 79.99%) or highly adhered (if $> 80\%$) (13). The degree of inhibition of biofilm formation was classified as strong ($> 80\%$), moderate (between 40.01 and 79.99%) or weak (if $< 40\%$) (14).

Molecular docking

Flexible molecular docking simulations were performed with the protein involved with *C. albicans* cell wall synthesis 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC), whose structure was taken from the Protein Data Bank (PDB) and loaded into PyMol 2.5.3, to remove water molecules and the cocrystallized ligand castanospermine (CAS). The structure of the ligand linalool (LIN) was obtained from PubChem and using Avogadro 1.2.0 software at pH 7.4 and Mopac2012 at the PM7 level, energy minimizations and molecular optimization were performed with the MMFF94 force field (15, 16).

Subsequently, the protein was loaded into the software AutoDock Tools (17) for the addition of hydrogens and Kollman charges, besides the mixing of non-polar hydrogens. Soon after, docking simulations were performed with the identification of the target active site with the respective flexible amino acids (Glu27, Tyr29, His135, Asn146, Asn191, Glu192, Tyr255, Glu292, Trp363), grid centre (34.475; 36.263; 55.769 Å), dimensions (40 x 40 x 40 Å) and 0.375 Å spacing.

After the location of the active site, the docking was developed in AutoDock 4.2, with 100 operations of Lamarckian genetic algorithm and in the standard parameters of AutoDock Tools. With this, values of Free Energy of Binding (ΔG) and Inhibitory Constant (K_i) were generated, being selected the conformations with lower value of ΔG . Finally, with the aid of PyMol 2.5.3 and Discovery Studio 2021 software, the results were analysed, determining the binding regions of the target with the ligand molecule, the types of interactions and the amino acids of the active site that participate in the linkages. The validation process of the methodology, was performed through molecular redocking and selected the conformation of the ligand with the lowest Root-Mean-Square Deviation (RMSD) value of the distances between the atoms and below 2.0 Å (18).

Molecular dynamics simulation

Molecular dynamics (MD) simulation was performed using GROMACS software version 2022.3 (19). The molecular complex selected for simulation initially had its ligand separated from the respective protein using PyMol 2.5.3 software and furthermore, water molecules and any other artefacts were removed. The topology and coordinate files of the protein were also generated using GROMACS with the CHARMM36 force field and then the topology file of the ligand was generated in CGenFF and consequently the complexes were built and the coordinate and topology files for the protein-ligand system were generated (20, 21). Following this, the system was confined and centred in a cubic box under periodic boundary conditions. The minimum solute-box distance was fixed at 1.5nm to ensure a distance of at least 3.0nm between the protein and its periodic image, avoiding artefacts during MD simulations and resulting in a box volume of 589,682nm³. The box was filled with approximately 17,230 spc216 water molecules (22) to reproduce the effects of the solvent, and counter-ions were added to neutralise the charge of the system.

The MD simulation started with two 100ps energy minimization (EM) steps performed in sequence. The first EM was performed with position restriction (PR) of the protein and ligand so that the water molecules could settle inside the box. Then, a second EM step was performed without PR to achieve a local minimum on the potential energy surface of the system. Both EM steps were conducted using the steepest descent algorithm and the maximum force was set to 100.0 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ as a convergence criterion. In sequence, temperature and pressure equilibrium was achieved by performing two 100ps equilibrium steps, first under an isothermal-isochoric (NVT) ensemble and then under an isothermal-isobaric (NPT) ensemble, to bring the system to a temperature of 300K and 1 bar of pressure. Both temperature and pressure were maintained using the velocity re-scaling thermostat (23) and the Parrinello-Rahman pressure coupling methods (24) respectively. Finally, a 30ns MD production step was conducted at 300K and 1 bar pressure using 2fs as integration time, a 1.2nm cutoff for short-range interactions (Lennard-Jones and Coulomb) and the leap-frog integrator algorithm; the complex coordinates were stored every 10ps. Finally, the MD simulation was analysed using the Visual Molecular Dynamics (VMD) software (25) and Grace (26).

Results

Effects of linalool on biofilm reduction

The effect of linalool on the biofilm formation of *C. albicans* LM 129 and ATCC 76845 was tested, and a reduction of cell adhesion on the microtubule surface was observed. The values obtained from the optical densities in the crystal violet test, treatment and control are presented in (Table 1). Thus, it was verified that linalool inhibited the formation of biofilm of the tested strains. Considering the standard deviations, the percentages of reduction of cell adhesion with linalool varied between 70.4% and 78.9%, characterizing a moderate antibiofilm activity of this compound. These values also indicated that the activity of linalool was significantly higher than the standard drug nystatin.

Table 1. Percentages of reduction and classification of cell adhesion in the *in vitro* biofilm formation assay.

Drug	<i>C. albicans</i> LM 129		<i>C. albicans</i> ATCC 76485	
	% reduction	adhesion type	% reduction	adhesion type
LIN	78,9 ± 2,3	moderate	70,4 ± 1,9	moderate
NYS	13,3 ± 2,5	high	29,3 ± 2,5	high

*Data were obtained from an experiment carried out in triplicate and presented as percentage values of reduction of biofilm adhesion, obtained from the mean ± p.e.m. in comparison with the negative control.

Interactions of linalool with 1,3-β-glucan synthase

By performing molecular redocking of the cocrystal castanospermine ligand on the enzyme 1,3-β-glucan synthase, RMSD values ≤ 2.0 Å were obtained, which validates the methodology used. Furthermore, it is possible to compare the binding energies (ΔG) and inhibitory constants (K_i) of the control ligand with the monoterpene linalool. These parameters demonstrate that the control castanospermine (redocking) ligand has a higher binding affinity compared to linalool, as can be seen in (Table 2).

Table 2. Values of Binding Energy (ΔG) and Affinity Constant (K_i) of linalool and castanospermine against the enzyme 1,3-β-glucan synthase (PDB ID: 1EQC).

Molecules	ΔG (kcal/mol)	RMSD (Å)	K_i
CAS	- 7.0	0.51	0.41 μ M
LIM	- 6.0	-	39.85 μ M

It is important to highlight the main interactions between the castanospermine ligand in the redocking process and the active centre of the enzyme 1,3- β -glucan synthase. In this context, the various hydrogen interactions with the residues (Glu27, Tyr29, His135, Asn191 and Glu292) stand out, in addition to van der Waals interactions, hydrogen carbon and hydrogen donor Pi bond as illustrated in figure 1. These interactions were similar to those of the cocrystal ligand, except for the two Pi-alkyl bonds with the residues (Tyr255 and Trp373) that did not form with the redocking ligand.

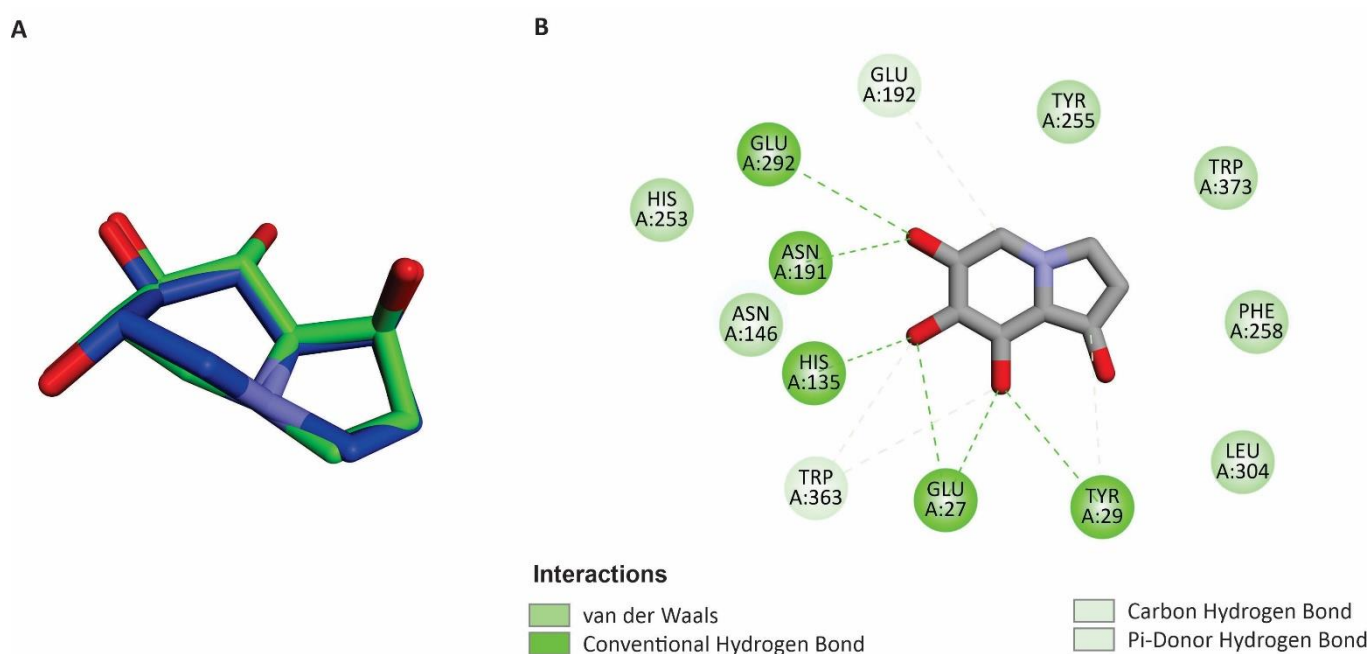


Figure 1. Validation process for molecular docking by redocking. **A**, Best overlap of castanospermine after redocking (blue) with respect to the PDB cocrystal (green). **B**, Two-dimensional interactions of castanospermine with the amino acids of the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC).

The molecular docking process of linalool with the enzyme 1,3- β -glucan synthase from *C. albicans* resulted in a favourable conformation, with free energy release (ΔG) of -6.0 kcal/mol, comparable to that of the control ligand (according to Table 2). Moreover, the interactions between the monoterpene and the enzyme active site are hydrogen bonds between residues Glu27 (with distance of 2.14 Å) with the H21 of the linalool hydroxyl and Asn146 (with distance of 2.16 Å) with the O1 of the hydroxyl of this monoterpene. It is also important to highlight the occurrence of a Pi-sigma bond between the benzene ring of Phe258 (with distance of 2.81 Å) and the C10 carbon atom of linalool, in addition to some van der Waals and Pi-alkyl interactions (as illustrated in Figure 2A and B).

The active centre of the enzyme 1,3- β -glucan synthase shows low hydrophobicity and the linalool ligand has lipophilic character, however the presence of the OH group at its C2-linked end gives it polarity and H donor and acceptor characteristic (Figure 2C and D).

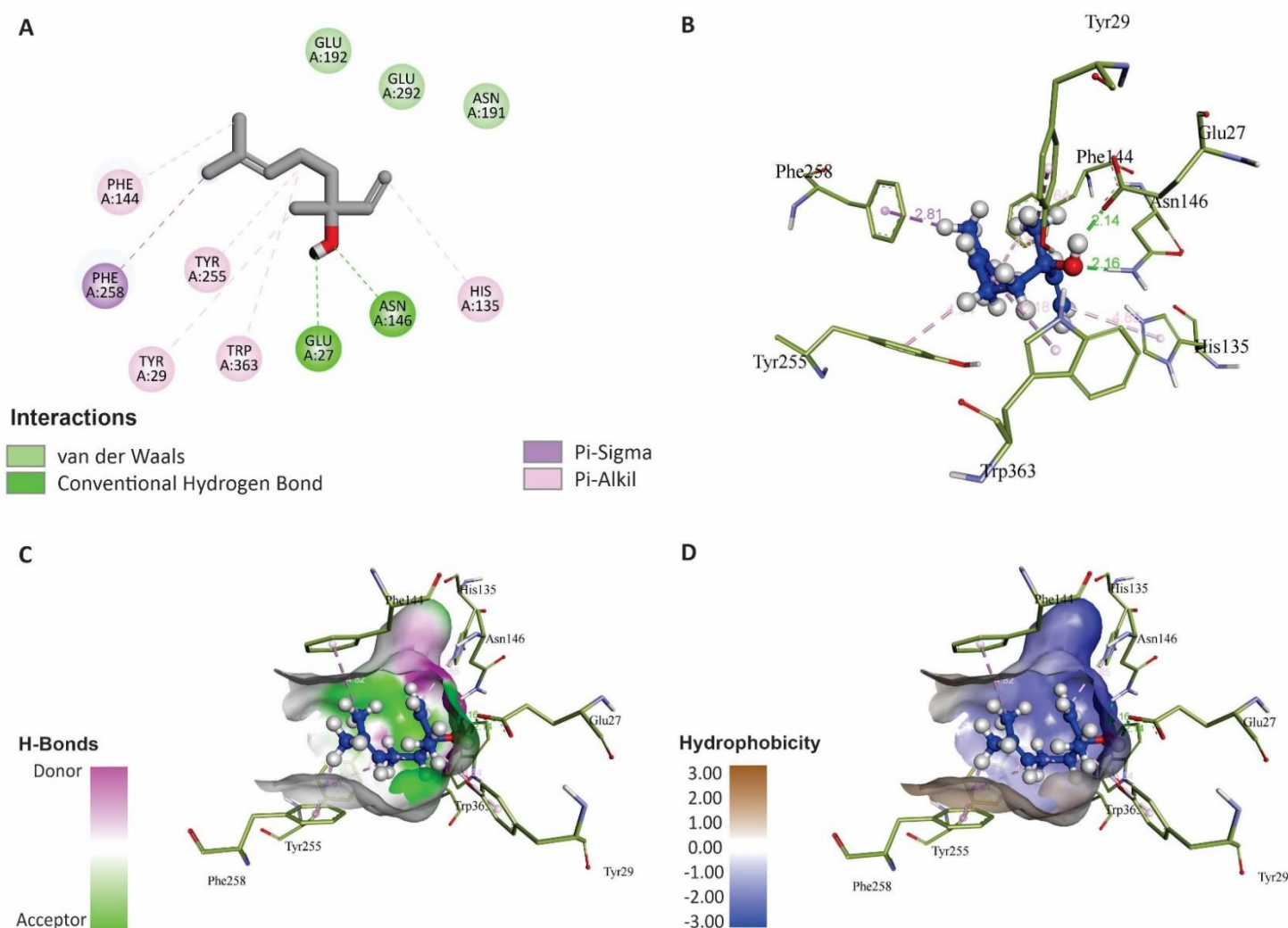


Figure 2. Flexible molecular docking analysis of linalool in the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase (PDB ID: 1EQC). **A**, 2D interactions of linalool with the amino acids of the active site of the enzyme under study. **B**, 3D interactions of linalool with the amino acids of the active site of the enzyme under study with emphasis on the binding distances. **C**, 3D surface model of hydrogen bonds. **D**, 3D surface model of hydrophobicity.

Molecular dynamics simulation calculations

After the docking studies, the protein and linalool were subjected to 30ns MD simulations. The aim of this simulation was to observe the dynamic behaviour of the linalool compound within the active site of 1,3- β -glucan synthase, in order to compare with the molecular docking results and obtain additional information to support the proposal of a new potential inhibitor for the enzyme under study.

The graph in figure 3 shows the variation of the behaviour of the total energy of the system (protein-ligand complex) (1,3- β -glucan synthase - LIN) over time, 30ns of simulation. It can be observed that the energy of the system varied, but there was stabilization of the energy ($\approx -5.905 \times 10^5$ kJ/mol) still at the beginning of the simulation and the trend line helps to visualize this effect, indicating that the average energy remains constant, suggesting structural stabilization.

