

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos**

Emmanuel Melquiádes Araújo

**Avaliação da atividade biológica do eugenol frente cepas de
*Penicillium citrinum***

**João Pessoa - PB
2023**

Emmanuel Melquiades Araújo

**Avaliação da atividade biológica do eugenol frente cepas de
*Penicillium citrinum***

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr. ^a Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa - PB

2023

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

A663a Araujo, Emmanuel Melquiades.
Avaliação da atividade biológica do eugenol frente
cepas de *Penicillium citrinum* / Emmanuel Melquiades
Araujo. - João Pessoa, 2023.
69 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Eugenol. 3. Atividade
antifúngica. 4. *Penicillium citrinum*. I. Lima,
Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

Emmanuel Melquiades Araújo

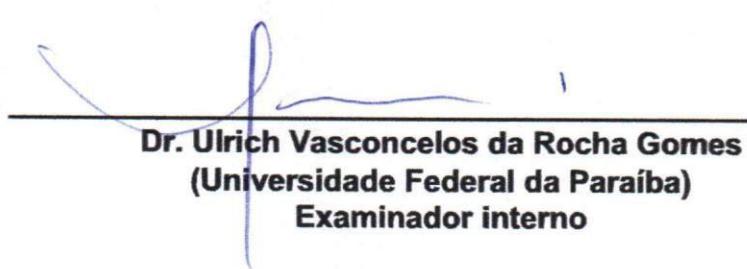
**Avaliação da atividade biológica do eugenol frente cepas de
*Penicillium citrinum***

Aprovado em: 17 / 11 / 23

Banca examinadora



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



**Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**



**Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo**

Aos meus pais e minha esposa. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, agradeço ao meu bom e maravilhoso Deus, por dirigir o meu pensar e agir, diante desse processo. O medo e o desânimo me rodearam todos os dias e em todos os momentos, mas ELE, pegou-me pela mão e disse: “*coragem*”. Agradeço a Santa Mãe de Deus, que demonstrou em toda sua vida um princípio: a humildade, que tento colocar em prática todos os dias.

E por falar em humildade, minha gratidão eterna a uma das mais respeitadas cientistas de nosso Brasil, professora **Edeltrudes de Oliveira Lima**. Citando a grande poeta Cora Coralina, resumo: “*O saber a gente aprende com os mestres e os livros e a sabedoria, com os humildes*”. Tive a grande sorte de receber esses dois ensinamentos diante de uma pessoa singular.

Agradeço, a minha esposa **Cynthia**, por mostrar em toda sua vida, que o estudo é o caminho. Em sua prática cotidiana, mostra o seu amor a profissão, sendo respeitada e amada em todos lugares que passa, deixando assim, um grande legado. Te amo.

Não menos importante é claro, todo meu agradecimento aos meus queridos pais. Sinto que em todo processo, desde a aprovação para o mestrado e finalizando esse texto, que meu melhor amigo e homem da minha vida, está ao meu lado, como sempre esteve em vida. Junto com minha amada **mãe**, são meu suporte da vida toda. A minha querida mãe, meu amor ETERNO.

Aos meus irmãos, **Tony, Kassia Jane e Rita de Cássia**, além dos meus cunhados e cunhadas, sobrinhos e minha sogra **Célia**, meu muito obrigado pela torcida.

Aos professores da banca, **Drº. Ulrich Vasconcelos, Drº. Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Drª. Hilzeth de Luna Freire Pessôa e Drº. Robson Cavalcante Veras**, deixo minha gratidão por avaliarem e contribuírem de forma significativa para o aprimoramento dessa dissertação de mestrado.

Aos Professores **Drº. Abrahão Oliveira, Drº. Cássio Ilan, Drº. Felipe Queiroga Sarmento e Drº. Gregório Fernandes Gonçalves**, por suas contribuições únicas e distintas. A todos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por cooperar na minha trajetória.

A diretora do Programa Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Profª. Drª Fabiana de Andrade Cavalcante** e a secretária, **Caroline Mangueira**, pela gentileza e prontidão.

A todos os colegas do laboratório, em especial, **Nayana Rocha e Brenda Kercya**, mas também a **Braúlio Teixeira, José Lucas Galvão e Drº. Rawny Galdino**.

Aos meus amigos da graduação que me ajudaram e torceram por mim, em especial a Doutoranda **Barbara Cavalcante**, ao **Drº. Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo**, **Drº. José Venâncio Chaves Júnior**, Doutorando **Fernando Ferreira Leite**, além de todo “*Clube do bolinha*”, da graduação. A minha querida amiga e **Profª Drª. Cybelle de Arruda Navarro de Silva**, por sua torcida por mim desde sempre.

A todos que fazem parte da Direção de Centro do CCS/UFPB, por me ajudarem e entenderem esse processo. Agradeço em especial ao **Profº. Drº. João Euclides Fernandes Braga e Fabiano Gonzaga Rodrigues**, e aos meus amigos e companheiros de batalha do dia a dia, **Alysson da Silva de Moraes**, **Ednaldo Macedo da Silva**, **Danilo Nascimento Rolim**, **Antônio Marcello Peixoto**, **Vinicio Gadelha Pessoa** e **Josiane Perussolo Cunico Conrado**.

Por fim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

*“Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente?...
À força de pequenas coisas! ”.*

(Jose Maria Escrivá)

Avaliação da atividade biológica do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum*

ARAÚJO, E. M.

Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2023).

RESUMO

Os fungos do gênero *Penicillium* apresentam ampla distribuição e são frequentemente isolados em ambientes que compreende desde lavouras, até hospitais. Suas espécies estão implicadas em diversas patologias, a exemplo penicilose, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. Em vista disso, e da elevada resistência fúngica aos antifúngicos atuais, tem-se impulsionado a busca por novos agentes antifúngicos. Para isso, as plantas medicinais e seus fitoconstituíntes tem sido investigadas. Com base nisso, objetivou-se avaliar a atividade biológica do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum*. Para isso, foram realizados ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); efeito da associação entre eugenol e o antifúngico padrão anfotericina B; ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol e ação dos produtos sobre a membrana celular: interação com ergosterol. Além disso, foi avaliado o efeito citotóxico *in vitro* do eugenol sobre eritrócitos humanos. Ademais, o eugenol foi submetido aos sistemas (pkCSM e Osiris) para realizar a antevisão de parâmetros de drogabilidade e toxicidade. Do mesmo modo, o docking molecular foi realizado no AutoDock 4.2 com as proteínas envolvidas com a síntese e manutenção da membrana celular de *P. citrinum*. Assim observou-se forte atividade antifúngica sobre todas as cepas de *Penicillium citrinum* avaliadas, visto que a CIM determinada foi de 1 µg/mL e a CFM de 1 µg/mL, demonstrando ação fungicida. Ademais, a permanência da CIM do eugenol na presença de sorbitol e ergosterol, revelaram que esta molécula possivelmente não afeta a integridade diretamente da parede e da membrana plasmática de *Penicillium citrinum*. No estudo de associação entre o eugenol e a anfotericina B, foi verificado que estes possuem um efeito indiferente. Já nos estudos *in silico*, o eugenol apresentou importante biodisponibilidade oral e risco mutagênico, entretanto não foi citotóxico na avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos. O docking molecular, propõe a hipótese preditiva de que o eugenol liga-se possivelmente ao sítio ativo da CYP51, enzima responsável pela biossíntese do ergosterol, sugerindo dessa forma que o produto testado atua de forma direta na formação do ergosterol da membrana citoplasmática fúngica. Assim sendo, as evidências desta pesquisa apontam que o eugenol retrata como promissor e possível opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Penicillium citrinum*, e também nos processos de contaminação pelo fungo nas culturais vegetais.

Palavras-chave: Produtos naturais, Eugenol, Atividade antifúngica

Evaluation of eugenol's biological activity in relation to *Penicillium citrinum* strains.

ARAÚJO, E.M.

Postgraduate in Natural and Synthetic Bioactive Products,
Master Degree Thesis, CCS/UFPB (2023).

SUMMARY

Fungi of the genus *Penicillium* have a wide distribution and are frequently isolated in environments ranging from crops to hospitals. Its species are implicated in several pathologies, such as penicilliosis, which mainly affects immunocompromised individuals. Considering this, and the high fungal resistance to current antifungals, the search for new antifungal agents has been encouraged. For this, medicinal plants and their phytoconstituents have been investigated. Based on this, the objective was to evaluate the biological activity of eugenol against strains of *Penicillium citrinum*. For this, tests were carried out to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimum Fungicide Concentration (CFM); effect of the association between eugenol and the standard antifungal amphotericin B; action of products on the fungal cell wall: test with sorbitol and action of products on the cell membrane: interaction with ergosterol. Furthermore, the in vitro cytotoxic effect of eugenol on human erythrocytes was evaluated. Moreover, eugenol was submitted to online software (pkCSM and Osiris) to preview druggability and toxicity parameters. Likewise, molecular docking was performed in AutoDock 4.2 with the proteins involved in the synthesis and maintenance of the *P. citrinum* cell membrane. Therefore, strong antifungal activity was observed on all strains of *Penicillium citrinum* evaluated, since the MIC determined was 1 µg/mL and the CFM was 1 µg/mL, demonstrating fungicidal action. Furthermore, the persistence of the MIC of eugenol in the presence of sorbitol and ergosterol revealed that this molecule possibly does not directly affect the integrity of the wall and plasma membrane of *Penicillium citrinum*. In the association study between eugenol and amphotericin B, it was found that they had an indifferent effect. *In silico* studies, eugenol presented important oral bioavailability and mutagenic risk, however it was not cytotoxic in the evaluation of the hemolytic potential in human erythrocytes. Molecular docking proposes the predictive hypothesis that eugenol possibly binds to the active site of CYP51, the enzyme responsible for the biosynthesis of ergosterol, thus suggesting that the tested product acts directly on the formation of ergosterol in the fungal cytoplasmic membrane. Therefore, the evidence from this research indicates that eugenol is a promising and possible option for the treatment of fungal infections caused by *Penicillium citrinum*, and also in the processes of contamination by the fungus in vegetable crops.

Keywords: Natural products, Eugenol, Antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotografia verso (A) e reverso (B) da colônia isolada de <i>Penicillium citrinum</i> em meio ágar batata dextrose.	20
Figura 2.	Microscopia <i>Penicillium citrinum</i>	21
Figura 3.	Laranjas acometidas por <i>Penicillium citrinum</i>	22
Figura 4.	Alvos de ação de drogas antifúngicas	24
Figura 5.	Diferentes mecanismos de multirresistência de células fúngicas.	26
Figura 6.	Estrutura química do eugenol.	29
Figura 7.	NPs Eu-CaCit: nanopartículas de citrato de cálcio incorporadas em eugenol.	56
Figura 8.	Processo de resolução e validação da estrutura 3D da enzima <i>Penicillium citrinum</i> CYP51.	59
Figura 9.	<i>Docking</i> molecular de fluconazol e eugenol com CYP51.	60
Figura 10.	Novos azóis à base de miconazol derivados do eugenol e do diidroeugenol apresentaram atividade antifúngica contra <i>Candida</i> spp. e <i>Cryptococcus gattii</i> com citotoxicidade irrelevante.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Cepas de <i>Penicillium citrinum</i> utilizadas nos ensaios.	34
Tabela 2.	Resultados da CIM (n=3) e CFM (n=3) e razão CFM/CIM do fitoconstituente eugenol ($\mu\text{g/mL}$) sobre cepas de <i>Penicillium citrinum</i> – técnica de microdiluição.	43
Tabela 3.	Resultados da CIM (n=3) e CFM (n=3), da anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) sobre cepas de <i>Penicillium citrinum</i> – técnica de microdiluição.	45
Tabela 4.	Efeito de eugenol frente cepas de <i>Penicillium citrinum</i> na ausência e presença de sorbitol 0,8M.	46
Tabela 5.	Efeito de eugenol frente cepas de <i>Penicillium citrinum</i> na ausência e presença de ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$.	47
Tabela 6.	Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) eugenol e anfotericina B frente cepas de <i>P. Citrinum</i> .	49
Tabela 7.	Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i> pkCSM de eugenol.	54
Tabela 8.	Propriedades toxicológicas <i>in silico</i> de eugenol e parâmetros de Lipinski, explorador da propriedade Osiris.	57
Tabela 9.	Valores de energia de ligação (ΔG) e constante inibitória (Ki) do fluconazol e eugenol contra a enzima CYP51.	60

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL frente a eritrócitos tipo A. 51
- Gráfico 2.** Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL frente a eritrócitos tipo B. 51
- Gráfico 3.** Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL frente a eritrócitos tipo O. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
5-FC	Fluorocitosina
ADMET	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Saboraud Dextrose
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
FLZ	Fluconazol
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OE	Óleo Essencial
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Gênero <i>Penicillium</i> : contaminação e infecção	19
2.2 Tratamentos Antifúngicos.....	23
2.3 Produtos naturais e o eugenol	27
2.4 Toxicidade	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Locais da pesquisa.....	33
4.1.1 Meios de cultura	33
4.1.2 Cepas de <i>Penicillium citrinum</i>	33
4.1.3 Fitoconstituente eugenol e antifúngico licenciados anfotericina B	34
4.1.4 Inóculo do microrganismo	34
4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35
4.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	36
4.2.3 Ensaio de associação através do método <i>Checkerboard</i>	36
4.2.4 Ação dos produtos na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol	37
4.2.5 Ação dos produtos sobre a membrana celular: Interação com ergosterol	38
4.2.6 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos	39
4.3 ENSAIOS <i>IN SILICO</i>.....	40
4.3.1 Triagem ADMET do eugenol.....	40
4.3.2 Previsões da estrutura 3D por AlphaFold2 e validação	41
4.3.3 Detecção do sítio ativo e formação de grid box	41
4.4.4 Preparação do ligante e molécula de proteína	41
4.5 Análises estatísticas	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	43
5.2 Investigação do mecanismo de ação antifúngico.....	45
5.2.1 Ação do eugenol na parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)	45
5.2.2 Ação do eugenol na membrana celular fúngica (ensaio com ergosterol).....	47
5.2.3 Ensaio de associação através do método <i>Checkerboard</i>	48
5.3 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos	50
5.4.1 Estudo ADMET <i>in silico</i>	53
5.4.2 Previsão e validação de estrutura tridimensional.....	58
5.4.3 Estudos de <i>docking</i>	59
6. CONCLUSÕES	63

1. INTRODUÇÃO

O reino Fungi é um dos mais heterogêneos do planeta, com funções celulares eucarióticas, diferentemente das bactérias. Atualmente, estima-se a existência de 4 milhões de espécies de fungos no planeta, em que cerca de 600 tipos são conhecidos como patógenos em humanos. Além disso, sua vasta pluralidade é indutora no resultado final da mudança biológica, elaborando funções essenciais desde a manutenção de um ecossistema harmônico assim como no processo de decomposição de matéria biológica (ASSAF *et al.*, 2020; VĚTROVSKÝ *et al.*, 2019; SHAFIEI *et al.* 2020).

Além disso, as espécies fúngicas são relatadas na literatura por suas toxinas presentes em grandes lavouras, atuando nas propriedades organolépticas dos produtos finais oriundos daquelas e assim afetando a economia de vários países (ARRUDA; BERETTA, 2019; INGOK *et al.*, 2020).

Inserido nesse contexto, um gênero de fungos que destaca-se é o *Penicillium*, pois possui grande importância na natureza, apresentando mais de 400 espécies presente nos ecossistemas (NICOLETTI *et al.*, 2023). Dentre essas, *Penicillium citrinum*, é recorrente em lavouras e há casos relatados que acometem humanos (TOGHUEO; BOYOM, 2020; COUTINHO *et al.*, 2020).

Nesse sentido, as infecções fúngicas, como a penicilose, acometem milhões de pessoas em todo mundo, principalmente, em pacientes imunossuprimidos e em locais onde o acesso a medicamentos é reduzido, como o continente africano e nas américas (LEE; PUUMALA; ROBBINS; COWEN, 2021). Somado a isso, a utilização precipitada e emergencial, contribuiu para o surgimento de patógenos multirresistentes. Sendo assim é de suma importância a descoberta de novas substâncias, para o desenvolvimento de terapias inovadoras, sejam elas conjuntas ou isoladas (IYER *et al.*, 2021).

Por esse lado, os produtos naturais têm conseguido uma função expressiva como fonte de descoberta de medicamentos e no benefício do processo de saúde. Logo, a busca por antifungicos naturais com amplo espectro de ação e potencial terapêutico tem estimulado o interesse científico, particularmente as moléculas de origem vegetal, já que as plantas detêm vasta capacidade de sintetizar substâncias químicas diversificadas como defesa

contra agentes patogênicos (AHMADI *et al.*, 2022; KEBEDE; GADISA; TUFA, 2021).

Desse modo, *Ocimum gratissimum* Lineu, da família Lamiaceae, conhecida como a alfavaca, presente em todo o estado brasileiro e apresenta inúmeras características e benefícios como aromatizante natural e na preparação de alimentos. Somado a isso, é utilizada na medicina como anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (UGBOGU *et al.*, 2021).

Na caracterização do perfil químico de *Ocimum gratissimum*, foi observado uma variedade de compostos, em que o majoritário é o eugenol (SANTOS *et al.*, 2021), conhecido como seguro pela Food and Drug Administration (FDA), apresentando propriedades, fungistáticas e fungicidas, principalmente por meio de terapias combinadas com outros antifúngicos (SHARIFZADEH; SHOKRI, 2020).

Nesse contexto, tornam-se necessários e de grande importância, estudos de novas moléculas naturais, e/ou sintéticas, com atividade biológica, como o eugenol, que possam exercer atividade antifúngica sobre o crescimento de espécies de fungos, mas particularmente sobre *Penicillium citrinum*.

