



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS



JOSÉ ROBERTO DANTAS DE ANDRADE SANTOS

Investigação do potencial antifúngico do *trans*-anetol sobre cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*: uma abordagem *in vitro* e *in silico*

JOÃO PESSOA – PB
2024

JOSÉ ROBERTO DANTAS DE ANDRADE SANTOS

Investigação do potencial antifúngico do *trans*-anetol sobre cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*: uma abordagem *in vitro* e *in silico*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Ensaios Pré-clínicos e Clínicos.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

**JOÃO PESSOA – PB
2024**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237i Santos, José Roberto Dantas de Andrade.

Investigação do potencial antifúngico do
trans-anetol sobre cepas de *Candida glabrata* e *Candida*
parapsilosis: uma abordagem in vitro e in silico / José
Roberto Dantas de Andrade Santos. - João Pessoa, 2024.
79 f. : il.

Orientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Coorientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Micologia. 2. Candidíase. 3. *Candida*
nao-albicans. 4. Resistência antifúngica. I. Oliveira
Filho, Abrahão Alves de. II. Lima, Edeltrudes de
Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.28(043)

Investigação do potencial antifúngico do *trans*-anetol sobre cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*: uma abordagem *in vitro* e *in silico*

Tese de Doutorado aprovada em 29/11/2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO**
Data: 12/12/2024 08:24:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Presidente)

Documento assinado digitalmente
 **HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA**
Data: 09/12/2024 16:57:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Hilzeth de Luna Freire Pessoa (Examinadora Interna)

Documento assinado digitalmente
 **HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES**
Data: 10/12/2024 13:01:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães (Examinador Interno)

Documento assinado digitalmente
 **RALINE MENDONÇA DOS ANJOS**
Data: 10/12/2024 11:44:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Raline Mendonça dos Anjos (Examinadora Externa)

Documento assinado digitalmente
 **GYMENNA MARIA TENÓRIO GUENES**
Data: 09/12/2024 18:02:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Gymena Maria Tenório Gunes (Examinador Externo)

Aos meus pais, Creuziene Dantas de Andrade Santos e Francisco dos Santos Paulino, que, com amor incondicional, semeiam em mim a coragem de sonhar. A confiança de vocês é a luz que guia meus passos. Com toda a minha admiração e carinho.

A vocês eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o reconhecimento genuíno daqueles que nos ajudam a trilhar o caminho do conhecimento, aqueles que compartilham não apenas saberes, mas também apoio e inspiração ao longo da jornada. Como disse Paulo Freire: *“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando.”* A cada passo deste percurso, cada ensinamento e gesto de apoio foram fundamentais para que este trabalho fosse possível.

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho, por abrir caminhos que me permitiram aprender, crescer e contribuir e, em nome d’Ele, agradeço profundamente a minha família, que mantém viva a essência de amor e cuidado que nos une. Sou imensamente grato pela vida de cada um de vocês — minha avó, meus pais, irmãos e sobrinhos — por todo apoio, confiança e pelas memórias e laços que construímos juntos. A vocês, minha eterna gratidão, por tudo o que somos e pelo que ainda haveremos de construir.

Deixo aqui registrada minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, cuja condução, conselhos e instruções foram fundamentais para a construção deste estudo. Seu olhar atento e sua escuta generosa foram indispensáveis em cada etapa deste caminho. Um exemplo de professor e pesquisador digno de todo reconhecimento, ao qual dedico meu mais sincero respeito e gratidão.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, toda a minha gratidão pelo suporte indispensável à realização de grande parte dos ensaios deste estudo. Ao longo dos testes, entre cafés e boas conversas, tive o privilégio de conhecer uma pessoa admirável, dotada de sensibilidade, empenho e uma dedicação incansável às mais diversas causas. Uma verdadeira fortaleza, que une sutileza e simplicidade em cada gesto. Não por acaso, nos tornamos amigos. Seu legado ultrapassa as conquistas profissionais e permanece como um exemplo de humanidade que levarei como inspiração para a vida.

Ao Prof. Dr. Cássio Ilan Soares Medeiros, meu agradecimento pela colaboração com este trabalho. Sua inteligência e disposição em ajudar merecem ser destacados. Você também foi parte importante para a construção deste estudo. A você, meu muito obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Bráulio Teixeira e José Lucas Galvão, meu agradecimento pelo apoio técnico e por toda a ajuda prestada na condução dos ensaios. São grandes profissionais com quem tive a honra de compartilhar boas experiências.

Aos professores membros da banca de defesa da tese, Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa, Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Dra. Raline Mendonça dos Anjos e Dra. Gymena Maria Tenório Guenes pela disposição em participar e colaborar para o aprimoramento deste trabalho.

A toda a equipe do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPgDITM-UFPB), incluindo coordenação, professores e secretaria.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio técnico-científico e financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste estudo.

Enfim, a cada mentor que foi farol, a cada amigo que foi âncora, e a cada alma que alimentou este sonho com sabedoria e risos, meu sincero obrigado.

José Roberto Dantas de Andrade Santos

RESUMO

Cerca de 1,5 milhão de pessoas morrem anualmente de infecções fúngicas invasivas globalmente, com aproximadamente 80% dessas mortes resultantes de infecções fúngicas oportunistas adquiridas em hospitais, predominantemente causadas por espécies de *Candida*. As plantas, como o anis estrelado (*Illicium verum*), são fontes de compostos com ampla atividade biológica, incluindo ação contra fungos. O anis estrelado contém diversos constituintes químicos, como fenilpropanoides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e ácidos fenólicos, e demonstra atividade antifúngica de amplo espectro. Este anis é eficaz na inibição da deterioração de alimentos por *Aspergillus* e *Fusarium*, e também possui propriedades antibacterianas e antioxidantes. No entanto, faltam estudos detalhados sobre o uso do anis estrelado como agente antifúngico, particularmente sobre os componentes ativos e seus mecanismos de ação. Este trabalho investiga o potencial antifúngico do *trans*-anetol, o principal componente do óleo essencial do anis estrelado, e explora seus possíveis mecanismos de ação contra cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Para este propósito, foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações fungicidas mínimas (CFM) por meio da técnica de microdiluição em caldo. Para o potencial antifúngico do TA em sinergismo com o fluconazol foi conduzido um ensaio de associação (*checkerboard*). Para verificar os possíveis mecanismos de ação foram utilizados os ensaios com sorbitol e ergosterol que avaliam as interações sobre a parede e membrana celular, respectivamente. Além disso, o *docking* molecular avaliou as interações do TA com a Pdr5, proteína de bomba de efluxo de drogas. Os principais resultados deste estudo apontaram para uma boa atividade antifúngica do TA para ambas as espécies de *Candida*. A CIM do TA para *Candida glabrata* variou de 128 µg/mL a 1024 µg/mL e de 128 µg/mL a 512 µg/mL para *Candida parapsilosis*. O ensaio de associação demonstrou atividade sinérgica entre o TA e o fluconazol. O índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) foi de 0,5 para *Candida glabrata* e de 0,375 para *Candida parapsilosis*. Já o ensaio de mecanismo de ação não foi capaz de precisar qual via de ação é utilizada pelo TA para produzir o efeito verificado. A partir do estudo de *docking* molecular foi possível verificar uma interação entre o sítio ativo da Pdr5 e o TA, com predomínio de ligações hidrofóbicas e do oxigênio do grupo metóxi da estrutura do TA com Tyr356 do sítio ativo da proteína. Assim, tomando em conjunto os achados deste estudo, fica evidenciado o potencial antifúngico do TA como um agente antifúngico isolado e, sobretudo, em conjunto com o fluconazol, promovendo uma atividade promissora que pode ajudar na aplicação prática de terapias combinadas destinadas a superar a resistência antifúngica.

Palavras-chave: Candidíase. *Candida não-albicans*. Micologia. Resistência antifúngica. Sinergismo.

ABSTRACT

Approximately 1.5 million people die annually from invasive fungal infections globally, with about 80% of these deaths resulting from opportunistic fungal infections acquired in hospitals, predominantly caused by *Candida* species. Plants, such as star anise (*Illicium verum*), are sources of compounds with broad biological activity, including antifungal action. Star anise contains various chemical constituents, such as phenylpropanoids, sesquiterpene lactones, flavonoids, and phenolic acids, and demonstrates broad-spectrum antifungal activity. This spice is effective in inhibiting food spoilage by *Aspergillus* and *Fusarium*, and also possesses antibacterial and antioxidant properties. However, detailed studies on the use of star anise as an antifungal agent are lacking, particularly regarding the active components and their mechanisms of action. This work investigates the antifungal potential of trans-anethole, the main component of star anise essential oil, and explores its possible mechanisms of action against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* strains. For this purpose, minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs) were assessed using the broth microdilution technique. The antifungal potential of trans-anethole in synergy with fluconazole was evaluated using a checkerboard assay. Possible mechanisms of action were investigated using sorbitol and ergosterol assays, which assess interactions with the cell wall and membrane, respectively. Furthermore, molecular docking evaluated the interactions of TA with Pdr5, a drug efflux pump protein. The main results of this study indicated good antifungal activity of trans-anethole against both *Candida* species. The MIC of trans-anethole for *Candida glabrata* ranged from 128 µg/mL to 1024 µg/mL and from 128 µg/mL to 512 µg/mL for *Candida parapsilosis*. The checkerboard assay demonstrated synergistic activity between trans-anethole and fluconazole. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was 0.5 for *Candida glabrata* and 0.375 for *Candida parapsilosis*. However, the mechanism of action assay could not pinpoint the exact pathway used by trans-anethole to produce the observed effect. Molecular docking studies revealed an interaction between the active site of Pdr5 and trans-anethole, with predominant hydrophobic interactions and the oxygen of the methoxy group of trans-anethole interacting with Tyr356 of the protein's active site. Taken together, the findings of this study highlight the antifungal potential of trans-anethole as a standalone antifungal agent and, particularly, in combination with fluconazole, showing promising activity that may aid in the practical application of combined therapies aimed at overcoming antifungal resistance.

Keywords: Antifungal resistance. Candidiasis. *Candida non-albicans*. Mycology. Synergism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação das candidíases	18
Figura 2 - Aspectos macro e microscópicos de <i>Candida glabrata</i> e <i>parapsilosis</i>	21
Figura 3 - Estrutura química dos derivados azólicos	24
Figura 4 - Estrutura química do <i>Trans</i> -anetol	29
Figura 5 - Fluxo dos testes realizados para avaliação do potencial antifúngico do TA	33
Figura 6 - Processo de resolução e validação da estrutura terciária da enzima Pdr5 de <i>C. glabrata</i> por homologia com a Pdr5 de <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 7- Processo de validação do docking por re-docking com molécula de ATP EM no sítio ativo da Pdr5 de <i>S. cerevisiae</i>	54
Figura 8 - Docking molecular do trans-anetol com a enzima Pdr5 de <i>C. glabrata</i> ...	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de antifúngicos usados no tratamento das candidíases	22
Tabela 2 - Levantamento das publicações envolvendo a atividade antimicrobiana do <i>trans</i> -anetol (TA)	30
Tabela 3 - Médias da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol e do fluconazol frente a cepas de <i>Candida Glabrata</i>	42
Tabela 4 - Médias da CFM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol frente a cepas de <i>Candida glabrata</i>	43
Tabela 5 - Médias da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol e do fluconazol frente a cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	43
Tabela 6 - Médias da CFM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol frente a cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	44
Tabela 7 - Concentração Inibitória Fracionária e o Índice da Concentração Inibitória Fracionária do <i>trans</i> -anetol associado ao fluconazol frente a cepas de <i>Candida glabrata</i>	47
Tabela 8 - Concentração Inibitória Fracionária e o Índice da Concentração Inibitória Fracionária do <i>trans</i> -anetol associado ao fluconazol frente a cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	48
Tabela 9 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol na presença e ausência de ergosterol frente a cepas de <i>Candida glabrata</i>	49
Tabela 10 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol na presença e ausência de ergosterol frente a cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	49
Tabela 11 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol na presença e ausência de sorbitol frente a cepas de <i>Candida glabrata</i>	50
Tabela 12 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do <i>trans</i> -anetol na presença e ausência de sorbitol frente a cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	50
Tabela 13 - Valores de energia de ligação (ΔG) e constante inibitória (K_i) do ATP e do <i>Trans</i> -anetol contra a enzima Pdr5 de <i>C. glabrata</i>	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FC 5-flucitosina

5-FU 5-fluorouracil

ADMET absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AIDS síndrome da imuno deficiência humana adquirida

AmB anfotericina B

ASD ágar saboraoud dextrose

ATCC *American Type Culture Collection*

BSIs infecções da corrente sanguínea

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CFM concentração inibitória mínima

CIF concentração inibitória fracionária

CIM concentração inibitória mínima

CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DM dinâmica molecular

DMSO dimetilsulfóxido

DNA ácido desoxirribonucléico

EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FLU fluconazol

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

ICIF índice da concentração inibitória fracionária

ME minimização de energia

NAC *Candida não-albicans*

q.s.p. quantidade suficiente para

ROS espécies reativas de oxigênio

RP restrição de posição

TA *trans*-anetol

UFC unidade formadora de colônia

MDR resistente a múltiplas drogas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Candidíase	17
2.1.1 Agente etiológico	18
2.1.1.1 <i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabrata</i>) e <i>Candida parapsilosis</i>	19
2.2 Tratamento e manejo clínico das candidíases	21
2.2.1 Azóis	23
2.2.2 Polienos	24
2.2.3 Equinocandinas	25
2.2.4 Fluocitosina pirimidina	26
2.3 Pesquisas por novos compostos para o tratamento das candidíases	27
2.3.1 Produtos naturais	28
2.3.1.1 <i>Trans-anetol</i>	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Local da pesquisa	33
4.2 Fluxograma dos ensaios	33
4.3 Preparo de materiais e micro-organismos	33
4.3.1 Cepas fúngicas	34
4.3.2 Meios de cultura	34
4.3.3 Substância	34
4.3.4 Inóculo	35
4.4 Ensaios <i>in vitro</i>	35
4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35
4.4.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	36
4.4.4 Ensaio com ergosterol - Ação do <i>trans-anetol</i> sobre a membrana celular fúngica	37
4.4.5 Ensaio de associação/sinergismo – <i>Checkerboard</i>	38
4.5 Ensaios <i>in silico</i>	39
4.5.1 <i>Docking</i> molecular	39
4.5.1.1 Modelagem por homologia da <i>Pdr5</i> de <i>C. glabrata</i>	39

4.5.1.2 Preparação do ligante e da proteína Pdr5.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
Figura 7- Processo de validação do docking por re-docking com molécula de ATP EM no sítio ativo da Pdr5 de <i>S. cerevisiae</i>	54
6 CONCLUSÕES	58
ANEXOS	71
Anexo 1 - Artigo submetido aos Anais da Academia Brasileira de Ciências	71
Anexo 2 - Artigo aceito na Revista Brasileira de Educação e Saúde – REBES... ..	72
Anexo 3 - Artigo aceito na <i>Dyes and Pigments</i>	73
Anexo 4 - Artigo publicado na <i>Brazilian Journal of Biology</i>	74
Anexo 5 - Artigo publicado na ACS OMEGA.....	75
Anexo 6 - Artigo publicado na <i>Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana</i>	76
Anexo 7 - Trabalho apresentado ao <i>Brazil France Symposium on Medicinal Chemistry</i>	77
Anexo 8 - Trabalho apresentado na 12º Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde.....	78
Anexo 9 - Ficha do produto da cepa padrão de <i>Candida glabrata</i>	79
Anexo 10 - Ficha do produto da cepa padrão de <i>Candida parapsilosis</i>	80

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, as infecções fúngicas eram consideradas relativamente raras como causa de doenças clinicamente relevantes, em comparação com outros patógenos, como bactérias e vírus. Esta tendência mudou na segunda metade do século XX, à medida que o número de pacientes imunocomprometidos suscetíveis a infecções fúngicas oportunistas aumentou, na sequência dos avanços no tratamento médico e da epidemia de HIV/AIDS (Casadevall, 2018).