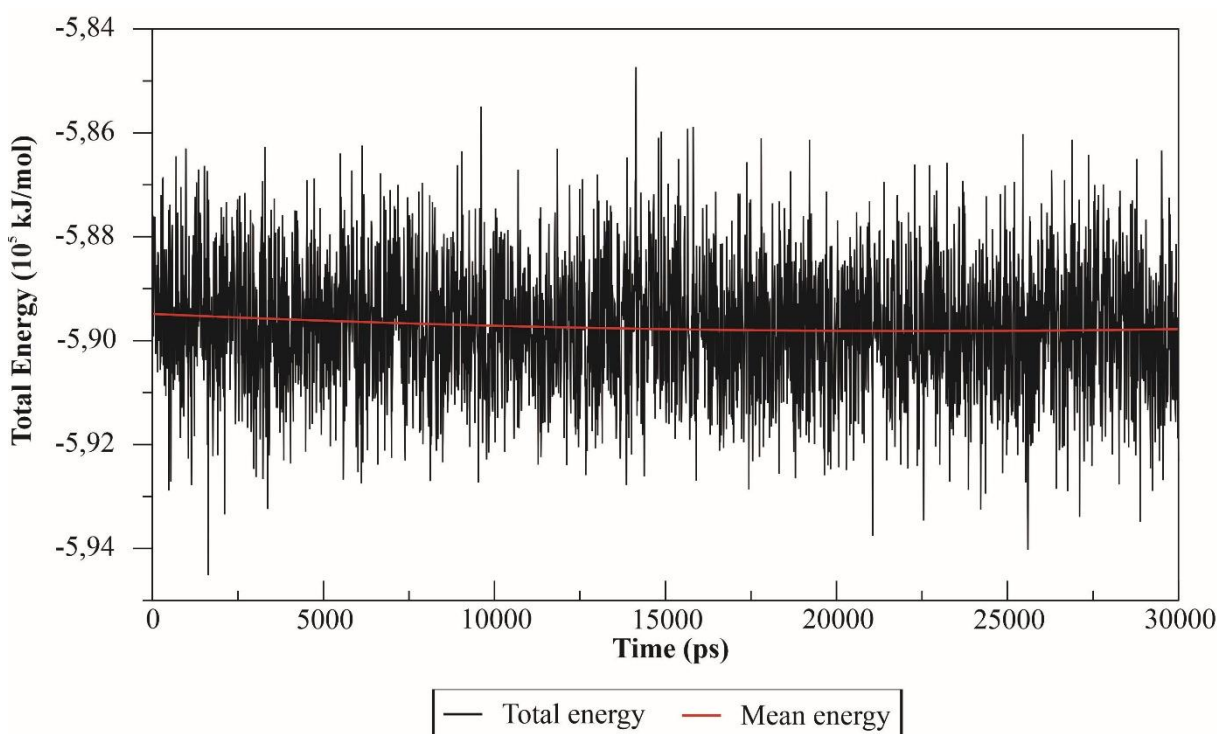


Figure 3. Total energy values during MD simulation for the 1,3- β -glucan synthase - LIN complex.

The RMSD values were also analysed to check the deviations and stability of the protein and ligand in the complex. A graph showing the average RMSD values between 0 and 30ns of simulation is shown in figure 4.

Since the first 20ns of MD simulation were considered sufficient for stabilization of the protein and the ligand, the average RMSD values shown in figure 4 are expected to be small. As can be seen, the protein and the ligand (alone) behave well, showing low RMSD values. However, for the protein-ligand complex one notices an increase in RMSD thus reaching a new stabilization point of the system, but with an RMSD considered low. This result suggests that the compound remains within the active site during the 30ns of simulation, demonstrating that the system has stabilized and confirming the results obtained by the total energy calculations described previously.

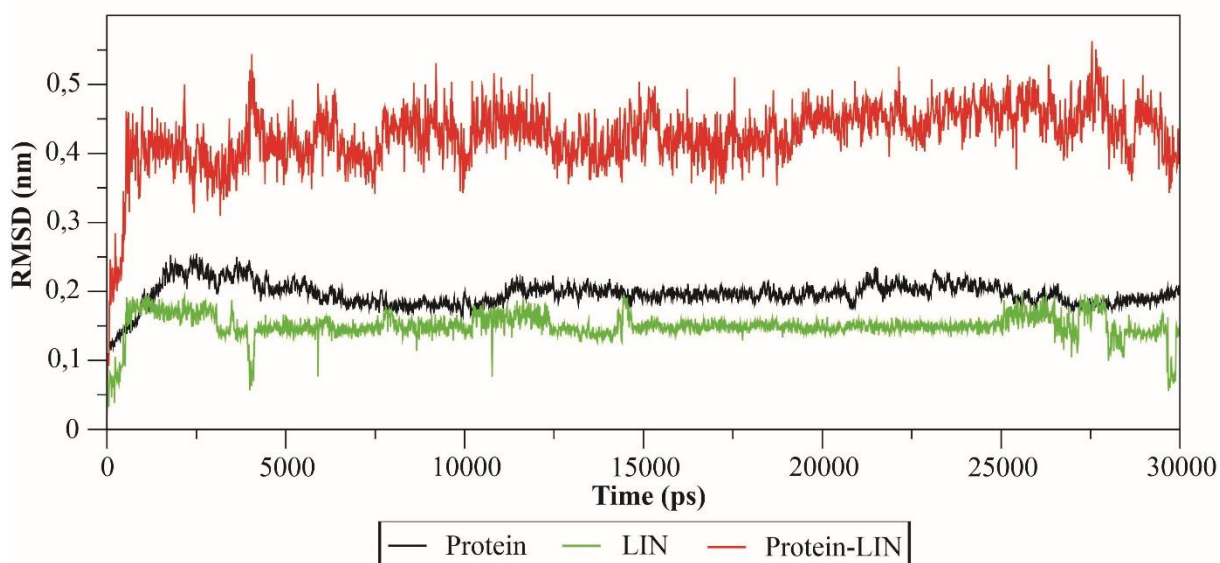


Figure 4. RMSD values between 0 and 30ns of MD simulation where protein, ligand and protein-LIN complex are represented.

The Root-Mean-Square Fluctuations (RMSF) of the protein residues over the simulation time were also analysed and are shown in figure 5. It provides a qualitative and quantitative view of all the regions of the protein during MD. It can be observed that the regions that fluctuated the most during the simulations (highest RMSF values) correspond to the protein side chains and loops (Figure 6A and B), residues (172-188) and (232-256), respectively. Moreover, the residues in the active site (backbone) region showed less fluctuation, showing to be the most stable regions. This result confirms the stability of the MD simulation and the moderate interaction of linalool towards the enzyme, suggested by the graphs of total energy, RMSD and RMSF, besides also suggesting selectivity, as observed in the molecular docking studies.

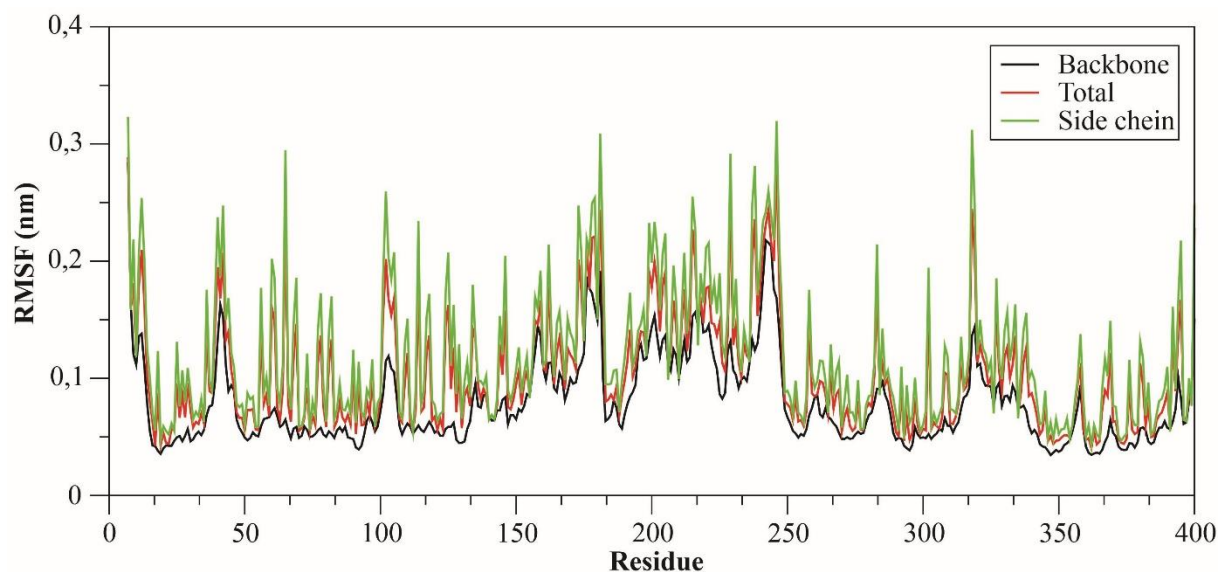


Figure 5. RMSF values per residue of the protein when complexed to the ligand linalool.

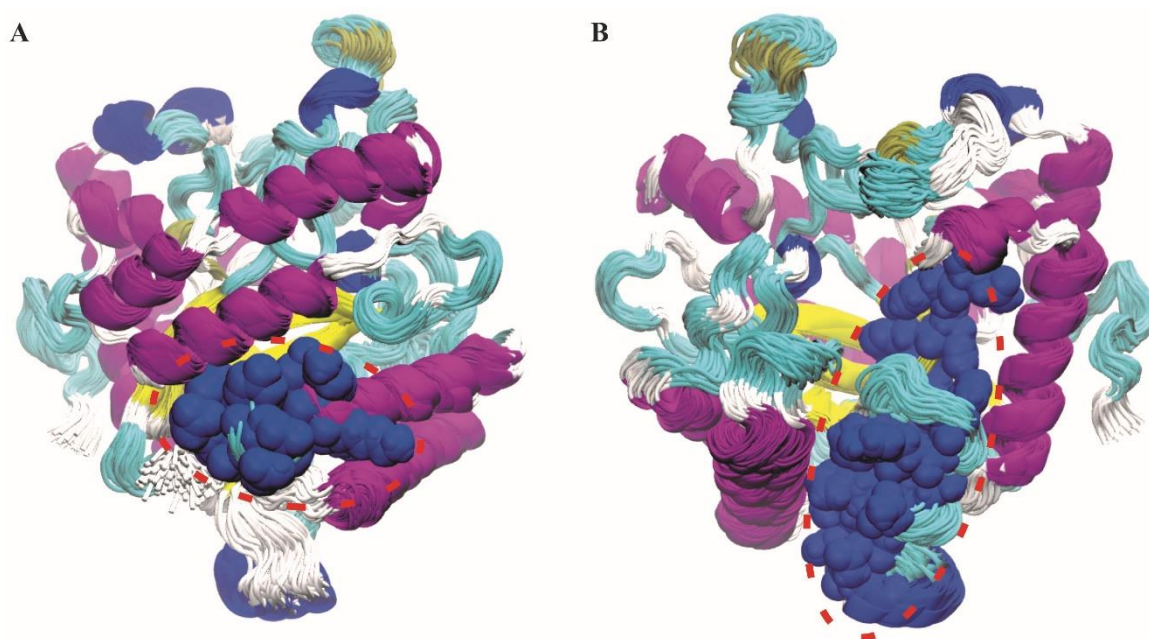


Figure 6. Regions of the protein 1,3-β-glucan synthase with the highest fluctuation of RMSF. **A**, Side chain posterior (blue) to the enzyme active site. **B**, Side chain (blue) in the vicinity of the entrance to the active site of the enzyme.

The radius of gyration (R_g) of the 1,3-β-glucan synthase-LIN complex during the simulation time was also analyzed and the average values are shown in figure 7. Interestingly, the R_g values initially increased due to the fluctuations of the protein side chains and then tended to stabilize, indicating the compactness of the protein and less possibility of disintegration of the protein-ligand complex.

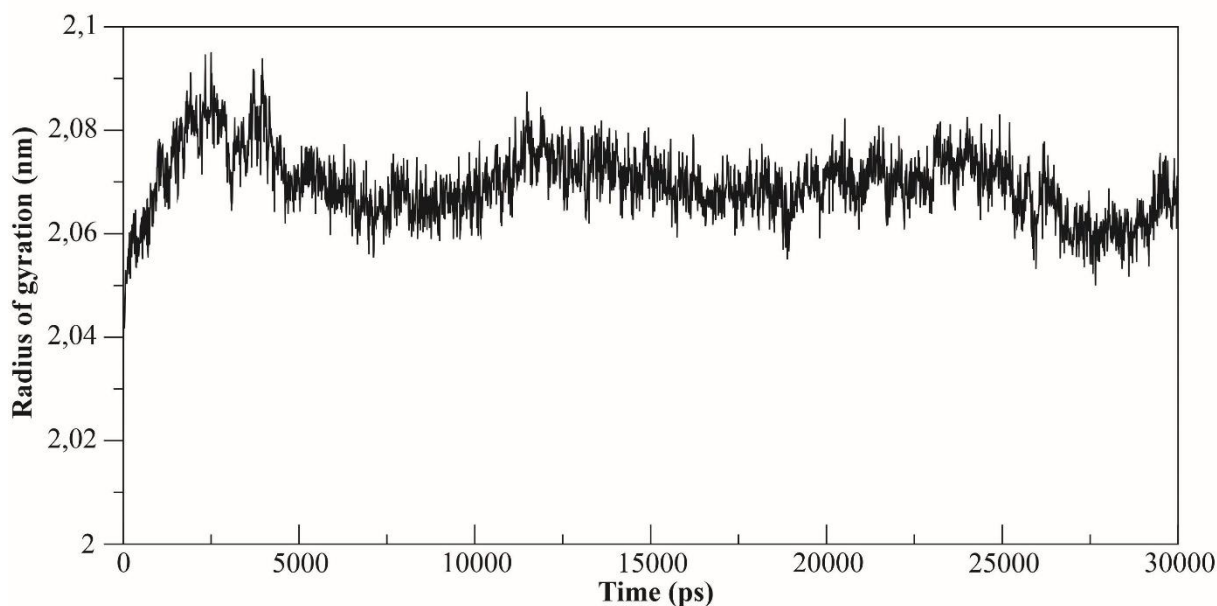


Figure 7. Average values of the radius of gyration (Rg) of the protein when in complex with the ligand linalool.

The analysis of the H-bonds formed between the ligand linalool and the residues of the active site of the protein under study aimed to confirm whether the interactions with the key residues in the active site were maintained or not during the MD simulation. In this regard, it was found that the OH group of linalool was able to interact through H-bonds with the residues in the active site of the enzyme [Glu27 (2.02 Å), Tyr29 (1.99 Å) and Trp363 (3.56 Å)] at the very beginning of MD (0-5ns) shown in blue in figure 8 and figure 9A. During the simulation period of 6.8-15ns H-bond formation of linalool occurred with the residues [Glu27 (2.12 Å) and Asn146 (2.35 Å)] (Figure 9B). However, these interactions lasted for a short time due to the fluctuations of the amino acids and the movement of linalool within the active site of the enzyme, observed by the discontinuities in the graph of figure 8. In the period of approximately 15.1-27.3ns, there were alternations of H-bonds of linalool towards residues [Tyr255 (1.93 Å) and Glu292 (2.22 Å)] (Figure 9C) and near the end of the MD, there are H interactions of the ligand with residues of (Tyr29 and Trp363).