Por isso, o recente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum*, assim como apurar seu mecanismo de ação, além de averiguar se o fitoconstituente apresenta um perfil toxicológico assegurado para uso terapêutico e/ou como biopesticida na agricultura e indústria de alimentos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Penicillium*: contaminação e infecção.

Os microrganismos, dentre eles os fungos, estão presentes praticamente em todos os ecossistemas de nosso planeta, podendo ser parasitas de animais e plantas, possibilitando doenças, mas também, podem viver em simbiose, onde irão ajudar plantas em vários processos, como a absorção de água e nutrientes (CAVALCANTE *et al.*, 2023). Além disso, têm um grande impacto negativo na saúde humana, acometendo pessoas com várias enfermidades como, a penicilose e meningite fúngica (JORDAN; BROTONS; PEREZ; GONZÁLEZ, 2021).

Os fungos são organismos que pertencem ao reino fungi, podendo ser unicelulares (leveduras), como também podem ser multicelulares (fungos filamentosos). Os fungos filamentosos têm grande capacidade de dispersão (AFONSO; SIMÕES; LIMA, 2021), sendo esses, presentes em vários ambientes, como hospitalares e grandes lavouras agrícolas (YOUSEFZADEH *et al.*, 2022).

Ademais, um dos maiores representantes dos fungos filamentosos, do filo Ascomycota, de disposição mundial, é o gênero *Penicillium*, cuja importância em vários campos, principalmente nos alimentos, na biotecnologia e medicina. Além disso, são produtores de uma grande quantidade de metabólitos secundários, como micotoxinas (citrinina), compostos antibacterianos, antifúngicos e imunossupressores (ASSAF *et al.*, 2020). São encontrados em vários habitats naturais, com baixas temperaturas, temperaturas acima de 50°C e alta salinização, atraindo pesquisadores devido ao interesse a condescendência a aecodepção (YADAV *et al.*, 2022).

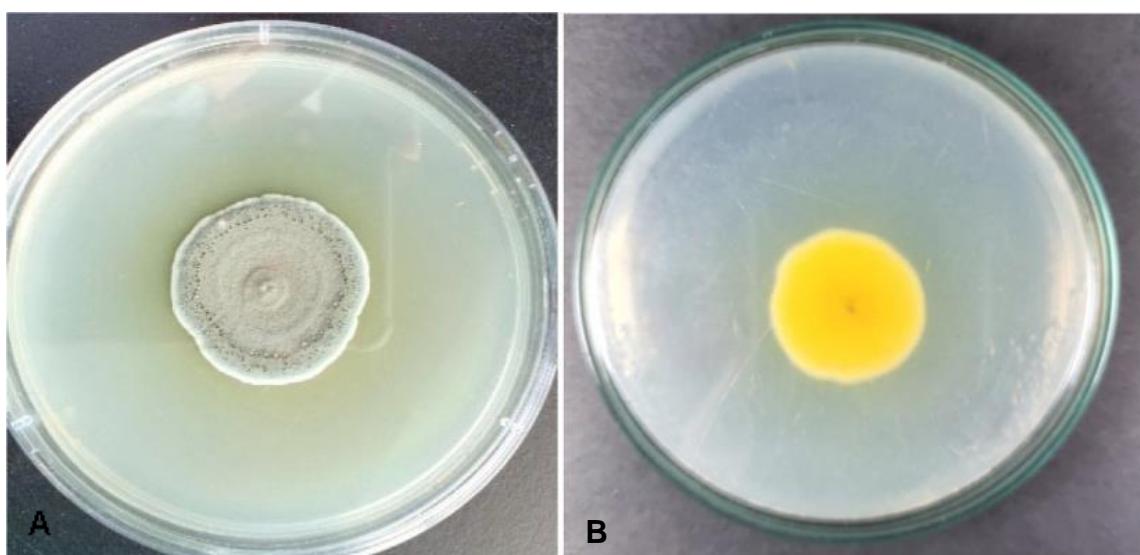
Dessa forma, uma estrutura indispensável para os fungos e sua sobrevivência, é a parede celular, principalmente pois oferece proteção contra os estresses do meio, assim, é um alvo importante para a idealização de drogas antifúngicas altamente seletivas, diagnósticos específicos e anticorpos terapêuticos (GOW; LENARDON, 2022).

Ainda nesse sentido, outra estrutura que merece destaque é a membrana citoplasmática dos fungos, que tem como principal constituinte os fosfolipídios, os quais possuem na sua constituição o ergosterol, determinando fluidez, permeabilidade e atividades das proteínas associadas à essa estrutura.

Problemas relacionados a biossíntese do ergosterol, causam defeitos a adaptação ao estresse e a sua proliferação celular. Além disso, alguns estudos publicados, demonstram que o ergosterol é necessário para a manutenção do DNA mitocondrial nos fungos (JORDÁ; PUIG, 2020).

Macroscopicamente, as colônias têm o crescimento rápido, verde-oliva em sua parte superior com a cor branca nos seus arredores, com uma cor branca e verde pálida no ínfero. Margens onduladas, superfície com características lanosas ou aveludada (Figura 1) (KUMAR *et al.*, 2023).

Figura 1. Foto de colônia em placa de petri de *Penicillium citrinum*.

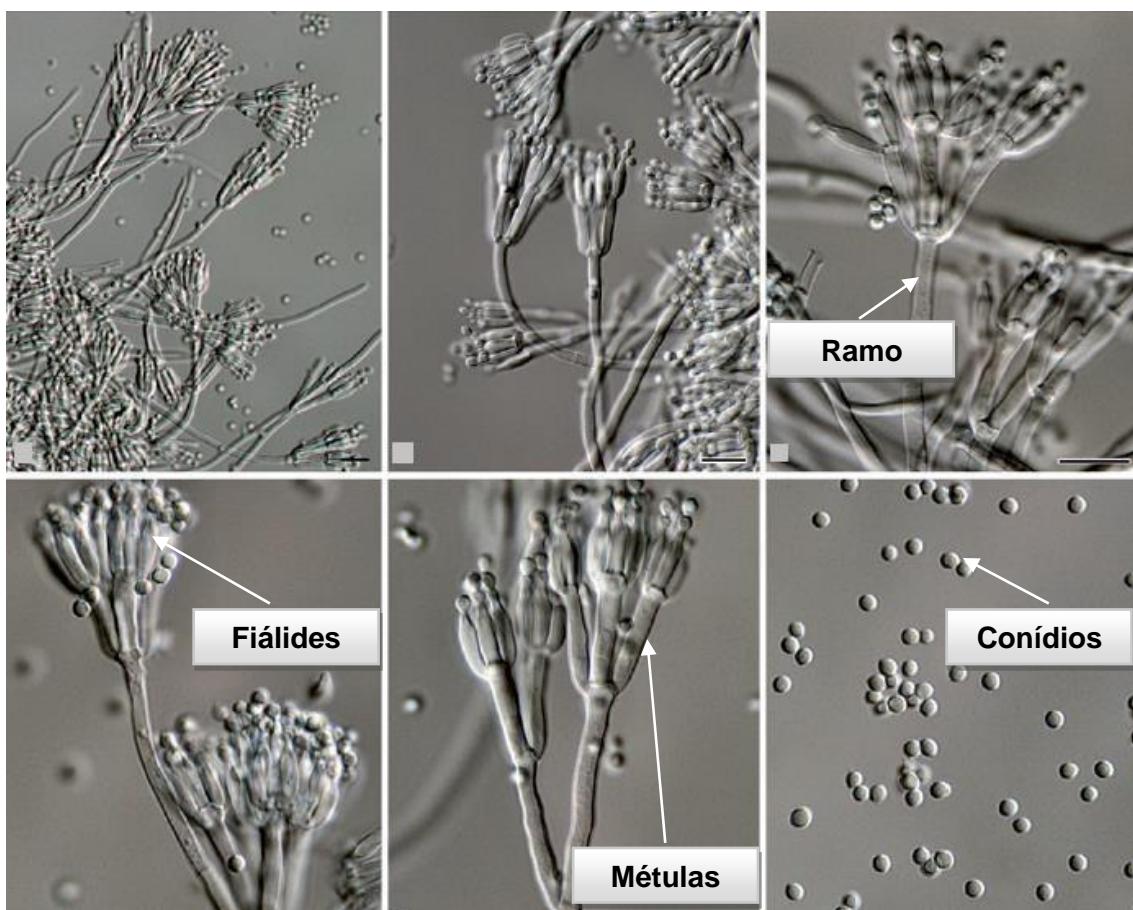


(A) Fotografia verso e reverso (B) da colônia isolada de *Penicillium citrinum* em meio ágar batata dextrose.

Fonte: (NGUYEN *et al.* 2023).

Microscopicamente nas espécies desse gênero (Figura 2), são visualizadas, hifas septadas e hialinas. A partir do micélio, conidióforos surgem em perpendicular à base, de forma encolhida ou avolumada, apresentando em seu cume, células conidiogênicas, chamadas fiáldes. Além disso, algumas espécies podem possuir ramificações chamadas râmulo, entre a métula e o ramo. Finalmente, tem-se os conídios que são unicelulares, hialinos globosos ou cilíndricos, onde sua parede pode ser rugosa e lisa (HOUBRKEN *et al.*, 2011).

Figura 2. Microscopia de *Penicillium citrinum*.



Culturas antigas de 7 dias, 25 °C. Estruturas predominantemente simetricamente biverticiladas e terverticiladas abundantemente produzido em isolados frescos; Fialides ampuliforme e Métulas em espirais; Conídios globosos a subgloboso, liso.

Fonte: HOUBRAKEN *et al.*, 2011.

Em relação as doenças causadas pelas espécies do gênero *Penicillium*, os primeiros relatos ocorreram em 1984 na Tailândia e em 1989 no Sudeste Asiático. Além disso, há uma associação com a ocorrência do vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), visto que é relatado que à proporção que a ocorrência de HIV aumentou, o número de casos de penicilose também aumentaram, indicando assim, que se trata de um agente patogênico oportunista. A forma de transmissão da penicilose, se dá através da inalação de esporos, afetando principalmente o trato respiratório, causando tosse, dispneia, febre e outros sintomas (HAKEEM *et al.*, 2023).

Dentre o agente etiológico da penicilose, podemos destacar *Talaromyces marneffei*, antes chamado de *Penicillium marneffei*, um dos poucos fungos dimórficos termicamente que acomete humanos, sendo primariamente,

um patógeno pulmonar que se espalha para os demais locais do corpo humano por meios linfáticos ou hematológico (PRUKSAPHON *et al.*, 2022). Mas, já é relatado atualmente na literatura, que outras espécies de *Penicillium* estão acometendo humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Como exemplo e bem atual, em março de 2021 na Índia, pacientes com a variante Delta (B.1.617.2) do coronavírus-2 (SARS-CoV-2), passaram a ser suscetíveis a infecções fúngicas, devido a seu imunocomprometimento, sendo um dos achados entre os enfermos, o gênero *Penicillium*, (AMBASTA *et al.*, 2022).

Em relação a localização do gênero, com maior intensidade, pode ser encontrado na agricultura, em grandes plantações de frutas, especiarias e cereais. No Brasil, devido à grande produção de frutas cítricas, existem muitas perdas econômicas, pois, há diversas doenças na pós-colheita dos frutos e especiarias por fungos, atingindo até 15% de toda a colheita. Assim, os principais fungos que acometem as frutas cítricas são *P. digitatum*, *P. citrinum* (Figura 3) e *P. italicum* (COUTINHO *et.al.*, 2020).

Figura 3. - Laranjas acometidas por *Penicillium citrinum*.



Fonte: COUTINHO *et al.*, 2020.

Penicillium citrinum, é encontrado como importante causador de mofo pós-colheita principalmente em frutas cítricas, e alguns estudos no Brasil, relatam também a presença de toxinas no milho e seus subprodutos com grandes níveis de contaminação (COUTINHO *et.al.*, 2020; SAVI; ZENAIDE; 2020). Dentre essas toxinas, a citrinina tem sua maior produção em temperaturas de 15-37 °C, onde seu maior rendimento obtido em 30 °C, sendo essa toxina

responsável por levar principalmente problemas renais, como necrose de células epiteliais e teratogenicidade (GUO *et al.*, 2019).

Apesar do potencial histórico como antibiótico, na descoberta da penicilina, esse fungo pode levar a casos graves como, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade, além disso, há cada vez mais o surgimento de cepas com resistências aos tratamentos atuais existentes no mercado, assim, é de suma importância a necessidade de novas substâncias que tenham ação contra esse fungo (TOGHUEO; BOYOM; 2020).

2.2 Tratamentos Antifúngicos

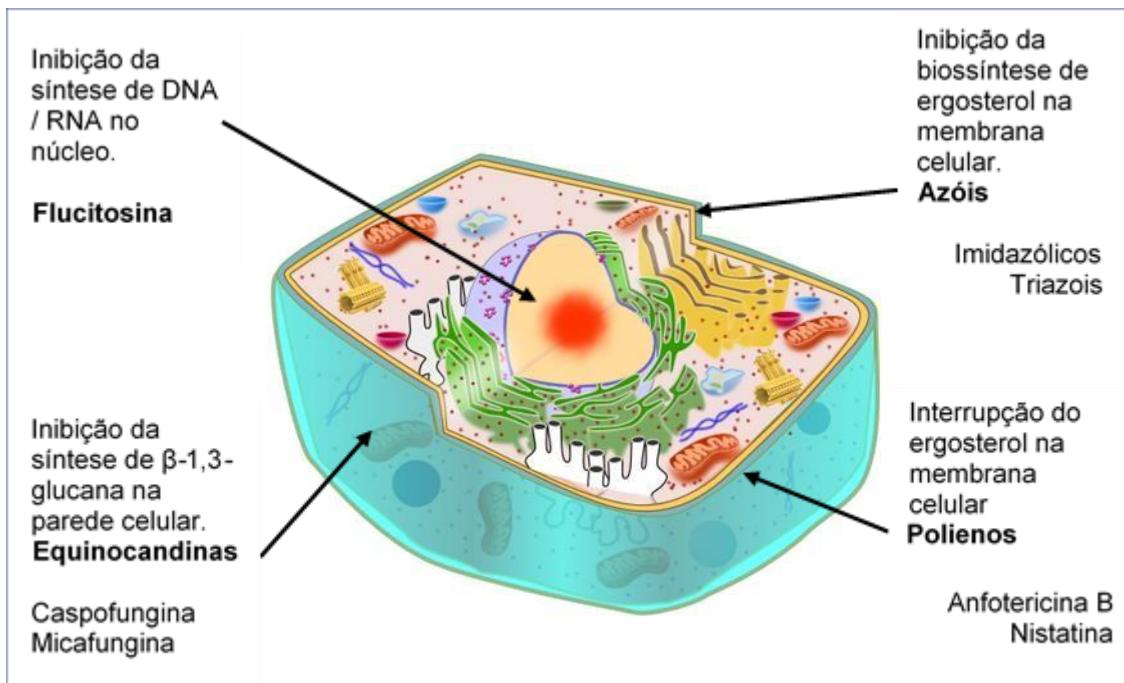
Ao comparar o arsenal disponível de antibacterianos existentes no mercado farmacêutico com a quantidade de antifúngicos, encontramos poucas classes de medicamentos e muitas vezes, restritos na sua utilização devido a problemas como toxicidades consideráveis e interações medicamentosas perigosas (MUHAJ *et al.*, 2022).

Com isso, a morbimortalidade por infecções fúngicas permanece alta, principalmente devido à demora para um diagnóstico preciso e rápido. Como consequência, dificilmente os pacientes têm acesso ao uso de um tratamento correto e eficaz, o que leva a profilaxias demoradas, que as vezes não surtem o efeito desejado, gerando um grande risco em pacientes que já se encontram altamente debilitados (JENKS *et al.*, 2020).

Atualmente, os antifúngicos mais conhecidos e utilizados são representados por quatro classes diferentes (Figura 4): azóis, como o voriconazol; equinocandinas, tais como micafungina; os análogos das pirimidinas, como a flucitosina, e finalmente os polienos, como a anfotericina B (SUN; HOY; HEITMAN, 2020). Além desses alvos, já se encontra na literatura, informações para tratamento fúngicos, incluindo terapias com citocinas, anticorpos monoclonais e imunoterapia celular (WILLIAMS; HARVEY; JAMES, 2020).

Os azóis, foram descritos no final dos anos 1960, inibem uma importante função das membras celulares dos fungos, a síntese de ergosterol. Para que a membrana tenha um controle na sua fluidez, assimetria e ser estável é preciso a presença do ergosterol (TRÉNOR; AHUIR; MARKUS, 2023).

Figura 4. Alvos de ação de drogas antifúngicas.



Fonte: Adaptado de Carmo (2023).

Essa classe, aumenta a permeabilidade da célula fúngica, trazendo a sua aniquilação, através da inibição da enzima, lanosterol 14- α -desmetilase (ou CYP51), responsável pela modificação do lanosterol em 14-desmetil lanosterol na via biossintética do ergosterol. O CYP51 estimula a modificação do grupo 14- α -metil do lanosterol em 14- α -hidroximetil e, posteriormente, em 14- α -carboxialdeído (TEIXEIRA *et al.*, 2022). Dentre os azóis, de acordo com a quantidade de nitrogênios presentes no anel, existem os imidazólicos, como o cetoconazol e clotrimazol, e os triaziois, que inclui o fluconazol, voriconazol e itraconazol (BÁEZ *et al.* 2020).