Os fungos anteriormente considerados como causas raras de infecção, emergiram como substanciais de doenças invasivas em hospedeiros com imunidade prejudicada. O surgimento destas infecções fúngicas oportunistas, causaram aumento da morbidade e mortalidade, introduzindo notáveis desafios diagnósticos e terapêuticos nos cuidados de saúde e resultou no aumento da atenção epidemiológica sobre doenças fúngicas (Seagle, 2021).

Cerca de 1,5 milhão de pessoas morrem de infecções fúngicas invasivas todos os anos em todo o mundo. Cerca de 80% das mortes causadas por sepse fúngica são devidas a infecções fúngicas oportunistas adquiridas em hospitais, mais comumente causadas por espécies de *Candida* (Biswas, 2021).

As espécies de *Candida* são comensais e, portanto, fazem parte da flora humana normal e estão localizadas na pele e nos tratos gastrointestinal e genital. No entanto, também pode causar várias infecções em pacientes suscetíveis, incluindo pacientes idosos, hospitalizados ou imunossuprimidos. A infecção invasiva por *Candida* é uma das infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo e são apontadas como uma das principais causas de infecções associadas à saúde (Bhattacharya *et al.*, 2020).

Os sintomas de infecção da pele e das membranas mucosas são geralmente leves com tendência a ocorrer em dobras cutâneas, como axilas, virilha, sob as mamas, ao redor do ânus e nas dobras ungueais. Durante a patogênese a levedura pode colonizar o tecido externo da epiderme, com formas filamentosas invadindo a epiderme intacta e penetrando na derme (Lu *et al.*, 2023). Já a doença invasiva é geralmente consequência de uma colonização aumentada ou anormal, juntamente com um defeito local ou generalizado nas defesas do hospedeiro (McCarty; Pappas, 2016).

Devido à falta de testes rápidos para candidíase, a maioria dos casos ainda é diagnosticada por culturas fúngicas, que podem ter baixa sensibilidade e gerar resultados falso-positivos. A terapia antifúngica empírica é frequentemente iniciada em pacientes febris ou sépticos na UTI, mas isso pode levar ao uso desnecessário de antifúngicos e promover resistência. (McCarty; White; Pappas, 2021; Bhattacharya *et al.*, 2020).

Além disso, as drogas utilizadas contra a candidíase incluem basicamente três classes de antifúngicos: polienos, azóis e equinocandinas, cada uma delas apresentando problemas que limitam seu uso clínico. Por exemplo, os polienos podem causar nefrotoxicidade grave devido ao direcionamento não seletivo do colesterol da membrana dos mamíferos (Ben-Ami, 2021).

Ademais, um espectro antifúngico limitado, a necessidade de administração intravenosa e os altos custos dos medicamentos tornaram-se desafios para o uso clínico de equinocandinas. Os azóis têm apenas efeitos fungistáticos em espécies de *Candida*, o que leva ao surgimento de isolados resistentes aos azóis. Assim, a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é urgentemente necessária para o tratamento da candidíase (Robbins *et al.*, 2017).

É importante destacar que a busca por esses agentes é particularmente importante, pois em comparação com o desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos, o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos é mais desafiador porque os fungos são eucariotos e muitos alvos potenciais para terapia também são encontrados em humanos, com risco substancial de toxicidade no hospedeiro (Campoy; Adrio, 2017).

Deste modo, a natureza é um recurso quimicamente diverso com imenso potencial para produzir moléculas biologicamente ativas. Os esforços atuais para identificar novas classes de antifúngicos visam revelar estruturas químicas sem precedentes e novos modos de ação com pouca ou nenhuma sobreposição entre alvos eucarióticos fúngicos e humanos (Heard; Wu; Winter, 2021).

As plantas, por exemplo, são fonte de muitos compostos que apresentam ampla atividade biológica, incluindo ação sobre diversas espécies de fungos (Wozniak, 2022). O anis estrelado (*Illicium verum*) contém um grande número de constituintes químicos, incluindo fenilpropanoides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, ácidos fenólicos e outras substâncias. Exibe uma atividade antifúngica de amplo espectro, inibe eficazmente a deterioração dos alimentos causada por

Aspergillus e *Fusarium* e já teve seus efeitos antibacterianos e antioxidantes reportados. Há ainda uma escassez de estudos teóricos sobre a aplicação do anis estrelado como agente antifúngico, uma vez que os componentes ativos e o mecanismo inibitório não foram totalmente descobertos (Bao *et al.*, 2023; Yu; Zhang; Yang, 2021). Isto posto, o *trans*-anetol, componente majoritário do óleo essencial do anis estrelado, teve seu potencial antifúngico e possíveis mecanismos de ação investigados pelo presente trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Candidíase

Candidíase é um termo amplo que se refere a infecções cutâneas, mucosas e de órgãos profundos, causadas por fungos do gênero *Candida*, que podem ocorrer em qualquer idade e geralmente em um contexto onde os fatores de risco de infecção são facilmente identificáveis (Pappas, 2018).

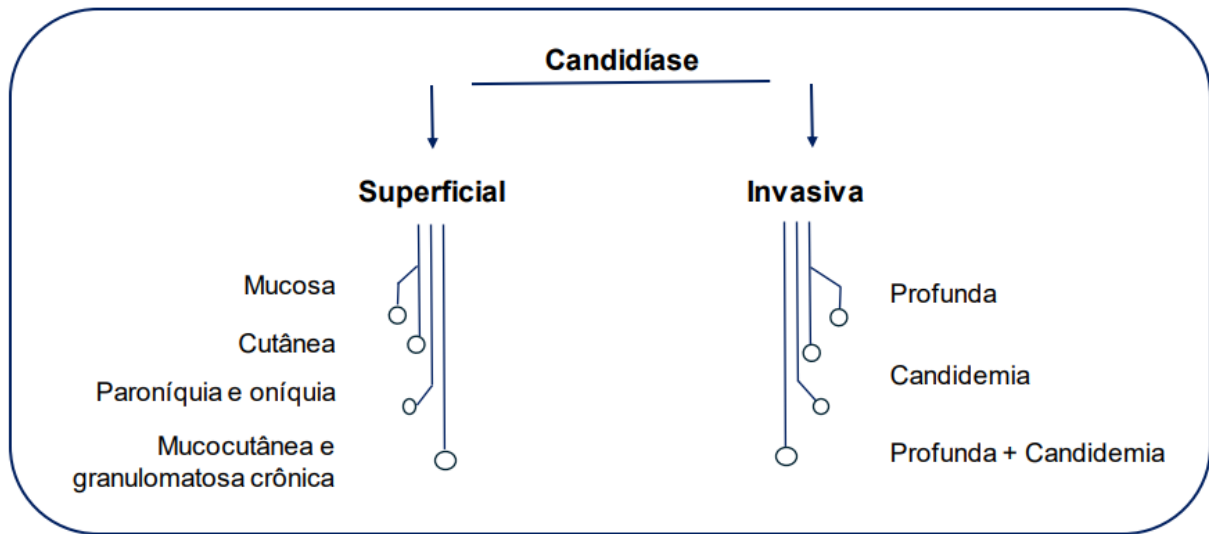
A candidíase é a micose emergente que apresenta maior repercussão devido à sua frequência e à gravidade de suas complicações. A candidíase superficial é uma das formas clínicas mais comuns. É caracteristicamente crônica e recorrente e, por vezes, indica o início de formas graves desta micose. (López; Martínez, 2010).

Nas micoses superficiais, as espécies fúngicas causais invadem especificamente o tecido tegumentar e parasitam a camada córnea da pele e outras estruturas ricas em queratina, nomeadamente cabelos e unhas. Seus efeitos resultam em coceira intensa e lesões incapacitantes no corpo, incluindo as partes íntimas, levando ao constrangimento social, além de afetar a qualidade de vida dos indivíduos (Sharma; Nonzom, 2021).

A candidíase superficial é classificada como: cutânea, mucosa (oral, vulvovaginal ou balanoprepucial), paroníquia e oníquia ou mucocutânea e granulomatosa crônica (López; Martínez, 2010). *Candida spp.* também são responsáveis por infecções fúngicas invasivas, frequentemente encontradas entre pacientes hospitalizados (Mccarty, 2021). A figura 1 mostra uma representação das classificações das candidíases.

A candidíase invasiva abrange um espectro de condições clínicas, das quais a mais frequente é a candidemia, que é relatada como uma das causas mais frequente de infecções da corrente sanguínea nos EUA e na Europa, estando associada a altas taxas brutas de mortalidade, internações hospitalares prolongadas e altos custos de saúde (Gonzalez-Lara; Ostrosky-Zeichner, 2020). A candidíase profunda ou CI é uma entidade clínica mais difícil de diagnosticar, pois está associada a várias síndromes que envolvem órgãos como fígado, baço, coração, olhos, peritônio, rim, ossos, meninges e pulmões, com ou sem candidemia concomitante (Antinori *et al.*, 2016).

Figura 1- Classificação das candidíases



Fonte: Santos, 2024

2.1.1 Agente etiológico

As espécies de *Candida* estão envolvidas na principal infecção fúngica oportunista do mundo, a candidíase, e entre as espécies do gênero, *Candida albicans* continua a ser a mais comum (Arya; Rafiq, 2023).

C. albicans é um fungo polimórfico que pode fazer a transição de uma fase de levedura para uma fase hifal e é comumente encontrado como comensal no corpo humano, colonizando assintomaticamente os tratos gastrointestinal, respiratório e reprodutivo, bem como a pele de aproximadamente 30-80 % de pessoas saudáveis (Strickland; Shi, 2021).

Embora uma proporção considerável de infecções por *C. albicans* surja de dispositivos médicos permanentes, estudos identificaram a população intestinal de *C. albicans* como a principal fonte de infecção endógena, especialmente após imunossupressão. Esses organismos podem causar infecções letais na corrente sanguínea (candidemia) e levar a doenças invasivas quando conseguem atravessar o epitélio intestinal (Allert *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento considerável na incidência de infecções fúngicas profundas, não apenas em pacientes imunocomprometidos, mas também relacionadas a infecções nosocomiais, e mesmo em população saudável. Assim, com o aumento da incidência de infecções fúngicas profundas, a ideia primitiva de que estavam relacionadas a um número restrito de fungos patogênicos e a uma área geográfica específica foi

completamente alterada. Além disso, com o rápido aumento na incidência de candidíase, outras espécies e microrganismos de *Candida*, além de *C. albicans*, têm estado envolvidos em tais infecções (Martins *et al.*, 2014; Arya; Rafiq, 2023).

O número de relatos de infecções causadas por espécies de *Candida não-albicans* (NAC) é crescente. Os principais problemas destas espécies é a alta incidência de infecções em adultos associada à elevada mortalidade, decorrente do aumento de micro-organismos que apresentam resistência aos antifúngicos (Rocha *et al.*, 2021).

O aparente aumento do envolvimento das espécies NAC na candidíase humana pode estar parcialmente relacionado com melhorias nos métodos diagnósticos, como o uso de meios cromogênicos com capacidade de diferenciar espécies de *Candida*, bem como a introdução de técnicas moleculares no diagnóstico de rotina da fungemia e, mais recentemente, o uso da espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) (Liguori *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2022).

No entanto, a elevada prevalência de espécies NAC em doenças também pode ser um reflexo do seu nível inerentemente mais elevado de resistência a certos medicamentos antifúngicos em comparação com *C. albicans*, pois isso promoveria a sua persistência, possivelmente até em detrimento de *C. albicans*, nas infecções de espécies mistas tratadas com antifúngicos tradicionais (Silva *et al.*, 2012; Jabeen *et al.*, 2019).

Nos países ocidentais, *C. albicans*, *Candida glabrata* (nomenclatura atualizada: *Nakaseomyces glabrata*), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (nomenclatura atualizada: *Pichia kudriavzevii*) foram relatadas como agente causador da candidíase. Infelizmente, em comparação com *C. albicans*, existem relativamente poucos estudos que examinam os impactos destas espécies NAC (Jabeen *et al.*, 2019; Borman; Johnson, 2021).

2.1.1.1 *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) e *Candida parapsilosis*

De todas as espécies de NAC, as infecções causadas por *C. glabrata* dominam a lista de NACs resistentes a medicamentos. *C. glabrata* é responsável por 15–25% dos casos de candidíase invasiva, com 40 a 60% de mortalidade e/ou morbidade. Nos EUA e no noroeste da Europa, *C. glabrata* é responsável pelo

segundo maior número de infecções da corrente sanguínea (BSIs) em pacientes de UTI. Além disso, em mulheres com candidíase vulvovaginal, a prevalência de *C. glabrata* é excepcionalmente alta, com quase 40% de chance de recorrência (Galocha *et al.*, 2019; Hassan; Chew; Than, 2021; Gupta *et al.*, 2022).

No que diz respeito à bioquímica das espécies de *Candida*, *C. glabrata* fermenta e assimila apenas glicose e trealose, o que contrasta com *C. albicans*, que assimila vários açúcares com a notável exceção da sacarose. Geneticamente, ela possui um genoma haplóide, em contraste com o genoma diplóide de *C. albicans* e várias outras espécies NAC (Kumar *et al.*, 2022).

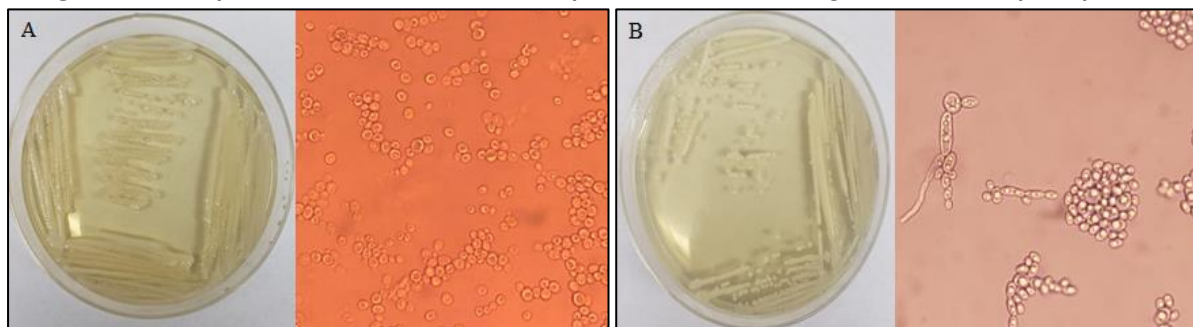
Neste sentido, a *C. parapsilosis* também tem se destacado como um importante agente causador de infecções por *Candida*. Das espécies NAC comumente isoladas, *C. parapsilosis* é frequentemente a segunda ou terceira mais prevalente, dependendo do grupo de pacientes, bem como das regiões geográficas (Tóth *et al.*, 2019).

Também pode ser denominada de um complexo de *C. parapsilosis*, pois pode ser dividida em três espécies irmãs: *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, e causa uma ampla gama de apresentações clínicas, desde colonização até infecções superficiais e disseminadas, com alta prevalência em bebês prematuros e potencial para causar surtos em ambientes hospitalares (Govrins; Lass-Flörl, 2024).

O complexo *C. parapsilosis* é incapaz de fermentar a maltose; geralmente se apresenta como células de levedura redondas ou alongadas com formação de pseudo-hifas (Figura 2). Geneticamente, apresenta um genoma diplóide semelhante a maior parte das espécies do gênero (Gomez-Molero *et al.*, 2020; Tóth *et al.*, 2019).