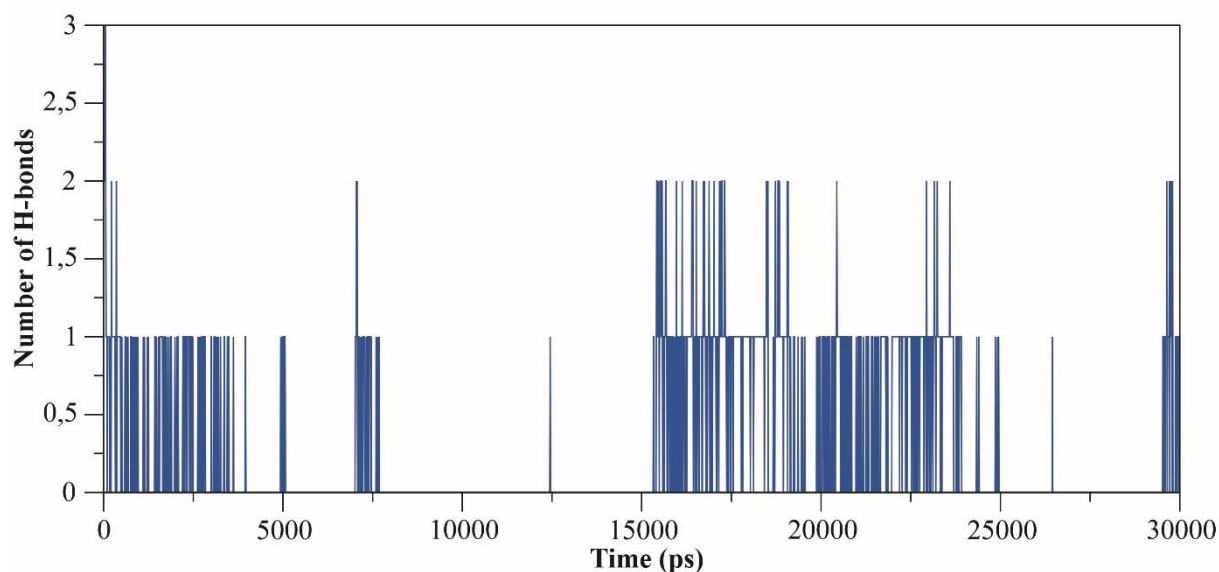


Figure 8. H-bonds established during MD simulation between 1,3- β -glucan synthase and linalool over time.

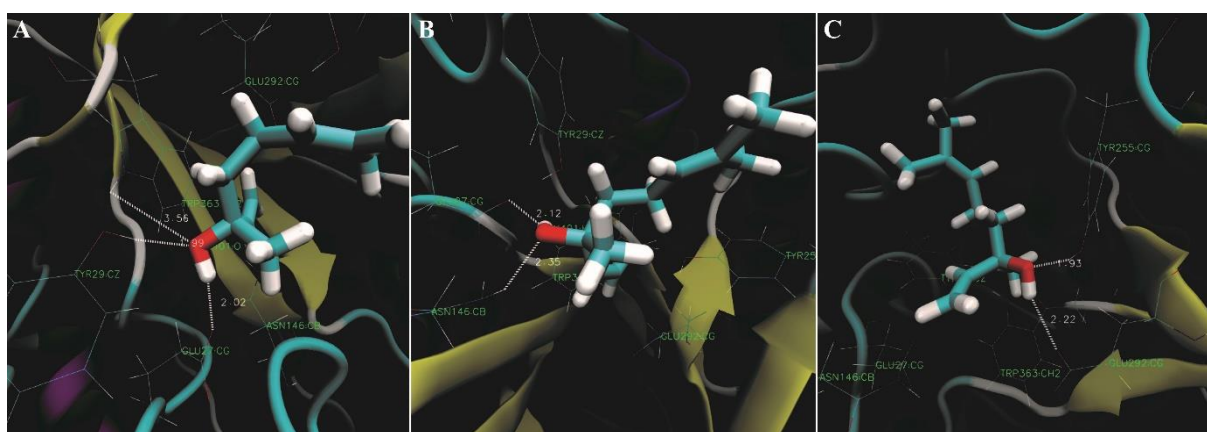


Figure 9. 3D model of the H-bond interactions of linalool to residues in the active site of 1,3- β -glucan synthase. **A**, H-bonds between 0 and 5ns. **B**, H-bond interactions from 6.8 to 15ns. **C**, H-bonds between 15.1 and 27.3ns.

Discussion

The VVC is a public health problem due to its high incidence and recurrence, causing discomfort and impairment to the quality of life of affected women (27). Many factors can influence the recurrence of VVC, such as the use of antibiotics, diabetes, pregnancy, oral contraceptives and immunodeficiency (28, 29). The treatment of VVC is based on the use of antifungal drugs, such as fluconazole, miconazole or clotrimazole. Although these drugs are effective, excessive use may lead to the development of resistant strains of *C. albicans*, increasing the therapeutic failure rate (30, 31, 32).

In view of this, and also of the potential adverse effects and pharmacological interactions that limit the use of already licensed antifungals, it is important to invest in research that seeks

substances that are effective for the treatment of VVC and that are safe for patients. Therefore, in general, molecules derived from natural products are safe and present an interesting pharmacological versatility, as well as a great therapeutic potential against fungi and yeasts resistant to antifungal drugs currently in clinical use (33, 34).

Among the great diversity of molecules found in plants with antimicrobial properties, monoterpenes such as linalool that demonstrated significant *in vitro* antifungal effect stand out. Linalool is an important component of essential oils and aromatic plants, such as Lavender (*Lavandula angustifolia*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), Basil (*Ocimum basilicum*) etc. with vast biological activity, among these, antifungal, anticonvulsant, anti-inflammatory, anxiolytic, antitumour and antibacterial (9).

Furthermore, the ability of *C. albicans* to form biofilms is an important virulence factor and may be associated with antifungal resistance and recurrence of infection (4). Biofilm is a collection of microorganisms that adhere to a surface and protect themselves in a polymeric extracellular matrix, becoming resistant to treatment. Biofilm formation is favoured by conditions such as the presence of medical devices, immunodeficiency and treatment with antibiotics. Therefore, the presence of biofilm should be considered in the diagnosis and treatment of VVC in order to prevent recurrence of the infection (5).

Thus, this study showed that linalool has important antifungal activity, especially interfering in the process of biofilm formation of *C. albicans in vitro* (Table 1). It was observed that linalool was bioactive against biofilm, reducing its formation by 74.65% on average for both strains of *C. albicans* analyzed and having a moderate rate of adhesion of the strains to the walls of microtubules. Thus, linalool was better than the standard antifungal nystatin, which showed low percentage of reduction of biofilm formation and high adhesion of fungal cells to the walls of microtubules. These data are important because many pharmaceutical formulations of vaginal creams for the treatment of VVC contain the antifungal nystatin in its composition and also opens possibilities for the inclusion of linalool in these compositions (35,36).

Furthermore, it seems that linalool interferes with *C. albicans* biofilm formation by interacting with a vital enzyme directly involved in the formation of the fungal cell wall, the 1,3- β -glucan synthase, responsible for synthesizing the entire glucan structure of the cell wall (37). Therefore, in this study it was found that linalool appears to inhibit the enzyme 1,3- β -glucan synthase with a K_i of 39.85 μ M and binding energy of -6.0kcal/mol, demonstrating good binding affinity (Table 2). As linalool is a lipophilic molecule it crosses cell membranes with relative ease, and being the active site of the enzyme under study of partially apolar character,

these phenomena point to a molecular complementarity that favours the various interactions of linalool towards the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase (Figure 2).

Taking together the MD results and corroborating with the flexible molecular docking, as well as the *in vitro* results of this study, it is possible to verify that linalool binds with the active site of the enzyme 1,3- β -glucan synthase, interacting with several amino acids of this by H-bonds, van der Waals, among others; forming a stable complex in up to 30ns of simulation without disintegrating. Therefore, linalool is probably able to inhibit the key enzyme for the synthesis of glucan, the main component of the *C. albicans* cell wall and consequently interfere with its viability and biofilm formation.

Conclusions

Therefore, biofilm formation by *C. albicans* is an important factor for the persistence of VVC and the development of RVVC. Furthermore, the enzyme 1,3- β -glucan synthase is an important therapeutic target for the treatment of this infection, and this study indicates that linalool is a promising compound for inhibiting fungal biofilm formation. However, further studies are needed to evaluate the efficacy and safety of linalool as a therapeutic agent for vulvovaginal candidiasis.

Authors' contributions: Analysis and writing of the original version: Cássio I. S. Medeiros and Rawny G. Gouveia. Revision and edition: Victor T. Gomes e Gislaíne S. Rodrigues. Supervision: Abrahão A. O. Filho, Ulrich Vasconcelos da R. Gomes and Edeltrudes O. Lima.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lírío J, Giraldo PC, Sarmiento AC, Costa APF, Cobucci RN, Saconato H, *et al.* Antifungal (oral and vaginal) therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras.* 2022; 68: 261-267. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20210916>
2. Sun Z, Ge X, Qiu B, Xiang Z, Jiang C, Wu J, *et al.* Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 100. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1123026>
3. Fan F, Liu Y, Liu Y, Lv R, Sun W, Ding W, *et al.* *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. *Int J Antimicrob Agents.* 2022; 60: 106673. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106673>

4. Atriwal T, Azeem K, Husain FM, Hussain A, Khan MN, Alajmi MF, *et al.* Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. *Front Microbiol.* 2021; 12: 932. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638609>
5. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, *et al.* Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 174: 110-125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.011>
6. Adaszyńska-Skwirzyńska M, Dziecioł M, Szczerbińska D. Lavandula angustifolia Essential Oils as Effective Enhancers of Fluconazole Antifungal Activity against *Candida albicans*. *Molecules.* 2023; 28: 1176. <https://doi.org/10.3390/molecules28031176>
7. Medeiros CIS, Sousa MNA, Filho GGA, Freitas FOR, Uchoa DPL, Nobre MSC, *et al.* Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action. *Braz J Med Biol Res.* 2022; 55: e11831. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e11831>
8. An Q, Ren JN, Li X, Fan G, Qu SS, Song Y, *et al.* Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food Funct.* 2021; 12: 10370-10389. <https://doi.org/10.1039/D1FO02120F>
9. Mączka W, Duda-Madej A, Grabarczyk M, Wińska K. Natural Compounds in the Battle against Microorganisms-Linalool. *Molecules.* 2022; 27: 6928. <https://doi.org/10.3390/molecules27206928>
10. Hood JR, Wilkinson J, Cavanagh HMA. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *J Essent Oil Res.* 2003; 15: 428-433. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698631>
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Fourth informational supplement M27-S4. Wayne, PA: CLSI; 2012.
12. Gomes VT, Padilha IQM, Amaral IPG. Assessment of high-power LED in the adhesion of wild *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2020; 11: 75-82.
13. Charlton TS. A repeatable biofilm removal assay and its application in the assessment of commercial cleaning formulations for medical devices. *Healthc Infect.* 2008; 13: 131-135. <https://doi.org/10.1071/HI08030>
14. Rodrigues LB, Dos Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, *et al.* Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol.* 2010; 41: 1082-1085. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400029>
15. Halgren TA. Force Fields: MMFF94. *Encyclopedia of Computational Chemistry.* 2002.
16. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012; 4: 1-17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
17. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009; 30: 2785. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
18. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminformatics.* 2019; 11: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
19. Hess B, Kutzner C, Spoel D van der, Lindahl E. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008; 4: 435-447. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>

20. Huang J, Mackerell AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*. 2013; 34: 2135-2145.
<https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
21. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, *et al*. CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem*. 2010; 31: 671-690.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
22. William LJ, Jayaraman C, Jeffry DM, Roger WI, Michael LK; Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1998; 79: 926.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
23. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*. 2007; 126: 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
24. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys*. 1998; 52: 7182. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
25. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996; 14: 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
26. Turner PJ. XMGRACE, Version 5.1.19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR; 2005.
27. Nsenga L, Bongomin F. Recurrent Candida vulvovaginitis. *Venereology*. 2022; 1: 114-123. <https://doi.org/10.3390/venereology1010008>
28. Lykke MR, Becher N, Haahr T, Boedtkjer E, Jensen JS, Uldbjerg N. Vaginal, cervical and uterine pH in women with normal and abnormal vaginal microbiota. *Pathogens*. 2021; 10: 1-8. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020090>
29. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, Ten Oever J, Netea MG. Recurrent vulvovaginal candidiasis: an immunological perspective. *Microorganisms*. 2020; 8: 144.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020144>
30. Barnes KN, Yancey AM, Forinash AB. Ibrexafungerp in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Ann Pharmacother*. 2022; 57: 99-106.
<https://doi.org/10.1177/10600280221091301>
31. Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187: 569-574. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.125897>
32. Nyirjesy P, Brookhart C, Lazenby G, Schwebke J, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022; 74.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciab1057>
33. Tran HNH, Udoh S, Russell G, Okeyoyin OR, Aftab S, Rodriguez I, *et al*. Recent Advances in the Application of Essential Oils as Potential Therapeutic Candidates for Candida-Related Infections. *Appl. Microbiol*. 2022; 2: 397-413.
<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2020030>
34. Politano VT, Lewis EM, Hoberman AM, Christian MS, Diener RM, Api AM. Evaluation of the developmental toxicity of linalool in rats. *Int J Toxicol*. 2008; 27: 183-188.
<https://doi.org/10.1080/10915810801977948>
35. Bassi P, Kaur G. Bioadhesive vaginal drug delivery of nystatin using a derivatized polymer: Development and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 96: 173-184.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.07.018>

36. Martín-Villena MJ, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. *Carbohydr Polym.* 2013; 94: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.005>
37. Radithia D, Tanjungsari R, Ernawati DS, Parmadiati AE. The effectiveness of essential oil from *Citrus limon* peel on *Candida albicans* biofilm formation: An experimental *in vivo* study. *J Taibah Univ Med Sci.* 2022; 18: 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2022.07.011>

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Tomando em conjunto os resultados dos experimentos *in silico* desse estudo, bem como a análise da literatura científica de ensaios *in vitro* e *in vivo*, o linalol apresentou características farmacocinéticas e toxicológicas favoráveis a administração ao organismo, pois este composto exibiu significativa biodisponibilidade oral teórica, elevada absorção intestinal, eliminação majoritariamente urinária e não foi hepatotóxico. Além disso, o linalol mostrou-se não ser mutagênico ou tumorigênico e parece não ter efeitos biológicos sobre o sistema reprodutivo. Portanto, o linalol apresentou baixa toxicidade aguda, por via oral e cutânea.

O linalol foi bioativo sobre as cepas de *C. albicans* de secreções vulvovaginais resistentes ao fluconazol. E essa bioatividade do linalol é forte e de natureza fungicida. Além disso, com base nos ensaios *in vitro* com o sorbitol e o ergosterol, o linalol parece interferir com a integridade da parede e da membrana celular de *C. albicans*. Sendo assim, verificou-se também através do docking e da dinâmica molecular que esse monoterpene interagiu quimicamente com três enzimas importantes para a biossíntese de componentes e manutenção da parede e membrana celular fúngicas (1,3- β -glucano sintase, lanosterol 14 α -demetilase e Δ 14-esterol redutase), possivelmente desempenhando atividade inibitória. Nota-se ainda, que o complexo receptor-ligante entre a 1,3- β -glucano sintase – linalol, estabilizou-se ao longo de 30ns de simulação, evidenciando o mecanismo de ação via parede celular.

É importante destacar ainda que o linalol quando em associação com o antifúngico nistatina resultou em efeito indiferente, mas quando combinado com o fluconazol teve efeito sinérgico sobre a cepa *C. albicans* ATCC 76485. Outrossim, o linalol foi bioativo sobre o processo de formação de biofilme de *C. albicans*, reduzindo em mais de 70% e tendo taxa de adesão moderada.