Nas décadas de 1980 e 1990 foram descobertos as equinocandinas, esses agentes diminuem a unidade das paredes celulares dos fungos, parando a síntese de glucana por meio da enzima 1,3- β -D-enzima glucana sintase, rompendo assim, a parede celular fúngica levando a morte da célula. A micafungina e a caspofungina são exemplos dessa classe de antifúngicos (BADER *et al.*, 2018).

Outras classes de antifúngicos são os análogos das pirimidinas, onde a flucitosina (5-fluorocitosina – 5FC) é um agente antimetabólico, classificado como antifúngico sistêmico, aprovado pela FDA em 1971 para o tratamento de infecções graves por *Candida* e *Cryptococcus* (PADDA; PARMAR, 2023).

Quando administrada, o resultado farmacológico da flucitosina só ocorre na presença de células fúngicas e a ação não atua nas células de mamíferos. Após a administração, a 5-FC é absorvida pela citosina-permease na célula fúngica e desaminada em 5-fluorouracila 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 (MEDEIROS, 2023).

Por fim, a anfotericina B é um dos principais representantes dos polienos, sendo efetiva em várias infecções fúngicas. O mecanismo de ação da anfotericina B se dá pela ligação com o ergosterol, que resulta na criação de poros na membrana fúngica e, em consequência, ocorre extravasamento de substâncias intracelulares, levando à morte celular (PALHARES, 2022).

A anfotericina B também age com o colesterol nas membranas celulares humanas, o que é responsável pela sua alta toxicidade. Com isso, pacientes que fazem seu uso, apresentam vários efeitos colaterais como febre, anafilaxia, perda de potássio e magnésio, além de encefalopatia desmielinizante, e sua administração a longo prazo está associado à anemia normocrômica e normocítica (NOOR; PREUSS, 2023).

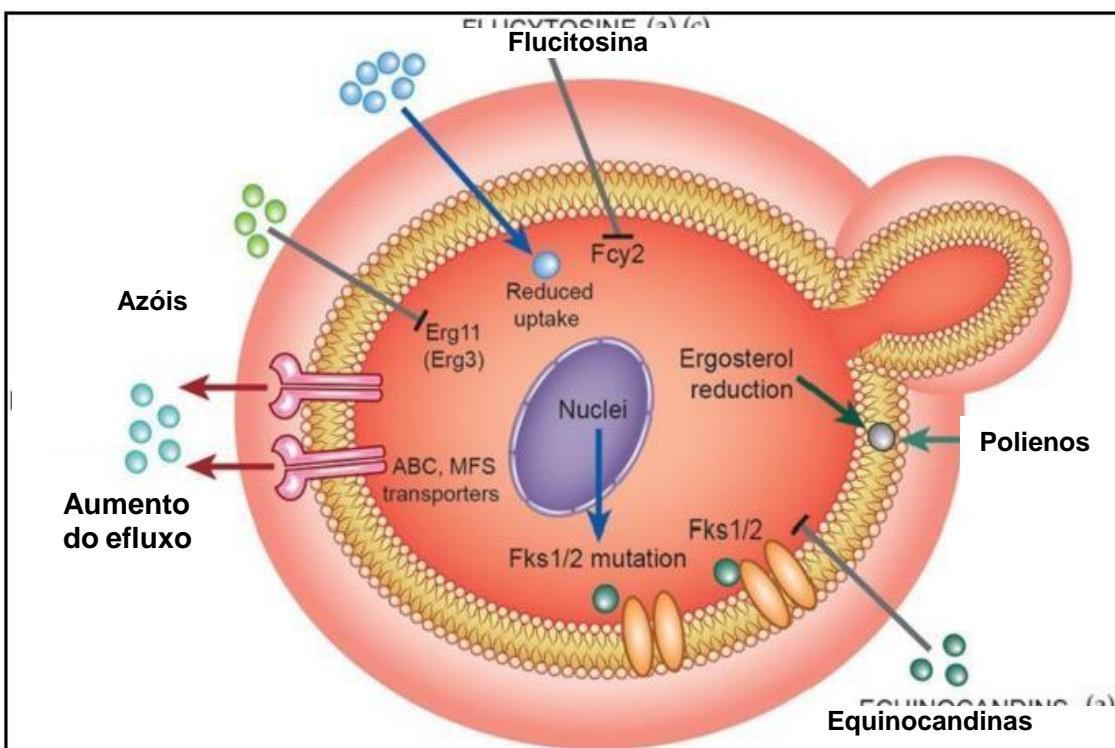
Muitas espécies de fungos desenvolveram uma evolução rápida para resistir ao arsenal presente na terapêutica, mesmo quando há combinação entre as classes disponíveis em alguns casos. A alta resistência fúngica, está ligada a evolução de genomas altamente adaptáveis, com altas taxas de mutação e com uma regulação na expressão de genes, como os que codificam os alvos de drogas ou bombas de efluxo de drogas (Figura 5) (SUN; HOY; HEITMAN, 2020).

Ainda nesse contexto, mecanismos de resistência dos fungos (Figura 5) como os azóis, modificam a parede celular ou membrana plasmática, trazendo à irregular absorção do fármaco e modificações na compatibilidade do alvo do medicamento (gene *ERG11*).

Já nos polienos, como a anfotericina B, foram verificadas mutações em genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, ERG 6 e ERG 11, portanto a diminuição do ergosterol na membrana celular. No caso da resistência intrínseca à flucitosina, dentre alguns mecanismos, citamos a consequência de mutações na purina citosina permease (Fcy2), perturbando a captagem celular do fármaco. Finalizando, os fungos podem adquirir mutações no gene FKS1, que conferem

sensibilidade diminuída à 1,3- β -D-glucano sintase para a classe das equinocandinas (MEDEIROS, 2023).

Figura 5. Diferentes mecanismos de multirresistência de células fúngicas.



As bolas coloridas mostram moléculas de antifúngicos. Fcy2 (purina citosina permeasse); Erg11 (gene biossíntese do ergosterol); ABC (proteínas transportadoras de membrana pertencentes aos transportadores ATP-binding cassette); MFS (principal superfamília facilitadora); FKS (gene para β (1,3) -d-glucana sintase).

Fonte: Adaptado de MEDEIROS, 2023.

Foi narrado que alguns antifúngicos, vêm sendo utilizados na agricultura através da pulverização para o controle de bolores que prejudicam vegetais, e com isso, observou-se o aumento na resistência pelo *Penicillium digitatum*, através de mutações em enzimas como a CYP51 (BRAUER et. al., 2019).

Além da resistência, foi demonstrado através de estudos em ratos, que o fungicida utilizado no controle de pragas em plantações chamado imazalil, do grupo do imazalil, sendo inibidor da síntese do ergosterol, causou em ratos, aumento da incidência de câncer de tireoide e fígado (<https://www.adapar.pr.gov.br/>: Consulta 23/10/2023).

2.3 Produtos naturais e o eugenol

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios das civilizações para tratar diversos problemas, entre eles gastrointestinais e na pele, sendo aqueles, fontes de uma gama diversificada de compostos biologicamente ativos importantes que funcionam na planta para desenvolvimento e sua proteção, sendo vital para sua sobrevivência nos ambientes (DENG *et al.*, 2020). Esses compostos são chamados de metabólitos primários e secundários, que são produtos de transição do metabolismo da planta, restrito em pequenas moléculas (AMINAH *et al.*, 2021).

Muitos desses metabólitos são estudados para verificar suas propriedades farmacológicas e com isso serem aplicados em tratamentos para doenças existentes, possuindo grandes diversidades em sua estrutura química e na sua atividade biológica (DENG *et al.*, 2020; MALIK; TALIE; AHMAD, 2022). A Food and Drug Administration (FDA), em 2019, cita que, dos 38 medicamentos aprovados, havia nove medicamentos obtidos de produtos naturais (TORRE; ALBERICIO, 2020).

Assim, pode-se citar os óleos essenciais (OE), obtidos a partir de fontes naturais, apresentando-se como líquidos oleosos e altamente voláteis. Nas plantas são extraídos por destilação a vapor ou extração por solvente de folhas, caules, raízes e outras partes. Possuem múltiplos compostos, que determinam suas propriedades físicas, químicas e biológicas e além disso, são utilizados pelas plantas, na defesa contra pragas. Ainda nesse contexto, sua composição, pode ser altamente variada devido ao habitat, época de colheita e método de extração, assim como qual a parte da planta utilizada, podendo ter a presença de terpenos, fenóis, entre outros (OMAR; KORDALI, 2019).

Ademais, com grande aplicação em várias áreas, os OE destacam-se na perfumaria com seus aromas e fragrâncias. Além disso, algumas espécies de plantas vêm sendo também utilizadas para a estabilidade e conservação de alguns alimentos, apresentando inibição no crescimento de bactérias e fungos, tornando-se assim, bastante recorrente a procura de alimentos do tipo *clean-label*, ou seja, alimentos mais saudáveis que substituem os velhos aditivos artificiais por alternativas naturais (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2021).

Devido ao amplo uso tradicional de plantas medicinais pela população, foi criado pelo Ministério da Saúde do Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, visando o uso racional de vegetais com fins terapêuticos. Dentro dessa política foi criada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, RENISUS, com mais de 71 espécies de plantas nativas e que permitam a utilização para tratamento complementar de algumas doenças entre os brasileiros, dentre das quais está presente a espécie *Ocimum gratissimum* (MARMITT *et al.*, 2020).

Ocimum gratissimum, conhecida como alfavaca ou folha-de-cheiro, é uma planta herbácea da família Lamiaceae, nativa da África e Ásia e presente em todo Brasil, sendo bastante utilizada na culinária. Em adição, existem seus benefícios medicinais contra a febre, cólicas menstruais, calmante, infecções genitourinárias e potencial antimicótico (UGBOGU *et al.*, 2021).

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* apresentou atividade antifúngica em alguns estudos contra fungos como *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*, enquanto os extratos etanólico e aquoso de suas folhas inibiram o crescimento de fungos como *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum* (VILANOVA *et al.*, 2019).

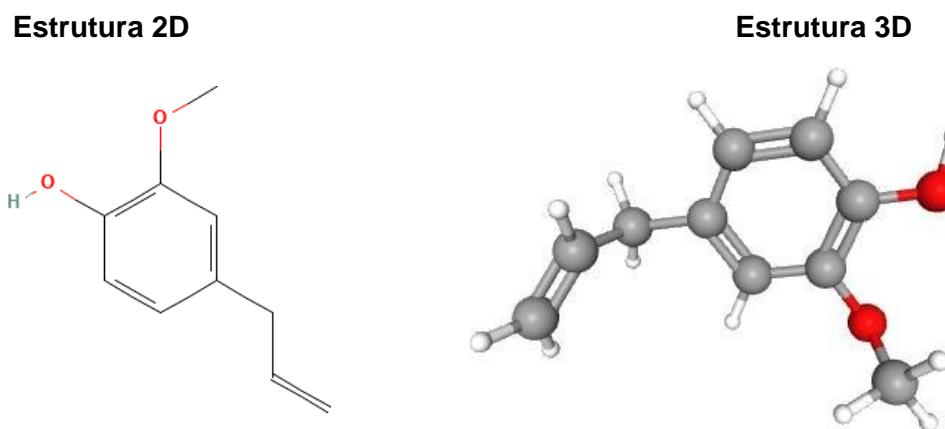
Propriedades, podem ser atribuídas a presença de diversos compostos, como os alcaloides, taninos e flavonoides. Em um estudo com *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum*, os compostos majoritários encontrados foram o eucaliptol e eugenol, sendo o produto com maior quantidade, cerca de 89%, o eugenol (VASCONCELOS *et al.*, 2021).

O eugenol, foi isolado pela primeira vez em 1929, é também conhecido como 2-metoxi-4-[2-propenil] fenol (Figura 6). Tem como característica cor clara a amarelo pálido, com consistência oleosa e aroma picante, sendo um composto aromático fenólico da classe dos fenilpropanóides, envolvidos em respostas de estresse bióticos e sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina (DIDEHDAR *et al.* 2021).

Diversas atividades farmacológicas já foram relatadas para o eugenol como propriedades anestésicas, antidepressivas, ansiolíticas, antibacteriana, antiviral, efeito antiproliferativo contra cânceres de várias origens e antifúngicas. Além disso, tem aplicações como aromatizante em alimentos e produtos farmacêuticos, ademais, o eugenol é utilizado para biocontrole na agricultura contra fungos e bactérias (ZARI; ZARI; HAKEEM, 2021).

A organização mundial de saúde (OMS), e alimentação e cultura, aconselhou uma dose por dia considerável, de 2,5 mg/kg de peso corporal humano, segura. A mesma organização mostrou segurança, sendo o eugenol não mutagênico e nem cancerígeno ((TALEUZZAMAN *et al.* 2021).

Figura 6 - Estrutura químicas do eugenol.



Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol (2023).

Ademais, foi descrito que emulsões de eugenol em associação com limonina tem atividade contra a espécie *Penicillium italicum*, no seu crescimento miscelial, germinação de esporos, morfologia de micélio e permeabilidade da membrana, em decorrência de peroxidação lípida, podendo ser utilizado como substituto na para inibição do crescimento do mofo azul (LI *et al.*, 2021).

Em várias perspectivas para o combate ao câncer, o eugenol tem grande potencial observado em vários estudos, principalmente quando utilizado a tecnologia de nanopartículas que visa melhorar a concessão de medicamentos antitumorais em locais mais específicos, diminuindo efeitos adversos (ZARI; ZARI; HAKEEM, 2021).

Em 2018, foi realizado uma investigação *in silico* da atividade do isômero do eugenol, isoeugenol, contra o *Penicillium citrinum*, em que foi verificado a atividade fungicida contra essas cepas. Estes dados mostram que o eugenol é um candidato potencial no tratamento de doenças causadas por essa espécie e é necessário a continuação de estudos que levem a confirmação dessa atividade bem como o mecanismo de ação (FERREIRA *et al.*, 2018).

2.4 Toxicidade

Existe um grande risco na saúde dos seres humanos consumidores de produtos naturais por acreditarem que os mesmos são inofensivos e que não provocam mal à saúde. As plantas mais comumente utilizadas pela população são bastante estudadas, mesmo assim, é necessário um maior cuidado para sua utilização, principalmente em pacientes de risco como mulheres grávidas, idosos e crianças, pois a presença de substâncias tóxicas em sua composição é um ponto de atenção para o ser humano e animais (YAN *et al.*, 2022; MIHAJLOV *et al.*, 2020).

Definir o potencial citotóxico de um determinado fitoconstituente, é um parâmetro preferencial para o progresso e comercialização de produtos, visto que alguns compostos químicos podem provocar efeitos adversos à população. É imprescindível a realização de testes hemolíticos em compostos naturais de potencial notável para o desenvolvimento de medicamentos (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Assim, a análise de possíveis reações citotóxicas em eritrócitos humanos é um modelo experimental *in vitro* seguramente utilizado para apurar a toxicidade e proteção celular para uma grande variedade de substâncias (DANTAS, 2017).

Somado a isso, devido a toxicidade relatada na literatura do eugenol, é importante estimar, *in silico*, novos estudos sobre sua toxicidade, para determinar assim, sua segurança e eficácia, deliberando parâmetros farmacocinéticos e dinâmicos, através de ferramentas de previsão, com uma capacidade futura de aplicação terapêutica para o tratamento de infecções causadas por espécies fúngicas.

Ferreira (2018), através da caracterização toxicológica do isoeugenol, frente *Penicillium citrinum*, verificou *in vitro* através do potencial hemolítico, que o composto não foi citotóxico para os eritrócitos sorotipo A e B. Outrossim, o extrato das folhas do *Syzygium cumini*, que apresenta em suas flores, eugenol, causou hemólise, a depender da concentração, em eritrócitos humanos, enquanto as hemácias do grupo sanguíneo O apresentaram maior vulnerabilidade, mesmo em menores concentrações (JUNIOR *et al.*, 2021).

Nesse panorama, é de extrema importância estudar e avaliar a ação do eugenol, como molécula bioativa sobre os fungos da espécie *Penicillium*

citrinum, associado a isso, investigar o seu mecanismo de ação, a fim de buscar futuras descobertas de constituições antifúngicas mais efetivas para combate de fungos desse gênero.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a atividade antifúngica do fitoconstituente eugenol contra cepas de *Penicillium citrinum*.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum*;
- ✓ Investigar possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos ou indiferentes de eugenol individuais e associados a antifúngico padrão pela Técnica de *Checkerboard*;
- ✓ Determinar a possível ação do eugenol na parede celular fúngica e membrana citoplasmática;
- ✓ Avaliar o potencial hemolítico em eritrócitos humanos;
- ✓ Analisar *in silico* a toxicidade e os parâmetros farmacocinéticos do eugenol;
- ✓ Estudar as interações moleculares do eugenol com a enzima fúngica lanosterol 14 α -demetilase (CYP51) através do *docking* molecular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais da pesquisa

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia (LM) /Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos / DCF do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e o Laboratório da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas/CTRS/UFCG/PATOS/PB. Os referidos laboratórios dispõem de estrutura, substâncias, materiais e equipamentos adequados e suficientes para a execução dos experimentos descritos.

4.1.1 Meios de cultura

Para a manutenção das amostras do fungo *Penicillium citrinum* e realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica dos produtos, foram utilizados, respectivamente os meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio de cultivo líquido RPMI (Instituto Roswell Park Memorial) 1640 com glutamina e sem bicarbonato da Sigma-Aldrich/Merck/Brasil, que foram preparados e mantidos conforme recomendações dos fabricantes. Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos, seguindo as recomendações dos fabricantes.