Embora se saiba que a *C. parapsilosis* infecta neonatos e crianças, as infecções também aumentaram nas populações adultas e tornaram-se particularmente preocupantes nos últimos anos devido a um forte aumento na resistência aos azóis e a numerosos surtos de *C. parapsilosis* nosocomiais resistentes ao fluconazol (Diaz-Garcia *et al.*, 2022).

Figura 2 - Aspectos macro e microscópicos de *Candida glabrata* e *C. parapsilosis*



A. macro e microscopia de *Candida glabrata* em meio Sabouraud; aumento óptico de 400 x. **B.** macro e microscopia de *Candida parapsilosis* em meio Sabouraud; aumento óptico de 400x.

Fonte: Santos, 2024

2.2 Tratamento e manejo clínico das candidíases

Os agentes antifúngicos estabelecidos para o tratamento da candidíase pertencem a quatro classes de medicamentos: azóis, polienos, equinocandinas e análogos da pirimidina (flucitosina). Azóis e polienos atuam ao nível da membrana fúngica, as equinocandinas na parede celular do fungo e a flucitosina prejudica a síntese de ácidos nucleicos (Tortorano *et al.*, 2021). A seleção do tratamento antifúngico é baseada em múltiplos fatores, incluindo o estado imunológico do hospedeiro, a extensão da infecção, a tolerância prévia ao medicamento e a resistência antifúngica (Ordaya; Clement; Vergidis, 2023).

O tratamento da candidíase é restrito pelo arsenal terapêutico limitado, alto custo e estreito espectro de ação dos antifúngicos. Outro obstáculo são os perfis de toxicidade de certas terapêuticas disponíveis devido à semelhança entre células fúngicas eucarióticas e humanas, manifestando-se como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Scorzoni *et al.*, 2021). A tabela 1 destaca alguns aspectos das principais classes de antifúngicos usados atualmente.

Alguns regimes medicamentosos requerem hospitalização para monitorar esses efeitos tóxicos e podem exigir mediação por meio de dosagens ajustadas, uso limitado ou, eventualmente, descontinuação da terapia. O tratamento eficaz também é dificultado pela emergência global de resistência e pela variação de espécies clinicamente significativas, com diferentes padrões de epidemiologia e suscetibilidade. A resistência desenvolvida coloca tensão num arsenal de drogas já limitado e falhas medicamentosas também podem ocorrer quando os medicamentos

para doenças primárias antagonizam os agentes antifúngicos administrados. (Tverdek; Kofteridis; Kontoyiannis, 2016; Scorzoni *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Principais classes de antifúngicos usados no tratamento das candidíases

Classe	Via mecanística	Agente e via de administração	Indicação clínica	Desvantagens	Referências
Azólicos	Bloqueio da síntese de colesterol; inibe a 14 α -lanosterol desmetilase	Miconazol: Tópico Supositório Bucal	Candidíase cutânea; vulvovaginal	Limitados ao uso mucocutâneo	Mohamed, Lu, Mounmin, 2019
		Clotrimazol: Tópico Oral	Candidíase cutânea; orofaríngea		Sawant, Khan, 2017
		Cetoconazol: Tópico Oral	Candidíase cutânea		
		Fluconazol: Oral Intravenoso	Candidíase orofaríngea; vulvovaginal; candidemia	Hepatotoxicidade; efeitos gastrointestinais	Scorzoni <i>et al.</i> , 2021
		Itraconazol: Oral Intravenoso	Candidíase orofaríngea; Candidíase refratária ao fluconazol		Tortorani <i>et al.</i> , 2021
		Voriconazol: Intravenoso Oral	Candidíase orofaríngea; Invasiva; candidemia		Pappas <i>et al.</i> , 2016
Poliênicos	Afinidade pelo ergosterol; compromete a integridade da membrana e K ⁺ efluxo	Nistatina: Cutânea Vaginal Tópico Oral	Candidíase cutânea; orofaríngea; vulvovaginal	Limitado ao uso mucocutâneo	Sousa <i>et al.</i> , 2023
		Anfotericina B: Intravenoso	candidemia	Nefrotoxicidade	Pappas <i>et al.</i> , 2016 Steimbach <i>et al.</i> , 2017; Pappas <i>et al.</i> , 2016
Equinocandinas	Inibição da (1,3) β -D glucano sintase; compromete a parede celular do fungo	Caspofungina: Intravenoso	Candidíase invasiva; candidemia; infecções por biofilme de	Custo elevado; limitado ao uso intravenoso	Mccarty, White, Pappas, 2021
		Micafungina: Intravenoso	<i>Candida</i> relacionadas a cateteres; infecções de		
		Anidulafungina: Intravenoso	<i>candidas</i> azoles-resistentes		
	Inibe a	5-fluorocitosina	Em		

Flucitosina	transcrição, a replicação do DNA e a síntese de proteínas	(5-FC): intravenoso	combinação com AmB - candidíase invasiva e ocular	Hepatotoxicidade; nefrotoxicidade; efeitos gastrointestinais	LiverTox, 2018; Padda, Pamar, 2023
-------------	---	---------------------	---	--	------------------------------------

Fonte: Santos, 2024

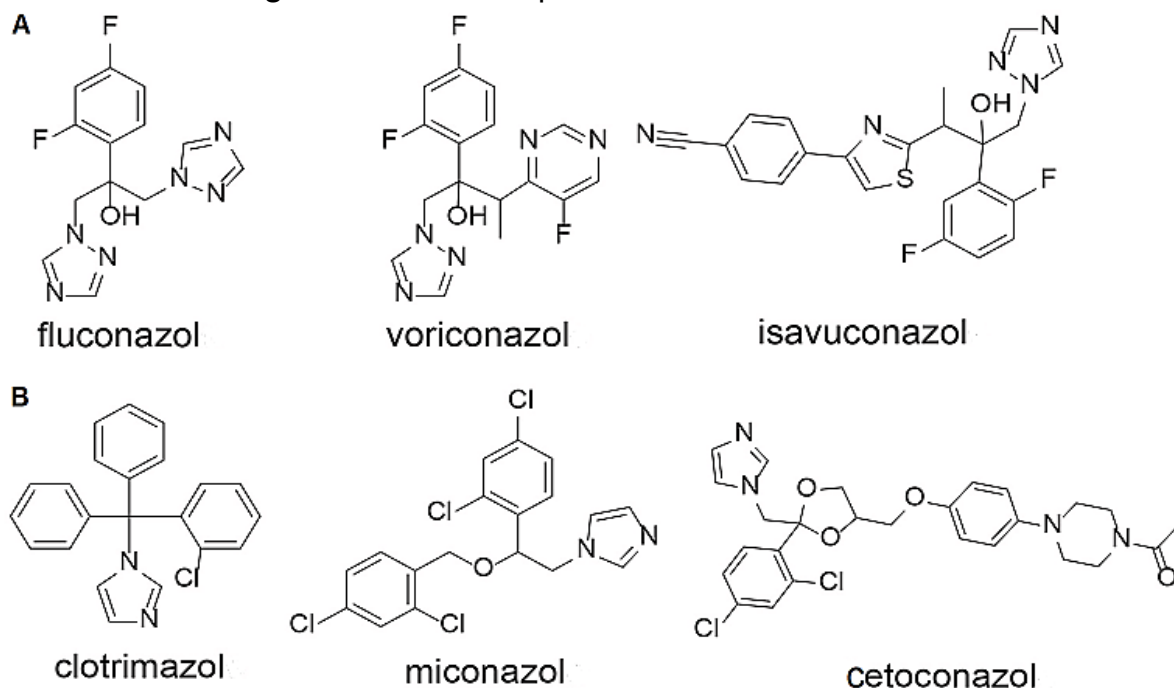
2.2.1 Azóis

Os azóis consistem em duas subclasses baseadas no número de átomos de nitrogênio no anel: os imidazóis, que contêm dois átomos de nitrogênio, e os triazóis, formados por três átomos de nitrogênio (Lee; Lee, 2018). A figura 3 retrata os detalhes estruturais de alguns importantes azóis disponíveis.

Os membros da classe azólica inibem a 14 α -lanosterol demetilase, uma das enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol. O ergosterol é o principal componente da membrana citoplasmática do fungo e os azóis induzem um efeito fungistático pela depleção do ergosterol e acúmulo de esteróis 14-metilados tóxicos (Ahmadi *et al.*, 2022).

Devido à sua atividade antifúngica potente e de amplo espectro, a classe dos antifúngicos azólicos é uma das recomendações de primeira linha mais amplamente aplicadas para a profilaxia e tratamento de muitas infecções fúngicas invasivas. Derivados de imidazol mais antigos, como clotrimazol, miconazol e cetoconazol, são usados principalmente para tratar micoses superficiais. Em resposta, antifúngicos triazólicos, incluindo itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, foram desenvolvidos para atender à necessidade de aplicações sistêmicas (Beck, Odermatt, 2021).

Figura 3 - Estrutura química dos derivados azólicos



Principais classes de derivados azólicos; **A.** derivados triazólicos; **B.** derivados imidazólicos

Fonte: Santos, 2024

No entanto, o uso de derivados azólicos não pode ocorrer de forma indiscriminada. Há evidências claras de que a exposição aos azóis através de doses subclínicas ou por tempo prolongado promove resistência aos azóis. Em relatório histórico, em 2013, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) listaram espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol entre os patógenos que representam séria ameaça à saúde humana (Paiva; Pereira, 2023).

Além disso, os efeitos adversos comuns aos azóis como classe incluem: prolongamento do intervalo QTc e elevações das enzimas hepáticas/hepatotoxicidade. Outros sintomas incluem alopecia, neuropatia periférica e efeitos gastrointestinais (Benitez; Carver, 2019; Jonhson, 2021).

2.2.2 Polienos

Os polienos exercem sua atividade antifúngica interagindo com esteróis na membrana celular do fungo, criando canais não aquosos e aquosos que levam ao vazamento de conteúdo celular, como o potássio, através desses poros. Isso leva à perda do potencial da membrana e subsequente colapso celular (Jonhson, 2021).

A nistatina é o medicamento antifúngico poliênico mais antigo e apresenta um espectro antifúngico bastante amplo, tornando-o um candidato competente para o tratamento de diversas infecções fúngicas. Porém, devido à sua toxicidade sistêmica e baixa permeabilidade intestinal, seu uso terapêutico é restrito a infecções fúngicas cutâneas e mucocutâneas (vaginais e orais) causadas por *Candida* (Sousa *et al.*, 2023).

A anfotericina B (AmB) foi o primeiro antifúngico aprovado para uso clínico em infecções fúngicas sistêmicas e continua sendo o único polieno disponível atualmente para esse uso. Nas últimas duas décadas, assistimos à evolução contínua dos antifúngicos triazóis e equinocandina, mais bem tolerados, de tal forma que a anfotericina B, já não é considerada uma escolha primária para certas infecções fúngicas, incluindo a candidíase invasiva (Logan; Wolfe; Williamson, 2022).

A formulação inicial foi o desoxicolato de anfotericina B (DAmB) e teve seu uso limitado pelo efeito nefrotóxico e reações relacionadas a infusão. Novas formulações menos tóxicas, à base de lipídios, foram desenvolvidas, incluindo lipossomas, complexos lipídicos e dispersão coloidal (Steimbach *et al.*, 2017).

O complexo lipídico AmB (ABLC, a maior das preparações lipídicas) está disponível no mercado em alguns países, enquanto a produção da dispersão coloidal AmB, um complexo de sulfato de colesteril de AmB, foi interrompida. A anfotericina B lipossomal (AmBisome®; LAmB) tem sido a formulação lipídica mais utilizada há quase 30 anos; é usado para tratar uma ampla gama de infecções fúngicas devido à sua atividade antifúngica, tolerabilidade e eficácia (Gómez-López, 2020).

2.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas têm como alvo a 1,3- β -D-glucana sintase, causando uma diminuição na síntese de 1,3- β -D-glucana, um componente essencial da parede celular do fungo. Em relação a sua estrutura química, são lipopeptídeos cíclicos semissintéticos, com boa solubilidade em água e formulações intravenosas (Szymański *et al.*, 2022).

As três equinocandinas, caspofungina, micafungina e anidulafungina, foram os primeiros antifúngicos da classe desenvolvidos para atingir seletivamente a parede celular do fungo. Como as células dos mamíferos não possuem parede celular, as equinocandinas não atuam diretamente nas células humanas. Essa especificidade do alvo levou à redução de casos de efeitos colaterais e eventos adversos em comparação com a terapia com outros agentes antifúngicos básicos, como a anfotericina B e a classe azólica de medicamentos antifúngicos (Patil; Majumdar, 2017).

Esses agentes estão disponíveis apenas como preparações parenterais. Apesar dessa limitação, a excelente eficácia documentada, poucas interações medicamentosas, excelente tolerância do paciente e preocupações com a resistência ao fluconazol levaram os médicos a favorecer as equinocandinas como terapia inicial para a maioria dos pacientes adultos com candidemia (McCarty; White; Pappas, 2021).

Eles geralmente retêm atividade contra a maioria das espécies de *Candida* resistentes aos azóis. Contudo, a resistência às equinocandinas tem aumentado na última década, especialmente entre isolados de *C. glabrata* (Logan; Wolfe; Williamson, 2022).

A manifestação de resistência às equinocandinas vem sendo analisada extensivamente e foi atribuída às mutações na enzima glucano sintase. Na última década, os casos de emergência clínica de resistência à equinocandina têm aumentado constantemente para numerosas espécies de *Candida*. Com os mecanismos básicos deste fenômeno já conhecidos, o trabalho de síntese de novos representantes mais eficazes de equinocandinas já são considerados (Patil; Majumdar, 2017; Szymański *et al.*, 2022).

2.2.4 Fluocitosina pirimidina

A flucitosina (5-FC) age ao entrar em contato com o fungo e ser absorvida pela enzima citosina permease. Dentro da célula fúngica, é convertida em sua forma ativa, 5-fluorouracil (5-FU), pela enzima citosina desaminase. O 5-FU interfere na síntese de RNA ao competir com o uracil, prejudicando a produção de proteínas (Sigera; Denning, 2023).

Além disso, inibe a síntese de DNA ao se converter em ácido fluoro-desoxiuridílico e inibir a timidilato sintase, causando danos ao DNA das células fúngicas. A ausência da enzima citosina desaminase em células de mamíferos explica sua inatividade em células humanas (Padda; Pamar, 2023).

Devido aos seus efeitos adversos e altas taxas de desenvolvimento de resistência, sua atividade e uso na prática clínica têm sido limitados. É especialmente recomendado em combinação com AmB para o tratamento da criptococose meníngea (Quiles-Melero; García-Rodríguez, 2021).

A toxicidade da flucitosina pode se manifestar com hepatite, insuficiência renal e sintomas gastrointestinais, como diarreia, náusea e vômito. É recomendado exames de rotina para monitorar se a flucitosina está na faixa ideal e se o paciente não apresenta nenhuma toxicidade e dano ao fígado, rins ou medula óssea (LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, 2018; Padda; Pamar, 2023).

2.3 Pesquisas por novos compostos para o tratamento das candidíases

Apesar da necessidade de mais opções de medicamentos antifúngicos, nenhuma nova classe de medicamentos antifúngicos se tornou disponível nas últimas duas décadas, e apenas um único novo agente, o isavuconazol, de uma classe antifúngica conhecida (os azóis), foi aprovado na última década (Hoenigl *et al.*, 2021).

As combinações de medicamentos também são uma estratégia importante para o tratamento de muitas doenças e têm recebido muita atenção nos últimos anos devido ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos antimicrobianos. As combinações de medicamentos podem produzir os efeitos sinérgicos, especialmente importantes para os pesquisadores (Zhu *et al.*, 2023).