Portanto, o linalol poderá ser considerado como uma opção terapêutica viável futuramente no combate à candidíase vulvovaginal. No entanto, devido algumas características físico-químicas do linalol que limitam sua utilização (como: alta solubilidade em lipídeos e baixa biodisponibilidade) o desenvolvimento de uma forma farmacêutica é necessário para se pensar em desenhar estudos *in vivo* em modelos de ratas com candidíase vulvovaginal que poderá ser realizado no futuro. Nesse sentido, formas farmacêuticas de β -ciclodextrinas podem ser desenvolvidas para contornar as limitações citadas, pois essas estruturas supramoleculares apresentam uma superfície externa hidrofílica que confere solubilidade em água e a cavidade interna hidrofóbica permitindo a inclusão de compostos lipofílicos como o linalol.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253–273, 2010.
- AHMADI, S.; AHMADI, G.; AHMADI, H. Micro Nano Bio Aspects A review on antifungal and antibacterial activities of some medicinal plants. **Micro Nano Bio Aspects**, v. 2022, n. 1, p. 10–17, 2022.
- AIMANIANDA, V. et al. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of β -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. **mBio**, v. 8, n. 3, 2017.
- AKHTAR, M. S.; SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. R. Natural bio-active compounds. **Natural Bio-active Compounds: Volume 1: Production and Applications**, p. 1–608, 2019.
- ALKAN, Y. et al. Voriconazole-Induced QT Interval Prolongation and Ventricular Tachycardia: A Non--Concentration-Dependent Adverse Effect. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. e49–e52, 2004.
- ALMEIDA, R. S. et al. The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000217, 2008.
- AN, Q. et al. Recent updates on bioactive properties of linalool. **Food & Function**, v. 12, n. 21, p. 10370–10389, 2021.
- ANAND, U. et al. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, 2019.
- ANDERSCH BJÖRKMAN, Y. et al. Air-oxidized linalool elicits eczema in allergic patients - a repeated open application test study. **Contact dermatitis**, v. 70, n. 3, p. 129–138, 2014.
- ANDES, D.; VAN OGTRON, M. *In Vivo* Characterization of the Pharmacodynamics of Flucytosine in a Neutropenic Murine Disseminated Candidiasis Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 938–942, 2000.
- ANGULO, D. A. et al. Ibrexafungerp, a Novel Triterpenoid Antifungal in Development for the Treatment of Mold Infections. **Journal of Fungi 2022, Vol. 8, Page 1121**, v. 8, n. 11, p. 1121, 2022.
- ANH, D. N. et al. Prevalence, species distribution and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among symptomatic non-pregnant women of reproductive age at a tertiary care hospital, Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 523, 2021.
- API, A. M. et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalool, CAS registry number 78-70-6. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 82 Suppl, n. S, p. S29–S38, 2015.
- APROTOSOAIE, A. C. et al. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193–219, 2014.

ASKUN, T.; ASKUN, T. Perspective Chapter: *Candida* and Candidiasis – Recent Taxonomic Developments, Invasion Biology, and Novel Active Compounds. **Candida and Candidiasis**, 2022.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 20:3, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

ATHANASOPOULOS, A. et al. Fungal plasma membrane domains. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 6, p. 642–673, 2019.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.

BEARDSLEY, J. et al. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1175–1191, 2018.

BECERRA-RODRÍGUEZ, C. et al. Yeast Plasma Membrane Fungal Oligopeptide Transporters Display Distinct Substrate Preferences despite Their High Sequence Identity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 963, 2021.

BELAKHOV, V. V.; GARABADZHIU, A. V.; CHISTYAKOVA, T. B. Polyene Macrolide Antibiotic Derivatives: Preparation, Overcoming Drug Resistance, and Prospects for Use in Medical Practice (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 52, n. 11, p. 890–901, 2019.

BELSITO, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic acetates when used as fragrance ingredients. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 12, n. 12 SUPPL, 2008.

BÉRARD, A. et al. Associations between low- and high-dose oral fluconazole and pregnancy outcomes: 3 nested case–control studies. **CMAJ**, v. 191, n. 7, p. E179–E187, 2019.

BERGER, S. et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319–331, 2020.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BLACK, C. A. et al. Acute Neutropenia Decreases Inflammation Associated with Murine Vaginal Candidiasis but Has No Effect on the Course of Infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1273–1275, 1998.

BLISS, J. M. et al. Vertical and Horizontal Transmission of *Candida albicans* in Very Low Birth Weight Infants Using DNA Fingerprinting Techniques. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 3, p. 231–235, 2008.

- BOIKOV, D. A. et al. *In vitro* activity of the novel echinocandin CD101 at pH 7 and 4 against *Candida* spp. isolates from patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 5, p. 1355–1358, 2017.
- BORMAN, A.M.; JOHNSON, E.M. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 2, e01811-20, 2021.
- BORGHI, M. et al. Pathogenic NLRP3 Inflammasome Activity during *Candida* Infection Is Negatively Regulated by IL-22 via Activation of NLRP4 and IL-1Ra. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 2, p. 198–209, 2015.
- BÖTTGER, A. et al. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. p. 3–17, 2018.
- BOUZ, G.; DOLEŽAL, M. Advances in Antifungal Drug Development: An Up-To-Date Mini Review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, 2021.
- BRODA, M. Natural Compounds for Wood Protection against Fungi—A Review. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3538, 2020.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.
- BRUNO, V. M. et al. Transcriptomic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis Identifies a Role for the NLRP3 Inflammasome. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007.
- CAIQUE BARBOSA DOS SANTOS, M. A. T. P. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS DA CAATINGA: As concepções dos moradores da fazenda fagundes em Curaçá – ba. **Revista Científica do UniRios**, v. 1, n. 1, p. 194–225, 2020.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CAPOCI, I. R. G. et al. Two New 1,3,4-Oxadiazoles With Effective Antifungal Activity Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- CAPUTI, L.; APREA, E. Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. **Recent patents on food, nutrition & agriculture**, v. 3, n. 1, p. 9–16, 2011.
- CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi 2020, Vol. 6, Page 321**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.
- CARVALHO, G. C. et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. **Medical mycology**, v. 59, n. 10, p. 946–957, 2021.
- CHADHA, A.; MADYASTHA, K. M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. **Xenobiotica**, v. 14, n. 5, p. 365–374, 1984.

- CHARLTON, T.S. A repeatable biofilm removal assay and its application in the assessment of commercial cleaning formulations for medical devices. **Healthcare infection**, v. 13, n. 4, p. 131-135, 2008.
- CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337–348, 2020.
- CHENG, S.-C. et al. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1304–1313, 2012.
- CHO, S. Y. et al. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. **FEBS Letters**, v. 585, n. 20, p. 3289–3296, 2011.
- CIUREA, C. N. et al. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Document M27-A4. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Suscetibility Testing of Yeasts**, 2017.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeast. **Clinical Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. December, p. 1–23, 2012.
- COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N. DE A.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528–538, 2017.
- COSTA, C. et al. New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135110, 2015.
- COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. **Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy**, p. 333–359, 2019.
- CRUZ, A. et al. *Candida utilis* yeast as a protein source for weaned piglets: Effects on growth performance and digestive function. **Livestock Science**, v. 226, p. 31–39, 2019.
- CUTLER, J. E. et al. Horizontal Transmission of *Candida albicans* and Evidence of a Vaccine Response in Mice Colonized with the Fungus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22030, 2011.
- DABIRI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 3, p. 437–442, 2018.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.
- DAVID J. FROST, KIM D. BRANDT, D. C. AND R. G. Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **JOURNAL OF ANTIBIOTICS**, v. 48, n. 4, p. 306–310, 1995.

- DAVIS, M. et al. Ibrexafungerp: a novel oral glucan synthase inhibitor. **academic.oup.com**, v. 58, n. 5, p. 579–592, 2020.
- DE GROOT, A. C.; SCHMIDT, E. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. **Dermatitis**, v. 27, n. 4, p. 161–169, 2016.
- DE LUCENA, J. D. et al. L-linalool exerts a neuroprotective action on hemiparkinsonian rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 6, p. 1077–1088, 2020.
- DE OLIVEIRA LIMA, M. I. et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 2, p. 195–202, 2017.
- DE OLIVEIRA SANTOS, G. C. et al. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- DELMA, F. Z. et al. Molecular Mechanisms of 5-Fluorocytosine Resistance in Yeasts and Filamentous Fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 909, 2021.
- DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e339–e347, 2018.
- DERBYSHIRE, M. C. Bioinformatic Detection of Positive Selection Pressure in Plant Pathogens: The Neutral Theory of Molecular Sequence Evolution in Action. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 644, 2020.
- DUARTE, A. et al. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. **Food Control**, v. 61, p. 115–122, 2016.
- DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed. [s.l.: s.n.].
- DUTTA, D.; FLIEGEL, L. Structure and function of yeast and fungal Na⁺/H⁺ antiporters. **IUBMB Life**, v. 70, n. 1, p. 23–31, 2018.
- DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408, 2022.
- ELBE, H. et al. Anticancer activity of linalool: comparative investigation of ultrastructural changes and apoptosis in breast cancer cells. **Ultrastructural Pathology**, v. 46, n. 4, p. 348–358, 2022.
- ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 7–10, 2002.
- ELGENDY, E. M.; SEMEIH, M. Y. Phyto – Monoterpene linalool as precursor to synthesis epoxides and hydroperoxides as anticarcinogenic agents via thermal and photo chemical oxidation reactions. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 966–973, 2019.
- ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant physiology**, v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020.

- ESCALANTE, A. et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 2008.
- ESPINEL-INGROFF, A. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, p. 101–106, 2008.
- FAKHIM, H. et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 377–382, 2018.
- FALLEIROS DE PÁDUA, R. A.; GUILHERMETTI, E.; ESTIVALET SVIDZINSKI, T. I. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 51–54, 2003.
- FAUSTINO; PINHEIRO. Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 29, 2020.
- FERRAZ, C. A. et al. Isopentenol Utilization Pathway for the Production of Linalool in *Escherichia coli* Using an Improved Bacterial Linalool/Nerolidol Synthase. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, v. 22, n. 13, p. 2325–2334, 2021.
- FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 290–298, 2014.
- FIDEL, P. L. et al. Systemic Cell-Mediated Immune Reactivity in Women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1458–1465, 1993.
- FIDEL, P. L. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. **Medical mycology**, v. 40, n. 4, p. 359–75, 2002.
- FIDEL, P. L. et al. An Intravaginal Live *Candida* Challenge in Humans Leads to New Hypotheses for the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2939–2946, 2004.
- FIDEL, P. L.; LYNCH, M. E.; SOBEL, J. D. Circulating CD4 and CD8 T cells have little impact on host defense against experimental vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2403–2408, 1995.
- FLOWERS, S. A. et al. Contribution of Clinically Derived Mutations in ERG11 to Azole Resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 450–460, 2015.
- FONG, I. W.; MCCLEARY, P.; READ, S. Cellular immunity of patients with recurrent or refractory vulvovaginal moniliasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, n. 3, p. 887–890, 1992.
- FORD, C. B. et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 2015, n. 4, p. 1–27, 2015.
- FOXMAN, B. et al. *Candida* vaginitis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 27, n. 4, p. 230–235, 2000.

- FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, 2018.
- GALATA, M.; SARKER, L. S.; MAHMOUD, S. S. Transcriptome profiling, and cloning and characterization of the main monoterpene synthases of *Coriandrum sativum* L. **Phytochemistry**, v. 102, p. 64–73, 2014.
- GAMARRA, S. et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibilities of Yeasts Causing Vulvovaginitis in a Teaching Hospital. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 251–258, 2014.
- GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for Interpretive Breakpoints. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 112–122, 2009.
- GARCIA-RUBIO, R. et al. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020.
- GARY W. PROCOP, DEIRDRE L. CHURCH, GERALDINE S. HALL, WILLIAM M. JANDA, ELMER W. KONEMAN, PAUL C. SCHRECKENBERGER, G. L. WOODS. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 7. ed. [s.l.: s.n.].
- GEORGOPAPADAKOU, N. H. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan synthase inhibitors. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, n. 2, p. 269–280, 24 fev. 2001.
- GHOSH, T. et al. A combination of linalool, vitamin C, and copper synergistically triggers reactive oxygen species and DNA damage and inhibits *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhi and *Vibrio fluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 4, 2019.
- GOMES, V.T.; PADILHA, I.Q.M.; AMARAL, I.P.G. Assessment of high-power LED in the adhesion of wild *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 75-82, 2020.
- GOPINATHAN, S. Detection of FUR1 Gene in 5-Flucytosine Resistant Candida Isolates in Vaginal Candidiasis Patients. **Journal of clinical and diagnostic research**, 2013.
- GOW, N. A. R.; LATGE, J.-P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.
- GREEN, L. H.; GOLDMAN, E. **Practical Handbook of Microbiology**. [s.l.] CRC Press, 2021.
- GROSSMAN, N. T.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R. Epidemiology of Echinocandin Resistance in Candida. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 4, p. 243–248, 2014.
- GROVER, N. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian journal of pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 9–11, 2010.
- GUO, F. et al. Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of Linalool Against *Pseudomonas fluorescens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137–147, 2000.
- HARRIOTT, M. M. et al. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, n. 12, p. 3635–3644, 2010.
- HESS, B. et al. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.
- HOLLAND, J. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. **Sexually Transmitted Infections**, v. 79, n. 3, p. 249–250, 2003.
- HOOD, J. R. et al. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. December 2012, p. 428–433, 2003.
- HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal Drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.
- HOWES, M. J. R. et al. Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. **Plants, People, Planet**, v. 2, n. 5, p. 463–481, 2020.
- HOWLETT, B. J. et al. Evolution of virulence in fungal plant pathogens: exploiting fungal genomics to control plant disease. <http://dx.doi.org/10.3852/14-317>, v. 107, n. 3, p. 441–451, 2017.
- HSU, C. C. et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 473–482, 2013.
- HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. **Journal of computational chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.
- HÜTTEL, W. Echinocandins: structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 1, p. 55–66, 2021.
- IVANOV, M. et al. Flavones, Flavonols, and Glycosylated Derivatives—Impact on *Candida albicans* Growth and Virulence, Expression of CDR1 and ERG11, Cytotoxicity. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1, p. 27, 2020.
- IVANOV, M.; ĆIRIĆ, A.; STOJKOVIĆ, D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, 2022.

- JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724–2739, 2016.
- JEANMONOD, R.; JEANMONOD, D. Vaginal Candidiasis. **StatPearls**, 2022.
- JENKS, J. D. et al. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? **Mycoses**, v. 63, n. 10, p. 1021–1032, 2020.
- JENSEN, R. H. et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551–2555, 2015.
- JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926, 1998.
- MAZU, T. et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016.
- KABERA, J. N. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377–392, 2014.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008.
- KASPER, S. et al. Efficacy and safety of silexan, a new, orally administered lavender oil preparation, in subthreshold anxiety disorder - Evidence from clinical trials. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 160, n. 21–22, p. 547–556, 2010.
- KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.
- KEBEDE, T.; GADISA, E.; TUFA, A. Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0249253, 2021.
- KELLY, S. L. et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5,6$ -desaturation. **FEBS Letters**, v. 400, n. 1, p. 80–82, 1997.
- KHAN, M. et al. Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 447–456, 28 mar. 2018.
- KHAN, M. S. A. et al. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. **Combating Fungal Infections: Problems and Remedy**, p. 21–45, 2010.
- KIDD, S.E.; ABDOLRASOULI, A.; HAGEN, F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, ofac559, 2023.
- KOFLA, G.; RUHNKE, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis - review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p. 159, 2011.

- KÖHLER, J. R. et al. Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.
- KUJAWSKI, J. et al. The log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-aided Drug Design – an Overview. **Computational Methods in Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 81–88, 2012.
- KUSE, E.-R. et al. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **The Lancet**, v. 369, n. 9572, p. 1519–1527, 2007.
- LAPCZYNSKI, A.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on d-linalool. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 11, n. 11 SUPPL., 2008.
- LEE, P. P.; LAU, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021.
- LEW, R. R. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 509–518, 2011.
- LEWIS, R. E. et al. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345–351, 2002.
- LEWIS, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805–817, 2011.
- LIANG, Y. et al. Biological evaluation of linalool on the function of blood vessels. **Molecular Medicine Reports**, v. 24, n. 6, 2021.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2001.
- LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M. 1,3-beta-Glucan Synthase: A Useful Target for Antifungal Drugs. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, v. 1, n. 2, p. 159–169, 2001.
- LIU, K. et al. Isolation and Biological Activities of Decanal, Linalool, Valencene, and Octanal from Sweet Orange Oil. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, nov. 2012.
- LO, H.-J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939–949, 1997.
- LOCKE, J. B. et al. Characterization of *In Vitro* Resistance Development to the Novel Echinocandin CD101 in *Candida* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6100–6107, 2016.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178–184, mar. 2010.