4.1.2 Cepas de *Penicillium citrinum*

Para a realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas 12 cepas de *P. citrinum* (tabela 1), isoladas de materiais biológicos no Laboratório de Micologia DCF/CCS/UFPB, João Pessoa/Paraíba. As amostras do fungo foram mantidas em tubos de ensaio (15X150 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado (Difco®) sob refrigeração (8º C) até o momento da realização do ensaio. As cepas de *P. citrinum*, que foram utilizadas na execução da pesquisa, estão cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN) sob o código AC2DA0C.

Tabela 1. Cepas de *Penicillium citrinum* utilizadas nos ensaios.

<i>Pecillium citrinum</i>	Origem	<i>Pecillium citrinum</i>	Origem
ATCC-28752	<i>American Type Culture Collection</i>	LM-183	unhas- mãos
LM-15	ambiente	LM-217	Pele-pernas
LM-21	ambiente	LM-309	Secreção-pulmão
LM-29	Unhas-mãos	LM-321	pele-pernas
LM-74	Pele-feridas	LM-521	ambiente
LM-157	Unhas - pé	LM-918	ambiente

Fonte: Elaboração própria (2023).

4.1.3 Fitoconstituinte eugenol e antifúngico licenciados anfotericina B

Os produtos utilizados na execução das metodologias, foram os seguintes: eugenol e o antifúngico padrão, a anfotericina B, todos da Sigma-Aldrich/Merck/Brasil. Os produtos foram pesados e devidamente solubilizados em 150 µL (3% v/v), de dimetilsulfóxido (DMSO), (Dinâmica Química Contemporânea Ltda/Brasil), e adicionados 100 µL (2% v/v) de Tween 80, (Inlab Confiança/Brasil), complementando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5mL. A partir da concentração inicial do eugenol e da anfotericina B, de 1.024 µg/mL, foi feita uma diluição em série até 0,5 µg/mL. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014).

4.1.4 Inóculo do microrganismo

As linhagens fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura ASD, por 10-14 dias, a temperatura de 28 a 30°C, com a finalidade de atingirem o crescimento. Para o preparo da suspensão das linhagens, as colônias fúngicas foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9 % p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de inoculação em “L”, foram obtidas as suspensões. A composição obtida de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio (15x150mm) esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do

aparelho Vortex (FANEM), comparando-se e ajustando-se, posteriormente, sua turbidez com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Por fim, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões foram ajustadas no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN *et al.*, 2004; SANTOS; HAMDAN, 2005).

4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleenland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das moléculas do eugenol e da anfotericina B padrão sobre cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (microplaca fundo U c/ tampa estéril individual – Cralplast) contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI 1640, duplamente concentrados nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL de cada produto foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 até 0,5 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL das suspensões fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma cepa fúngica. Paralelamente, foram realizados os controles: microrganismo (RPMI + suspensão de *P. citrinum*), para comprovação da viabilidade das cepas; meio de cultura (RPMI), para comprovação da sua esterilidade. As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura ambiente de 28-30 °C / 5-7 dias. O produto foi considerado ativo quando inibiu visivelmente, pelo menos, 50% dos microrganismos utilizados nos ensaios de atividade biológica (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HAFIDH *et al.*, 2011). A Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi considerada e interpretada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 500 µg/mL = forte atividade; 600 - 1600 µg/mL = moderada atividade; > acima de 1600 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ

et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi expresso pela média aritmética das CIMs obtidas nos ensaios.

4.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Em seguida, a partir da CIM, foi realizada a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Inicialmente, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada inibição do crescimento fúngico (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionadas a 100 µL de caldo RPMI contidos em novas placas de microdiluição / 96 poços-Cralplast e incubadas a 28-30º C por 5-7 dias. A CFM foi considerada como sendo a menor concentração do produto teste capaz de inibir visivelmente o crescimento dos microrganismos. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (SALIE, ESGLES, LENG, 1996; NCUBE, AFOLAYAN, OKOH, 2008; BALOUIRI, SADIKI, IBNSOUDA, 2016). Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura e de viabilidade das espécies fúngicas ambos no caldo RPMI 1640. A investigação do modo de ação do produto teste, a partir da razão CFM/CIM, considerou a metodologia utilizada por Santos et al. (2014), para especificar a natureza do efeito antimicrobiano. Dessa forma, substâncias com a razão CFM/CIM ≤ 4, são consideradas fungicidas; e quando obtida uma razão CFM/CIM > 4, fungistáticas.

4.2.3 Ensaio de associação através do método *Checkerboard*.

O efeito da associação do produto com o antifúngico licenciado de escolha Anfotericina B, foi determinado através da técnica de *checkerboard* para derivação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

Para realização desse ensaio, 100 µL de RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato foram distribuídos na placa de 96 cavidades, com fundo em forma de "U" Cralplast. Posteriormente, 50 µL da substância teste em diversas concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8) foram adicionados no sentido vertical e 50 µL do antifúngico anfotericina B em diferentes concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8), foram adicionados no sentido horizontal da microplaca. Por último, foram acrescentados 20 µL da suspensão fúngica, previamente ajustados de acordo

com o tubo 0,5 da escala McFarland. As microplacas foram incubadas a 28°C por 72 horas, e após esse período, foi feita a leitura para observar a presença ou não do crescimento fúngico visível (WHITE *et al.* 1996).

Todos os controles foram aplicados com o objetivo de atestar a ausência de interferência pelos agentes emulsificantes, a esterilidade do meio de cultura utilizado e a viabilidade dos microrganismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, onde $CIFA = CIM$ do produto A na combinação $\div CIM$ do produto A individual e $CIFB = CIM$ do produto B na combinação $\div CIM$ do produto B individual. Posteriormente, o ICIF foi calculado através da equação:

$$\boxed{ICIF = CIFA + CIFB.}$$

O ICIF foi interpretado da seguinte forma: *sinergismo* ($ICIF \leq 0,5$); *aditividade* ($ICIF > 0,5$ e < 1); *indiferença* ($ICIF \geq 1$ e < 4); ou *antagonismo* ($ICIF \geq 4,0$) (LEWIS *et al.* 2002; CORREA-ROYERO *et al.* 2010).

4.2.4 Ação dos produtos na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol

Este método se baseia na medida dos danos que o produto avaliado, com atividade antifúngica, produz aos componentes da parede celular fúngica. Caso o produto atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos.

A determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” e em triplicata. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido CSD previamente adicionado de sorbitol ($PM = 182,17$) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Posteriormente, 100 µL do produto avaliado, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 do produto natural e, no caso do sorbitol,

uma concentração final de 0,8 M em cada cavidade. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo fúngico nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de microrganismo foi realizado distribuindo 100 µL nas cavidades do mesmo CSD e sorbitol (0,8 M), 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico padrão. As placas foram seladas e incubadas a 28º C por até 8 dias para ser realizada a leitura (FROST *et al.*, 1995).

4.2.5 Ação dos produtos sobre a membrana celular: Interação com ergosterol.

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando danos à membrana celular fúngica. Caso os efeitos dos produtos testes sobre a célula fúngica sejam devido à ligação ao ergosterol presente na membrana, pode-se verificar se esses produtos interagem diretamente com o esterol. Pois, na presença de ergosterol exógeno no meio de cultura ocorrerá prevenção na ligação dos produtos ao ergosterol da membrana. Dessa maneira, as CIM's dos produtos tendem a aumentar na presença do ergosterol exógeno, porque precisará de uma concentração muito maior deles para que possam interagir com ergosterol da membrana fúngica.

A determinação da CIM dos produtos contra cepas fúngicas foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U". O meio de cultura (CSD) foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®). Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD e ergosterol nas mesmas concentrações e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico padrão anfotericina B, visto que possui mecanismo de ação conhecido, no qual ocorre interação com ergosterol da membrana para servir de controles positivos dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 8 dias para ser realizada a leitura (ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.2.6 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos A, B e O.

Amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras do eugenol em diferentes concentrações foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Todo esse processo tem como número do parecer 6.076.256 do comitê de ética do Centro Universitário de Patos – UNIFIP, na Plataforma Brasil. CAAE: 68900423.7.00005181.

4.3 ENSAIOS *IN SILICO*

4.3.1 Triagem ADMET do eugenol

Os expedientes utilizados por meio de computadores, podem contribuir para a descoberta de medicamentos à base de produtos naturais, sendo um grande apoio para a continuação das descobertas de novas fases de sucesso. Em comparação com outras abordagens experimentais utilizadas, o investimento utilizado para experiências *in silico* parecem quase irrelevantes (CHEN; KIRCHMAIR, 2020).

O eugenol foi submetido à ferramenta farmacocinética on-line pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsmprediction>) para prever suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas mais relevantes. As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) analisadas incluem parâmetros de absorção, como hidrossolubilidade, permeabilidade ao Caco-2, absorção intestinal, permeabilidade cutânea, substrato ou inibição das P-glicoproteínas I e II. Também foram avaliados parâmetros de distribuição, como volume de distribuição em estado estacionário (VDss), fração não ligada às proteínas plasmáticas, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) e permeabilidade do sistema nervoso central (SNC). Além disso, foram investigados aspectos relacionados ao metabolismo, como substrato ou inibidores das isoformas do citocromo P450, bem como a excreção, representada pela depuração total do fármaco. Por fim, foram analisadas a toxicidade AMES, hepatotoxicidade e toxicidade oral aguda em ratos (LD50) (PIRES, *et al.*, 2015).

Ademais, foram realizadas previsões das propriedades de similaridade do eugenol com produtos farmacêuticos licenciados utilizando as ferramentas online Osiris Property Explorer (<https://www.organicchemistry.org/prog/peo/>) e Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>) (DAIANA, *et al.*, 2017). Os resultados foram interpretados com base na regra dos cinco de Lipinski, que estabelece que a maioria das moléculas "semelhantes a drogas" deve apresentar $cLogP \leq 5$, peso molecular (MW) ≤ 500 Da, número de acetores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ($nHBA \leq 10$) e número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 ($nHBD \leq 5$). Portanto, moléculas que violam mais de uma dessas regras podem apresentar problemas de biodisponibilidade (LIPINSKI *et al.*, 2001).

4.3.2 Previsões da estrutura 3D por AlphaFold2 e validação

Subjacente à indisponibilidade da estrutura 3D cristalizada da CYP51 de *P. citrinum*, realizou-se modelagem molecular a partir da sequência de aminoácidos da enzima, obtida do NCBI com número de acesso BAC20565.1 e com o auxílio do programa AlphaFold2 implementado pelo ColabFold. O código do ColabFold está disponível gratuitamente e utiliza uma máquina virtual para a síntese dos modelos (JUMPER, *et al.*, 2021; VARADI, *et al.*, 2022).

A conformação do modelo previsto pelo AlphaFold2 foi validada por meio do diagrama de Ramachandran. A análise dos ângulos de torção phi (Φ) e psi (Ψ) foi realizada utilizando o servidor online PROCHECK para calcular a conformação do modelo previsto. Além disso, o modelo também foi submetido a uma verificação adicional utilizando o servidor online MolProbity para confirmar sua avaliação (SOBOLEV, *et al.*, 2020).

4.3.3 Detecção do sítio ativo e formação de grid box

Utilizando o software visualizador Discovery Studio (DS), 2021, foram identificados os sítios ativos das enzimas alvo. Em seguida, foi realizado o mapeamento em grade para direcionar o ligante eugenol, a fim de procurar sua região de forte afinidade com o sítio ativo da proteína. A grade utilizada para a proteína CYP51 de *P. citrinum* tinha dimensões de $40 \times 40 \times 40$ pontos, com um espaçamento de 0.375 Å entre os pontos da grade. Esses pontos foram centrados no ligante, nas coordenadas da proteína em estudo ($0.766, 0.835$ e -4.153). A criação da grade teve como objetivo buscar uma interação promissora e oferecer melhor suporte durante o encaixe, considerando a orientação, posição e conformação do receptor (REPASKY, *et al.*, 2007).

4.4.4 Preparação do ligante e molécula de proteína

Utilizando o Auto Dock Tools (ADT) versão 1.5.6 do Scripps Research Institute, foram adicionados átomos de hidrogênio com natureza polar ao modelo AlphaFold2 previsto para CYP51 fúngica. Além disso, cargas de Kollman foram atribuídas a cada átomo, e os átomos de hidrogênio não polares foram incorporados à estrutura da proteína. As estruturas resultantes foram salvas no formato de arquivo PDBQT para análises posteriores no ADT (WESTERMAIER,

et al., 2015). Em seguida, foram realizados a preparação da estrutura 3D do ligante eugenol. Essa estrutura foi obtida do PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato de entrada '.sdf'. Após a análise do estado de protonação no software Marvin Sketch 18.08.0, o arquivo foi carregado e pré-otimizado no software Avogadro 1.2.0 em pH 7,4, utilizando o campo de força MMFF94 recomendado para moléculas orgânicas. Após a pré-otimização, foi criado o arquivo de entrada '.mop' para otimização no programa Mopac2012, no nível PM7, gerando uma saída no formato '.pdb'. Em seguida, as cargas AM1-BCC foram adicionadas usando o software UCSF Chimera 1.16, e o arquivo foi salvo no formato '.mol2' (HANWELL, *et al.*, 2012; MOPAC, 2016; PETTERSEN, *et al.*, 2004). O arquivo '.mol2' do ligante foi então convertido em arquivo PDBQT, utilizando processos como detecção de raiz, seleção de torção e definição do número de torções, por meio do ADT. A simulação de *docking* molecular entre o ligante e a enzima foi realizada utilizando o conjunto de *docking* Autodock 4.2, empregando o algoritmo genético e Lamarckiano (MORRIS, *et al.*, 2009).

4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas neste estudo foram definidas conforme as especificidades de cada ensaio microbiológico realizado. Para isso, foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias, considerando o valor de $p < 0,05$.

Para a análise estatística dos testes toxicológicos, foram utilizados testes matemáticos definidos de acordo com a característica do experimento utilizando o software GRAPH PAD PRISM 7. Os resultados foram considerados significativos quando apresentaram valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) retrata um parâmetro fundamental na análise de vulnerabilidade de um microrganismo a substância escolhida, em que o método de diluição em caldo torna-se um dos mais adequados para determinar tal concentração de forma quantitativa e qualitativa, provada pela falta de crescimento fúngico (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os resultados do ensaio de avaliação da atividade antifúngica do eugenol frente cepas *Penicillium citrinum* estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da CIM (n=3) e CFM (n=3) e razão CFM/CIM do fitoconstituente eugenol ($\mu\text{g/mL}$) sobre cepas de *P.citrinum* – técnica de microdiluição.

Cepas	Eugenol		CFM/CIM	EFEITO	Anfotericina B	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)			Microrganismo	Meio de Cultura
ATCC-28752	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-15	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-21	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-29	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-74	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-157	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-183	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-217	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-309	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-321	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-521	1	1	1	Fungicida	+	-
LM-918	1	1	1	Fungicida	+	-

(+): Crescimento microbiano no meio de cultura; (-): Ausência de crescimento microbiano no meio de cultura. Fonte: Elaboração própria (2023).

Analizando a Tabela 2, observa-se que o eugenol na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, inibiu o crescimento de todas as cepas (100%) usadas no ensaio para a avaliação da atividade antifúngica. A atividade antifúngica do eugenol foi considerada satisfatória contra as cepas testadas (até 500 $\mu\text{g/mL}$ = forte atividade). Em 0,5 $\mu\text{g/mL}$, não correu inibição visível as cepas testadas.

Em relação a CFM, pode-se observar que os resultados apresentam em realação a CIM, 100% de equivalência. Para os valores de CIM=CFM e CIMx2, as cepas de *P.citrinum* não apresentaram crescimento, sendo o contrário, demonstrado na diluição CIMx4. Além disso, foi observado também, que a razão entre CFM/CIM utilizada para descrever o efeito do eugenol sobre o *P. citrinum*, foi fungicida (<4), de acordo com a classificação de FARSHORI *et al.* (2010); SIDDIQUI *et al.* (2013).

Existem indícios favoráveis de que fitoquímicos podem inibir o crescimento de fungos em concentrações diferentemente baixas e as suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) estão ao nível dos medicamentos antifúngicos com melhores resultados (PRAJAPATI *et al.* 2022).

Yanakiev (2020) relatou em sua revisão, que o eugenol é majoritário na constituição (cerca de 90%) em espécies *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*, concentrações inibitórias mínimas de 15,62 µg/mL contra uma espécie de *Candida albicans* resistente ao fluconazol.

Santos *et al.* (2021), investigaram a ação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e todas suas frações, principalmente o eugenol, e a concentração 1 µg/mL, apresentou importante e maior ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, sendo este, presente com frequência em pacientes imunossuprimidos.

Já em relação ao gênero *Penicillium sp.*, a espécie causadora de mofo em culturas pós-colheita (frutas e hortaliças), *Penicillium chrysogenum*, o extrato do *Ocimum campechianum* (eugenol 49,18%) apresentou CIM de 220 µg/mL (SOUZA *et al.* 2022). Ferreira (2018), a partir de do isoeugenol, relatou que a CIM foi de 32 µg/mL em cepas de *P. citrinum* de origem clínica e ambiental.

Sendo assim, esse resultado corrobora grande relevância, visto que na literatura, há poucos estudos que apresentam valores próximos ao estudo do pesquisador em questão.

Na Tabela 3, tem-se a determinação da CIM e CFM de um antifúngico padrão, a anfotericina B, onde o mesmo apresentou a CIM de 32 µg/mL para 11 das 12 cepas e a CFM também de 32 µg/mL para 50% das cepas.

De acordo com a classificação de Sartoratto *et al.* (2004), a atividade antifúngica da anfotericina B foi considerada ótima. A partir da CIM da anfotericina B, foi observado crescimento a partir da concentração 128 µg/mL na cepa (LM-183), e em relação a CFM, também se verificou crescimento ligada a

mesma cepa, além de LM- 29, LM-157, LM-217, LM-521, LM-918, sendo todas também de origem clínica. A anfotericina B inibiu 92% das cepas testadas de *P. citrinum*, apresentando menor capacidade de inibição de acordo com esse ensaio em comparação com o fitoconstituente em estudo, eugenol.