Há uma variedade de abordagens para a descoberta de drogas antifúngicas, incluindo o ensaio baseado em crescimento, onde a densidade óptica como uma indicação de crescimento celular é utilizada. Normalmente, protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e do Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) são utilizados para determinar a

suscetibilidade *in vitro* contra uma variedade de patógenos fúngicos (Fernandes *et al.*, 2021).

A descoberta de medicamentos antifúngicos é um desafio, pois os patógenos fúngicos usam a mesma maquinaria eucariótica que os humanos, reduzindo assim o número de alvos específicos de patógenos. Portanto, é essencial identificar mecanismos bioquímicos exclusivos para os fungos como alvos de descoberta de drogas, a fim de desenvolver a(s) próxima(s) geração(s) de terapias antifúngicas (Pianalto, Alspaugh, 2016).

Neste sentido, uma outra abordagem que vem ganhando força na descoberta de agentes com propriedades biológicas são os métodos *in silico*. Eles permitem obter informações antes da realização dos testes biológicos, podendo reduzir os tempos e custos de análise, considerando o elevado número de variáveis que podem influenciar a atividade biológica de um composto individualmente ou em misturas (Rampone *et al.*, 2021).

Um antifúngico idealmente deve ter propriedades como: toxicidades ou efeitos colaterais mínimos; ser direcionado a um alvo fúngico específico e evitar interferência com alvos do hospedeiro; efeitos preferencialmente fungicidas; um amplo espectro de atividade contra fungos (Mazu *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2021).

2.3.1 Produtos naturais

A busca de compostos naturais ou sintéticos como drogas antifúngicas tem seu próprio conjunto de vantagens. Uma característica única dos produtos naturais é a sua alta diversidade estrutural, acessando áreas do espaço químico que são de difícil acesso através de compostos puramente sintéticos. Os produtos naturais também são bem validados por possuírem atividade biológica, com muitos exemplos aprovados como agentes terapêuticos na sua forma nativa ou como derivados semissintéticos (Aldholmi *et al.*, 2019).

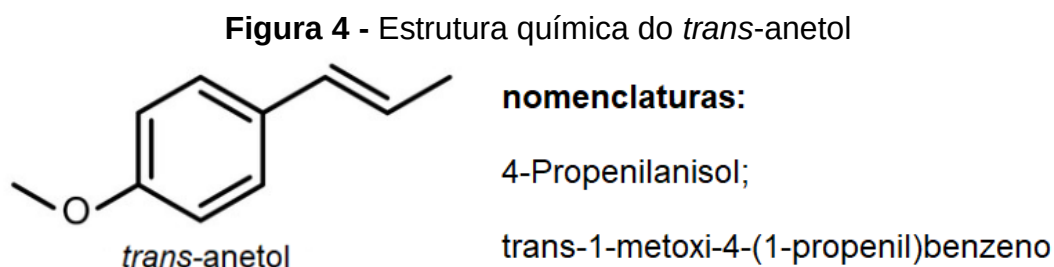
Neste contexto, as plantas são fonte de muitos compostos que apresentam ampla atividade biológica, incluindo ação sobre diversas espécies de fungos. Um importante grupo de constituintes vegetais inclui metabólitos secundários, que

podem ser divididos em quatro classes: compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides e compostos contendo enxofre (Wózniak, 2022).

Admite-se também que compostos de plantas poderiam exibir mecanismo de ação diferente daqueles dos azóis e outros medicamentos antifúngicos hoje disponíveis. Outro ponto é que as combinações de agentes ativos podem revelar-se mais úteis como agentes quimioterapêuticos do que os compostos utilizados isoladamente. Portanto, algumas substâncias naturais são investigadas quanto ao sinergismo com azóis, polienos ou equinocandinas hoje usadas no tratamento de infecções por *Candida* (Zida *et al.*, 2017).

2.3.1.1 *Trans*-anetol

O *trans*-anetol (TA) é um fenilpropanóide (Figura 4), principal constituinte volátil do fruto *Illicium verum*, conhecido popularmente como anis estrelado e utilizado como agente aromatizante nas indústrias alimentícia, cosmética, de perfumes e farmacêutica. Vários estudos realizados durante os últimos anos revelaram que o anetol exerce múltiplos efeitos benéficos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênicos, quimiopreventivos, antidiabéticos, imunomoduladores, neuroprotetores e antitrombóticos (Tsukuda *et al.*, 2022).



Fonte: Santos, 2024

Em camundongos, ratos e humanos, o *trans*-anetol administrado oralmente são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e completamente metabolizados principalmente no fígado para produzir metabólitos ácidos polares, que são conjugados e eliminados principalmente na urina (Newberne *et al.*, 1999).

Em relação à toxicidade aguda, os valores de DL₅₀ oral para o *trans*-anetol estão na faixa de 1820 a 5000 mg/kg de peso corporal. Além disso, nenhuma hepatotoxicidade significativa foi observada em ratos machos ou fêmeas em níveis

de dose de até 300 mg de *trans*- anetol/kg de peso corporal/dia por 90 dias. Os dados disponíveis também demonstram que o anetol não apresenta mutagenicidade e genotoxicidade (Newberne *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1964).

Foi observada uma hepatotoxicidade considerável apenas quando ratas foram submetidas a altos níveis de TA, em uma ingestão dietética crônica de 550 mg de *trans* -anetol/kg de peso corporal/dia (819-847 dias) (Truhaut *et al.*, 1989).

Dessa forma, o *Illicium verum* foi classificado pelo Ministério da Saúde da República Popular da China (2002) como um dos itens que podem ser considerados tanto "alimento quanto remédio". Essa classificação indica que ele apresenta baixa toxicidade para os seres humanos (WEI, 2014).

Os efeitos antifúngicos do TA foram analisados frente a *Aspergillus flavus*, *Magnaporthe oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*. A atividade antibacteriana também vem sendo reportada. Os constituintes voláteis são geralmente produtos químicos lipofílicos com baixos pesos moleculares e suas propriedades antimicrobianas têm aumentado o interesse no desenvolvimento de fórmulas com atividade fungicida (Lei *et al.*, 2023; Bao *et al.*, 2023).

No entanto, os mecanismos antimicrobianos do TA raramente foram relatados, o que restringe nossa compreensão de sua ação sobre os micro-organismos. Além disso, a análise do TA como componente isolado também não foi aprofundada. A tabela 2 detalha as principais publicações envolvendo o TA como um componente majoritário e/ou isoladamente.

Tabela 2 - Levantamento das publicações envolvendo a atividade antimicrobiana do *trans*-anetol (TA)

Componente majoritário	Isolado	Artigo	Descrição	Referências
	X	Antifungal effects of trans-anethole, the main constituent of <i>Illicium verum</i> fruit volatiles, on <i>Aspergillus flavus</i> in stored whea	Atividade considerável contra <i>Aspergillus flavus</i> em grãos de trigo	Lei <i>et al.</i> , 2023
	X	Inhibitory Effect of Eugenol and trans-Anethole Alone and in Combination with Antifungal Medicines on <i>Candida albicans</i> Clinical Isolates	Atividade antifúngica em sinergismo com o Eugenol contra <i>Candida spp.</i>	Dąbrowska M <i>et al.</i> , 2021
X		Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica	Atividade antifúngica do <i>Illicium verum</i> (90% TA) contra fungos em extrato de tomate	Almeida <i>et al.</i> , 2015
		Chemical composition of	Atividade antifúngica do óleo essencial de	

X		essential oils from the apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity in vitro against candida species from oral cavity	<i>Anethum graveolens</i> (79% TA); eficaz contra <i>Candida spp</i> da cavidade oral.	Vieira <i>et al.</i> , 2019
X	X	The effect of fennel essential oil and trans-anethole on antibacterial activity of mupirocin against <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from asymptomatic carriers	O óleo essencial de erva doce (77,9% TA) e do TA isolado com mupirocina aumentou a atividade antibacteriana deste último.	Kwiatkowski, Paweł <i>et al.</i> , 2019
X		Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of <i>Illicium verum</i>	Atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial de <i>Illicium verum</i> (86,43% TA). Atividade contra cepas gram- e gram+	Outemsaa, Brahim <i>et al.</i> , 2021
X	X	Antifungal Activity of the Essential Oil of <i>Illicium verum</i> Fruit and Its Main Component trans-Anethole	Atividade do óleo essencial e do TA isolado contra fungos fitopatogênicos	Huang <i>et al.</i> , 2010
X		Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (<i>Pimpinella anisum</i> L., Apiaceae)	Atividade antifúngica considerável do óleo essencial do fruto de anis contra <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> and <i>C. krusei</i>	Kosalec <i>et al.</i> , 2008
X		Antimicrobial and antioxidant activities of fennel oil	Atividade do óleo essencial de erva doce (82% TA) contra bactérias gram – e gram +	Naaz <i>et al.</i> , 2022

Fonte: Santos, 2024

Deste modo, este trabalho se concentrou na análise da atividade antifúngica do TA frente a cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* e ainda, nos possíveis mecanismos pelo qual esta atividade se manifesta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antifúngico do trans-anetol sobre cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas e fungicidas mínimas (CIM e CFM) do trans-anetol frente a cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*;
- Estabelecer os tipos de interações do trans-anetol em associação com fluconazol frente às cepas estudadas;
- Investigar as interações entre o trans-anetol e a parede celular das leveduras;
- Avaliar as interações do trans-anetol e da membrana celular fúngica;
- Estudar as interações moleculares do *trans*-anetol com a enzima Pdr5 por meio do *docking* molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

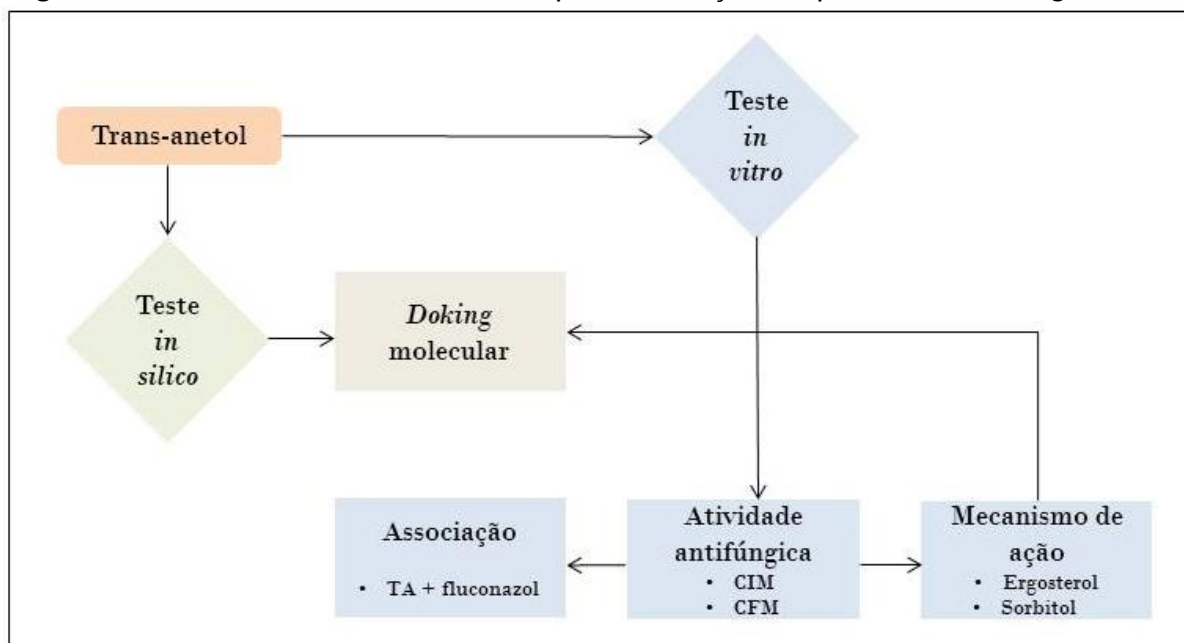
4.1 Local da pesquisa

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

4.2 Fluxograma dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos a partir de uma sequência coordenada de etapas, compreendendo testes *in vitro* e *in silico* (figura 5). Este processo possibilita a otimização de tempo, reagentes e insumos, além da obtenção de resultados relativamente rápidos, robustos e em acordo com as metodologias propostas nos mais variados centros de pesquisa.

Figura 5 - Fluxo dos testes realizados para avaliação do potencial antifúngico do TA



Fonte: Santos, 2024

4.3 Preparo de materiais e micro-organismos

4.3.1 Cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 10 cepas. 5 cepas de *Candida glabrata*, sendo 4 linhagens clínicas (LM 13, LM16, LM 78 E LM 302) e 1 padrão (ATCC® 90030). Das 5 cepas de *Candida parapsilosis*, 4 eram de linhagens clínicas (LM 33, LM 60, LM 65 e LM 197) e 1 padrão (ATCC® 22019). Todas as cepas são oriundas da coleção do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos. As linhagens fúngicas foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda), a uma temperatura de 4°C. Foram utilizadas para os ensaios, repiques de 48 horas incubados à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Bona, *et al.*, 2014; Dunlap; Madigan; Martinko, 2010).

4.3.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios Agar Sabouraud Dextrose (ASD), para a manutenção das cepas fúngicas, e RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato, para ensaios de atividade antifúngica, adquiridos comercialmente da Difco Laboratories Ltd (USA, France) e INLAB, São Paulo, Brasil, respectivamente. Ambos os meios foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, sendo solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4.3.3 Substância

Foi utilizado como produto-teste o fenilpropanóide *trans*-anetol [4-Propenilanol, *trans*-1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno] (Figura 1) (pureza: $\geq 98,5\%$) adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich® (Ponta Grossa, PR, Brasil). A solução de trabalho foi preparada no momento de execução dos ensaios, pesando o TA em balança analítica (SHIMADZU) e, em seguida, solubilizando-o em 150µL (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO) adicionados de 50µL (1%) de tween 80. Logo após, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 5mL) para obtenção de uma

emulsão na concentração inicial de 1024µg/mL. Analogamente, o fármaco utilizado como controle na execução das metodologias foi o fluconazol (FLU), adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP, Brasil) e preparado segundo as especificações dos fabricantes e nas concentrações adequadas para cada ensaio (Bona *et al.*, 2014).

4.3.4 Inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de culturas recentes de cada uma das cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* selecionadas, previamente cultivadas em tubos esterilizados contendo ASD, inclinados e incubadas à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h para atingirem o crescimento satisfatório. No preparo das suspensões das linhagens fúngicas, as colônias de preparo recentes foram diluídas em 5mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 15s com auxílio do aparelho vórtex (Fanem), logo após, a densidade do inóculo foi padronizada conforme a escala de McFarland 0,5 para a obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2012; Hadacek; Greger, 2000).

4.4 Ensaio *in vitro*

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação de atividade antifúngica do *trans*-anetol foi realizada conforme os protocolos da CLSI (2012) e Hadacek, Greger (2000) com poucas modificações. A CIM do TA foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em caldo em placa para cultura de células (Kasvi, Kasvi Imp e Dist. Prod/Laboratório LTD, Curitiba, Brasil), contendo 96 poços. Foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI-1640-L-glutamina duplamente concentrado nos orifícios da placa. Posteriormente, 100 µL da emulsão contendo o TA foi dispensado somente nas cavidades da primeira linha da placa de microdiluição. Em seguida, a substância investigada foi diluída de forma seriada na razão 1:2, obtendo-se assim,

concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas fúngicas ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) nas cavidades.