- MAKANJUOLA, O.; BONGOMIN, F.; FAYEMIWO, S. An Update on the Roles of Non-*albicans Candida* Species in Vulvovaginitis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 121, 2018.
- MAKSIMOV, A. Y. et al. Organic Antifungal Drugs and Targets of Their Action. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 705–736, 2021.
- MARCHAIM, D. et al. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. **Obstetrics and gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407–1414, 2012.
- MARCUS D HANWELL, DONALD E CURTIS, DAVID C LONIE, TIM VANDERMEERSCH, E. Z. AND G. R. H. “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform”. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, 2012.
- MARNETT, L. J. et al. GRASr2 evaluation of aliphatic acyclic and alicyclic terpenoid tertiary alcohols and structurally related substances used as flavoring ingredients. **Journal of food science**, v. 79, n. 4, 2014.
- MARTEL, C. M. et al. A Clinical Isolate of *Candida albicans* with Mutations in ERG11 (Encoding Sterol 14 α -Demethylase) and ERG5 (Encoding C22 Desaturase) Is Cross Resistant to Azoles and Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, 2010.
- MATZINGER, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301–305, 2002.
- MCCARTHY, M. W. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ibrexafungerp. **Drugs in R and D**, v. 22, n. 1, p. 9–13, 2022.
- MEESTERS, R. J. W.; DUISKEN, M.; HOLLENDER, J. Study on the cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of the terpene alcohol linalool: Indication of biological epoxidation. **Xenobiotica**, v. 37, n. 6, p. 604–617, 2007.
- MELO, C. M. et al. Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, p. 115608, 2020.
- MENDLING, W. Guideline: Vulvovaginal Candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). **Mycoses**, v. 58, p. 1–15, 2015.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, n. 3, p. 183–195, 2013.
- MOHAMED, M. E. et al. Cardioprotective Effect of Linalool against isoproterenol-induced myocardial infarction. **mdpi.com**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2021.
- MOLERO, G. et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **academia.edu**, [s.d.].

MØLGAARD-NIELSEN, D.; PASTERNAK, B.; HVIID, A. Use of Oral Fluconazole during Pregnancy and the Risk of Birth Defects. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 830–839, 2013.

MOPAC 2016, S. J. J. P. **MOPAC Manual. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, USA. Disponível em: [HTTP://OpenMOPAC](http://OpenMOPAC)**., 2016.

MORA, C. et al. How many species are there on earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, 2011.

MORA-DUARTE, J. et al. Comparison of Caspofungin and Amphotericin B for Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2020–2029, 2002.

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; LOYOLA, L. Antimicrobial Activity of Three Baccharis Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile. **Molecules**, v. 13, n. 1, p. 790–794, 2008.

MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 599–606, 2017.

MOYES, D. L. et al. Candida lysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64–68, 2016.

MULYANINGSIH, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1061–1066, 2010.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108–113, 2007.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NICOLA, A. M. et al. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 21–38, 2019.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 2015.

NYIRJESY, P. et al. Evaluation of vulvovaginal symptoms and Candida colonization in women with type 2 diabetes mellitus treated with canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor. **Current Medical Research and Opinion**, v. 28, n. 7, p. 1173–1178, 2012.

NYIRJESY, P. et al. CD101 Topical Compared With Oral Fluconazole for Acute Vulvovaginal Candidiasis: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 23, n. 3, p. 226–229, 2019.

OBATA, T.; OBATA, T. Metabolons in plant primary and secondary metabolism. **Phytochemistry Reviews** 2019 18:6, v. 18, n. 6, p. 1483–1507, 2019.

OLEG TROTT, A. J. O. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

OMELCHUK, O. A.; TEVYASHOVA, A. N.; SHCHEKOTIKHIN, A. E. Recent advances in antifungal drug discovery based on polyene macrolide antibiotics. **Russian Chemical Reviews**, v. 87, n. 12, p. 1206–1225, 2018.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream Candida Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3149–3154, 2003.

PAAVONEN, J. A.; BRUNHAM, R. C. Vaginitis in Nonpregnant Patients: ACOG Practice Bulletin Number 215. **Obstetrics and gynecology**, v. 135, n. 5, p. 1229–1230, 2020.

PAIVA, L. C. F. et al. Assessment of in vitro biofilm formation by Candida species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 497–502, 2012.

PAPPAS, P. G. et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 5, p. 634–643, 2003.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009.

PARK, S. et al. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Elsevier**, v. 18, n. 3, p. 369–372, 2012.

PARKE, D. V.; RAHMAN, KH. M. Q.; WALKER, R. The Absorption, Distribution and Excretion of Linalool in the Rat. **Biochemical Society Transactions**, v. 2, n. 4, p. 612–615, 1974.

PARKER, W. B. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 2880–2893, 2009.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182, 1998.

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Elsevier**, v. 9, n. 8, p. 721–726, 2003.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11–22, 2021.

PERSONETT, H. A. et al. Renal Recovery following Liposomal Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity. **International Journal of Nephrology**, v. 2019, p. 1–8, 2019.

- PETERS, B. M. et al. Fungal Morphogenetic Pathways Are Required for the Hallmark Inflammatory Response during *Candida albicans* Vaginitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 532–543, 2014a.
- PETERS, B. M. et al. Candida Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1003965, 2014b.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PFALLER, M. A. et al. *In Vitro* Activities of Caspofungin Compared with Those of Fluconazole and Itraconazole against 3,959 Clinical Isolates of *Candida* spp., Including 157 Fluconazole-Resistant Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 1068–1071, 2003.
- PFALLER, M. A. et al. *In Vitro* Activities of Anidulafungin against More than 2,500 Clinical Isolates of *Candida* spp., Including 315 Isolates Resistant to Fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5425–5427, 2005.
- PHILIPS, J. A. et al. Torsades de pointes associated with voriconazole use. **Transplant Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 33–36, 2007.
- PHILLIPS, N. A.; ROCKTASHEL, M.; MERJANIAN, L. Ibrexafungerp for the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: Design, Development and Place in Therapy. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 17, p. 363–367, 2023.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.
- PRAŻYŃSKA, M.; BOGIEL, T.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. In vitro activity of micafungin against biofilms of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* at different stages of maturation. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 2, p. 209–216, 2018.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.
- REBOLI, A. C. et al. Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 24, p. 2472–2482, 2007.
- REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, 2018.
- RICHARDS, T. A.; LEONARD, G.; WIDEMAN, J. G. What Defines the “Kingdom” Fungi? **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.
- RICHARDSON, J. P. et al. Candidalysin Drives Epithelial Signaling, Neutrophil Recruitment, and Immunopathology at the Vaginal Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 2, 2018.

- RIERA, F. O. et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 7, 2022.
- RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A.P, *et al.* Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Pathogenesis and Clinical Relevance of *Candida* Biofilms in Vulvovaginal Candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- ROFFEY, S. J.; WALKER, R.; GIBSON, G. G. Hepatic peroxisomal and microsomal enzyme induction by citral and linalool in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 403–408, 1990.
- ROSATI, D. et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 144, 2020.
- ROSELLETTI, E. et al. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17877, 2017.
- RUGGIERO, M. A. et al. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130114, 2015.
- RYBAK, J. M. et al. Abrogation of Triazole Resistance upon Deletion of CDR1 in a Clinical Isolate of *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, 2019.
- RYBAK, J. M. et al. Mutations in TAC1B: a Novel Genetic Determinant of Clinical Fluconazole Resistance in *Candida auris*. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020.
- SAAG, M. S. et al. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710–718, 2000.
- SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 111–120, 2016.
- SALCI, T. P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug discovery today**, v. 23, n. 4, p. 802–814, 2018.
- SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, 2016.
- SANGLARD, D.; COSTE, A. T. Activity of Isavuconazole and Other Azoles against *Candida* Clinical Isolates and Yeast Model Systems with Known Azole Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 229–238, 2016.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, 2015.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

- SCHWEBKE, J. R. et al. Ibrexafungerp Versus Placebo for Vulvovaginal Candidiasis Treatment: A Phase 3, Randomized, Controlled Superiority Trial (VANISH 303). **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 11, p. 1979–1985, 2022.
- SHAFIEI, M. et al. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104240, 2020.
- SHERRY, L. et al. Biofilms Formed by Isolates from Recurrent Vulvovaginal Candidiasis Patients Are Heterogeneous and Insensitive to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, 2017.
- SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237–243, 2013.
- SILVA, B. I. M. et al. Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 7, p. 5775–5785, 2021.
- SILVA, K. et al. Inibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. **Wiley Online Library**, v. 60, n. 6, p. 387–393, 2017.
- SILVA, M. I. G. et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193–207, 2012.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402–413, 2010.
- SILVA, VIVIANE ARAÚJO DA. **ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum basilicum* (LAMIACEAE) E DO LINALOL**. 2015. Tese (Doutorado) - Produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
- SILVA, V. A.; SOUSA, J. P.; PAULA, A. F. R.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, N. A. C.; CUNHA, S. M. D.; LIMA, E. O. Assessment of genotoxic effect of *Ocimum basilicum* L. and Linalool. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, e07996127, 2020.
- SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15–21, 2016.
- 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.
- SOBEL, R. et al. Efficacy and safety of oral ibrexafungerp for the treatment of acute vulvovaginal candidiasis: a global phase 3, randomised, placebo-controlled superiority study (VANISH 306). **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 129, n. 3, p. 412–420, 2022.
- SOBRAL, M. V. et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, 2014.

- SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. **mdpi.com**, v. 15, n. 11, p. 7532–7546, 2010.
- SOUSTRE, J. Caspofungin modulates in vitro adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 522–525, 2004.
- SOUZA, C. M. C. et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 515–523, 2016.
- SOUZA, R. O. et al. Amphotericin B-Loaded Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanofibers: An Alternative Therapy Scheme for Local Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 10, p. 2674–2685, 2018.
- STUART WILKINSON, J. Some remarks upon the development of epiphytes. with the description of a new vegetable formation found in connexion with the human uterus. **The Lancet**, v. 54, n. 1365, p. 448–451, 1849.
- SU, H.; HAN, L.; HUANG, X. Potential targets for the development of new antifungal drugs. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 12, p. 978–991, 2018.
- SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011.
- SURESH KUMAR, S. P. Y. K. W. A. K. AND P. S. Therapeutic Potential of Medicinal Plants: A Review. **Journal of Biological and chemical Chronicles**, v. 1, n. 1, p. 46–54, 2015.
- SVETAZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137–158, 2010.
- TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.
- TER BURG, W. et al. Assessment of the risk of respiratory sensitization from fragrance allergens released by air fresheners. **Inhalation toxicology**, v. 26, n. 5, p. 310–318, 2014.
- TURNER, P. J. XMGRACE, Version 5.1. 19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR, v. 2. Beaverton, OR, USA, Oregon Graduate Institute of Science and Technology: 2005.
- VAN SCHALKWYK, J. et al. Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC**, v. 37, n. 3, p. 266–274, 2015.
- VANDEPUTTE, P. et al. Molecular Mechanisms of Resistance to 5-Fluorocytosine in Laboratory Mutants of *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 171, n. 1, p. 11–21, 2011.
- VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

- VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671, 2010.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VENUGOPAL, D. et al. Epidemiology, risk factors and antimicrobial profile of Vulvovaginal Candidiasis (VVC): A study among women in the central region of Saudi Arabia. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 2, p. 101049, 2021.
- VERWEIJ, P. E. et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 3, p. 362–368, 2016.
- WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* Adhesion to and Invasion and Damage of Vaginal Epithelial Cells: Stage-Specific Inhibition by Clotrimazole and Bifonazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4436–4439, set. 2011.
- WESTERMAIER, Y.; BARRIL, X.; SCAPOZZA, L. Virtual screening: An *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome. **Methods**, v. 71, n. C, p. 44–57, 2015.
- WIEDERHOLD, N. P. et al. Caspofungin Dose Escalation for Invasive Candidiasis Due to Resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3254–3260, 2011.
- WORKOWSKI, K. A. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61 Suppl 8, p. S759–S762, 2015.
- WRING, S. et al. SCY-078, a novel fungicidal agent, demonstrates distribution to tissues associated with fungal infections during mass balance studies with intravenous and oral [¹⁴C]SCY-078 in albino and pigmented rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 2, 2019.
- WRING, S. A. et al. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamic target of SCY-078, a first-in-class orally active antifungal glucan synthesis inhibitor, in murine models of. **Am Soc Microbiol**, v. 61, n. 4, 2017.
- XIAO, B.; SANDERS, M. J.; CARMENA, D.; BRIGHT, N. J.; HAIRE, L. F.; UNDERWOOD, E.; PATEL, B. R.; HEATH, R. B.; WALKER, P. A.; HALLEN, S.; GIORDANETTO, F.; MARTIN, S. R.; CARLING, D.; GAMBLIN, S. J. Structural Basis of AMPK Regulation By Small Molecule Activators. **Nature Communications**, 2013.
- YAO, J. et al. Total synthesis and structure–activity relationships of new echinocandin-like antifungal cyclolipohexapeptides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 196–208, 2012.
- YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules** 2016, Vol. 21, Page 559, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.
- ZAAS, A. K.; ALEXANDER, B. D. Echinocandins: role in antifungal therapy, 2005. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, n. 10, p. 1657–1668, 2005.

ZENGİN, H.; MOLECULES, A. B.-; 2014, UNDEFINED. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by. **mdpi.com**, v. 19, n. 11, p. 17773–17798, 2014.

ZONIOS, D. I. et al. Hallucinations during Voriconazole Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 1, p. e7–e10, 2008.

ZOTCHEV, S. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 211–223, 2003.

Anexo A

ANEXO A

TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos – 2018

Available online on www.ijppr.com

International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2018; 10(7); 284-290

doi: [10.25258/phyto.10.7.3](https://doi.org/10.25258/phyto.10.7.3)

ISSN: 0975-4873

Research Article

Antifungal Activity and *in Silico* Toxicology of the *O*-Eugenol

Araújo M I F¹, Freitas F O R¹, Morais A M B¹, Brustein V P¹, Nogueira T B Sá S¹, Nogueira R B Sá S¹, Sousa M N A¹, Uchoa D P L¹, Nobre M S C¹, Duarte L S M¹, Lima U J M¹, Almeida Filho G G¹, Medeiros C I S^{1,2*}, Oliveira Filho A A⁴, Lima E O², Pessoa H L F³, Salgado P R R¹

¹Research Laboratory in Microbiology, Integrated College of Patos, Patos, Brazil²Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil³Department of Cell and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil⁴Academic Unit of Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, BrazilAvailable Online: 25th July, 2018

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 3, n. 3, jul./set. 2018, p. 1029-1035.
ISSN: 2448-1394



Journal of Medicine
and Health Promotion

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 3, n. 2, abr./jun 2018, p. 994-999
ISSN: 2448-1394



Journal of Medicine
and Health Promotion

ATIVIDADE ANTIVIRAL E ANTINEOPLÁSICA DO MONOTERPENO ESPATULENOL: UM ESTUDO *IN SILICO*

ANTIVIRAL AND ANTINEOPLASIC ACTIVITY OF ESPATULENOL MONOTERPENE: A STUDY
IN SILICO

Lucas Linhares Gomes
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lucaslinharesq@hotmail.com

Lucas Brito Matias
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lucasbm1914@gmail.com

Maria Tays Pereira Santana
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
taayssantana@gmail.com

Flávia Bruna Ribeiro Batista
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lflaviabruna95@hotmail.com

Thallita Alves dos Santos
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
thallita_28@hotmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN – Santa Cruz – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com

ATIVIDADE ANTIVIRAL DO MONOTERPENO TIMOL: UM ESTUDO *IN SILICO*

ANTIVIRAL ACTIVITY OF THYMOL MONOTERPENE: A STUDY IN SILICO

Maria Tays Pereira Santana
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
taayssantana@gmail.com

Lucas Linhares Gomes
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lucaslinharesq@hotmail.com

Flávia Bruna Ribeiro Batista
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lflaviabruna95@hotmail.com

Thallita Alves dos Santos
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
thallita_28@hotmail.com

Lucas Brito Matias
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lucasbm1914@gmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN – Santa Cruz – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com

Atividade anti-*Candida tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- & (S)-(-)- citronelal em associação com cetoconazol

Anti-Candida tropicalis activity of (R)-(+)- & (S)-(-)- citronellal enantiomers in combination with ketoconazole

Cássio Ilan Soares Medeiros^{1*}, Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira², Janiere Pereira de Sousa³,
Abrahão Alves de Oliveira Filho³, Edeltrudes de Oliveira Lima⁴

¹Graduação em Ciências Biológicas, Faculdades Integradas de Patos (FIP) e Mestre em Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Paraíba; ²Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Santa Cruz, Rio Grande do Norte; ³Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, Paraíba; ⁴Doutora em Farmácia, USP, Professora Associada, UFPB

de Andrade Santos et al., IJPSR, 2018; Vol. 9(6): 2281-2286.