Tabela 3. Resultados da CIM (n=3) e CFM (n=3) da anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) sobre cepas de *P.citrinum* – técnica de microdiluição.

Cepas <i>P. Citrinum</i>	Anfotericina B		Controle	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	Microrganismo	Meio de Cultura
ATCC-28752	32	32	+	-
LM-15	32	32	+	-
LM-21	32	32	+	-
LM-29	32	+	+	-
LM-74	32	32	+	-
LM-157	32	+	+	-
LM-183	+	+	+	-
LM-217	32	+	+	-
LM-309	32	32	+	-
LM-321	32	32	+	-
LM-521	32	+	+	-
LM-918	32	+	+	-

(+): Crescimento microbiano no meio de cultura; (-): Ausência de crescimento microbiano no meio de cultura. Fonte: Elaboração própria (2023).

A anfotericina B, chega a acometer 80% dos pacientes com nefrotoxicidade devido sua alta interação com esteróis presentes nas células renais, promovendo assim, hipocalêmia, acidose metabólica e diminuição da taxa de filtração glomerular e existindo em muitos casos, um risco aumentando de mortalidade (SALES; FORESTO, 2020). Portanto, há uma necessidade urgente de opções alternativas de novos tratamentos à base de produtos naturais como o eugenol.

5.2 Investigação do mecanismo de ação antifúngico

5.2.1 Ação do eugenol na parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)

A membrana plasmática e a parede celular, como já foram descritas anteriormente, são os principais alvos dos fármacos antifúngicos. Sendo assim, foi verificado se o eugenol agia sobre a parede celular do *Penicillium citrinum*,

realizando o ensaio do sorbitol (tabela 4), utilizado como protetor osmótico para estabilizar o protoplasto dos fungos, e a partir daí foi comparado com os valores da CIM dos produtos na ausência ou presença de sorbitol (FROST *et al.*, 1995).

De acordo com Escalante *et al.* (2008), se o produto apresentar ação sobre a parede celular do fungo, ocorrerá lise das células fúngicas na ausência desse suporte osmótico e crescimento da CIM na presença do sorbitol.

Tabela 4. Efeito do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum* na ausência e presença de sorbitol 0,8M.

Cepas <i>P. Citrinum</i>	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Eugenol	
	Sem Sorbitol	Com Sorbitol
ATCC-28752	1	1
LM-15	1	1

Fonte: Elaboração própria (2023).

Verificou-se que as linhagens de *P. citrinum*, não sofreram alterações na parede celular na presença ou ausência de sorbitol, demonstrando assim, que o eugenol não atua pela instabilidade da parede celular, mas através de outro mecanismo.

Existe uma carência de dados atuais da ação do eugenol na parede celular do *Penicillium citrinum*, impedindo uma argumentação mais objetiva para esse resultado. Entretanto, Ferreira (2018), explanou que o isoeugenol, sintetizado a partir do eugenol, demonstrou que possivelmente o fitoconstituente não agia modificando a parede celular do *Penicillium citrinum*.

No entanto, Didehdar *et al.* (2022), em sua revisão, referiu-se que a parede celular de *Candida albicans*, sofreu várias lesões após tratamento com o eugenol e que outras 76%, tinham redução da biossíntese de ergosterol.

Perante a esse resultado e da negativa dessa hipótese, da ação antifúngica do eugenol na parede celular do *Penicillium citrinum*, foi apurado se o funcionamento contra o fungo em questão, foi por causa de prejuízos via comunicação com o ergosterol da membrana citoplasmática.

5.2.2 Ação do eugenol na membrana celular fúngica (ensaio com ergosterol)

O principal esterol fúngico é o ergosterol, sendo essencial para o bom funcionamento celular, determinando uma boa fluidez, permeabilidade e outras funções associados a membrana, além de estimular seu crescimento e proliferação.

Isso é confirmado por Escalante *et al.* (2008), que demonstrou, que quando a ação antifúngica do produto for causada pela ligação ao ergosterol, a existência de ergosterol exógeno irá barrar a ligação do produto ao da membrana celular fúngica, de forma que o produto desenvolverá complexos com o exógeno, ao invés da membrana, tendo como resultado o aumento na sua CIM, em comparação ao controle sem adição de ergosterol.

Dessa forma, na Tabela 5, observou-se os valores da CIM do eugenol contra as cepas de *P. citrinum*, na presença ou ausência do ergosterol, ao qual não sofreu alteração, parecendo assim, que a execução do eugenol ao fungo em estudo, aparenta não acontecer pela interação direta com o ergosterol.

Tabela 5. Efeito do eugenol frente a cepas de *Penicillium citrinum* na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL.

Cepas <i>P. citrinum</i>	CIM (µg/mL)			
	Eugenol		Anfotericina B	
	Sem Ergosterol	Com Ergosterol	Sem Ergosterol	Com Ergosterol
ATCC-28752	1	1	32	512
LM-15	1	1	32	512

Fonte: Elaboração própria (2023).

Como controle foi utilizado a anfotericina B, que é um polieno macrolídeo com cadeias insaturadas onde seu principal mecanismo de ação é efetivado através da união aos esteróis da membrana fúngica, sobretudo o ergosterol, gerando a formação de canais nas células fúngicas cavando o conteúdo citoplasmático, provocando danos oxidativo e posteriormente morte celular. Além disso, foi recentemente descrito que a anfotericina B age de forma a extrair o ergosterol da membrana, influenciando em sua instabilidade (MELERO; RODRÍGUEZ, 2021).

Ainda na Tabela 5, ocorreu um aumento, como esperado, no CIM da anfotericina B para as duas linhagens de *Penicillium citrinum* avaliadas, com a adição do ergosterol. Com isso maiores quantidades de ergosterol adicionados ao meio, foram necessárias maiores quantidades de anfotericina B para produção dos mesmos efeitos nas cepas de *Penicillium citrinum*, sendo evidenciado pelo o aumento do CIM.

Novamente, Ferreira (2018), descreveu que o isoeugenol não teve interação com o ergosterol adicionado as quatro cepas de *Penicillium citrinum*. Não é descartado, que outros mecanismos de ação na membrana plasmática, como inibição enzimática e consequente falha na biossíntese do ergosterol, podem ser utilizados pelo eugenol para produzir efeito antifúngico em *Penicillium citrinum*, como relatado em outros estudos com espécies de fungo como *Botryosphaeria dothidea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, causadores de mofo em maçãs pós-colheita (WANG *et al.* 2023)

ZHAO *et al.* (2021) demonstraram em seus resultados, que o eugenol inibiu efetivamente a biossíntese do ergosterol no fungo *Rhizoctonia solani*, diminuindo a expressão da C-4 metil esterol oxidase, aumentando a permeabilidade da membrana prejudicando o transporte de vários nutrientes.

Logo, infere-se que o mecanismo de ação do eugenol não está envolvido com a interação com membrana ou parede celular nesse estudo. Na literatura, é certificado que o eugenol e outros fenóis, coibem a biossíntese de ergosterol e também inibem bombas de efluxo em *C. albicans* e outras espécies, ocasionando a reversão da resistência aos medicamentos entre esses patógenos (ALAM *et al.*, 2023).

5.2.3 Ensaio de associação através do método *Checkerboard*.

A terapia combinada de fitoconstituintes com alguns antifúngicos, tem como finalidade da diminuição da toxicidade e aumento do sucesso do tratamento, além de reduzir os casos de resistência (DHANDAPANI *et al.*, 2021).

A combinação de fármacos antifúngicos é uma estratégia que pode ser benéfica quando as interações medicamentosas são sinérgicas, principalmente quando se trata dos casos de infecção por organismo resistente. Por essa razão, quando o tratamento convencional não supre as expectativas do resultado esperado, a interação com antifúngicos é um dos principais agravantes que

levam aos pesquisadores procurarem essas combinações na busca de eficácia terapêutica (RAFFETIN *et al.*, 2018).

Através do método *Checkerboard*, achou-se o ICIF (Índice da concentração inibitória fracionada) (Tabela 6) em tem-se a combinação *in vitro* do antifúngico anfotericina B, mais comumente utilizado na penicilose e do fitoconstituente em estudo eugenol, sendo classificada como sinérgica quando $\leq 0,5$, indiferente entre ≥ 1 e <4 , antagonista $\geq 4,0$ ou aditivas por entre $>0,5$ e <1 .

Tabela 6. Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) eugenol e anfotericina B frente cepas de *P. Citrinum*.

<i>Cepas P. citrinum</i>	Eugenol	Anfotericina B	Eugenol + Anfotericina B	Resultado
	CIF ($\mu\text{g/mL}$)	CIF ($\mu\text{g/mL}$)	ICIF ($\mu\text{g/mL}$)	
ATCC-28752	1	0,125	1,125	Indiferença
LM-15	1	0,125	1,125	Indiferença

CIF – Concentração Inibitória Fracionária; ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionária.

Fonte: Elaboração própria (2023).

De acordo a propositura de LEWIS *et al.* (2002), esse resultado comprova que não aconteceu interação entre os compostos, pois não houve mudança na CIM em nenhum momento, considerando a associação do eugenol com a anfotericina B como indiferente para as cepas de *P. citrinum* testadas. Efeito indiferente ocorre quando o mecanismo de um fármaco não interfere no mecanismo de ação do outro.

Uma informação expressiva, no atual estudo, é que não ocorreu antagonismo entre os dois produtos testados. É relevante que não exista esse tipo de interação entre dois produtos associados, uma vez que, mesmo na falta de sinergismo, por vezes, é preciso associar duas substâncias diferentes, com objetivos distintos, seja para prevenir a emergência de resistência, aumentar o espectro de ação dos produtos ou reduzir os efeitos tóxicos (DANTAS, 2017).

Existe uma escassez de estudos recentes, tratando o resultado da combinação de anfotericina B com produtos naturais, sobre cepas de *Penicillium citrinum*. Porém, em relação a *Candida albicans*, um ensaio relata a combinação do eugenol com a anfotericina B, em que o resultado foi uma atividade maior, em

comparação com o tratamento de componente único, influenciando assim, na diminuição da concentração tóxicas do antifúngico (KHAN *et al.*, 2019).

Curiosamente sobre a combinação de componentes ativos, como o eugenol, timol e carvacrol do OE de *Origanum vulgare* contra *Penicillium verrucosum*, foi relatado que seu Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), não mostrou interação entre os componentes, permitindo assim, a utilização combinada em alguns alimentos para alimentação e conservação (SCHLOSSER; PRANGE, 2018).

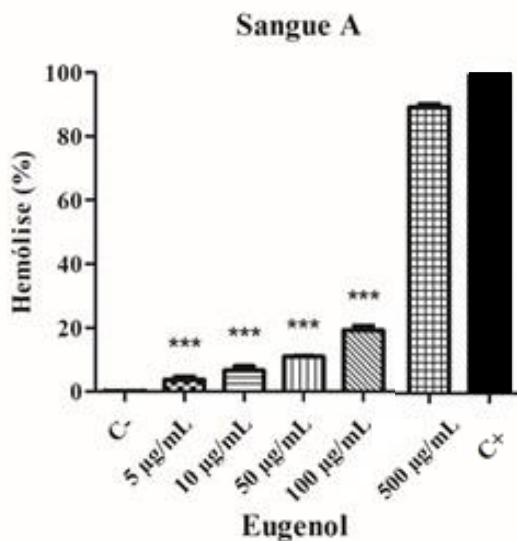
5.3 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos.

Em um espaço fisiológico dentro de uma hemácia normal, o conteúdo com maior quantidade é a hemoglobina com 97%, cuja a função de transporte de gases nos humanos e outros animais. Uma ruptura na membrana que protege esse material citosólico irá influenciar no comportamento normal e toda funcionalidade normal nos tecidos (GÓMEZ, *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais e seus fitoconstituintes, tem caráter lipofílico e alta afinidade pelas membranas celulares, podendo ocorrer efeitos citotóxicos com atividade hemolítica a depender de sua composição química, ocorrendo assim, mudanças na célula fúngica, sendo esse teste de grande importância para validação da toxicidade do eugenol (BEHBAHANI *et al.*, 2019).

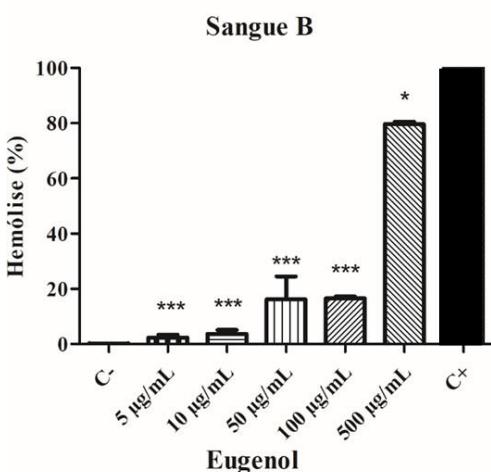
Nos gráficos 1, 2 e 3, o eugenol produziu baixa hemólise, respectivamente nos eritrócitos humanos do tipo A B e O, quando correlacionado ao controle positivo.

Gráfico 1. Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a eritrócitos tipo A.



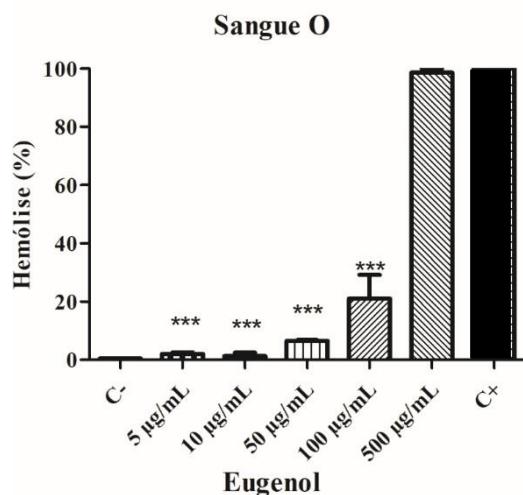
C-: Controle negativo suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). C+: Controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X 100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. analisados pelo teste t. * $p<0,05$ comparado ao controle positivo.

Gráfico 2. Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a eritrócitos tipo B.



C-: Controle negativo suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). C+: Controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X 100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. analisados pelo teste t. * $p<0,05$ comparado ao controle positivo.

Gráfico 3. Atividade citotóxica do eugenol nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL frente a eritrócitos tipo O.



C-: Controle negativo suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). C+: Controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X 100. Os dados foram expressos como média ± e.p.m. analisados pelo teste t. * $p<0,05$ comparado ao controle positivo.

Os resultados desses testes, indicaram que o eugenol retratou baixa atividade hemolítica (< 40% de hemólise) em comparação ao controle positivo para a maioria das concentrações testadas, nos três tipos de eritrócitos, A, B e O. Nas concentrações mais altas, porém, a atividade hemolítica do eugenol, variou de moderada (40-80% de hemólise) a alta (> 80% de hemólise), conforme tipo sanguíneo (Rangel *et al.*, 1997).

Em concentrações antifúngicas (CIM \leq 5 µg/mL), eugenol demonstrou baixa atividade hemolítica em eritrócitos humanos de todos os tipos sanguíneos. Diante disso e comparando com o resultado obtido na determinação da CIM, de 1µg/mL, nesse estudo, o eugenol guia para uma avaliação positiva em relação a toxicidade, o que é interessante para uso terapêutico porvir.

A partir dos resultados encontrados nessa avaliação, pode-se conduzir a uma análise otimista da citotoxicidade do eugenol. Com grande relevância para verificar a segurança desse composto, esse dado tem um grande significado, considerando que o eugenol é achado em plantas utilizadas na medicina popular, além disso é associado em diversos gêneros de higiene pessoal, como perfumes e cremes, além de serem utilizados como aromatizantes em alimentos, e que com a existência de uma citotoxicidade, fica restrito sua utilização (Ferreira, 2018).

5.4 ENSAIOS *IN SILICO*

5.4.1 Estudo ADMET *in silico*

A antevisão de propriedades farmacocinéticas nas primeiras fases da descoberta de um medicamento, são indispensáveis para conduzir novas diligências. O arranjo correto da farmacodinâmica e farmacocinética, incluindo alta potência, afinidade e seletividade contra o alvo molecular, somado a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade tolerável adequadas (ADMET), são condições cruciais para medicamentos eficazes (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019).

Com um objetivo de investigar informações farmacocinéticas do eugenol, foram obtidos aspectos importantes de relevância farmacológica, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos *in silico* pkCSM de eugenol.

Propriedades	Nome do Modelo	Valor Previsto	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	-2.25	Numérica (log mol/L)
	Permeabilidade de Caco2	1.559	Numérica (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
	Absorção Intestinal (humano)	92.041	Numérico (% Absorvido)
	Permeabilidade da pele	-2.207	Numérica (log K _p)
	Substrato da Glicoproteína-P	Não	Categorial (Sim/Não)
	Inibidor da Glicoproteína P I	Não	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor da Glicoproteína P II	Não	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	Volume de distribuição no estado estacionário (humano)	0.24	Numérico (log L/kg)
	Fração não ligada (humana)	0.251	Numérica (F _u)
	Permeabilidade BHE	0.374	Numérica (log BB)
	Permeabilidade SNC	-2.007	Numérica (log PS)
Metabolismo	Substrato CYP2D6	Não	Categórico (Sim/Não)
	Substrato CYP3A4	Não	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor CYP1A2	Sim	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor CYP2C19	Não	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor CYP2C9	Não	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor CYP2D6	Não	Categórico (Sim/Não)
	Inibidor CYP3A4	Não	Categórico (Sim/Não)
Excreção	Total Clearance	0.282	Numeric (log ml/min/kg)
	Substrato Renal OCT2	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	AMES Toxicidade	Sim	Categórico (Sim/Não)
	Hepatotoxicidade	Não	Categórico (Sim/Não)
	Sensibilização da pele	Sim	Categórico (Sim/Não)
	Toxicidade aguda oral em ratos	2.118	Numérica (mol/kg)

Fonte: Elaboração própria (2023).