Da mesma forma, este procedimento foi realizado para o antifúngico fluconazol, avaliando a susceptibilidade das cepas ao antifúngico padrão. Foi realizado também o controle de crescimento dos micro-organismos, colocando-se nas cavidades da placa 100µL do RPMI-1640 duplamente concentrado, 100µL de água destilada estéril e 10µL do inóculo de cada linhagem. Além disso, foi realizado um controle de esterilidade do meio de cultura, no qual foram colocados 200µL do RPMI-1640 em um orifício da placa, na ausência da suspensão fúngica.

O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24-48h. Decorrido o tempo delimitado, foi realizada a leitura para registro dos dados. A CIM foi considerada como a menor concentração do agente antifúngico, responsável por impedir o crescimento visível do microrganismo, enquanto a CIM₅₀ foi definida como a concentração responsável por inibir o crescimento visível de 50% dos micro-organismos, levando em consideração o total de cepas testadas (Bona *et al.*, 2014).

A substância foi classificada de forte atividade quando a CIM foi de até 600 µg/mL; moderada atividade quando a CIM variou entre 600 e 1500 µg/mL. acima de 1500 µg/mL foi denominada de fraca atividade ou inativa (Holetz *et al.*, 2002; Sartoratto *et al.*, 2004).

4.4.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura da CIM, alíquotas de 10µL do sobrenadante dos poços onde ocorreu inibição completa do crescimento fúngico (CIM, CIM × 2 e CIM × 4) foram subcultivadas em 100µL de RPMI-1640 em novas placas de 96 poços. O sistema foi então, assepticamente selado e incubado à 35 ± 2 °C por 24-48h. A CFM foi definida como a menor concentração no qual não houve evidência de crescimento das leveduras.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média aritmética das CFMs obtidas nos três ensaios. Analogamente, os mesmos procedimentos foram realizados com o antifúngico padrão (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008). A atividade antifúngica foi classificada por meio da razão entre

CFM/CIM, em que se considerou fungicida quando CFM/CIM <4 e fungistática, quando CFM/CIM ≥ 4 (Siddiqui *et al.*, 2013).

4.4.3 Ensaio com sorbitol - Ação do *trans*-anetol sobre a parede celular fúngica

A determinação da CIM do TA na presença de sorbitol, um protetor osmótico dos protoplastos fúngicos, foi realizado por microdiluição em placas de 96 poços. A cada poço foram adicionados 100 μ L de RPMI-1640 suplementado com sorbitol de massa molecular 182,17g (Vetec Química Fina LTDA - Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ambos duplamente concentrados. Em seguida, 100 μ L da emulsão do TA foram dispensados aos poços da primeira linha da placa. Usando diluição em série na razão de dois, as concentrações necessárias dos produtos foram obtidas em cada poço com uma concentração final de sorbitol de 0,8mol/L. Por fim, foram adicionados aos poços da placa 10 μ L dos inóculo de uma cepa representativa de *C. glabrata* e uma cepa de *C. parapsilosis*, em que cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica específica (Frost *et al.*, 1995; Escalante *et al.*, 2008; Georgopapadakou, 2001).

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

4.4.4 Ensaio com ergosterol - Ação do *trans*-anetol sobre a membrana celular fúngica

De forma semelhante ao ensaio com sorbitol, foi realizada a determinação da CIM do TA frente às cepas selecionadas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* desta vez, na presença do ergosterol exógeno, por microdiluição, conforme descrito anteriormente no item 4.4.1 para a determinação da CIM. Neste caso, foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 previamente adicionado de 400 μ g/mL de ergosterol

(Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). E o controle do crescimento dos microrganismos foi realizado com 100µL do meio de cultura e o ergosterol em iguais concentrações e 10µL de cada inóculo fúngico. As placas foram então, assepticamente seladas e incubadas à $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48h. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos três ensaios. Dessa maneira, foi possível comparar os valores da CIM do TA frente às cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* na ausência e na presença de ergosterol exógeno (Escalante *et al.*, 2008).

4.4.5 Ensaio de associação/sinergismo – *Checkerboard*

O ensaio de associação foi realizado através da técnica de *checkerboard*, utilizando placas de microdiluição, com 96 cavidades e fundo cônico (INLAB, São Paulo-SP, Brasil). Inicialmente, a partir dos valores de CIM obtidos, foram preparadas soluções do fármaco A (TA) e fármaco B (FLU) em diferentes concentrações (8XCIM, 4XCIM; 2XCIM; CIM; CIM/2; CIM/4; CIM/8). Em seguida, foi adicionado 100 µL de RPMI 1640, em todas as cavidades da placa. Posteriormente, foram distribuídos 50 µL do fármaco A, nas diferentes concentrações horizontalmente, enquanto para que o fármaco B, teve 50 µL distribuído em diferentes concentrações no sentido vertical. Assim, todas as diferentes concentrações foram testadas e combinadas entre os fármacos. Por fim, adicionou-se 20 µL do inóculo (Huang; Wang; Sun, 2019).

A aferição do potencial antimicrobiano foi obtida através da associação entre fármacos e foi determinado através da Concentração Inibitória Fracionária (CIF):

$$\text{CIF}_A = \frac{\text{CIM do produto A combinado}}{\text{CIM do produto A individualmente}} \quad \text{e} \quad \text{CIF}_B = \frac{\text{CIM do produto B combinado}}{\text{CIM do produto B individualmente}}$$

Posteriormente, calculou-se o Índice da Concentração Inibitória Fracionária a partir da seguinte equação:

$$\text{ICIF} = \text{CIFA} + \text{CIFB}$$

Assim, considerou-se associação sinérgica quando o ICIF for ≤ 0.5 ; associação indiferente quando $0.5 < \text{ICIF} \leq 4.0$ e associação antagônica caso $\text{ICIF} > 4.0$ (White *et al.*, 1996; Tobudic *et al.*, 2010).

4.5 Ensaios *in silico*

4.5.1 Docking molecular

O *docking* molecular é um método computacional virtual comumente usado para prever o complexo de duas moléculas de ligação, incluindo macromoléculas biológicas ou moléculas pequenas, como ligantes endógenos e fármacos. Além disso, o docking de moléculas pode ser usado para determinar interações de ligantes com proteínas alvo no desenvolvimento de fármacos baseados em sua estrutura (Chun *et al.*, 2023).

4.5.1.1 Modelagem por homologia da Pdr5 de *C. glabrata*

Devido à ausência da estrutura cristalizada em 3D da Pdr5 de *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), foi empregada a modelagem molecular por homologia a partir da sequência de aminoácidos consultada no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acesso em 12 de agosto de 2024) e utilizando a ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>, acesso em 14 de agosto de 2024) (Biasini *et al.*, 2014), foi construído o modelo 3D da Pdr5 de *C. glabrata*. Além disso, foi utilizado como base para a modelagem, a Pdr5 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* resolvida experimentalmente por EM e depositada no RCSB (<https://www.rcsb.org/>, PDB ID: 7P05). Após a construção do modelo, este foi sobreposto com a Pdr5 de *S. cerevisiae* utilizando o software PyMOL v.2.5.2 (The PyMOL). O servidor SWISS-MODEL foi utilizado para calcular as pontuações QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) e QMEANDisCo (QMEAN-Distance Constraint) do modelo da proteína. A validação da conformação do modelo foi realizada por meio do diagrama de Ramachandran, enquanto a análise dos ângulos de torção phi (Φ) e psi (Ψ) foi conduzida com o auxílio do servidor online

PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>, acesso em 14 de agosto de 2024) para verificar a conformidade com o modelo previsto. Adicionalmente, o modelo passou por uma verificação suplementar através do servidor online MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>, acesso em 14 de agosto de 2024) para confirmar sua validade (Sobolev *et al.*, 2020).

4.5.1.2 Preparação do ligante e da proteína Pdr5

Foram realizadas simulações de docking molecular rígido com as proteínas Pdr5 de *S. cerevisiae* (PDB ID: 7P05) ligada ao ATP, ADP e rodamina bem como, com o modelo resolvido por homologia cujas estruturas foram carregadas no software PyMol v.2.5.2, para a remoção de moléculas de água e outros artefatos. O ligante trans-anetol foi obtido do PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, acesso em 12 de agosto de 2024) no formato de entrada '.sdf', e utilizando o software Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012) em pH 7.4 e o campo de força MMFF94, foi pré-otimizado gerando o arquivo de saída '.mop' (Halgren, 2002). Então, a otimização foi concluída no software Mopac 2012 no nível PM7, gerando o arquivo de saída no formato '.pdb' (MOPAC, 2016), e as cargas AM1-BCC foram adicionadas usando o software UCSF Chimera 1.16, e o arquivo foi salvo no formato '.mol2' (Pettersen, 2004).

Posteriormente, os arquivos das proteínas com formato de entrada '.pdb' foram carregadas no software AutoDockTools versão 1.5.6 (ADT) (*Scripps Research Institute*, San Diego, California) (Morris *et al.*, 2009), para a adição dos hidrogênios polares e cargas de Kollman, além da mesclagem de hidrogênios não polares e salvas no formato de arquivo PDBQT. Em seguida, as simulações de docking foram feitas com a identificação do sítio ativo da Pdr5 com o centro de grid: (168.691; 153.878; 144.092 Å), dimensões (40 × 40 × 40) e espaçamento de 0.375 Å.

Então o docking foi desenvolvido no AutoDock 4.2 suite (Morris *et al.*, 2009), com 100 operações de algoritmo genético Lamarckiano e nos parâmetros padrões do ADT. Com isso, foram gerados valores de Energia Livre de Ligação (ΔG) e Constante Inibitória (K_i) sendo selecionadas as conformações com menor valor de ΔG . Por fim, com o auxílio dos softwares PyMol 2.5.2 (The PyMOL) e Discovery Studio (DS) Visualizer (2021) (Biovia, 2021), os resultados foram analisados,

determinando as regiões de ligação do alvo com a molécula ligante, os tipos de interações e os aminoácidos do sítio ativo que participam das ligações. A validação da metodologia foi realizada através do re-docking molecular, que consiste em refletir a posição e orientação do ligante encontrado na estrutura resolvida experimentalmente (ATP) e selecionar a conformação do ligante com menor valor de Root Mean Square Deviation (RMSD) das distâncias entre os átomos que dever ser $\leq 2.0 \text{ \AA}$ (Bell, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração inibitória mínima (CIM) foi testada e determinada para o *trans*-anetol nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia, sendo considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas visualmente. Os resultados dos ensaios que avaliam a atividade antifúngica do fitoconstituente contra cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* estão descritos a seguir.

Observou-se que para *C. glabrata* as cepas ATCC 9003, LM 302, LM 78, LM 13 e LM 16 foram sensíveis ao *trans*-anetol. Neste caso, a concentração necessária para inibir 50% (CIM₅₀) dos microrganismos investigados foi de 256 µg/mL, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias da CIM (µg/mL) do Trans-anetol e do fluconazol frente a cepas de *Candida glabrata*.

Micro-organismos	Trans-anetol	Fluconazol	Controle de cepas
<i>Candida glabrata</i>	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	
ATCC 90030	512	32	+
LM 302	256	64	+
LM 78	128	64	+
LM 13	128	512	+
LM 16	1024	512	+

(+) crescimento das cepas

A concentração fungicida mínima (CFM) permite compreender em qual concentração determinada substância se apresenta fungicida (Franconi; Lupetti, 2023). Em relação à CFM do TA nas cepas de *C. glabrata*, observou-se que os valores para ATCC 90030 e LM 78 foram, respectivamente, 512 µg/mL e 128 µg/mL e para as cepas LM 13 e LM 302 a CFM foi de 1024 µg/mL, como descrito na tabela 4.

O modo de ação foi classificado por meio da razão entre CFM/CIM, em que se considerou fungicida quando CFM/CIM < 4 e fungistática, quando CFM/CIM ≥ 4. Dessa forma, duas das cepas descritas foram sensíveis ao TA e, além de inibirem o

crecimento, foram capazes de destruir as células fúngicas, tornando-as inviáveis (Siddiqui *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Médias da CFM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol frente a cepas de *Candida glabrata*

Micro-organismos	Trans-anetol		Atividade
	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM/CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>Candida glabrata</i>			
ATCC 90030	512	1	Fungicida
LM 302	1024	4	Fungistático
LM 78	128	1	Fungicida
LM 13	1024	8	Fungistático

Em relação a CIM do TA frente as cepas de *Candida parapsilosis*, foi verificado que ATCC 22019, LM 33, LM 60 e LM 197 foram sensíveis ao TA, apresentando uma CIM₅₀ de 256 $\mu\text{g/mL}$ como destacado na tabela 5.

Tabela 5 - Médias da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol e do fluconazol frente a cepas de *Candida parapsilosis*

Micro-organismos	Trans-anetol	Fluconazol	Controle de cepas
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>Candida parapsilosis</i>			
ATCC 22019	128	32	+
LM 33	512	32	+
LM 60	256	64	+
LM 65	256	32	+
LM 197	256	32	+

(+) crescimento das cepas

No que se refere às cepas de *C. parapsilosis* testadas: ATCC 22019, LM 33, LM 60, LM 65 e LM 197, o TA apresentou efeito fungicida com CFM variando entre 128 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$, como descrito na tabela 6. Deste modo, essa

concentração, além de inibir o crescimento, foi fungicida para as referidas cepas (Siddiqui *et al.*, 2013).

Tabela 6 - Médias da CFM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol frente a cepas de *Candida parapsilosis*

Micro-organismos	Trans-anetol		Atividade
	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM/CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>Candida parapsilosis</i>			
ATCC 22019	128	1	Fungicida
LM 33	512	1	Fungicida
LM 60	256	1	Fungicida
LM 65	256	1	Fungicida
LM 197	256	1	Fungicida

A substância pode ser classificada como de forte atividade quando a CIM é de até 600 $\mu\text{g/mL}$; moderada atividade quando a CIM varia entre 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$; acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ é denominada de fraca atividade ou inativa (Holetz *et al.*, 2002; Sartoratto *et al.*, 2004).

O TA é um componente importante dos óleos essenciais derivados do anis estrelado ou erva-doce. Recentemente, foi relatado que este fenilpropanoide apresenta uma variedade de atividades biológicas, especialmente por seu amplo espectro de atividade contra fungos fitopatogênicos (Huang *et al.*, 2010).

As atividades reportadas também se estendem aos efeitos antimicrobianos contra bactérias e fungos, incluindo patógenos humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* (Fujita *et al.*, 2014), ainda assim, seu potencial frente a micro-organismos de interesse clínico não foi investigado profundamente.

No presente estudo, o TA apresentou CIM variando entre 128 $\mu\text{g/mL}$ e 1024 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida glabrata* e foi fungicida para duas das quatro cepas. De maneira semelhante, Dabrowska e colaboradores (2021) avaliaram o potencial antifúngico do trans-anetol contra *C. albicans* e obtiveram CIM que variou de 61mg/mL a 247 mg/mL. Do mesmo modo, as concentrações encontradas, embora mais altas, foram consideradas fungicidas para a maioria das cepas de *C. albicans*

testadas, ao passo que para algumas cepas o efeito observado foi fungistático, o que corrobora com nossos achados.

Os resultados encontrados estão alinhados com o estudo de Fujita, Fujita e Kubo (2007), em um dos primeiros relatos sobre a atividade do TA frente a micro-organismos. As CIMs relatadas para *C. albicans* e *S. cerevisiae* foram de 200 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Os efeitos antifúngicos do anetol e seus derivados contra o fungo modelo *S. cerevisiae* também foram avaliados por Tsukuda e colaboradores (2022). As concentrações inibitórias mínimas e fungicidas mínimas (CIM e CFM) do anetol, após um período de incubação de 48 horas, foram 0,625 e 1,25 mmol l⁻¹, respectivamente.