E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148

IJPSR (2018), Volume 9, Issue 6

(Research Article)



INTERNATIONAL
JOURNAL
OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES
AND
RESEARCH



Received on 25 August, 2017; received in revised form, 23 December, 2017; accepted, 30 December, 2017; published 01 June, 2018

ANTI-BACTERIAL AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY *IN SILICO* OF CINNAMOMUM CASSIA ESSENTIAL OIL

José Roberto Dantas de Andrade Santos¹, Francisco Orlando Rafael Freitas¹, Alanna Michely Batista de Moraes¹, Vanessa Passos Brustein¹, Tiago Bezerra de Sá Sousa Nogueira¹, Raquel Bezerra de Sá de Sousa Nogueira¹, Milena Nunes Alves de Sousa¹, Daysianne Pereira de Lira Uchoa¹, Michelângela Suelleny de Caldas Nobre¹, Luara de Sousa Monteiro Duarte¹, Jorge Luiz Silva Araújo Filho¹, Fabrício Kleber de Lucena¹, Marcelo Alves Barreto¹, Umberto Joubert de Moraes Lima¹, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho¹, Abrahão Alves de Oliveira Filho³, Edeltrudes de Oliveira Lima², Cássio Ilan Soares Medeiros^{1,2} and Hilzeth de Luna Freire Pessoa⁴

Research Laboratory in Microbiology¹, Integrated College of Patos, Patos, Brazil.

Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences², Academic Unit of Biological Sciences³, Department of Cell and Molecular Biology⁴, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Atividade anti-*Candida tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- & (S)-(-)-citronelal em associação com nistatina

Anti-Candida tropicalis activity of (R)-(+)- & (S)-(-)-citronellal enantiomers in association with nystatin

Actividad anti-Candida tropicalis de los enantiómeros (R)-(+)- & (S)-(-)-citronelal en combinación con nistatina

Cássio Ilan Soares MEDEIROS¹
Heloísa Mara Batista Fernandes de OLIVEIRA²
Janiere Pereira de SOUSA¹
Abrahão Alves de OLIVEIRA FILHO³
Edeltrudes de Oliveira LIMA¹

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-085 João Pessoa, Paraíba, Brasil

²Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59200-000 Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brasil

³Universidade Federal de Campina Grande, 58429-140 Patos, Paraíba, Brasil

Faculdades Integradas de Patos Curso de Medicina v. 3, n. 2, abr./jun 2018, p. 988-993 ISSN: 2448-1394	 Journal of Medicine and Health Promotion
---	---

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN SILICO* DO MONOTERPENO ALFA-CADINOL

ANALYTICAL ACTIVITY STUDY IN SILICO MONOTERPENE ALPHA-CADINOL

Flávia Bruna Ribeiro Batista
 Graduada de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
flaviabruna95@hotmail.com

Maria Tays Pereira Santana
 Graduada de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
taaysantana@gmail.com

Lucas Linhares Gomes
 Graduando de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lucaslinharesq@hotmail.com

Lucas Brito Matias
 Graduando de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
luksvardo25@gmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
 Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra-UFRN- Santa Cruz
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abraão Alves de Oliveira Filho
 Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abraham.farm@gmail.com

Faculdades Integradas de Patos Curso de Medicina v. 3, n. 1, jan./mar 2018, p. 875-882 ISSN: 2448-1394	 Journal of Medicine and Health Promotion
---	---

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS APLICADAS À ODONTOLOGIA DA UNCARIA TOMENTOSA

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES APPLIED TO DENTISTRY OF UNCARIA TOMENTOSA

Dameres Pereira Cavalcante
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
dameres.cavalcante@hotmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
 Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Isabelle Silvério Tenório
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
bele.1997@hotmail.com

Isadora da Costa Filgueira
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
isadorafilgueira.if@gmail.com

Katryne Targino Rodrigues
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
katrynetrodrigues@gmail.com

Larissa Rafaela de Medeiros Silva
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
larissarafaela2015.1@gmail.com

Natália Magalhães Alves
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
natalinhmagalhães@gmail.com

Raquel Vieira Bezerra
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
raquelvieira62@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abraão Alves de Oliveira Filho
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abraham.farm@gmail.com

Faculdades Integradas de Patos Curso de Medicina v. 3, n. 1, jan./mar 2018, p. 965-976 ISSN: 2448-1394	 Journal of Medicine and Health Promotion
---	---

ANÁLISE QUALITATIVA DE MICRORGANISMOS ENCONTRADOS EM CHUPETAS DE CRIANÇAS PERTENCENTES A UMA CRECHE PÚBLICA

QUALITATIVE ANALYSIS OF MICRORGANISMS FOUND IN PACIFIER OF CHILDREN BELONGING TO A PUBLIC CRECHE

Maria Isabella Ferreira de Araújo
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba – Brasil
isabella.araujo61@gmail.com

Maria Aparecida Mariz de Lima
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba – Brasil
cidinhamariz@gmail.com

Marcos Mateus Leandro de Assis
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba – Brasil
marcosmateus712@gmail.com

Alanna Michely Batista de Moraes
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba – Brasil
alannamichely@yahoo.com.br

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Faculdades Integradas de Patos Curso de Medicina v. 3, n. 1, jan./mar 2018, p. 913-921 ISSN: 2448-1394	 Journal of Medicine and Health Promotion
---	---

ANÁLISE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA *IN SILICO* DO FLAVONOIDE 5-HIDROXI-4', 7-DIMETOXIFLAVONA

PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN SILICO OF FLAVONOIDE 5-HYDROXY-4', 7-DIMETOXIFLAVONE

Vinicius Filgueiras de Oliveira
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa-Paraíba – Brasil
filgueirasv@gmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
 Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abraão Alves de Oliveira Filho
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abraham.farm@gmail.com

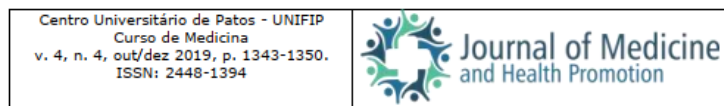
Thais Gaudêncio do Rego
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
gaudenciothais@gmail.com

Activity anti-*Candida albicans* and Effects of the Association of β -citronellol with Three Antifungal Azolics

Daniele F. SILVA*, Ana C.L. SILVA, Hermes DINIZ-NETO,
Heloísa M.B.F. OLIVEIRA, Cássio I.S. MEDEIROS, Júlio A. PEREIRA,
Janiere P. SOUSA, Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO & Edeltrudes O. LIMA

*Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2 University Hospital Ana Bezerra,
Federal University of Rio Grande of Norte, Santa Cruz, Rio Grande of Norte, Brazil.*

Artigos – 2019



EDUCAÇÃO AMBIENTAL EM SAÚDE: ESTUDO DOS CASOS NOTIFICADOS DE HEPATITE A NA PARAÍBA (2014 A 2018)

ENVIRONMENTAL HEALTH EDUCATION: STUDY OF HEPATITIS A CASES REPORTED IN
PARAÍBA (2014 TO 2018)

Israelly Medeiros de Andrade
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
israellymedeiros123@gmail.com

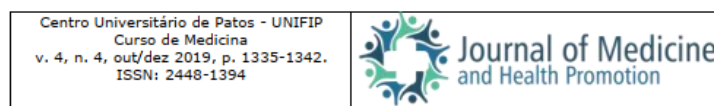
Millena de Souza Alves
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
millenaasouzaa@gmail.com

Tiago da Nóbrega Albuquerque
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Pombal – Paraíba – Brasil
tiagofernandes_pb@hotmail.com

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com



ANÁLISE DOS CASOS DE HEPATITE B NOTIFICADOS NO ESTADO DA BAHIA NO PERÍODO DE 2010-2018

ANALYSIS OF HEPATITIS B CASES NOTIFIED IN THE STATE OF BAHIA FOR 2010-2018

Gíssia Santana Carmo
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
gissiascarmo@hotmail.com

Joyce Ferreira Nobre Cavalcante
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
joycentf@gmail.com

Gisnaac Santos de Oliveira Junior
Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos S/A – ITPAC – Palmas – Brasil
gisnaac_jun@hotmail.com.br

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 09, pp. 29640-29644, September, 2019

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE *POGOSTEMON CABLIN* (LAMIACEAE) EM COMBATE A CEPAS DE *CANDIDA KRUSEI*

¹Millena de Souza Alves, ¹Maria Alice Araújo de Medeiros, ¹Camilla Torres Pereira, ¹Karla de Lima Alves Simão, ¹Bruna de Lima Alves Simão, ¹Aline de Farias Diniz, ²Aleson Pereira de Sousa, ²Cássio Ilan Soares Medeiros, ¹Gymenna Maria Tenório Guênes, ²Daniele de Figuerêdo Silva, ¹Rosália Severo de Medeiros, ¹Raline Mendonça dos Anjos, ¹Luciano de Brito Júnior, ²Edeltrudes de Oliveira Lima and ¹Abrahão Alves de Oliveira Filho

¹Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 09, pp. 29883-29886, September, 2019

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL

^{*1}Karla de Lima Alves Simão, ¹Bruna de Lima Alves Simão, ¹Camilla Torres Pereira, ¹Maria Alice Araújo de Medeiros, ¹Millena de Souza Alves, ¹Raquel Vieira Bezerra, ¹Aline de Farias Diniz, ²Aleson Pereira de Sousa, ²Cássio Ilan Soares Medeiros, ¹Gymenna Maria Tenório Guênes, ¹Maria das Graças Veloso Marinho de Almeida, ¹Rosália Severo de Medeiros, ¹Raline Mendonça dos Anjos, ¹Luciano de Brito Júnior, ¹Manuella Santos Carneiro Almeida and ¹Abrahão Alves de Oliveira Filho

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB

ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 09, pp. 29887-29890, September, 2019

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HEXÂNICO DE *PSIDIUM GUINEENSE* SWARTZ

¹Camilla Torres Pereira, ¹Maria Estella Torres Pereira, ¹Millena de Souza Alves, ¹Karla de Lima Alves Simão, ¹Bruna de Lima Alves Simão, ¹Maria Alice Araújo de Medeiros, ¹Raquel Vieira Bezerra, ²Aleson Pereira de Sousa, ¹Raline Mendonça dos Anjos, ¹Aline de Farias Diniz, ²Cássio Ilan Soares Medeiros, ¹Gymenna Maria Tenório Guênes, ¹Maria Angélica Sátiro Gomes Alves, ¹Luciano de Brito Júnior, ²Yanna Carolina Ferreira Teles and ¹Abrahão Alves de Oliveira Filho

¹Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 09, Issue, 09, pp. 29589-29592, September, 2019

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO (R)- (+) - CITRONELAL CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Maria Alice Araújo de Medeiros, ¹Millena de Souza Alves, ¹Karla de Lima Alves Simão, ¹Camilla Torres Pereira, ¹Bruna de Lima Alves Simão, ¹Aline de Farias Diniz¹, ²Aleson Pereira de Sousa, ²Cássio Ilan Soares Medeiros, ¹Gymenna Maria Tenório Guênes, ¹Raline Mendonça dos Anjos, ¹Rosália Severo de Medeiros, ¹Maria Angélica Sátyro Gomes Alves, ¹Luciano de Brito Júnior, ¹Manuella Santos Carneiro Almeida and ^{*}1Abrahão Alves de Oliveira Filho

¹Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

Centro Universitário de Patos - UNIFIP
Curso de Medicina
v. 4, n. 4, out/dez 2019, p. 1291-1297.
ISSN: 2448-1394

Journal of Medicine
and Health Promotion

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 4, n. 3, jul/set 2019, p. 1242-1253.
ISSN: 2448-1394

Journal of Medicine
and Health Promotion

POTENCIAL FITOTERÁPICO DA VALERIANA OFFICINALIS APLICADA À ODONTOLOGIA

PHYTOTHERAPIC POTENTIAL OF VALERIAN OFFICINALIS APPLIED TO ODONTOLOGY

Laís Sousa Maia
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
laissousahmaia@gmail.com

Luiza Queiroz Rosado de Souza
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
lrsouzaa@gmail.com

Antônio Pereira de Araújo Neto
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
an_tonioneto@outlook.com

Mateus Araújo Andrade
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
mateusevo@outlook.com

Regina Mendes da Silva
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
reginamendes16@hotmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
abrahao.farm@gmail.com

PRESENÇA DE *ASPERGILLUS* EM HOSPITAIS BRASILEIROS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

PRESENCE OF *ASPERGILLUS* IN BRAZILIAN HOSPITALS: AN INTEGRATIVE REVIEW

Francisco Patrício de Andrade Júnior
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil
juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

Vanessa Santos de Arruda Barbosa
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Cuité - Paraíba - Brasil
vanessabarbosa@ufcg.edu.br

Laís Vilar Cordeiro
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil
laissavilar@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil
abrahao.farm@gmail.com

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 4, n. 3, jul/set 2019, p. 1219-1230.
ISSN: 2448-1394



ANÁLISE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA *IN SILICO* DO ÁCIDO UNDECILÊNICO APLICADA A ODONTOLOGIA

IN SILICO PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF UNDECILENIC ACID APPLIED TO DENTISTRY

Júlia Tavares Palmeira
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
julia.palmeira@hotmail.com

José Henrique de Araújo Cruz
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
henrique_araujo1992@hotmail.com

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Gymenna Maria Tenório Guênes
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
gymennat@yahoo.com.br

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 4, n. 3, jul/set 2019, p. 1214-1218.
ISSN: 2448-1394



FITOTERAPIA E EDUCAÇÃO AMBIENTAL APLICADA À SAÚDE NA ESCOLA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

PHYTOTHERAPY AND ENVIRONMENTAL EDUCATION APPLIED TO HEALTH AT SCHOOL: AN EXPERIENCE REPORT

Lara Danúbia Galvão de Souza
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
lara.danubia@outlook.com

Diego Cabral Herculano
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
dvego.pb1@hotmail.com

Inaldo Gizeldo Monteiro de Sousa
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
dinghomonteiro1@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com

Maria das Graças Veloso Marinho de Almeida
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
mgvmarinho@bol.com.br

Faculdades Integradas de Patos
Curso de Medicina
v. 4, n. 3, jul/set 2019, p. 1188-1200.
ISSN: 2448-1394



PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO N, N-DIMETILTRIPTAMINA: UM ESTUDO *IN SILICO*

N, N-DIMETHYLTRYPTAMINE THERAPEUTIC PROPERTIES: A STUDY IN SILICO

José Henrique de Araújo Cruz
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
henrique_araujo1992@hotmail.com

Júlia Tavares Palmeira
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
julia.palmeira@hotmail.com

Manuella Santos Carneiro Almeida
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
manuellacarneiro@hotmail.com

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte – Brasil
heloisambf@gmail.com

Gymenna Maria Tenório Guênes
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
gymennat@yahoo.com.br

Maria Angélica Satyro Gomes Alves
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
angelicasatyrogomes@hotmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
hilzeth@gmail.com

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
margarethdiniz.ufpb@gmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil
abrahao.farm@gmail.com

Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B

Study of the antifungal potential and mechanism of action of thymol against strains of Candida parapsilosis resistant to fluconazole and amphotericin B

Janiere Pereira de Sousa¹, Cássio Ilan Soares Medeiros^{2*}, Fillipe de Oliveira Pereira³, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra⁴, Abrahão Alves de Oliveira Filho⁵, Edeltrudes de Oliveira Lima⁶

¹Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB); ²Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB; ³Mestre e Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB, Professor Adjunto da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG); ⁴Mestre e Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB, Professor Titular da Universidade Federal da Paraíba; ⁵Mestre e Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB, Professor Adjunto da UFCG; ⁶Mestre e Doutora em Farmácia pela USP, Professora Titular da UFPB, PB

Repercussão da microbiota intestinal na modulação do sistema nervoso central e sua relação com doenças neurológicas

Repercussion of the intestinal microbiota in modulation of the central nervous system and its relation with neurological diseases

Tércio Palmeira Costa¹, Cássio Ilan Soares Medeiros^{2*}

¹Graduando do curso de Medicina, Faculdades Integradas de Patos, Paraíba, Brasil; ²Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil

CIÊNCIA^eNATURA

UFSM

Ci. e Nat., Santa Maria v.42, e54, p. 01-11, 2020
DOI:10.5902/2179460X39693
ISSN 2179-460X

Chemistry

Submissão: 15/08/2019 Aprovação: 14/02/2020 Publicação: 13/08/2020

Citral: antifungal activity and mode of action, against *Cladosporium oxysporum*

Camilla Pinheiro de Menezes^I, Cássio Ilan Soares Medeiros^{II},
Ana Luíza Alves de Lima Perez^{III}, Janiére Pereira de Sousa^{IV}, Lilian Sousa Pinheiro^V,
Abrahão Alves de Oliveira Filho^{VI}, Edeltrudes de Oliveira Lima^{VII}

Research, Society and Development, v. 9, n. 7, e214973814, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3814>

Silva, RCMO, Cunha, SMD, Medeiros, CIS, Anjos, RM, Oliveira, HMBF, Souza, AP, Telo, VCF & Oliveira Filho, AA (2020). Genotoxic potential of the metholic extract of *Psidium guineense* cv (Açaçá verdadeiro) in oral mucosa cells. *Research, Society and Development*, 9(7): 1-10, e214973814.