Notavelmente, o eugenol exibe importante taxa de absorção intestinal (superior a 30%), embora apresente baixa solubilidade em água e permeabilidade cutânea relativamente limitada ($\log K_p > -2,5$). Além disso, esse fitoconstituente possui a capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) ($\log B_B > 0,3$) e entrar no sistema nervoso central (SNC) ($\log P_S > -2,0$). No entanto, deve-se mencionar que o volume de distribuição no estado estacionário (V_{Dss}) é baixo, tendo que ser ($\log V_{Dss} > 0,45$), e cerca de 75% do eugenol pode estar ligado a proteínas plasmáticas.

Ademais, o eugenol parece não interferir com as principais isoenzimas do complexo citocromo P450 (CYP450), exceto a CYP1A2, a qual o monoterpeno parece atuar como inibidor, e sua depuração é majoritariamente por excreção renal. Correspondendo a quase 15% das enzimas hepáticas, a CYP1A2 metaboliza medicamentos como o antipsicótico clozarpina e o popular propranolol utilizado para o controle da pressão arterial (GUO *et al.* 2021).

A planta *Piper cubeba* L., que tem como principais componentes o eugenol (33,95%) e o metileugenol (41,31%), certifica a inibição da CYP1A2 em seu estudo. Já, Zehetner (2019), em sua tese, cita que o eugenol pode estar incluído na atenuação da formação de compostos carcinogênicos por meio da inibição de enzimas como CYP1A1 e 1A2, as duas tidas por estarem implicadas na intensificação de carcinógenos.

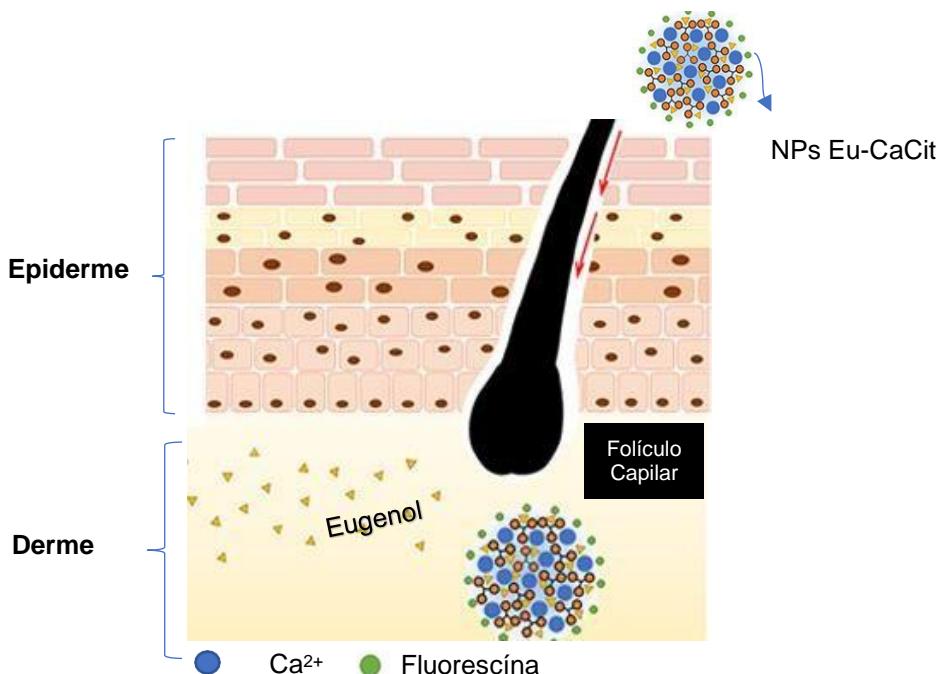
Outrossim, na Tabela 7, foi previsto que o teste de AMES, que é um método para detecção de agentes mutagênicos (Bruce Ames *et al.* 1973) nesse caso aqui, *in silico*, apontou que o eugenol tem um valor previsto positivo para induzir a mutações genéticas. Andrade *et al.* 2020, comparou o eugenol a

medicamentos utilizados com grande frequência pela população como o paracetamol e aspirina, apresentando como resultados, semelhanças toxicológicas entre os mesmos. Tal analogia é ainda maior entre o eugenol e a aspirina, provavelmente porque possuem estruturas químicas mais semelhante.

Ainda em relação a toxicidade, por estarem presentes na constituição de vários produtos, entre eles os cosméticos, sempre existiu até hoje, a preocupação dos efeitos tóxicos *in vivo* do eugenol inclusive em relação a pele (ULANOWSKA *et al.*, 2021). Somente para o isoeugenol, diversos produtos de beleza e cuidados pessoais estão referenciados em bases de dados, e perto de 50% desses produtos foram registrados nos últimos 5 anos (AHN *et al.* 2023).

Em relação ao teste de toxicidade *in silico* da sensibilização em pele, de acordo com o valor previsto o mesmo não condiz para usos futuros. No entanto, no estudo de Cherdchom *et al.* (2021), foi comprovado *in vivo*, a utilização de técnicas que atenuam a sensibilização, e que possa culminar em uma diminuição considerável na irritação a nível de pele. Modelos (Figura 7) utilizando nanopartículas (quitosana ou citrato de cálcio), servem de veículos tópicos, melhorando a estabilidade de medicamentos hidrofóbicos e capacidade de reduzir a toxicidade (CHERDCHOM *et al.*, 2021).

Figura 7. NPs Eu-CaCit: nanopartículas de citrato de cálcio incorporadas em eugenol



Fonte: ACS Ômega, 2021.

Continuando os testes *in silico* para uma possível toxicidade, foi utilizado o dispositivo OSIRIS (Tabela 8), revelando que o eugenol contém grupos químicos (OH-) com potencial mutagênico, tumorigênico e irritante, embora não interfira nos processos de reprodução. Barboza *et al.* (2018), demonstrou que a toxicidade do eugenol em polpas dentárias de humanos, provoca danos no DNA em pequenas concentrações, o que não acontece em grandes concentrações.

Vários relatos mostram o uso do eugenol, como redutor no risco de cânceres como de sangue, cólon, estômago, mama e pele, além de muitas avaliações *in vitro* demonstrarem supressão de metastases, supressão de

linhagens de células cancerígenas e a indução de apoptose em células de câncer de cólon HTB37 (BEGUM *et al.* 2022; ESMEETA *et al.* 2022).

Tabela 8 – Propriedades toxicológicas *in silico* do eugenol e parâmetros de Lipinski, explorador da propriedade Osiris.

Propriedades toxicológicas		Parâmetros Lipinski's	
Mutagênico	Sim	Massa Molecular (g/mol)	164.20
Tumorigênico	Sim	TPSA	29.46
Irritante	Sim	Semelhança com drogas	-2.78
Efeito Reprodutivo	Não	Pontuação de drogas	0.11
-	-	nHBA	2.0
-	-	nHBD	1.0
-	-	cLogP	2.27
-	-	cLogS	-2.05

TPSA: Área de Superfície Polar Topológica, cLogP = Coeficiente de partição n-octanol/água, cLogS = coeficiente de solubilidade em água. Fonte: Elaboração própria (2023).

Ademais, demonstrou potencial genotóxico em macrofágos peritoniais de camundongos em todas concentrações, mas conforme protocolo de tratamento, mostrou potencial antigenotóxico, o que pode estar relacionado ao seu efeito no metabolismo do medicamento.

Vijayasteltar *et al.* (2016), utilizando um extrato polifénolico, com a presença de eugenol nos botões de cravo, avaliaram através de via oral em ratos Wistar, toxicidade crônica (90 dias) e aguda (5 a 14 dias). Em seus resultados, não foi observado alterações toxicologicamente comportamentais consideráveis clinicamente e nem em exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos quando administrados com doses de 0,25 a 1g/kg de peso corporal.

Já para os critérios fundamentais da regra dos cinco de Lipinski, que avalia a probabilidade de um composto exibir boas propriedades farmacocinéticas e, portanto, potencial para ser um fármaco oral eficaz, o eugenol teoricamente, deteria de uma reunião de resultados, onde seria plausível deduzir, que estaria adequado a ser um medicamento administrado por via oral, levando em conta os parâmetros avaliados: MW ≤ 500Da, logP ≤ 5, nHBA ≤ 10 e nHBD) ≤ 5.

Apesar de existir grandes pesquisas sobre toxicidade relativos aos efeitos tóxicos do eugenol, os resultados são ainda muito limitados. Especialmente sobre a toxicidade crônica e genotoxicidade. Diferentes propriedades e atividades do eugenol não são bem explicados, devendo ser mais explorados através de pesquisas em animais de longo prazo *in vitro* e *in vivo*.

5.4.2 Previsão e validação de estrutura tridimensional

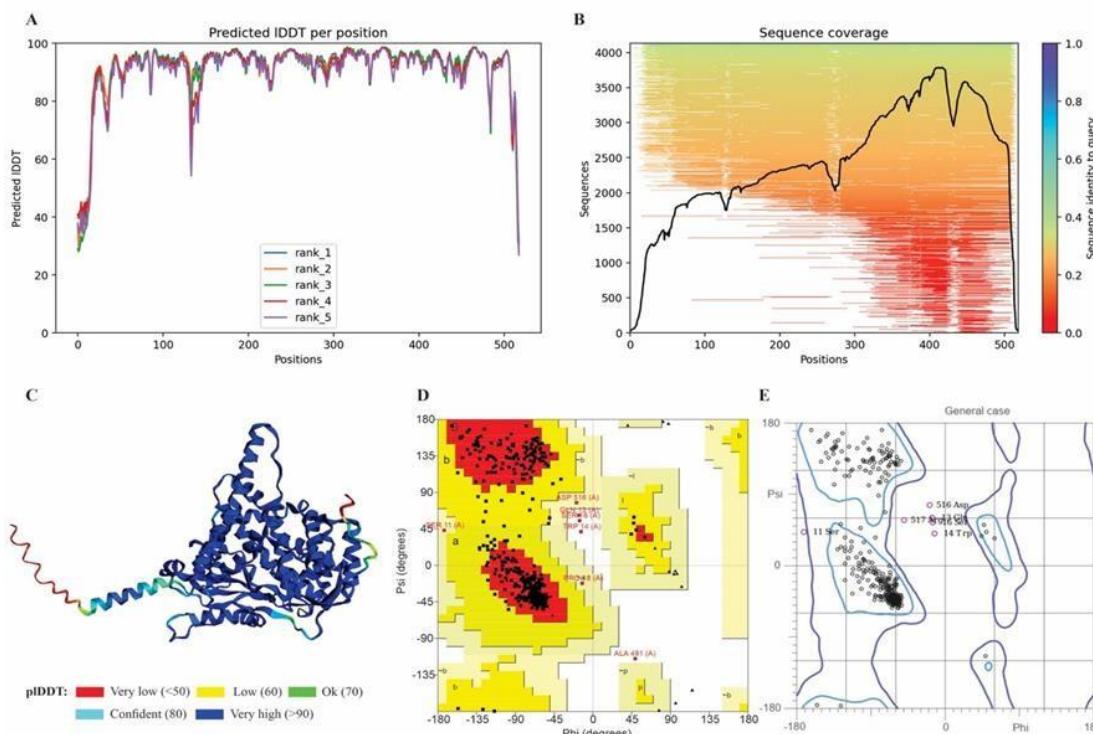
Para validar os ensaios bioquímicos, modelos CYP51 de *P. citrinum* que foram preditos por AlphaFold2 e obtidos em formato PDB. O servidor AlphaFold2 da ColabFold é uma ferramenta para previsões de estruturas de proteínas. Ele gera previsões de alta qualidade da estrutura 3D de moléculas de proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos (VARADI *et al.*, 2022).

Neste estudo, verificou-se que a CYP de *P. citrinum* com 518 aminoácidos foi modelado adequadamente o que pode ser observado na Figura 8. Na Figura 8A, tem-se a métrica do teste de diferença de distância local predita (pLDDT) que está associado com a segurança da antevisão da estrutura, proporcionando uma métrica superior para apontar as regiões ordenadas e desordenadas (WILSON, *et al.*, 2022), no qual independe da sobreposição estrutural prévia da proteína, onde foi superior a 91%, portanto é modelo com alta precisão e adequado para aplicações posteriores. E neste caso, o modelo predito (rank_1) foi escolhido, por apresentar maior conservação e confiabilidade em toda sua estrutura.

A cobertura de sequências (Figura 8B) para a enzima em estudo foi baseada em mais de 4000 sequências homólogas para produzir os modelos, e a identidade das sequências consultadas foi de aproximadamente 60%, já as regiões sem cobertura (gaps) não prejudicaram o modelamento do sítio ativo da enzima.

Gráficos de Ramachandran foram obtidos independentemente nos servidores PROCHECK e MolProbity. O servidor PROCHECK mostrou que 91,1% dos resíduos estavam nas regiões mais favoráveis (A, B e L), indicando um modelo de boa qualidade (Figura 8D). No gráfico MolProbity Ramachandran, também se tem 95,9% dos resíduos nas regiões permitidas, o que novamente confirmou a qualidade do modelo previsto (Figura 8E).

Figura 8. Processo de resolução e validação da estrutura 3D da enzima *P. citrinum* CYP51.



(A) e (B) *pLDLDT* previsto e cobertura da posição dos resíduos de aminoácidos do CYP51. (C) Modelo 3D exibindo regiões CYP51 com maior e menor identidade de sequência. (D) e (E) Validação do modelo de pontuação máxima por PROCHECK Ramachandran plot e MolProbity Ramachandran plot, respectivamente.

Shi; Zheng; Zhang, (2020) afirmam que 4 triázolicos, fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol, foram utilizados para simulações de dinâmica e *docking* molecular para analisar o mecanismo de ligação com a enzima CYP51. Os resultados mostraram que, essencialmente, a relação hidrofóbica é a razão motora para a conexão dos inibidores com a CYP51, sendo o estudo, valioso para teoricamente servir de suporte para novos azólicos

5.4.3 Estudos de *docking*

O AutoDock 4.2 foi empregado para determinar como os ligantes fluconazol e eugenol se orientam em relação ao sítio ativo da CYP51, obtendo-se a conformação 3D e os valores de energia mínima de ligação (ΔG) e a constante inibitória (K_i) para cada molécula (Tabela 9).

O eugenol mostrou uma forte interação com o sítio ativo da CYP51, apresentando um ΔG de -5.47 kcal/mol e uma K_i de 98,19 μM , conforme detalhado na Tabela 9, sendo extremamente semelhante. Esses resultados direcionaram a análise posterior para o desenvolvimento de novos inibidores da

CYP51 de *P. citrinum*, e os modos de ligação dos potenciais inibidores enzimáticos foram investigados utilizando o software visualizador Discovery Studio (DS), versão 2021 (BIOVIA, 2021), em comparação com o fluconazol.

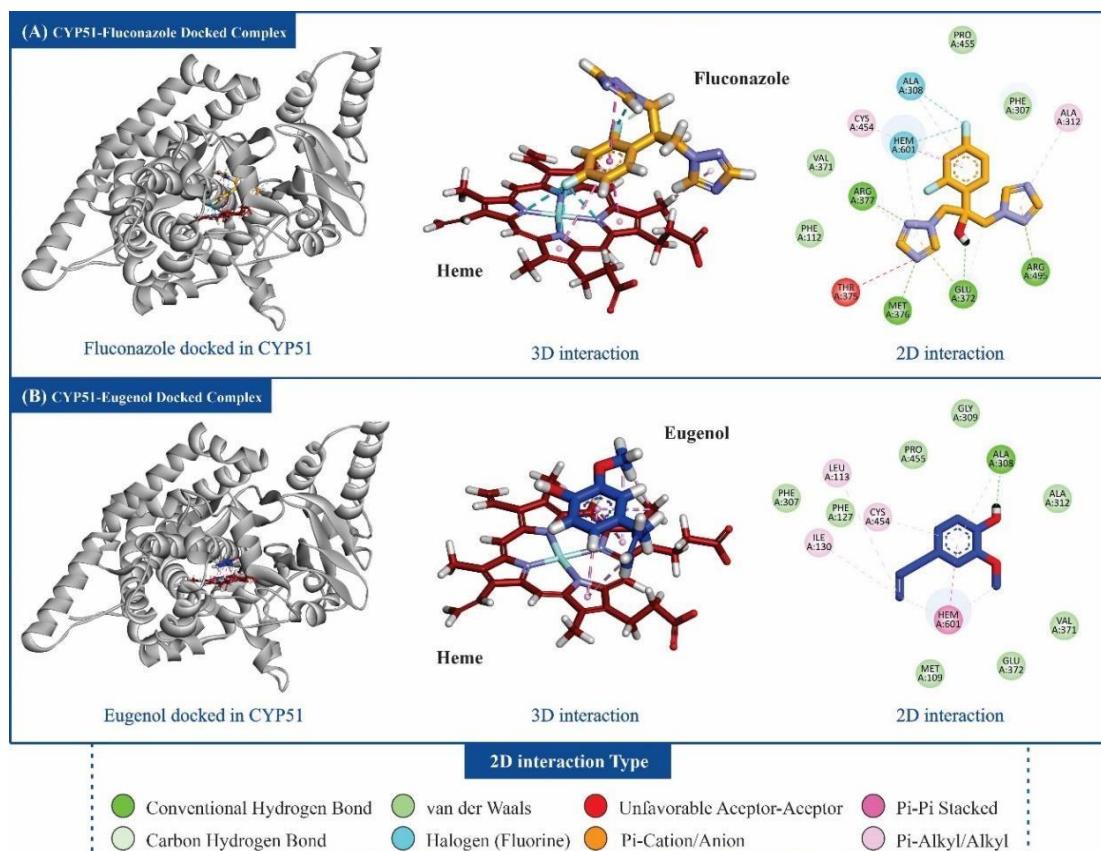
Tabela 9 - Valores de energia de ligação (ΔG) e constante inibitória (K_i) de fluconazol e eugenol contra a enzima CYP51.