Em 2007, Nakajima e colaboradores já haviam reportado a atividade fungicida de uma preparação contendo o TA frente a cepas clínicas de *Candida* isoladas da mucosa oral de pacientes, incluindo *Candida glabrata* e *parapsilosis*. No referido estudo, a diluição inibitória mínima de 1:20 teve efeito sobre a maioria das 70 cepas teste (95,7%).

Mais recentemente, Dumitrecus *et al* (2023) exploraram a atividade antifúngica e antibacteriana de um óleo essencial de *Pimpinella anisum* L. (composto 72% de TA) contra cepas de *C. albicans*. Neste caso, os autores demonstraram uma boa taxa de inibição das cepas de bactérias gram-negativas e *C. albicans* a partir da densidade óptica (OD). Para *Candida albicans*, a porcentagem de inibição produzida pelo óleo de anis foi de 72% em comparação ao controle para diluição de 2 µL.

Vieira *et al* (2019) também verificaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *P. anisum* (composto 94 % de TA) frente a cepas de *Candida* isoladas da mucosa oral, incluindo espécies de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Na avaliação dos autores, a CIM encontrada foi de 875 µg/mL para as referidas cepas.

Vale destacar que a grande maioria dos trabalhos citados envolveram óleos essenciais que tinham o TA como componente majoritário. Huang e colaboradores (2010) já apontaram que a atividade antifúngica do óleo pode ser atribuída ao seu alto teor de TA, que foi confirmado como o principal componente ativo, de modo que a molécula sozinha poderia ser desenvolvida como um agente fungicida.

Outro ponto importante é em relação às metodologias empregadas nos trabalhos que avaliam atividades antimicrobianas. Neste estudo, foi utilizado o método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O uso de metodologias distintas, como a EUCAST, pode explicar em parte as diferenças verificadas em relação às CIMs do TA, em razão principalmente dos diferentes tempos de incubação (Tava *et al.*, 2021).

Cepas de origem clínica diferentes também podem apresentar variações em relação às CIMs, pois os mecanismos de resistência não são igualmente distribuídos entre as espécies e, portanto, podem contribuir para as diferenças observadas no perfil de suscetibilidade (Sanglard; Coste, 2016).

Além disso, as CIMs de *C. glabrata* (128 µg/mL a 1024 µg/mL) foram superiores as CIMs de *C. parapsilosis*, onde a CIM variou de 128 µg/mL a 512 µg/mL e o efeito fungicida foi mais bem evidenciado também nesta última, o que leva ao entendimento de que os efeitos antifúngicos foram mais consistentes nas cepas de *C. parapsilosis*.

Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo na incidência de infecções causadas por *C. glabrata*. Este aumento pode ser atribuído ao crescente uso de fluconazol, assim como ao aumento da população suscetível a estas infecções. *C. glabrata* é considerada atualmente um patógeno emergente devido à sua capacidade de desenvolver resistência aos medicamentos (Fernandez-Calderón *et al.*, 2021).

Esta resistência está relacionada ao genoma haploide do fungo, que permite rápidas mudanças genéticas. Durante o tratamento ou profilaxia com fluconazol, *C. glabrata* frequentemente desenvolve resistência, e pode adquirir níveis elevados de resistência cruzada com triazóis e outras classes de antifúngicos (Whaley; Rogers, 2016). No presente estudo, as cepas de *C. glabrata* testadas foram sensíveis ao fluconazol, com CIM que variou de 32 µg/mL a 512 µg/mL, enquanto para *C. parapsilosis* a CIM variou de 32 µg/mL a 64 µg/mL. Isto posto, a CIM maior para *C. glabrata* pode estar relacionada à sua capacidade de desenvolver resistência. Ainda assim, O FLU foi usado como controle para ambas as espécies de *Candida* testadas.

Neste sentido, embora esteja ocorrendo progresso no aprimoramento dos antifúngicos disponíveis e na identificação de novos alvos, o ritmo de

desenvolvimento de antimicrobianos é superado pela emergência de resistência. Assim, é crucial explorar abordagens alternativas além de alvos genéticos ou funcionais para fortalecer o uso dos antifúngicos. Estratégias iniciais incluem terapia combinada para combater ou prevenir infecções fúngicas (Lee *et al.*, 2020).

O potencial antimicrobiano combinado foi obtido através da associação entre fármacos e foi determinado através da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) e do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), descritas nas tabelas 7 e 8.

Combinações de agentes ativos contra espécies de *Candida* podem provar ser mais úteis como agentes quimioterápicos do que tais compostos usados isoladamente. Portanto, algumas substâncias são investigadas para sinergismo com azóis, polienos ou equinocandinas hoje usados no tratamento de infecção por *Candida* (Zida *et al.*, 2017).

Para D'agostino e colaboradores (2019) é interessante combinar moléculas já conhecidas com alguns componentes de óleos essenciais para provocar sinergia, ou seja, ter um efeito comum superior ao das moléculas sozinhas. Além disso, um efeito sinérgico entre dois compostos poderia reduzir a dose a ser usada e, assim, reduzir a toxicidade para humanos e os potenciais efeitos colaterais de ambos os compostos.

Tabela 7 - Concentração Inibitória Fracionária e o Índice da Concentração Inibitória Fracionária do trans-anetol associado ao fluconazol frente a cepas de *Candida glabrata*

<i>C. glabrata</i>	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de associação farmacológica
	Trans-anetol	Fluconazol	Trans-anetol + Fluconazol	
ATCC 90030	0,25	0,25	0,5	Sinérgico

Tabela 8 - Concentração Inibitória Fracionária e o Índice da Concentração Inibitória Fracionária do trans-anetol associado ao fluconazol frente a cepas de *Candida parapsilosis*

<i>C. parapsilosis</i>	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de associação farmacológica
	Trans-anetol	Fluconazol	Trans-anetol + Fluconazol	
ATCC 22019	0,25	0,125	0,375	Sinérgico

Neste sentido, foram analisados os efeitos conjuntos do TA e FLU frente as duas espécies representativas de *Candida* usando combinações do fluconazol e TA na técnica de *checkerboard*, testando assim várias concentrações combinadas das duas moléculas. Deste modo, foi observado que para as cepas ATCC de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* o índice de Inibição da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) foi de 0,5 e 0,375 respectivamente, o que aponta para um sinergismo farmacológico entre o TA e o FLU em ambas as espécies testadas.

Já foi relatado que o anetol aumenta a atividade fungistática de um fármaco modelo dodecanol, encontrado em óleos essenciais, para um efeito fungicida ao bloquear o processo de recuperação do crescimento e o efluxo do fármaco, além de aumentar a atividade fungicida do fluconazol contra cepas de *Candida albicans* (Fujita *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2017).

Em outro estudo, Tsukuda e colaboradores (2022) investigaram a relação estrutura-atividade do TA e alguns derivados relacionados. A potência antifúngica do TA foi avaliada junto com o n-dodecanol e o flucanazol. Aqui também ficou evidente a sinergia do fluconazol e derivados relacionados ao anetol em *S. cerevisiae* e em *Candida albicans*. A ICIF do TA junto ao fluconazol foi de 0,188 em *Candida albicans*, demonstrando, portanto, uma atividade sinérgica das moléculas, similarmente o que foi encontrado nos nossos estudos.

Até onde se sabe, este parece ser o primeiro estudo de avaliação do sinergismo do TA e fluconazol contra *Candida não-albicans*. A maioria dos trabalhos relatados até aqui se preocuparam em detalhar a atividade do TA sozinho ou em sinergismo frente a organismos modelo como *S. cerevisiae*. Nossos achados são especialmente importantes por mostrar que a atividade do TA em sinergismo com

antifúngicos convencionais ou mesmo sozinho, se estende a importantes espécies de patógenos humanos.

Neste sentido, estes resultados contribuem para a fundação da aplicação prática de terapias combinadas destinadas a superar a resistência antifúngica. Diante dos achados reportados até aqui, tornou-se imperativo explorar os mecanismos pelos quais esta atividade se manifesta.

O ensaio para avaliar as possíveis interações do TA com a membrana dos fungos foi realizado por meio da determinação da CIM com e sem a presença do ergosterol acrescido ao meio de cultura. Deste modo, estudamos a capacidade do composto de formar complexos com ergosterol. Os resultados estão descritos nas tabelas 9 e 10.

O ergosterol é um esterol presente nas membranas celulares dos fungos, servindo muitas das mesmas funções de membrana celular que o colesterol em humanos. Como o ergosterol não é um componente das células animais, é um alvo convidativo para medicamentos antifúngicos (Peyton; Gallagher; Hashemzadeh, 2015).

Se a atividade do TA for causada pela ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impediria a ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Consequentemente, causaria um aumento na CIM do TA na presença de ergosterol exógeno em relação ao experimento de controle. Assim, o efeito do ergosterol exógeno na CIM do TA foi determinado.

Tabela 9 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol na presença e ausência de ergosterol frente a cepas de *Candida glabrata*

<i>C. glabrata</i>		<i>Trans-anetol</i>	
	Com ergosterol	Sem ergosterol	Razão
ATCC 90030	512	512	1

Tabela 10 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol na presença e ausência de ergosterol frente a cepas de *Candida parapsilosis*

<i>C. parapsilosis</i>		<i>Trans-anetol</i>	
	Com ergosterol	Sem ergosterol	Razão
ATCC 22019	128	128	1

Os ensaios revelaram CIMs idênticas na presença e na ausência do ergosterol. Desta forma, a atividade antifúngica relatada parece não envolver a complexação do colesterol como mecanismo de ação.

De maneira semelhante ao ensaio com o ergosterol, o ensaio que avaliou as possíveis interações entre o TA e a parede celular dos fungos foi realizado por meio da determinação da CIM com e sem a presença do sorbitol acrescido ao meio de cultura. Os resultados estão descritos nas tabelas 11 e 12.

Para investigar como o TA afeta a parede celular dos fungos, foi realizado um teste usando sorbitol, um protetor osmótico comum que ajuda a estabilizar os protoplastos fúngicos. Compostos que interferem na parede celular dos fungos têm um efeito característico: seus efeitos antifúngicos são anulados quando estão em um meio contendo um estabilizador osmótico, como o sorbitol. As células protegidas com sorbitol conseguem crescer na presença de substâncias que inibem a síntese da parede celular fúngica, ao contrário das células que não têm sorbitol, que têm seu crescimento inibido. Esse efeito se reflete no aumento do valor da CIM quando o sorbitol está presente, comparado com o valor obtido em um meio sem sorbitol (meio padrão) (Leite *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2024).

Tabela 11 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol na presença e ausência de sorbitol frente a cepas de *Candida glabrata*

<i>C. glabrata</i>		<i>Trans-anetol</i>	
	Com sorbitol	Sem sorbitol	Razão
ATCC 90030	512	512	1

Tabela 12 - Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do trans-anetol na presença e ausência de sorbitol frente a cepas de *Candida parapsilosis*

<i>C. parapsilosis</i>		<i>Trans-anetol</i>	
	Com sorbitol	Sem sorbitol	Razão
ATCC 22019	128	128	1

Os resultados obtidos mostraram que as CIMs com e sem a presença do sorbitol se mantiveram as mesmas, o que leva ao entendimento de que o TA não atua interferindo na integridade da parede celular do fungo. Cabe destacar que este

é um dos primeiros estudos que trata das interações do TA com membranas e/ou parede celular dos fungos, o que dificulta a comparação com outras investigações.

Os trabalhos reportados até aqui têm apontado para caminhos diversos. Para Yutani *et al* (2011), o TA causou anormalidades morfológicas por sua inibição da biossíntese do componente quitina da parede celular de *Mucor mucedo*. Enquanto para Fujita *et al* (2014), o TA atua contra fungos como *Aspergillus fumigatus* e a levedura em brotamento *S. cerevisiae* por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fragmentação de DNA, produzindo morte celular semelhante à apoptose.

De todo modo, as interações detalhadas da molécula associadas a essas atividades permanecem obscuras. Se os mecanismos subjacentes aos efeitos sinérgicos do TA puderem ser elucidados, será possível informar o desenvolvimento de quimioterapias antifúngicas combinadas usando doses menores de medicamentos, reduzindo assim o risco potencial de efeitos adversos.

Em 2017, Fujita e colaboradores sugeriram que o aumento da atividade antifúngica do TA, como identificado no nosso estudo, ocorre devido à supressão do efluxo do medicamento ao inibir transportadores que desempenham um papel na resistência fúngica aos medicamentos. Portanto, é altamente possível que o anetol potencialize os efeitos antifúngicos de uma série de drogas, atuando sobre estes transportadores e, portanto, inibindo o efluxo de drogas.

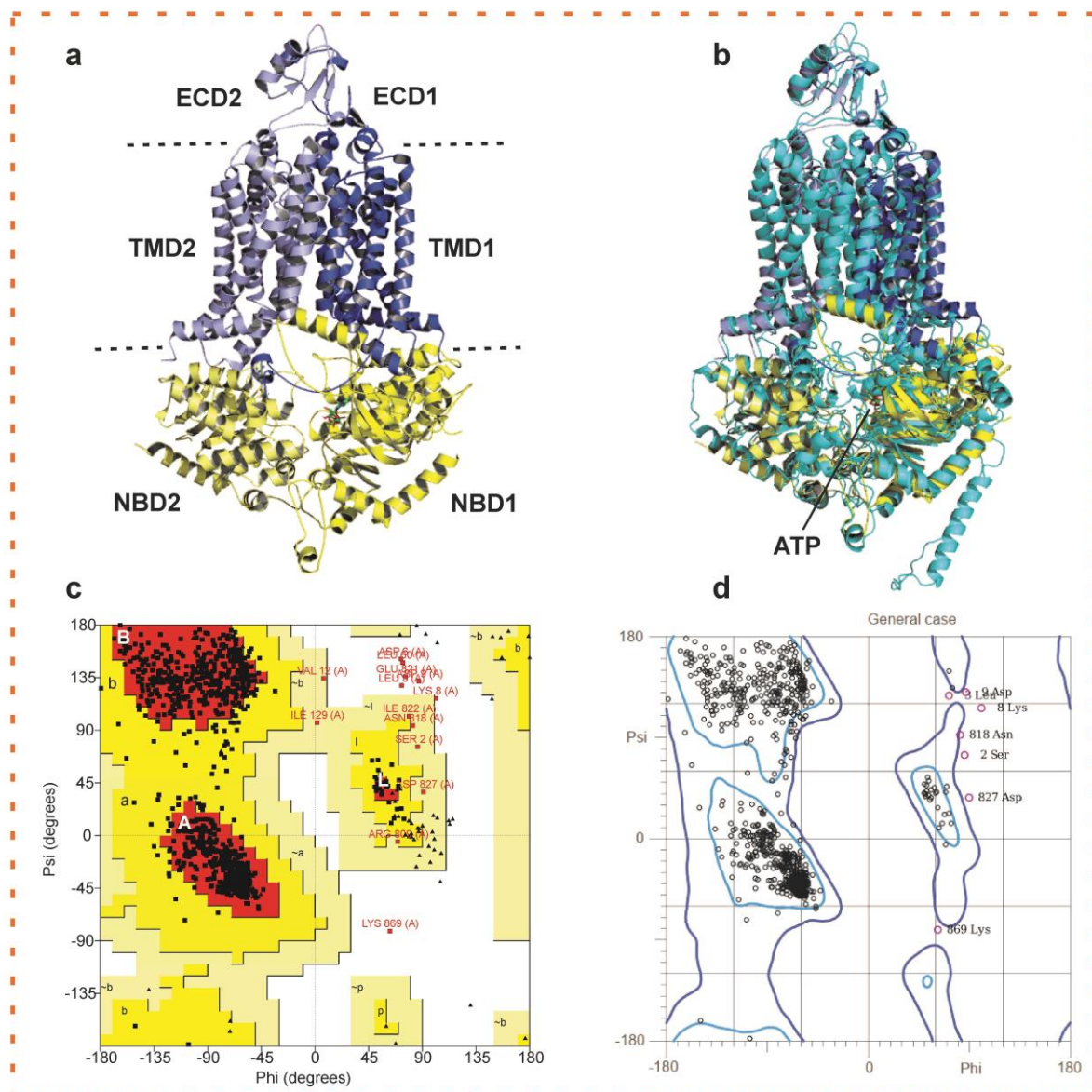
A partir destes achados, a Pdr5 é um membro da superfamília de proteínas ABC (cassete de ligação a ATP) que, por sua vez, pode conferir resistência a medicamentos por bombear medicamentos para fora da célula (Balzi *et al.*, 1994). Por esta razão, a Pdr5 foi considerada como um alvo importante para o desenvolvimento do *docking* molecular visando as possíveis interações da referida proteína com o TA.