Potencial Genotóxico do Extrato Metanólico de *Psidium guineense* Sw (Açaçá verdadeiro) em Células da Mucosa Oral

Genotoxic Potential of the Metholic Extract of *Psidium guineense* Sw (Açaçá verdadeiro) in Oral Mucosa Cells

Potencial Genotóxico del Extracto Metólico de *Psidium guineense* Sw (Açaçá verdadeiro) en Células Orales de Mucosa

Recebido: 01/05/2020 | Revisado: 03/05/2020 | Aceito: 04/05/2020 | Publicado: 05/05/2020

Rebeca Cicera Mendes de Oliveira Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2891-9209>

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil

E-mail: rebecadodonto21@gmail.com

Saraghina Maria Donato da Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3015-6175>

Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Brasil.

E-mail: saracunha20@hotmail.com

Cassio Ilan Soares Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6413-8303>

Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Brasil.

E-mail: cassioism@hotmail.com

Raline Mendonça dos Anjos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0751-7523>

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil

E-mail: raline.anjos@gmail.com

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8237-9920>

Hospital Universitário Ana Bezerra (UFRN), Brasil

E-mail: Heloisambf@gmail.com

Aleeson Pereira de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3430-477X>

Artigos – 2021

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 14 (8)

August 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/14820211429>Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1429>

Potencial genotóxico em extrato acetato de etila de *Psidium guineense* sw
(Araçá verdadeiro)

Genotoxic potential in ethyl acetate extract of *Psidium guineense* sw (Araçá
verdadeiro)

R. C. M. O. Silva

Universidade Federal de Campina Grande

G. M. T. Guênes

Universidade Federal de Campina Grande

C. I. S.

Medeiros Universidade Federal da Paraíba

L. B. Júnior

Universidade Federal de Campina Grande

M. A. S. G. Alves

Universidade Federal de Campina Grande

R. M. Anjos

Universidade Federal de Campina Grande

R. A. Rosendo

Universidade Federal de Campina Grande

Y. C. F. Teles

Universidade Federal da Paraíba

Corresponding author

A. P. Sousa

Universidade Federal da Paraíba

aleson_155@hotmail.com

A. A. Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande

Artigos – 2022

Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 51(2), 860-870, 2022

www.farmacologia.unal.edu.co

Artigo de pesquisa científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.98326>

Avaliação da citotoxicidade em hemácias de humanos do extrato etanólico de *Praxelis clematidea* (Griseb.)

Maria Estella Torres Pereira¹, Camilla Torres Pereira¹, Cássio Ilan Soares Medeiros², José Maria Barbosa-Filho², Gabriela Lemos de Azevedo Maia³, Aleson Pereira de Sousa^{4*}, Abrahão Alves de Oliveira Filho¹

¹ Unidade Acadêmica de Ciências, Centro de Saúde e tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintético Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

³ Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil

⁴ Programa de Pósgraduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

* Autor correspondente: aleson_155@hotmail.com

Recebido: 14 de setembro de 2021

Revisado: 8 de dezembro de 2021

Aceto: 16 de dezembro de 2021

July 2022 Vol.:22, Issue:1

© All rights are reserved by Abrahão Alves de Oliveira Filho et al.

Bioprospecting the Cytotoxic Activity of Patchouli Essential Oil (*Pogostemon cablin* Benth) Against Human Blood Cells


IJSRM
INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH METHODOLOGY
an Official Publication of Human Journals

Saraghina Maria Donato da Cunha¹, Cássio Ilan Soares Medeiros², Aleson Pereira de Sousa³, Gyselle Tenório Guênes⁴, Maria Alice Araújo de Medeiros⁵, Millena de Souza Alves⁶, Bernadete Santos⁷, Abrahão Alves de Oliveira Filho^{8*}

¹ Doctors student at the Federal University of Paraíba - UFPB, Brazil ² Doctors student at the Federal University of Paraíba - UFPB, Brazil ³ Doctors student at the Federal University of Paraíba - UFPB, Brazil ⁴ Masters student at the University of Pernambuco - UPE, Brazil ⁵ Masters student at the Federal University of Campina Grande - UFCG, Brazil ⁶ Masters student at the Federal University of Campina Grande - UFCG, Brazil ⁷ Masters student at the Federal University of Campina Grande - UFCG, Brazil ⁸ Professor at the Federal University of Campina Grande - UFCG, Brazil

Submitted: 20 June 2022
Accepted: 25 June 2022
Published: 30 July 2022

Keywords: Cytotoxicity; Phytotherapy; Essential Oil; Natural Product.

ABSTRACT

Natural products, particularly those of plant origin, are the main promising candidates for new drugs due to availability, low cost, and fewer side effects, and this logic, highlights the Essential Oils (EOs), which are a complex mixture of volatile compounds and have several relevant biological activities, but there are few studies on the potential beneficial and/or adverse effects, making necessary the investigation of these EOs, especially the evaluation of toxicity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity of Patchouli essential oil (*Pogostemon cablin* Benth) against human blood cells. This was a laboratory-type experimental study, with an inductive approach and quantitative. To carry out the cytotoxic activity studies, human red blood cells of blood types A, B, and O were used and the hemolytic and anti-hemolytic activity was evaluated. The analyses performed revealed that they showed a low percentage of hemolysis for human erythrocytes of the ABO system at a concentration of 50 to 100 µg/mL. In addition, it showed a moderate anti-hemolytic effect at concentrations of 500 to 1000 µg/mL for blood types B and O. Considering the results obtained in the in vitro cytotoxicity study, Patchouli EOs become a promising candidate for the use of its bioactive properties in herbal medicines. However, auxiliary studies such as *in vivo* toxicity are necessary to better elucidate the mechanisms of action of this compound.



HUMAN JOURNALS

www.ijssrm.humanjournals.com



Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action

C.I.S. Medeiros^{1,2}, M.N.A. de Sousa², G.G.A. Filho², F.O.R. Freitas², D.P.L. Uchoa², M.S.C. Nobre², A.L.D. Bezerra², L.A.D.M.M. Rolim², A.M.B. Morais², T.B.S.S. Nogueira², R.B.S.S. Nogueira², A.A.O. Filho³, and E.O. Lima¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

²Curso de Medicina, Centro Universitário UniFIP, Patos, PB, Brasil

³Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil

Ação antibacteriana do linalol contra *Klebsiella pneumoniae* e suas interações com a ATP sintase *in silico*

Françueuda Alves da Silva^{[1]*}, Eliane Alves Lustosa^[2], Gislaine da Silva Rodrigues^[3], Abrahão Alves de Oliveira Filho^[4], Cássio Ilan Soares Medeiros^[5]

^[1] cudaalves.biomed@gmail.com, ^[5] medeiros cassio4@gmail.com. Centro Universitário de Patos (UNIFIP), Brasil

^[2] eliane lustosa18@hotmail.com, ^[4] abraham farm@gmail.com. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil

^[3] gislaine.srodrigues@uel.br. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

* autora correspondente

Resumo

As infecções bacterianas e a resistência antimicrobiana, particularmente de *Klebsiella pneumoniae*, continuam sendo uma das questões mais desafiadoras que ameaçam a saúde das pessoas em todo o mundo. Compostos naturais derivados de plantas têm recebido atenção considerável por seu papel potencial como antibacteriano e para mitigar a resistência a antibióticos. Sendo assim, o linalol é um importante metabólito secundário encontrado em grande variedade de plantas e apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antibacteriana. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana do linalol contra *Klebsiella pneumoniae* e suas interações com a ATP sintase através do *docking* molecular. Nesse trabalho foram realizados ensaios *in vitro*, onde foi aplicado a técnica de microdiluição em caldo obtendo a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). Além disso, o procedimento adotado para o *docking* molecular foi o de ancoramento com a proteína rígida e os ligantes flexíveis. As análises *in vitro* mostraram que o linalol teve efeito bactericida contra *K. pneumoniae* na concentração de 256 µg/mL. E o *docking* molecular revelou que o linalol interage com o centro ativo da subunidade B da ATP sintase com energia de ligação $\Delta E = -3,63$ kcal/mol. Nesse estudo foi demonstrado que o linalol é uma molécula capaz de induzir a morte bacteriana e que preditivamente esse efeito possivelmente ocorre por interrupção na síntese de ATP.

Palavras-chave: *docking* molecular; farmacologia; fitoterapia; *Klebsiella pneumoniae*; microbiologia.

Antibacterial action of linalool against *Klebsiella pneumoniae* and its interactions with ATP synthase *in silico*

Artigos – 2023



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antifungal effect of (*R*) and (*S*)-citronellal enantiomers and their predictive mechanism of action on *Candida albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses

Efeito antifúngico dos enantiômeros (*R*) e (*S*)-citronelal e seu mecanismo de ação preditivo sobre *Candida albicans* de onicomioses resistentes ao voriconazol

R. G. Gouveia^a, N. R. Oliveira^a, F. P. Andrade-Júnior^a, R. C. Ferreira^a, G. M. W. Amorim^b, D. K. F. Silva^a, S. S. Duarte^a, C. I. S. Medeiros^{a*}, A. A. Oliveira-Filho^c and E. O. Lima^{a,b}

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Departamento de Ciências Farmacêuticas – DCF, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CTSR, Patos, Paraíba, Brasil

Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 52(1), 496-510, 2023

www.farmacia.una.edu.co

Artigo de pesquisa científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.XXXXX>

Atividade anti-*Staphylococcus aureus* e anti-*Klebsiella pneumoniae* do cinamaldeído e suas interações com ATP sintase e FtsZ através do docking molecular

Emerson Luan Andrade de Oliveira¹, Gislaine da Silva Rodrigues², Abrahão Alves de Oliveira Filho³, Cássio Ilan Soares Medeiros^{1,4*}

¹ Departamento de Biomedicina, Centro Universitário UniFIP, Patos, PB, Brasil

² Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

³ Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos, PB, Brasil

⁴ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

*Autor correspondente: medeirosccassio4@gmail.com, Orcid: 0000-0002-6413-8303

Recebido: 21 de julho de 2022

Revisado: 23 de fevereiro de 2023

Aceto: 26 de fevereiro de 2023

Resumos publicados em anais de congresso – 2021




38

ESTUDO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DA CARVONA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS E KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN VITRO E SUAS INTERAÇÕES COM A ATP SINTASE IN SILICO

Jonas Ferreira de Almeida, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho, Wostenildo Crispim Ramalho, Daysianne Pereira de Lira Uchoa, Vandezita Dantas de Medeiros Mazzaro & Cássio Ilan Soares Medeiros

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

Introdução: Os *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, frequentemente colonizam e prosperam nos trato respiratório e gastrointestinal de humanos. A colonização com tais bactérias pode predispor indivíduos vulneráveis a doenças, principalmente pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Esses microrganismos estão consistentemente associados a infecções hospitalares, e a resistência antimicrobiana limita severamente as opções de tratamento em infecções causadas por esses patógenos. Dessa forma, o estudo de propriedades antibacterianas de novos compostos químicos tem sido realizado. Nesse contexto, destaca-se o monoterpeno carvona oriunda de várias plantas como *Mentha spicata* L, *Mentha piperita*, *Anethum graveolens* L, *Carum carvi* L e a *Lippia alba*, cuja as óleos essenciais destas apresentam propriedades antimicrobianas. **Objetivo:** Investigar se a carvona desempenha atividade bactericida contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* in vitro, bem como as interações desse monoterpeno com a ATP sintase bacteriana in silico. **Metodologia:** foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana por meio de microdiluição em caldo BHI para obtenção da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). Além disso, realizou-se um docking molecular para avaliar as interações da carvona com a proteína ATP sintase bacteriana. **Resultados e conclusão:** a carvona apresentou efeito bactericida para as 10 cepas testadas com razão CBM/CIM entre 1 e 2. Nos ensaios do docking molecular foi possível verificar que a carvona interage com a subunidade B da ATP sintase com energia de ligação de -5.30 kcal.mol⁻¹ através de ligações de hidrogênio e de van der Waals, sugerindo a possibilidade da carvona inibir a síntese de ATP bacteriana e desempenhar seu efeito bactericida. No entanto, outros experimentos in vitro precisam ser realizados para testar essa hipótese.

Palavras-chave: Carvona; Mecanismo de ação; *S. aureus*; *K. pneumoniae*.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>




40

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO LINANOL CONTRA CEPAS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN VITRO E IN SILICO

Franqueuda Alves da Silva, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho, Daysianne Pereira de Lira Uchoa, Wostenildo Crispim Ramalho, Rosivania Silva Mota & Cássio Ilan Soares Medeiros

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

Introdução: A *Klebsiella pneumoniae* é um microrganismo Gram negativo de morfologia bacilar, responsável por causar uma variedade de enfermidades infecciosas como: infecções urinárias, pneumonia, meningite e seps. A espécie ao longo dos anos vem aumentando sua capacidade em desenvolver mecanismos de resistência a antibióticos de uso corrente, como por exemplo a resistência aos carbapenêmicos, antibióticos de amplo espectro. Por outro lado, o linalol que é um monoterpeno extraído de diversas espécies de plantas como: *Lamiaceae* (Lavanda), *Lauraceae* (*Cinnamomum*) e *Umbelliferae* (*Coentro*) entre outras, vem demonstrando ter uma boa atividade antibacteriana. **Objetivo:** dessa forma, buscou-se estudar o potencial antibacteriano do linalol contra cepas de *K. pneumoniae* in vitro e suas interações com a ATP sintase da parede celular através do docking molecular. **Metodologia:** foram realizados testes in vitro em placas de 96 poças nos quais realizou-se a microdiluição em caldo BHI do linalol previamente preparado para obter-se a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). Também foi realizado um estudo de interações do linalol com a ATP sintase da parede celular bacteriana através do docking molecular utilizando o software gratuito Autodock vina. **Resultados e conclusão:** a CIM do linalol foi de 256µg.mL⁻¹ e a CBM = 512µg.mL⁻¹, caracterizando o efeito bactericida do linalol na respectiva concentração (CIM x 2). Além disso, foi possível observar que o linalol interage com a subunidade B da ATP sintase através de ligações de hidrogênio e van der Waals, resultando em energia de ligação de -4.3 kcal.mol⁻¹, indicando que possivelmente o mecanismo de ação bactericida do linalol possa envolver a ATP sintase da parede celular bacteriana.