Deformação	Enzimas	ΔG		ΔG	
		(kcal/mol) FLU	K_i	(kcal/mol) EUG	K_i
<i>P. citrinum</i>	CYP51	- 5.49	94.16 μM	- 5.47	98.19 μM

Fonte: Elaboração própria (2023).

Sendo o eugenol comparável a sua atividade inibitória prevista com o fluconazol agindo na biossíntese do ergosterol, foi utilizado o *docking molecular* para entender a interação entre o eugenol e a proteína fúngica CYP51 de *P. citrinum*. Sendo assim, AutoDock 4.2 foi usado para acoplar o composto teste eugenol e o controle positivo fluconazol com a CYP51. As interações 2D e 3D do fluconazol e do eugenol com CYP51 são mostradas na figura 9.

Figura 9. *Docking molecular* de fluconazol e eugenol com CYP51.



(A) perfil de interação 3D e 2D do fluconazol com o CYP51 **(B)** perfil de interação 3D e 2D para eugenol com CYP51.

O fluconazol interagiu com Phe112, Phe307 e Val371 (interações de van der Waals), Glu372, Met376, Arg377 e Arg495 (ligações de Hidrogênio), Ala312 e Cys454 (interações alquil/Pi-alquil), Ala308 (interação halogênica) e interações de empilhamento π-π e halogênica do grupo heme da CYP51 com o anel benzênico do fluconazol (Figura 8A). O conjunto dessas interações ocorreram espontaneamente e revelaram uma pontuação de *docking* de -5.49 kcal/mol.

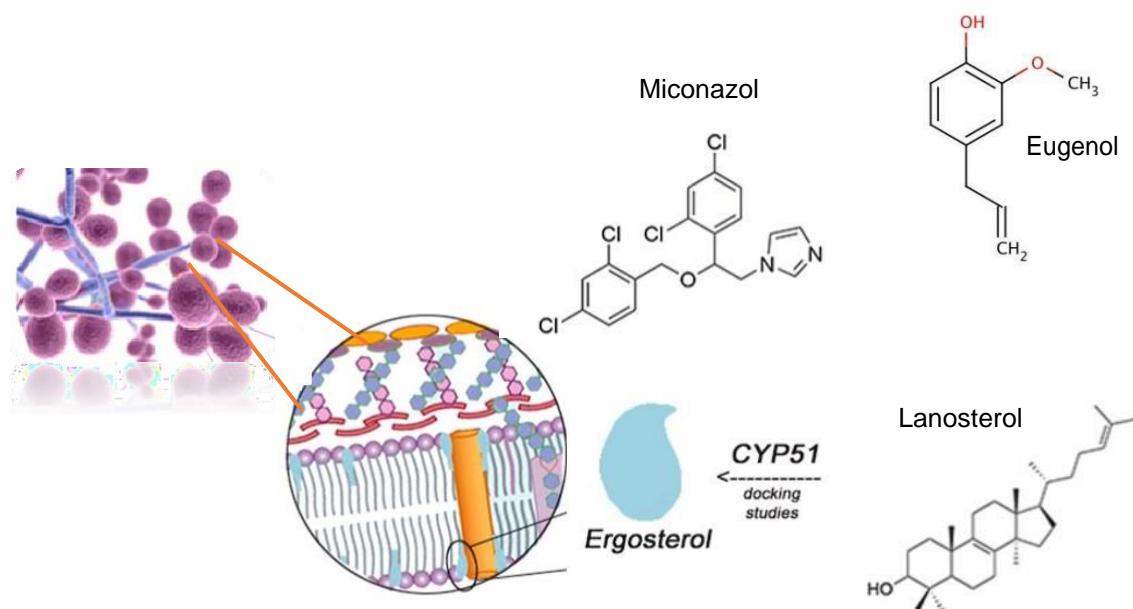
Para o eugenol, foi observado que ele interage com a CYP51 através da formação de vários tipos de ligações, como interações de van der Waals (Met109, Phe127, Phe307, Gly309, Ala312, Val371, Glu372 e Pro455), ligação de H (Ala308), interações alquil/Pi-alquil (Leu113, Ile130 e Cys454) e interação de empilhamento π-π do grupo heme da CYP51 com o anel benzênico do eugenol (Figura 8B).

A enzima CYP51 exibe uma porção protoporfirina, com um átomo de ferro situado no sítio ativo, ao qual os antifúngicos azólicos se aderem. Em conformidade com a estrutura remanescente, são determinadas outras interações com a molécula alvo, que determinarão a conformação alvo e azólica, bem como a afinidade e seletividade pela enzima fúngica.

Como dito anteriormente, o ergosterol é parte imprecendível para a composição da membrana citoplasmática fúngica. A diminuição da quantidade de ergosterol na membrana dos fungos, tornam-a predestinadas a avarias, que podem levar a extinção da célula fúngica. A grande parte dos antifúngicos, tem como essencial objetivo, enzimas implicadas na via da biossíntese do ergosterol, como a CYP51, um elemento da superfamília do citocromo P450, (PRAJAPATI *et al.*, 2022).

Dentre as classe de antifungicos, os azóis, onde está incluindo o fluconazol, atuam inibindo a enzima CYP51. Em um recente estudo, foi relatado a configuração do desenvolvimento e a ação antifúngica de novos imidázois e triázois, a partir do eugenol e do di-hidroeugenol (Figura 10). Outrossim, nesse mesmo estudo, a partir de ensaios *in vitro*, demonstrou-se que alguns compostos foram mais ativos modificando a biossíntese do ergosterol, aconselhando assim, que a enzima CYP51, seja o objetivo desses novos compostos (PÉRET *et al.*, 2023).

Figura 10. Novos azóis à base de miconazol derivados do eugenol e do diidroeugenol apresentaram atividade antifúngica contra *Candida spp.* e *Cryptococcus gattii* com citotoxicidade irrelevante.



Fonte: Péret, 2023.

Perante as evidências, os resultados alcançados ao longo do presente estudo, demonstrou que o eugenol manifesta um conjunto de possíveis atividades farmacológicas, boa disponibilidade oral e inexistência hepatotoxicidade teórica *in silico*, ausência de citotoxicidade *in vitro* em eritrócitos humanos além de ótima atividade antifúngica contra linhagens de *Penicillium citrinum*.

Porém, a crítica sobre a toxicidade dos compostos fenólicos pode ocorrer, portanto, a preocupação é pertinente. Contudo, o efeito tóxico pode estar associado a dose e frequência adotadas. A literatura mostra vários fármacos que são tóxicos em doses comumente utilizadas, contudo, mantém o efeito terapêutico desejado em doses baixas, que são consideradas seguras devido a "distância" da dose tóxica.

Portanto, é importante ter cautela ao tecer críticas ao perfil farmacológico de uma substância, sendo os achados deste estudo, encorajadores, fornecendo um suporte sólido, para a prática de ensaios agregados futuros *in vitro* e *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

Perante o exposto, conclui-se;

- O eugenol apontou ótima atividade fungicida sobre cepas de *Penicillium citrinum* testadas;
- O mesmo fitoconstituinte, não afetou na fragilidade da parede celular ou pela relação direta com o ergosterol da membrana citoplasmática, porém, provavelmente influencia em outro mecanismo de ação;
- A associação entre o eugenol e a anfotericina foi indiferente para todas as variações de cepas testadas, não ocorrendo no momento do teste aditividade, sinergismo ou antagonismo;
- Na análise *in silico*, o eugenol demonstrou, de acordo com a regra dos cinco de Lipinski, a probabilidade de possíveis propriedades farmacocinéticas com potencial para um fármaco oral eficaz;
- O eugenol apresentou baixa hemólise para os eritrócitos sorotipo A B e O;
- *Docking molecular*, foi atentado, que o eugenol interage com o sítio ativo CYP51 mediante ao ordenamento de múltiplas ligações e com isso, tem potencial de influenciar na biossíntese do ergosterol que é de suma importância para a composição da membrana citoplasmática fungica.

Dessa forma, tem-se uma promissora competência para o eugenol, sendo candidato a protótipo de fármaco de origem natural, tanto para uso na clínica e também, como agente biopesticida, levando a um menor uso de agrótoxicos na agricultura, diminuindo os riscos à saúde alimentar dos consumidores e contaminação ambiental através do uso de agrotóxicos.

Estudos posteriores, podem investigar mais a fundo os efeitos, tal qual, outros alvos de ação de eugenol, e ainda, realizar testes em diferentes cepas e condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, T. B.; SIMÕES, L. C.; LIMA, N.; Occurrence of filamentous fungi in drinking water: their role on fungal-bacterial biofilm formation. **Research in Microbiology**, v.172, n. 103791, 2021.
- ALAM, H.; SRIVASTAVA, V.; SEKGELE, W.; WANI, M.Y.; AL-BOGAMI, A.S.; MOLEPO, J.; AHMAD, A. Cellular apoptosis and cell cycle arrest as potential therapeutic targets for eugenol derivatives in *Candida auris*. **Plos One**, v. 18, 2023.
- AMBASTA, A.; KUSUMESH, R.; RAJPAL, K.; KUMAR, S.; SINGH, V. Non-Mucormycetes Causes of Fungal Rhino Sinusitis With Periocular Swelling in COVID-19 With Delta Variant. **Cureus**, v.14, n. 28825, 2022.
- AMINAH, N.S.; LAILI, E.R.; RAFI, M.; ROCHMAN, A.; INSANU, M.; TUN, K.N.W. Secondary metabolite compounds from *Sida* genus and their bioactivity. **Helijon**, v. 7, 2021.
- ANDRADE, F.; MENDES, A.N. Computational analysis of eugenol inhibitory activity in lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. **Nature**, v. 10, 2020.
- AHN, J.; AVONTO, C.; PANDEY, P.; KHAN, S. I.; KHAN, I.A.; ROBERTS, D. W.; CHITTIBOYINA, A G. Chemistry of Isoeugenol and Its Oxidation Products: Mechanism and Kinetics of Isoeugenol as a Skin Sensitizer. **Chemical Research in Toxicology**, v.36, p. 747-756, 2023.
- ARAÚJO, J. S. C.; CASTILHO, A. R. F.; LIRA, A. B.; PEREIRA, A. V.; AZEVÊDO, T. K. B.; COSTA, EDJA, M. M. B.; PEREIRA, M. S. V.; PESSÔA, H. L. F.; PEREIRA, J. V. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts, **Archives of Oral Biology**, v. 85, p.113-119, 2018.
- ARRUDA, A.D.; BERETTA, A. L. R. Mycotoxins and their effects on human health: literature review. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 51, n. 4, 2019.
- ASSAF, C. E. H.; SERRANO, C. Z.; TAHTAH, N.; KHOURY, A.E.; ATOUI, A.; OSWALD, I.P.; PUEL, O.; LORBER, S. Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020.
- BADER, J. C.; BHAVNANI, S. M.; ANDES, D. R.; AMBROSE, P. G. We can do better: a fresh look at echinocandin dosing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 44-50, 2018.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.
- BARBOZA, J. N.; FILHO, C. S. M. B.; SILVA, R. O.; MEDEIROS, J. V. R.; SOUSA, D. P. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. **Hindawi**, v. 2018, 2018.
- BRAUER, V. S.; REZENDE, C. P.; PESSONI, A. M.; PAULA, R. G.; RANGAPPA, K. S.; NAYAKA, S. C.; GUPTA, V. K.; ALMEIDA, F. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. **Biomolecules**, v. 9, n. 521, 2019.
- BEGUM, S. N.; RAY, A. S.; RAHAMAN, C. H. A comprehensive and systematic review on potential anticancer activities of eugenol: From pre-clinical evidence to molecular mechanisms of action, **Phytomedicine**, v. 107, 2022.
- BEHBAHANI, B. A.; NOSHAD, M.; FALAH, F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 13, n. 1, 2019.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, discovery studio (DS) visualizer, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

- CAO, C.; XI, L.; CHATURVEDI, V. Talaromycosis (Penicilliosis) Due to *Talaromyces (Penicillium) marneffei*: Insights into the Clinical Trends of a Major Fungal Disease 60 Years After the Discovery of the Pathogen. **Springer Link**, v. 184, p. 709-720, 2019.
- CARMO, A.; ROCHA, M.; PEREIRINHA, P.; TOMÉ, R.; COSTA, E. Antifungals: From Pharmacokinetics to Clinical Practice. **Antibiotics**, v.12, 2023.
- CAVALCANTE, F. S.; MENDOZA, A. Y. G.; CAMPOS, M. C. C.; LIMA, J. P. S. de. Bioeconomy of fungi: a literature review. **Revista Valore**, v.8, 2023.
- COUTINHO, T. C.; FERREIRA, M. C.; ROSA, L. H.; OLIVEIRA, A. M. de; JÚNIOR, E. N. O. *Penicillium citrinum* and *Penicillium mallochii*: New phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 234, 2020.
- CHERDCHOM, S.; KEAWSONGSAENG, W.; BUASORN, W.; RIMSUEB, N.; PIENPINIJTHAM, P.; SEREEMASPUN, A.; ROJANATHANES, R.; ARAMWIT, P. Development of Eugenol-Embedded Calcium Citrate Nanoparticles as a Local Anesthetic Agent. **ACS Omega**, v. 6, p. 28880-2889, 2021.
- CHEN Y.; KIRCHMAIR J. Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. **Molecular Informatics**, v.39, 2020.
- DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42717, p. 1-13, 2017.
- DANTAS, T. B.; AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DO TIMOL SOBRE LINHAGENS DE *PENICILLIUM CITRINUM*. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2017**.
- DENG, L.; MING, Q.; LI, N.; LEI, Y.; ZHANG, D.; CHEN, J. X. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, p. 493-508, 2020.
- DIDEHDAR, M.; CHEGINI, Z.; SHARIATI, A. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida* species infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
- DHANDAPANI, S.; SISTLA, S.; GUNALAN, A.; MANOHARAN, M.; SUGUMAR, M.; SASTRY, A. S. In-vitro synergistic activity of colistin and meropenem against clinical isolates of carbapenem resistant *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae* by checkerboard method. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 39, p. 6-10, 2021.
- ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. 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.
- ESMEETA, A.; ADHIKARY, S.; DHARSHNA, V.; SWARNAMUGHI, P.; Z. UMMUL MAQSUMMIYA, Z. U.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; DUTTAROY, A. K. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, 2022.
- FERREIRA, S. B.; DANTAS, T. B.; SILVA, D. F.; FERREIRA, P. B.; MELO, T. R.; LIMA, E. O. In Silico and In Vitro Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum*. **Bentham Science**, v. 18, p. 2186-2196, 2018.
- FERREIRA, L.L.G.; ANDRICOPULO, A.D. ADMET modeling approaches in drug discovery. Drug Discov Today. **Drug Discovery Today**, v. 24, p.1157-1165, 2019.
- FU, X.; GAO, Y.; YAN, W.; ZHANG, Z.; SARKER, S.; YIN, Y.; LIU, Q.; FENG, J.; CHEN, J. Preparation of eugenol nanoemulsions for antibacterial activities. **Royal Society of Chemistry**, v. 24, p. 3180-3190, 2022.

- GAITÁN, A. R.; POZO, J. L. AmBisome, three challenges: *Candida auris* infection, central nervous system infection, and biofilm-associated infection. **Ibero-American Journal of Mycology**, v. 38, p. 84-90, 2021.
- GEREMIA, N.; BRUGNARO, P.; SOLINAS, M.; SCARPARO, C.; PANESI, S. *Candida auris* as an Emergent Public Health Problem: A Current Update on European Outbreaks and cases. **Healthcar**, v. 11, n. 3, 2023.
- GÓMEZ, R. L. V.; GARCÍA, M. E. A.; RAMOS, J. C. G.; CHÁVEZ, P.; R.; VARGAS, D. S. S.; FIGUEROA, F. C.; RUIZ, B. R.; BOGDANCHIKOVA, N.; PESTRYAKOV, A. Hemolysis of Human Erythrocytes by Argovit AgNPs from Healthy and Diabetic Donors: An In Vitro Study. **Materials**, v.14, 2021.
- GOW, N. A.; LENARDON, M. D. Architecture of the dynamic fungal cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v.21, p. 248-259, 2022.
- GURAV, T.P.; DHOLAKIA, B.B.; GIRI, A.P. A glance at the chemodiversity of Ocimum species: Trends, implications, and strategies for the quality and yield improvement of essential oil. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, p. 879-913, 2022.
- GUO, W.; ZHAO, M.; CHEN, Q.; HUANGA, L.; MAO, Y.; XIA, N.; TENG, J.; WEI, B. Citrinin produced using strains of *Penicillium citrinum* from Liupao tea. **Food Bioscience**, v. 28, p. 183-191, 2019.
- HAKEEM, S. C.; KULIRANKAL, K. G.; MARY, A.; MONI, M.; SATHYAPAIAN, D. T. Penicilliosis in a Non-HIV Patient: A Case Report. **Cureus**, v.15, n. 37484, 2023.
- HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform". **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, 2012.
- HOUBKRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53-138, 2011.
- HU, Z.; SHIQUAN, L.; XU, Z.; DONG, M.; LIU, S. Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Penicillium citrinum* in dark tea. **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 4, n. 2, p. 2445-2446, 2019.
- INGOK A. M.; DEVECIOGLU, D.; DIKMETAS, D.N.; KARBANCIOLLU-GULER, F.; CAPANOGLU, E.; Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxicogenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. **Molecules**, v. 25, 2020.
- IYER, K. R.; REVIE, N. M.; FU, C.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 454-466, 2021.
- ITURRIETA-GONZÁLEZ, I.; GIACAMAN, A.; GODOY-MARTÍNEZ, P.; VEGA, F.; SEPÚLVEDA, M.; SANTOS, C.; TOLEDO, V.; RIVERA, G.; ORTEGA, L.; SAN MARTÍN, A.; et al. *Penicillium digitatum*, First Clinical Report in Chile: Fungal Co-Infection in COVID-19 Patient. **Journal of Fungi**, v. 8, 2022.
- JENKS, J. D.; CORNELY, O. A.; CHEN, S. C.; THOMPSON III, G. R.; HOENIGL, M. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? **Mycoses**, v. 63, p. 1021-1032, 2020.
- JORDAN, M. L.; BROTONS, B.; PEREZ, J. M. F.; GONZALEZ, E. Extracellular Vesicles in the Fungi Kingdom. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 7221, 2021.
- JORDÁ, T.; PUIG, S. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v.11, n. 795, 2020.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S.; BALLARD, A.J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A.W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**. v. 596, p. 583-589, 2021.