Palavras-chave: Linalol; ATP sintase; *Klebsiella pneumoniae*; Ação bactericida.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>



41

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO D-LIMONENO CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS E KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN VITRO E SUAS INTERAÇÕES COM A ATP SINTASE DA PAREDE CELULAR BACTERIANA IN SILICO

Priscila Martins de Souza, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho, Daysianne Pereira de Lira Uchoa, Wastenilda Crispim Ramalho, Aruana Neves Salvador de Alcantara & Cássio Ilan Soares Medeiros

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

Introdução: A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno biológico decorrente da pressão seletiva que ocorre frequentemente através do uso indiscriminado de antibacterianos. Esse processo inviabiliza o uso de muitas fármacos, fazendo com que a terapêutica já existente contra determinadas infecções se torne ineficaz. Diante disso, a busca por novas classes de substâncias químicas com potencial para tratar essas infecções que apresentem novas estratégia de ação sobre os microrganismos é de interesse científico. Sendo assim, o D-limoneno é um monoterpeno que faz parte da composição de mais de 300 vegetais e inúmeras pesquisas relatam que seu uso pode inibir/diminuir a atividade microbiana de bactérias, sendo esta então uma molécula bastante promissora como antibacteriano. **Objetivo:** investigar o potencial antibacteriano do D-limoneno contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* in vitro e suas interações com a ATP sintase da parede celular bacteriana in silico. **Metodologia:** foram realizados ensaios in vitro para determinar a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) e além disso, executou-se um docking molecular através do software gratuito Autodock vina com a proteína ATP sintase bacteriana. **Resultados e conclusão:** verificou-se que o efeito do D-limoneno contra as bactérias testadas foi bactericida, tendo em vista que a relação CBM/CIM ficou entre 1 e 2. Além disso, constatou-se que a energia de ligação do D-limoneno com a subunidade B da ATP sintase foi de $-5.70 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e interagiu com vários aminoácidos através de ligações van der Waals e Alkyl, demonstrando assim que essa interação é possível e que a ATP sintase bacteriana passa ser um alvo para a ação de novos fármacos antibacterianos.

Palavras-chave: D-limoneno; ATP sintase; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>



42

ATIVIDADE ANTI-STAPHYLOCOCCUS AUREUS DO CITRONELAL E SUA INTERAÇÃO COM PBP2A IN SILICO

Sergio Calix Luiz da Silva, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho, Wastenilda Crispim Ramalho, Ronaldo Caetano Carneiro, Rosivania Silva Mata & Cássio Ilan Soares Medeiros

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

A descarboxilase do ácido glutâmico (GAD – Glutamic Acid Decarboxylase) é a enzima limitante da taxa de produção do ácido gama-aminobutírico (GABA) através do seu precursor L-glutamato. Existem duas isoformas de GAD, GAD1 de 67 kDa e GAD2 de 65 kDa. A GAD 67 está presente em interneurônios do sistema nervoso central (SNC) e envolvida na síntese de GABA para o metabolismo em geral, enquanto a GAD 65 atua nas sinapses. É importante ressaltar a importância do GABA, não só como principal neurotransmissor inibitório do SNC, mas também seu efeito contrário no período pré-natal, uma vez que esses efeitos excitatórios são de suma importância para o desenvolvimento do sistema nervoso. Dessa forma, diversos estudos apontam que disfunções no sistema GABAérgico ocasionam sérios problemas neurológicos como: autismo, epilepsia, esquizofrenia, entre outros. Por conseguinte, a MeCP2 (Proteína-2 de Ligação Metil CpG) está envolvida nos processos de repressão e transcrição do DNA através dos domínios MDB (Domínio de Ligação a Metila) e TRD (Domínio de Repressão Transcricional) principalmente. A função da MeCP2 é alvo de diversas pesquisas na esfera epigenética de doenças neurológicas, haja vista sua considerável expressão em neurônios GABAérgicos do SNC. Somado a isso, vale destacar o advento terapêutico do canabidiol (CBD), fitocanabinóide (pCB) extraído da Cannabis sativa, popularmente conhecida como maconha. O CBD tem sido utilizado na farmacoterapia de pacientes neuropatas resistentes aos medicamentos convencionais, pois não provoca psicoatividade e dependência. Além disso, acredita-se que o CBD interage com diversos alvos, dentre eles o mais descrito é o sistema endocanabinóide (ECS), responsável por controlar a liberação de neurotransmissores que regulam o balanço excitatório/inibitório do SNC. Nesse estudo, foi considerada a capacidade de ativação transcricional da MeCP2, conjecturando que o canabidiol possa aumentar sua capacidade de ligação ao DNA. Dessa maneira, através de docking molecular, avaliou-se essa interação no intuito de relacioná-la com o possível aumento dos níveis de GAD 65 e/ou 67 na presença do canabidiol, podendo gerar efeitos inibitórios pelo aumento da produção de GABA. Assim, com a obtenção dos resultados de interesse, pretendeu-se relacionar as propriedades terapêuticas do CBD com algumas patologias alusivas aos sistemas GABAérgico como o autismo e epilepsia.

Palavras-chave: Canabidiol; Descarboxilase do ácido glutâmico; GABA; MeCP2; Cannabis.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>



43

ANÁLISE DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO CINAMALDEÍDO FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS E KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN VITRO E IN SILICO

Emerson Luan Andrade de Oliveira, Wastenildo Crispim Ramalho, Geraldo Gonçalves de Almeida Filho, Rosivania Silva Mota, Ronaldo Caetano Carneiro & Cássio Ilan Soares Medeiros

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* são bactérias da microbiota humana normal, podendo ser responsáveis por várias enfermidades infecciosas inclusive casos de infecções nosocomiais. Como resultado da pressão seletiva frente a ampla utilização de antibacterianos, essas bactérias tem desenvolvido resistência a múltiplos medicamentos dessa classe. Sendo assim, o estudo de substâncias derivadas de produtos naturais tem ganhado importância no meio científico, em geral devido aos baixos efeitos adversos dessas moléculas bem como, o baixo custo. Dessa forma, o cinamaldeído (fenilpropanóide) oriundo de plantas do gênero *Cinnamomum* tem apresentado propriedades antimicrobianas sobre uma vasta gama de bactérias patogênicas. **Objetivo:** verificar o potencial antibacteriano do cinamaldeído in vitro contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* bem como, analisar as interações dessa molécula com a ATP sintase da parede celular bacteriana. **Metadologia:** Foram realizados testes in vitro com 10 cepas bacterianas em placas de 96 poços para determinar a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) por microdiluição em caldo BHI. O docking molecular foi realizado para estudar as interações do cinamaldeído com a ATP sintase bacteriana como possível alvo farmacológico. **Resultados e Conclusão:** o cinamaldeído mostrou-se bactericida para as cepas testadas (*S. aureus*, CBM=128µg.mL⁻¹; *K. pneumoniae*, CBM=64µg.mL⁻¹) e foi capaz de interagir com a subunidade B da ATP -1 sintase com energia de ligação -5.10kcal.mol⁻¹, sugerindo uma possibilidade do mecanismo de ação dessa molécula que precisa ser melhor investigada.

Palavras-chave: Cinamaldeído; Ação bactericida; ATP sintase; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>



39

CANABIDIOL E MECP2: UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA E CORRELAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS DE INTERESSE

Ana Beatriz Monteiro de Medeiros, Cássio Ilan Soares Medeiros, Vanessa Silva de Almeida

Centro Universitário de Patos (UNIFIP)

RESUMO

A descarboxilase do ácido glutâmico (GAD – Glutamic Acid Decarboxylase) é a enzima limitante da taxa de produção do ácido gama-aminobutírico (GABA) através do seu precursor L-glutamato. Existem duas isoformas de GAD, GAD1 de 67 kDa e GAD2 de 65 kDa. A GAD 67 está presente em interneurônios do sistema nervoso central (SNC) e envolvida na síntese de GABA para o metabolismo em geral, enquanto a GAD 65 atua nas sinapses. É importante ressaltar a importância do GABA, não só como principal neurotransmissor inibitório do SNC, mas também seu efeito contrário no período pré-natal, uma vez que esses efeitos excitatórios são de suma importância para o desenvolvimento do sistema nervoso. Dessa forma, diversos estudos apontam que disfunções no sistema GABAérgico ocasionam sérios problemas neurológicos como: autismo, epilepsia, esquizofrenia, entre outros. Por conseguinte, a MeCP2 (Proteína-2 de Ligação Metil CpG) está envolvida nos processos de repressão e transcrição do DNA através dos domínios MDB (Domínio de Ligação a Metila) e TRD (Domínio de Repressão Transcricional) principalmente. A função da MeCP2 é alvo de diversas pesquisas na esfera epigenética de doenças neurológicas, haja vista sua considerável expressão em neurônios GABAérgicos do SNC. Somado a isso, vale destacar o advento terapêutico do canabidiol (CBD), fitocanabinóide (gCB) extraído da Cannabis sativa, popularmente conhecida como maconha. O CBD tem sido utilizado na farmacoterapia de pacientes neuropatas resistentes aos medicamentos convencionais, pois não provoca psicoatividade e dependência. Além disso, acredita-se que o CBD interage com diversos alvos, dentre eles o mais descrito é o sistema endocanabinóide (ECS), responsável por controlar a liberação de neurotransmissores que regulam o balanço excitatório/inibitório do SNC. Nesse estudo, foi considerada a capacidade de ativação transcricional da MeCP2, conjecturando que o canabidiol possa aumentar sua capacidade de ligação ao DNA. Dessa maneira, através de docking molecular, avaliou-se essa interação no intuito de relacioná-la com o possível aumento dos níveis de GAD 65 e/ou 67 na presença do canabidiol, podendo gerar efeitos inibitórios pelo aumento da produção de GABA. Assim, com a obtenção dos resultados de interesse, pretendeu-se relacionar as propriedades terapêuticas do CBD com algumas patologias alusivas aos sistemas GABAérgico como o autismo e epilepsia.

Palavras-chave: Canabidiol; Descarboxilase do ácido glutâmico; GABA; MeCP2; Cannabis.

BAHE – Brazilian Archives of Health and Environment, v. 2, n. esp. 3 (2021).

ISSN:2675 - 2298

16 A 18 DE JUNHO

2021

<https://bahe.unifip.edu.br>

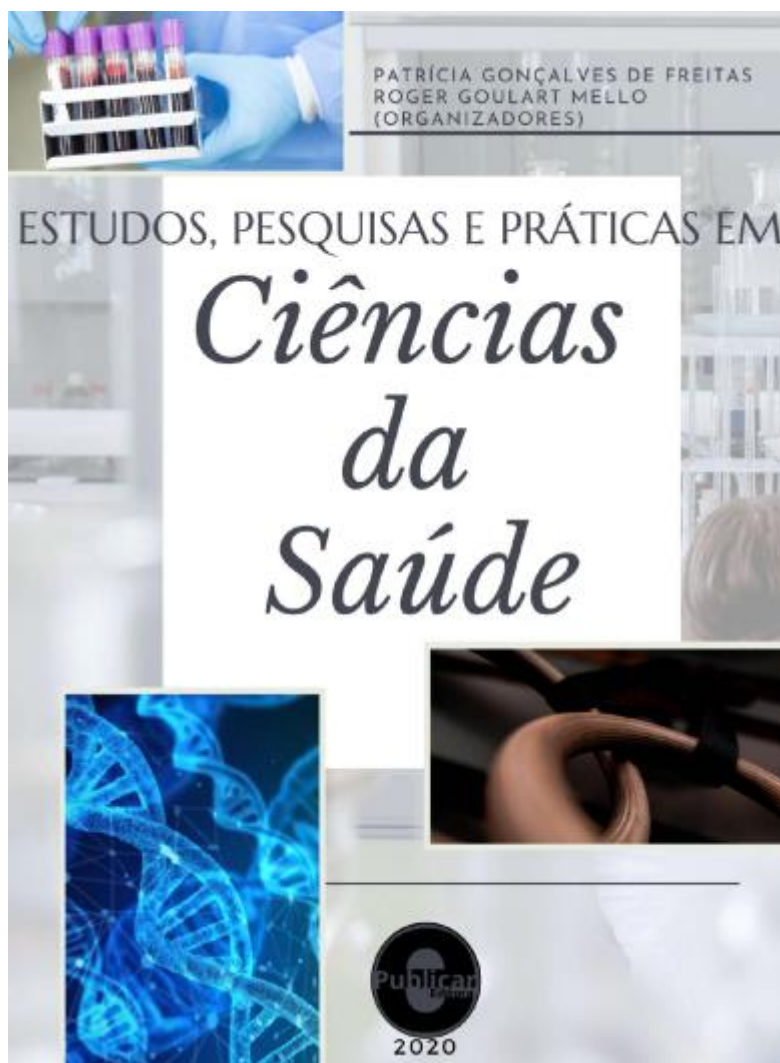
Capítulos de livros – 2020



ASPECTOS CLÍNICOS E FARMACOLÓGICOS DAS CANDIDÍASES

**Daniele de Figuerêdo Silva¹, Hermes Diniz Neto¹, Cássio Ilan Soares Medeiros¹,
Shellygton Lima Silva¹, Laísa Vilar Cordeiro¹, Edeltrudes de Oliveira Lima¹**

1. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil.



CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO EXTRATO HEXÂNICO DE *PSIDIUM GUINEENSE* SW (ARAÇÁ VERDADEIRO) SOBRE CÉLULAS DA MUCOSA ORAL

Rebeca Cícera Mendes de Oliveira Silva, Graduada em Odontologia, Universidade Federal de Campina Grande

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira, Doutora em Farmacologia, Hospital

Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Vinícius Filgueiras de Oliveira, Mestrando em Computação, Comunicação e Artes, Universidade Federal da Paraíba

Saraghina Maria Donato da Cunha, Doutoranda em Desenvolvimento de Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba

Aleson Pereira de Sousa, Doutorando em Desenvolvimento de Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba

Cássio Ilan Soares Medeiros, Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba

Raline Mendonça dos Anjos, Docente, Universidade Federal de Campina Grande

Yanna Carolina Ferreira Teles, Docente, Universidade Federal da Paraíba

Abrahão Alves de Oliveira Filho, Docente, Universidade Federal de Campina Grande



Catálogo na Fonte
Elaborado por: Josefina A. S. Guedes
Bibliotecária CRB 9/870

1611i
2020

Interface saúde e meio ambiente / Milena Nunes Alves de Sousa, Elzenir Pereira de Oliveira Almeida (organizadoras). - 1. ed. - Curitiba : Appris, 2020. 261 p. ; 23 cm. - (Multidisciplinaridade em saúde e humanidades).

Inclui bibliografias
ISBN 978-65-5523-175-5

1. Saúde. 2. Doenças. 3. Meio ambiente. I. Sousa, Milena Nunes Alves de. II. Almeida, Elzenir Pereira de Oliveira. III. Título. IV. Série.

CDD - 613

Livro de acordo com a normalização técnica de Vancouver

USO DE PLANTAS MEDICINAIS E DE FITOTERÁPICOS NA AGRICULTURA FAMILIAR BRASILEIRA 165

Polliana Peres Cruz Carvalho

Maria Alice Ferreira Farias

André Luiz Dantas Bezerra

Cássio Ilan Soares Medeiros

Milena Nunes Alves de Sousa