JUNIOR, E.C.; CAVALCANTI, Y.W.; LIRA, A.B.; PESSÔA, H.L.F.; LOPES, W.S.; DA SILVA, D.R.; FREIRES, I.A.; ROSALEN, P.L.; COSTA, E.M.M.B.; PEREIRA, J.V. Phytochemical composition, antifungal activity, in vitro and in vivo toxicity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves extract. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, v.5, p.536 - 557, 2021.

KHAN, S. N.; KHAN, S.; MISBA, L.; SHARIEF, M.; HASHMI, A.; KHAN, A. U. Synergistic fungicidal activity with low doses of eugenol and amphotericin B against *Candida albicans*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 518, p. 459-464, 2019.

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, 2021.

KUMAR, V.; KUMAR, H.; VISHAL, V. Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of *Penicillium citrinum* and *Paecilomyces variotii* (Eurotiales) from oil-contaminated areas. **Archives of Microbiology**, v. 205, n.50, 2023.

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

LI, Y.; ZHAO, R.; LI, Y.; ZHOU, Z. Limonin Enhances the Antifungal Activity of Eugenol Nanoemulsion against *Penicillium italicum* In Vitro and In Vivo Tests. **Microorganisms**, v. 9, 2021.

LI, R.K.; RINALDI, M.G. *In vitro* antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1401-1405, 1999.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 2001.

LISBOA, C. F.; MELO, E. C.; DEMUNER, A. J.; SILVA, L. C.; CARNEIRO, A. P. S.; COELHO, A. P. F. Chemical composition of *Lippia origanoides* Kunt. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils stored at -20°C. **Industrial Crops and Products**, v. 151, 2020.

LOPES, C. M. U.; OLIVEIRA, J. R. S.; HOLANDA, V. N.; RODRIGUES, AYF; FONSECA, C. S. M.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMILO, C. J.; LIMA, V. L. D. M.; COUTINHO, H.D.M.; KOWALSKI, R. GC-MS Analysis and Hemolytic, Antipyretic and Antidiarrheal Potential of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. **Separations**, v. 7, 2020.

MAK, K.K.; KAMAL, M.B.; AYUBA, S.B.; SAKIROLLA, R.; KANG, Y.B.; MOHANDAS, K. Comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry. **Pharmacognosy Reviews**, v. 13, p. 1-9, 2019.

MARIANI, V.; BIASINI, M.; BARBATO, A.; SCHWEDE, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics**. v. 29, p. 2722-2728, 2013.

MIHAJLOV-KRSTEV, T.; JOVANOVIĆ, B.; ZLATKOVIĆ, B.; MATEJIĆ, J.; VITOROVIĆ, J.; CVETKOVIĆ, V.; ILIĆ, B.; ĐORĐEVIĆ, L.; JOKOVIĆ, N.; MILADINOVIĆ, D. Phytochemistry,

Toxicology and Therapeutic Value of *Petasites hybridus* Subsp. *Ochroleucus* (Common Butterbur) from the Balkans. **Plants**, v.9, 2020.

MEDEIROS, C. I. S. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL SOBRE *Candida albicans* DE SECREÇÕES VULVOVAGINAIS. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2023.

MELERO, I. Q.; RODRÍGUEZ, J. G. Systemic antifungal drugs. **Ibero-American Journal of Mycology**, v. 38, p. 42-46, 2021.

MOPAC 2016, S. J. J. P. MOPAC Manual. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, USA. Disponível em: <HTTP://OpenMOPAC.>, 2016.

MORRIS, G.M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M.F.; BELEW, R.K.; GOODSELL, D.S.; AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, 2009.

MUHAJ, F. F.; GEORGE, S. J.; NGUYEN, C. D.; TYRING, S. K. Antimicrobials and resistance part II: Antifungals, antivirals, and antiparasitics. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 86, p. 1207-1226, 2022.

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, p.770-803, 2020.

NICOLETTI, R.; ANDOLFI, A.; BECCHIMANZI, A.; SALVATORE, M.M. Anti-Insect Properties of *Penicillium* Secondary Metabolite. **Microorganisms**, v. 11, 2023.

NISAR, M. F.; KHADIM, M.; RAFIQ, M.; CHEN, J.; YANG, Y.; WAN, C. C. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. **Hindawi**, v. 2021, 2021.

NOOR, A.; PREUSS, C.V. Amphotericin B. **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

NOCUA-BÁEZ, L. C.; URIBE-JEREZ, P.; TARAZONA-GUARANGA, L.; RICARDO, R.; CORTÉS, J. A. Azoles of then and now: a review. **Chilean Infectol Magazine**, v. 37, n. 3, 2020.

OMAR, M.S.; KORDALI, S. Review of Essential Oils as Antifungal Agents for Plant Fungal Diseases. **Ziraat Fakültesi Dergisi**, v. 14, p. 294-301, 2019.

PADDA, I.S.; PARMAR, M.; Flucytosine. **StatPearls Publishing**; 2023.

PRAJAPATI, J.; GOSWAMI, D.; DABHI, M.; ACHARYA, D.; RAWAL, R. Potential dual inhibition of SE and CYP51 by eugenol conferring inhibition of *Candida albicans*: Computationally curated study with experimental validation. **Computers in Biology and Medicine**, v. 151, 2022.

PALHARES, M. A. Colonização por *Aspergillus* em pacientes internados em hospital público de Campo Grande, MS. **Dissertação de Mestrado - Programa de PósGraduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2022.

PÉRET, V. A. C.; REIS, R. C. F. M.; BRAGA, S. F. P.; BENEDETTI, M. D.; CALDAS, I. S.; CARVALHO, D. T.; SANTANA, L. F. A.; JOHANN, S.; SOUZA, T. B. New miconazole-based azoles derived from eugenol show activity against *Candida* spp. and *Cryptococcus gattii* by inhibiting the fungal ergosterol biosynthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 256, 2023.

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.

- PIRES, D.E.V.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B.; pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal Medicinal Chemistry**, v.58, p. 4066–4072, 2015.
- PRUKSAPHON, K.; NOSANCHUK, J. D.; RATANABANANGKOON, K.; YOUNGCHIM, S. *Talaromyces marneffei* Infection: Virulence, Intracellular Lifestyle and Host Defense Mechanisms. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, 2022.
- PRAJAPATI, J.; GOSWAMI, D.; DABHI, M.; ACHARYA, D.; RAWAL, R. M. Potential dual inhibition of SE and CYP51 by eugenol conferring inhibition of *Candida albicans*: Computationally curated study with experimental validation. **Computers in Biology and medicine**, v. 151, 2022.
- RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, 1997.
- RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, n. 104283, 2019.
- REPASKY, M.P.; SHELLEY, M.; FRIESNER, R.A.; Flexible ligand docking with Glide. **Current Protocols Bioinformatics**. 2007.
- SARTORATO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275- 280, 2004.
- SAVI, G. D.; ZENAIDE, F. Mycotoxins: risks to human health due to daily ingestion of contaminated food and its occurrence in clinical samples. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, 2020.
- SANTOS, J. P. C.; RODRIGUES, H. C. M.; RESENDE, H. E.; BARBOSA, B. B.; ROSA, L. P. de A.; NOMINATO, L. T. *Ocimum gratissimum* Lineu: A review of its pharmacological effects and medicinal uses. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4 n. 6, p. 28716–28732, 2021.
- SALES, G.T.M.; FORESTO, R.D. Drug-induced nephrotoxicity. **Magazine of the Brazilian Medical Association**, v. 13, p. 82-90, 2020.
- SCHLOSSER, I.; PRANGE, A. Antifungal activity of selected natural preservatives against the foodborne molds *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, 2018.
- SIDDQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.
- SIYAL, F.J.; MEMON, Z.; SIDDIQUI, R.A.; ASLAM, Z.; NISAR, U.; IMAD, R.; SHAH, M.R. Eugenol and liposome-based nanocarriers loaded with eugenol protect against anxiolytic disorder via down regulation of neurokinin-1 receptors in mice. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 33, p. 2275-2284, 2020.
- SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H. In vitro synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against *Candida tropicalis* and *Candida krusei* strains isolated from the genital tract of mares. **Equine Veterinary Journal**, v.53, p. 94-101, 2020.
- SHAFIEI, M.; PEYTON, L.; HASHEMZADEH, M.; FOROUUMADI, A. History of the development of antifungal azoles: a review on structures, sar, and mechanism of action. **Bioorganic chemistry**,v.104, 2020.
- SHI, N.; ZHENG, Q.; ZHANG, H.; Molecular Dynamics Investigations of Binding Mechanism for Triazoles Inhibitors to CYP51. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2020.

SOBOLEV, O.V.; AFONINE, P.V.; MORIARTY, N.W.; HEKELMAN, M.L.; JOOSTEN, R.P.; PERRAKIS, A.; ADAMS, P.D. A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. **Structure**, v. 28, p. 1249-1258, 2020.

SOUZA, F.S.; MOUCHREK, A.N.; SERRA, J.L.; MENDONÇA, C. de J.S.; BORGES, K.R.A.; MENDONÇA, S. de J.R.; SANTOS, A.M.C.M.; FILHO, V.E.M.; SILVA, F.C. *Ocimum campechianum* essential oil: chemical composition and antifungal activity against filamentous fungi. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, p. 62056–62073, 2022.

SUN, S.; HOY, M.J.; HEITMAN, J. Fungal pathogens. **Current Biology**, v. 30, p. 1163-1169, 2020.

TALEUZZAMAN, M.; JAIN, P.; VERMA, R.; IQBAL, Z.; MIRZA, A. M. Eugenol as a Potential Drug Candidate: A Review, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, 2021.

TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO, D.T.; SOUZA, E.; PINTO, E. New Antifungal Agents with Azole Moieties. **Pharmaceuticals**, v. 15, 2022.

TRÉNOR, P. O.; AHUIR, A. P.; MARKUS, L. Fungal Drug Response and Antimicrobial Resistance. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 5, 2023.

TOGHUEO, R.M.K., BOYOM, F.F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications.v. 10, **Biotech**, 107, 2020.

TORRES NETO, L.; MONTEIRO, M.L.G.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J; TELESHOVA, N.; SAILER, J. Essential oils block cellular entry of SARS-CoV-2 delta variant. **Nature**, v. 12, n. 20639, 2022.

TORRE B.G.; ALBERICIO F. The Pharmaceutical Industry in 2020. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. **Molecules**, v. 26, 2023.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3671, 2021.

UGBOGU, O. C.; EMMANUEL, O.; AGI, G. O.; UCHE, M. E.; NNANNA, R. O.; UGBOGU, E. A.; A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Heliyon**, v. 7, 2021.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S.; NATASSIA, C.; YORDANOVA, G.; YUAN, D.; STROE, O.; WOOD, G.; LAYDON, A.; ŽÍDEK, A.; GREEN, T.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; PETERSEN, S.; JUMPER, J.; CLANCY, E.; GREEN, R.; VORA, A.; LUTFI, M.; FIGURNOV, M.; COWIE, A.; HOBBS. N.; KOHLI, P.; KLEYWEGT, G.; BIRNEY, E.; HASSABIS, D.; VELANKAR, S.; AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**. v. 7; p. 439-444, 2022.

VASCONCELOS, S. C.; RÉGIS, L. A.; MENEZES FILHO, A. C. P. de.; CAZAL, C. de M.; PEREIRA, P. S.; CHRISTOFOLI, M. Chemical composition, bactericidal, and antioxidant activity of the essential oils in the leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Research, Society and Development**, v.10, n. 8, 2021.

VĚTROVSKÝ, T.; KOHOUT, P.; KOPECKÝ, M.; MACHAC, A.; MATĚJ, H.; BAHNMANN, B. D.; BRABCOVÁ, V.; CHOI, J.; MESZÁROŠOVÁ, L.; HUMANO, Z. R.; LEPINAY, C.; LLADO, S.; MONDÉJAR, R. L.; MARTINOVIC, T.; MAŠÍNOVÁ, T.; MORAIS, D.; NAVRÁTILOVÁ, D.; ODRIZOZOLA, I.; STURSOVÁ, M.; ŠVEC, K.; TLÁSKAL, V.; URBANOVÁ, M.; WAN, J.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; HOWE, A.; LADAU, J.; PEAY, K. G.; STORCH, D.; SELVAGEM, J.; BALDRIAN, P. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. **Nature communications**, v. 10, 2019.

VIJAYASTELTAR, L.; NAIR, G. G.; MALIAKEL, B.; KUTTAN, R.; KRISHNAKUMAR, I. Safety assessment of a standardized polyphenolic extract of clove buds: Subchronic toxicity and mutagenicity studies. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 439-449, 2016.

- WANG, Y.; CHEN, H.; XIA, T.; HUANG, Y. Characterization of fungal microbiota on normal ocular surface of humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 123, 2020.
- WANG, D.; WANG, G.; WANG, J.; ZHAI, H.; XUE, X. Inhibitory effect and underlying mechanism of cinnamon and clove essential oils on *Botryosphaeria dothidea* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing rots in postharvest bagging-free apple fruits. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- WESTERMAIER, Y.; BARRIL, X.; SCAPOZZA, L.; Virtual screening: An in silico tool for interlacing the chemical universe with the proteome. **Methods**, v. 71, p. 44–57, 2015.
- WILLIAMS, T. J.; HARVEY, S.; JAMES, D. A. Immunotherapeutic approaches for fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 58, p. 130-137, 2020.
- YADAV, A.N.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. Endophytic fungal communities and their biotechnological implications for agro-environmental sustainability. **Folia Microbiologica**, v. 67, p. 203-232, 2022.
- YANAKIEV, S. Effects of Cinnamon (*Cinnamomum spp.*) in Dentistry: A Review. **Molecules**, v. 25, 2020.
- YANG, R.; CHEN, X.; HUANG, Q.; CHEN, C.; RENGASAMY, K. R. R.; CHEN J.; WAN, C. Mining RNA-Seq Data to Depict How *Penicillium digitatum* Shapes Its Transcriptome in Response to Nanoemulsion. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.
- YAN, S.; WANG, K.; NAGGAR, Y. A.; HEYDEN, Y. V.; ZHAO, L.; WU, L.; XUE, X. Natural plant toxins in honey: An ignored threat to human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, 2022.
- YOUSEFZADEH, A.; MALEKI, A.; ATHAR, S.D.; AHMADI, M.; MOHAMMADI, E.; TANG, V. T.; KALMARZI, R. N.; KASHEFI, H. Evaluation of bio-aerosols type, density, and modeling of dispersion in inside and outside of different wards of educational hospital. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p.14143–14157, 2022.
- ZARI, A.T.; ZARI, T.A.; HAKEEM, K.R. Anticancer Properties of Eugenol: A Review. **Molecules**, v. 26, 2021.
- ZHAO, Y.; WANG, Q.; WU, X.; JIANG, M.; JIN, H.; HOU, T. Unraveling the polypharmacology of a natural antifungal product, eugenol, against *Rhizoctonia solani*. **Pest Management Science**, 2021.

CONTRIBUIÇÃO ACADÊMICA



Eficácia do uso de produtos derivados de plantas em doenças infecciosas e biofilmes bucais: uma revisão integrativa

Efficacy of the use of plant-derived products in oral infectious diseases and biofilms: an integrative review

DOI: 10.55905/oelv21n9-059

Recebimento dos originais: 11/08/2023
Acceptação para publicação: 11/09/2023

André Azevedo dos Santos

Doutorando em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPGPNSB)

Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Endereço: Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa – PB, CEP: 58051-900
E-mail: andreazevedojs@gmail.com

Bráulio de Almeida Teixeira

Mestrando em Farmacologia

Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: braulioteixeiramobile@gmail.com

David Henrique Xavier Barbosa

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Endereço: Campus Universitário, Lagoa Nova, Natal - RN, CEP: 59078-970
E-mail: hhenriquexavier757@gmail.com

Emmanuel Melquiades Araújo

Mestrando em Farmacologia

Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: emmanuel@ltf.ufpb.br

José Lucas Ferreira Marques Galvão

Mestre em Farmacologia

Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: luksfmgalvao_4@hotmail.com