Devido à ausência da estrutura tridimensional (3D) da enzima Pdr5 de *C. glabrata* (*N. glabratus*) em qualquer banco de dados, foi criado um modelo de estrutura terciária para esta proteína, utilizando a proteína modelo proveniente da levedura *S. cerevisiae* (PDB ID: 7P05). A estrutura da proteína modelo foi obtida por microscopia eletrônica, com uma resolução de 3.13 Å. A identidade da sequência entre a proteína alvo e a proteína modelo foi de 74,92%, com uma similaridade de sequência de 54% e uma cobertura geral de 98%. Para avaliar a qualidade do modelo gerado, foram utilizadas as pontuações QMEAN e GMQE. A pontuação

QMEAN é uma medida da qualidade global do modelo e por resíduo, variando de 0 a -4,0, sendo valores próximos a 0 indicativos de boa qualidade do modelo. O valor GMQE, por sua vez, é uma estimativa da precisão da estrutura terciária do modelo, variando de 0 a 1, com valores maiores indicando maior confiabilidade do modelo. No caso do modelo da proteína Pdr5, a pontuação QMEAN foi de -1.80, e o valor GMQE foi de 0,68, indicando que a estrutura é confiável e de boa qualidade.

Para verificar adicionalmente a confiabilidade do modelo previsto, gráficos de Ramachandran foram gerados de forma independente nos servidores PROCHECK e MolProbity. O servidor PROCHECK revelou que 92,2% dos resíduos estavam localizados nas regiões mais favoráveis (A, B e L), o que é um indicativo de um modelo de alta qualidade. O gráfico MolProbity Ramachandran também mostrou que 99,3% dos resíduos estavam dentro das regiões permitidas, reforçando a qualidade do modelo previsto (figura 6). Dessa forma, ambos os softwares corroboraram a confiabilidade da estrutura prevista da enzima (MOPAC, 2016).

Figura 6 - Processo de resolução e validação da estrutura terciária da enzima Pdr5 de *C. glabrata* por homologia com a Pdr5 de *S. cerevisiae*



a modelo em cartoon da Pdr5 por EM mostrando o domínio de ligação de nucleotídeo (NBD) e domínio transmembrana (TMD). **b** Pdr5 SWISS-MODEL e sobreposição com a estrutura resolvida por EM e em destaque o ATP no NBD1. **c** diagrama de Ramachandran oriunda do Procheck. **d** diagrama de Ramachandran oriunda do MolProbity.

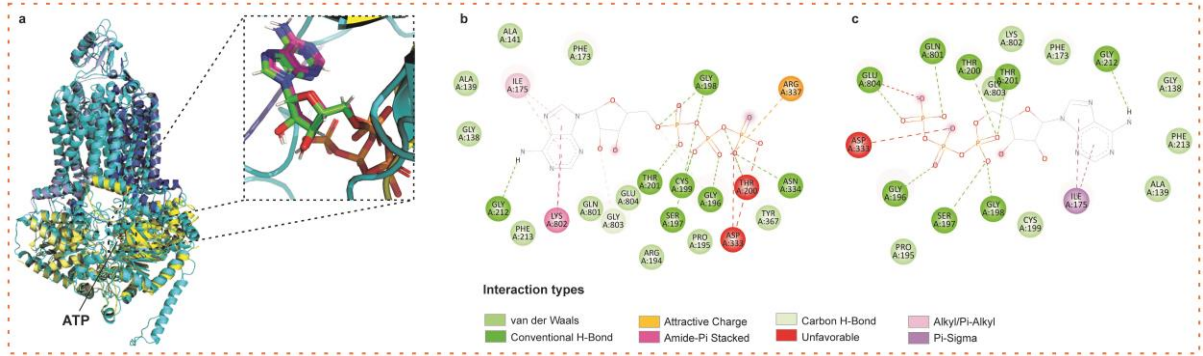
O AutoDock 4.2 foi utilizado para determinar a orientação dos ligantes ATP e Trans-anetol em relação ao sítio ativo da Pdr5, resultando na obtenção da conformação 3D, dos valores de energia mínima de ligação (ΔG) e da constante inibitória (K_i) desses ligantes. No processo de interação com o sítio ativo da Pdr5, o ATP redocado apresentou maior afinidade em relação ao trans-anetol e um RMSD ≤ 2 Å, validando a metodologia (Tabela 13). Além disso, na figura 7a pode-se verificar

a Pdr5 e no detalhe a sobreposição 3D do ATP EM (verde) e o re-docking (rosa), e na figura 7b e 7c observa-se as interações 2D, formadas por uma variedade de tipos de ligações e aminoácidos. Com tudo, o *trans*-anetol demonstrou um ΔG de -4.49 kcal/mol e uma K_i de 513.96 μM . De semelhante modo, o TA se ligou ao sítio ativo da Pdr5 de *C. glabrata*, com detalhes apresentados na tabela 13 e na figura 8. Esses resultados orientaram a análise subsequente com o objetivo de estudar um possível inibidor da enzima Pdr5 de *C. glabrata*. Além disso, investigou-se o modo de ligação do *trans*-anetol ao sítio ativo enzimático, explorando esses aspectos utilizando o software visualizador Discovery Studio (DS), versão 2021 (Biovia, 2021).

Tabela 13 - Valores de energia de ligação (ΔG) e constante inibitória (K_i) do ATP e do Trans-anetol contra a enzima Pdr5 de *C. glabrata*.

Strains	Enzymes	ΔG (kcal/mol)	RMSD	K_i	ΔG (kcal/mol)	K_i
		ATP			Trans-anetol	
<i>C. glabrata</i>	Pdr5	- 6.59	0.556	14.72 μM	- 4.49	513.96 μM

Figura 7- Processo de validação do docking por re-docking com molécula de ATP EM no sítio ativo da Pdr5 de *S. cerevisiae*



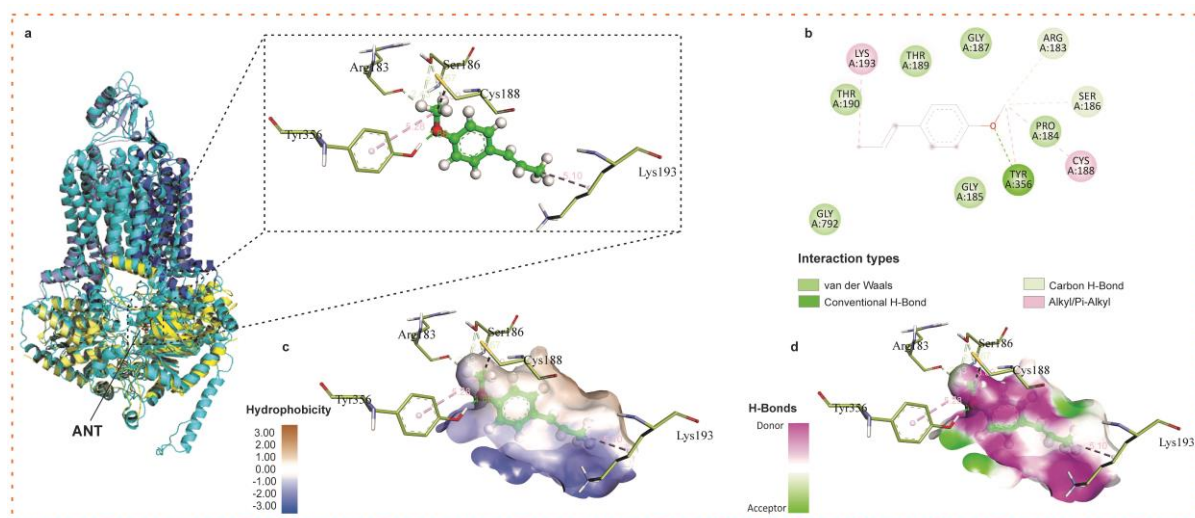
a modelo em cartoon da Pdr5 mostrando no detalhe da imagem a sobreposição do ATP EM (verde) com o ATP re-docking (rosa). **b** interações 2D do ATP EM. **c** detalhes das interações 2D do ATP re-docking no sítio ativo da Pdr5.

Para investigar a interação entre o *trans*-anetol e a enzima fúngica Pdr5 de *C. glabrata*, aplicou-se a técnica de docagem molecular rígida. O AutoDock 4.2 foi utilizado para acoplar o composto *trans*-anetol ao sítio ativo da enzima em estudo. As representações 2D e 3D dessas interações podem ser observadas na figura 8,

onde é possível observar que o composto *trans*-anetol interagiu com o sítio ativo da enzima por meio de interações hidrofóbicas, de van der Waals, carbono hidrogênio, alquil e pi-alquil. Além dessas interações, destaca-se a ligação de hidrogênio do oxigênio do grupo metóxi do TA para com o resíduo Tyr356 (1.88 Å) figura 8a e 8b.

Ainda é importante ressaltar que as interações entre o *trans*-anetol e os resíduos do sítio ativo da Pdr5 se estabeleceram de forma espontânea resultando na pontuação de -4.49 kcal/mol, comparável a afinidade da molécula de ATP. No entanto, o *trans*-anetol é uma molécula pequena e com poucos grupos funcionais para interagir com maior afinidade com a bolça na qual se encontra o ATP (NBD1). Ademais, esse sítio ativo aparenta características predominantemente hidrofílicas (figura 8c e 8d) e é um fator importante na complementariedade molecular nas interações fármacos-receptor que possivelmente reduz a afinidade do *trans*-anetol comparativamente ao ATP.

Figura 8 - Docking molecular do *trans*-anetol com a enzima Pdr5 de *C. glabrata*



a modelo em cartoon da Pdr5 mostrando no detalhe as interações 3D do *trans*-anetol com os resíduos do sítio ativo da enzima. **b** interações 2D do *trans*-anetol com o sítio ativo enzimático da Pdr5. **c** e **d** modelo 3D em superfície hidrofóbica e de interações de hidrogênio respectivamente, com destaque nos aminoácidos do sítio ativo da enzima em estudo.

Por outro lado, o tamanho é apenas um dos critérios para a interação substrato-transportador. É razoável supor que um composto seria um tanto lipofílico para atingir Pdr5p na membrana porque pelo menos alguns substratos, incluindo

algumas moléculas relativamente hidrofílicas e moléculas mais hidrofóbicas já testadas, entram por difusão. Além disso, já ficou demonstrado que ao menos um local de transporte usa interações hidrofóbicas para reconhecer seus substratos (Golin; Ambudkar; May, 2007).

De acordo com Lamping *et al* (2007), as bombas de efluxo de drogas transferem FLU do citosol para o ambiente, protegendo as células fúngicas de danos. No modelo de levedura *S. cerevisiae*, 16 transportadores ABC participam do efluxo de drogas e da resistência a múltiplas drogas (MDR), entre os quais Pdr5 é uma bomba de efluxo de drogas estabelecida para o fluconazol.

Vale destacar que em fungos o principal mecanismo de MDR depende da superexpressão destes transportadores de efluxo dentro da membrana plasmática. Essas proteínas expulsam os medicamentos da célula, evitando que atinjam a concentração intracelular necessária para uma atividade antifúngica bem-sucedida (Moraes *et al.*, 2020; Holmes *et al.*, 2016; Sanguinetti *et al.*, 2015).

Mais recentemente, um estudo mecanístico conduzido por Zhou *et al* (2021), revelou que o arteméter, produto natural isolado da *Artemisia annua*, aumentou a eficácia do FLU por meio da interrupção da função da bomba de efluxo multidrogas Pdr5, resultando no acúmulo intracelular de FLU.

No presente trabalho, as interações do TA com o sítio ativo da Pdr5 ficaram evidenciadas. Além das interações hidrofóbicas, de van der Waals, carbono hidrogênio, alquil e pi-alquil, houve uma interação do oxigênio da estrutura do TA com um resíduo Tyr356 da proteína Pdr5. Assim, pode-se deduzir que a afinidade da molécula, especialmente pelo sítio ativo da proteína, pode impactar sua atividade, o que diminuiria o efluxo das drogas e aumentaria o tempo de exposição a estas. Deste modo, a exposição prolongada ao FLU explicaria em parte o forte efeito sinérgico verificado *in vitro*, corroborando com os resultados relatados até aqui.

Segundo Singh *et al* (2018), a coadministração de um agente antifúngico, como o fluconazol, e uma substância capaz de inibir as bombas de efluxo impediria a resistência antifúngica, garantindo assim o resultado adequado do tratamento. Isto posto, considerando nossos resultados e a homologia entre a Pdr5 e transportadores MDR de fungos patogênicos, pode-se sugerir que o TA é um candidato potencial para ser usado em associação com fluconazol no tratamento de infecções fúngicas resistentes ao fluconazol.

Neste sentido, estudos adicionais empregando isolados clínicos de fungos patogênicos que superexpressam essas proteínas devem ser conduzidos para avaliar o efeito do TA em outras espécies de fungos patogênicos.

6 CONCLUSÕES

Tendo como base os resultados apresentados, o TA pode ser considerado um importante agente antifúngico com destaque para os seguintes pontos:

- Atividade fungistática ou fungicida para as cepas de *Candida glabrata*;
- Atividade fungicida para as cepas de *Candida parapsilosis*;
- Um sinergismo farmacológico entre o TA e o fluconazol foi verificado, aumentando assim o potencial antifúngico de ambos os constituintes;
- Os ensaios conduzidos a partir do ergosterol e do sorbitol acrescidos aos meios não apontaram para interações do TA com a membrana e/ou a parede celular dos fungos.
- O estudo de *docking* molecular apontou para uma interação entre o TA e o sítio ativo da proteína Pdr5.

A partir destes achados, ficou demonstrado o potencial antifúngico do TA, sobretudo, em conjunto com o fluconazol, promovendo uma atividade promissora que pode ajudar na aplicação prática de terapias combinadas destinadas a superar a resistência antifúngica.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; MOHAMMADNEJADI, E.; KARAMI, P.; RAZZAGHI-ASL, N. Current status and structure activity relationship of privileged azoles as antifungal agents (2016–2020). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 3, p. 106518, 2022.
- ALDHOLMI, M.; MARCHAND, P.; OURLIAC-GARNIER, I.; LE PAPE, P.; GANESAN A. A decade of antifungal leads from natural products: 2010-2019. **Pharmaceuticals**, v.12, n. 4, p. 182, 2019.
- ALLERT, S.; FÖRSTER, T. M.; SVENSSON, C. M.; RICHARDSON, J. P.; PAWLIK, T.; HEBECKER, B.; RUDOLPHI, S.; JURASCHITZ, M.; SCHALLER, M.; BLAGOJEVIC, M.; MORSCHHÄUSER, J.; FIGGE M. T.; JACOBSEN, I. D.; NAGLIK, J. R.; KASPER, L.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Candida albicans-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. **mBio**, v. 9, n. 3, 2018.
- ALMEIDA, M. D.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, v. 2, p. 22059, 2015.
- ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21-28, 2016.
- ARYA, N. R.; RAFIQ, N. B. Candidiasis. 2023 May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32809459. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560624/>.
- BALZI, E.; WANG, M.; LETERME, S.; VAN DYCK, L.; GOFFEAU, A. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 2206-2214, 1994.
- BAO, ZHENGYU.; FAN, M.; HANNACHI, K.; LI, T.; ZHAO, J.; LI, Y.; WANG, L. Antifungal activity of star anise extract against Penicillium roqueforti and Aspergillus niger for bread shelf life. **Food Research International**, v. 172, p. 113225, 2023.
- BECK, K. R.; ODERMATT, A. Antifungal therapy with azoles and the syndrome of acquired mineralocorticoid excess. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 524, p. 111168, 2021.
- BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, p. 1-9, 2019.

BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to antifungal drugs. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 279-311, 2021.

BENITEZ, L. L.; CARVER, P. L. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 833-853, 2019.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.

BIOVIA, Dassault Systèmes, discovery studio (DS) visualizer, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

BISWAS, P. S. Vaccine-induced immunological memory in invasive fungal infections—a dream so close yet so far. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 671068, 2021.

BONA, E. A. M. D.; PINTO, F. G. D. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. D. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.

BORMAN, A. M.; JOHNSON, E. M. Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 10.1128/jcm. 01811-20, 2021.

CASADEVALL, A. Fungal diseases in the 21st century: the near and far horizons. **Pathogens & Immunity**, v. 3, n. 2, p. 183, 2018.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CHUN, C. Y.; CORO, S.; CHIA, A. Y. Y.; TANG Y. In silico study of potential SARS-CoV-2 antagonist from *Clitoria ternatea*. **International Journal of Health Sciences**, v. 17, n. 3, 2023.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Fourth informational supplement M27-S4. Wayne, PA: CLSI; 2012.

DĄBROWSKA, M.; ZIELIŃSKA-BLIŹNIEWSKA, H.; KWIATKOWSKI, P.; ŁOPUSIEWICZ, Ł.; PRUSS, A.; KOSTEK, M.; SIENKIEWICZ, M. Inhibitory effect of eugenol and trans-anethole alone and in combination with antifungal medicines on

Candida albicans clinical isolates. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 5, p. e2000843, 2021.

D'AGOSTINO, M. T. N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3713, 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DÍAZ-GARCÍA, J.; GÓMEZ, A.; ALCALÁ, L.; REIGADAS, E.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; PÉREZ-AYALA, A.; GUINEA, J. Evidence of fluconazole-resistant Candida parapsilosis genotypes spreading across hospitals located in Madrid, Spain and harboring the Y132F ERG11p substitution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. e00710-22, 2022.

DUMITRESCU, E.; MUSELIN, F.; TÎRZIU, E.; FOLESCU, M.; DUMITRESCU, C. S.; ORBOI, D. M.; CRISTINA, R. T. Pimpinella anisum L. essential oil a valuable antibacterial and antifungal alternative. **Plants**, v. 12, n. 13, p. 2428, 2023.

DUNLAP.; MADIGAN.; MARTINKO. **Microbiologia de Brock**. 10a ed. Pearson, 2010.

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.

FERNANDES, M. C.; DASILVA, D.; HARANAHALLI, K.; MCCARTHY, J. B.; MALLAMO, J.; OJIMA, I.; DEL POETA, M. The Future of Antifungal Drug Therapy: Novel Compounds and Targets. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 20, p. 65, 2021.

FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L.; GÓMEZ-NAVIA, C.; BLANCO-BLANCO, M. T.; SÁNCHEZ-SILOS, R.; LUCIO, L.; PÉREZ-GIRALDO, C. Antifungal and anti-biofilm activity of a new Spanish extract of propolis against Candida glabrata. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 147, 2021.

FRANCONI, I.; LUPETTI, A. In Vitro Susceptibility Tests in the Context of Antifungal Resistance: Beyond Minimum Inhibitory Concentration in Candida spp. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 12, p. 1188, 2023.

FROST, D.; KIM, D.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. Whole-Cell Candida albicans Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306–310, 1995.

FUJITA, K. I.; ISHIKURA, T.; JONO, Y.; YAMAGUCHI, Y.; OGITA, A.; KUBO, I.; TANAKA, T. Anethole potentiates dodecanol's fungicidal activity by reducing PDR5

expression in budding yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 477-484, 2017.

FUJITA, K.; FUJITA, T.; KUBO, I. Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 1, p. 47-51, 2007.

FUJITA, K.; TATSUMI, M.; OGITA, A.; KUBO, I.; TANAKA, T. Anethole induces apoptotic cell death accompanied by reactive oxygen species production and DNA fragmentation in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 4, p. 1304-1313, 2014.

GALOCHA, M.; PAIS, P.; CAVALHEIRO, M.; PEREIRA, D.; VIANA, R.; TEIXEIRA, M. C. Divergent Approaches to Virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two Sides of the Same Coin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2345, 2019.

GARY, W.; PROCOP, D. L.; CHURCH, G. S. HALL, W. M.; JANDA, ELMER. W.; KONEMAN, P. C.; SCHRECKENBERGER, G. L. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 7. ed. [s.l: s.n.].

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β 1,3-glucan synthase inhibitors. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, n. 2, p. 269–280, 24 fev. 2001.

GOLIN, J.; AMBUDKAR, S.V.; MAY, L. The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates?. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 1, p. 1-5, 2007.

GOMEZ-LOPEZ, A. Antifungal therapeutic drug monitoring: focus on drugs without a clear recommendation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 11, p. 1481-1487, 2020.

GÓMEZ-MOLERO, E. E.; WILLIS, J. R.; DUDAKOVA, A.; CARRETÉ, L.; WEIG, M.; GROß, U.; BADER, O. Phenotypic variability in a coinfection with three independent *Candida parapsilosis* lineages. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1994, 2020.

GONZALEZ-LARA, M. F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive candidiasis. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. **Thieme Medical Publishers**, v. 41, p. 003-012, 2020.

GOVRINS, M.; LASS-FLÖRL, C. *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 46-59, 2024.

GUPTA, H.; GUPTA, P.; KAIRAMKONDA, M.; POLURI, K. M. Molecular investigations on *Candida glabrata* clinical isolates for pharmacological targeting. **RSC Advances**, v. 12, n. 27, p. 17570-17584, 2022.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137–147, 2000.

HALGREN, T. A. Force Fields: MMFF 94. **Encyclopedia of Computational Chemistry**, v. 2, 2002.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 1-17, 2012.

HASSAN, Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. *Candida glabrata*: pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 667, 2021.

HEARD, S. C.; WU, G.; WINTER, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 232-241, 2021.

HOENIGL, M.; SPRUTE, R.; EGGER, M.; ARASTEHFAR, A.; CORNELLY, O. A.; KRAUSE, R.; LASS-FLÖRL, C.; PRATTES, J.; SPEC, A.; THOMPSON, GR 3RD.; WIEDERHOLD, N.; JENKS, J. D. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. **Drugs**, v. 81, n. 15, 2021.

HOLMES, A. R.; CARDNO, T. S.; STROUSE, J. J.; IVNITSKI-STEELE, I.; KENIYA, M. V.; LACKOVIC, K. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1485-1501, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, L.; WANG, M.; SUN, L. Synergy Testing by E-Test and Microdilution Checkerboard for Fosfomycin Combined with Tigecycline against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Laboratory**, v. 65, n. 12, 2019.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; GONG, Y.; CHEN, X.; GUO, Z.; WANG, Q.; JIANG, W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. **Molecules**, v. 15, p. 7558-7569, 2010.

JABEEN, G. NAZ, S. A., JABEEN, N., SHAFIQUE, M., SHARAFAT, S., BAIG, S.; NAZEER, S. Non-albicans *Candida* species: Emergence of neglected pathogens

among population of Karachi. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, 2019.

JOHNSON, M. D. Antifungals in clinical use and the pipeline. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 341-371, 2021.

KOSALEC, IVAN.; PEPELJNJAK, STJEPAN.; KUŠTRAK, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 55, n. 4, p. 377-385, 2005.

KUMAR, S.; KUMAR, A.; ROODBARY, M.; MOHAMMADI, R.; ČERNÁKOVÁ, L.; RODRIGUES, C. F. Overview on the infections related to rare *Candida* species. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 963, 2022.

KWIATKOWSKI, P.; PRUSS, A.; MASIUK, H.; MNICHOWSKA-POLANOWSKA, M.; KACZMAREK, M.; GIEDRYS-KALEMBA, S. The effect of fennel essential oil and trans-anethole on antibacterial activity of mupirocin against *Staphylococcus aureus* isolated from asymptomatic carriers. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 36, n. 3, p. 308-314, 2019.

LAMPING, E.; MONK, B. C.; NIIMI, K.; HOLMES, A. R.; TSAO, S.; TANABE, K.; CANNON, R. D. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 7, p. 1150-1165, 2007.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel approaches for efficient antifungal drug action. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 1771-1781, 2018.

LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LEI, J. D.; LI, Q.; ZHANG, S. B.; LV, Y. Y.; ZHAI, H. C.; WEI, S.; HU, Y. S. Transcriptomic and biochemical analyses revealed antifungal mechanism of trans-anethole on *Aspergillus flavus* growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 23, 2023.

LEITE, M. C. A. BEZERRA, B. A. P.; SOUSA, J. P.; LIMA, O. E. Investigating the antifungal activity and mechanism (s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015.

LIGUORI, G.; DI ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p. 76-78, 2009.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases;

2012-. Flucytosine. [Updated 2018 Feb 2]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548624/>

LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J. C. Antifungal resistance and the role of new therapeutic agents. **Current Infectious Disease Reports**, v. 24, n. 9, p. 105-116, 2022.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

LU, HUI.; HONG, T.; JIANG, Y.; WHITEWAY, M.; ZHANG, S. Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 199, p. 114960, 2023.

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

MAZU, K. T.; BRICKER, A. B.; FLOREZ-ROZAS, H.; ABLORDEPPEY Y. S. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, 2016.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2016.

MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

MOHAMED, A. A.; LU, X. L.; MOUNMIN, F. Diagnosis and treatment of esophageal candidiasis: current updates. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2019, n. 1, p. 3585136, 2019.

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

MORAES, D. C.; CARDOSO, K. M.; DOMINGOS, L. T. S.; DO CARMO, F. R.; PINTO, M.; MONTEIRO, R. Q.; FERREIRA-PEREIRA, A. β -Lapachone enhances the antifungal activity of fluconazole against a Pdr5p-mediated resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1051-1060, 2020.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

- NAAZ, S.; AHMAD, N.; QURESHI, MI.; HASHMI, N.; AKHTAR, M. S, KHAN, M. M. Antimicrobial and antioxidant activities of fennel oil. **Bioinformation**. v. 18, n. 9, p. 795-800.
- NAKAJIMA, J.; PAPAAH, P.; YOSHIZAWA, M.; MAROTTA, F.; NAKAJIMA, T.; MIHARA, S.; MINELLI, E. Effect of a novel phyto-compound on mucosal candidiasis: Further evidence from an ex vivo study. **Journal of Digestive Diseases**, v. 8, n. 1, p. 48-51, 2007.
- NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.
- NEWBERNE, R.; SMITH, R. L.; GOODMAN, J. L.; MUNRO, I.C.; PORTOGHESE, P. S.; WAGNER, R.B.M. The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavoring substance. **Food and Chemical Toxicology**.v. 37, p.789-811,1999.
- ORDAYA, E.; CLEMENT, J.; VERGIDIS, P. The role of novel antifungals in the management of candidiasis: a clinical perspective. **Mycopathologia**, v. 188, n. 6, p. 937-948, 2023.
- OUTEMSAA, B.; OUBIHI, A.; JABER, H.; HAIDA, S.; KENFAOUI, I.; IHAMDAN, R.; OUHSSINE, M. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Illicium verum*. In: **E3S Web of Conferences**. v. 319, n. 01052, 2021.
- PADDA, I. S.; PARMAR, M. Flucytosine. [Updated 2023 Jan 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557607/>.
- PAIVA, J.; PEREIRA, J. M. Treatment of invasive candidiasis in the era of *Candida* resistance. **Current Opinion in Critical Care**, v. 29, n. 5, p. 457-462, 2023.
- PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.
- PAPPAS, P.; LIONAKIS, M.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018.
- PATIL, A.; MAJUMDAR, S. S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1635-1660, 2017.
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization

system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs Today**, v. 51, n. 12, p. 705-718, 2015.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 26, 2016.

QUILES-MELERO, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. Antifúngicos de uso sistémico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 2, p. 42-46, 2021.

RAMPONE, S.; PAGLIARULO, C.; MARENA, C.; ORSILLO, A.; IANNACCONE, M.; TRIONFO, C.; PAOLUCCI, M. In silico analysis of the antimicrobial activity of phytochemicals: towards a technological breakthrough. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 200, 2021.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 753-775, 2017.

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

SANGLARD, D.; COSTE, A. T. Activity of isavuconazole and other azoles against Candida clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 229-238, 2016.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2-13, 2015.

SARTORATTO, A.; 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 plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1478-1490, 2017.

SCORZONI, L.; FUCHS, B. B.; JUNQUEIRA, J. C.; MYLONAKIS, E. Current and promising pharmacotherapeutic options for candidiasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 22, n. 7, p. 887-888, 2021.

SEAGLE, E. E.; WILLIAMS, S. L.; CHILLER, T. M. Recent trends in the epidemiology of fungal infections. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 237-260, 2021.

SHARMA, B.; NONZOM, Skarma. Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario-an updated analysis. **Mycoses**, v. 64, n. 8, p. 890-908, 2021.

SHEN, C.; LUO, Z.; ZHAN, P.; DENG, F.; ZHANG, P.; SHEN, B.; HU, J. Antifungal activity and potential mechanism of action of Huangqin decoction against *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 001805, 2024.

SIDDIQUI, 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.

SIGERA, L. M.S.; DENNING, D. W. Flucytosine and its clinical usage. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.

SILVA, SÓNIA.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; AHMAD, K.; HAMEED, S. Fungicidal Action of Geraniol Against *Candida Albicans* is Potentiated by Abrogated *Cacdr1p* Drug Efflux And Fluconazole Synergism. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. E0203079, 2018.

SOBOLEV, O. V.; AFONINE, P. V.; MORIARTY, N. W.; HEKKELMAN, M. L.; JOOSTEN, R. P., PERRAKIS, A.; ADAMS, P. D. A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. **Structure**, v. 28, n. 11, p. 1249-1258, 2020.

SOUSA, F.; NASCIMENTO, C.; FERREIRA, D.; REIS, S.; COSTA, P. Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 199, p. 114969, 2023.

STEIMBACH, Laiza M. et al. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations—A systematic review and meta analysis. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 146-154, 2017.

STRICKLAND, A. B.; SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 3219-3238, 2021.

SZYMAŃSKI, M.; CHMIELEWSKA, S.; CZYŻEWSKA, U.; MALINOWSKA, M.; TYLICKI, A. Echinocandins—structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876-894, 2022.

TAVA, V.; PRIGITANO, A.; CORTESI, P.; ESPOSTO, M. C.; PASQUALI, M. *Fusarium musae* from diseased bananas and human patients: Susceptibility to fungicides used in clinical and agricultural settings. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 784, 2021.

The PyMOL v.2.5.2, Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E. In Vitro Activity of Antifungal Combinations Against *Candida Albicans* Biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 271-274, 2010.

TAYLOR, J. M.; JENNER, P. M.; JONES, W. I. A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 378-387, 1964.

TRUHAUT, R.; LE BOURHIS, B.; ATTIA, M.; GLOMOT, R.; NEWMAN, J.; CALDWELL, J. Chronic toxicity/carcinogenicity study of trans-anethole in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 27, n. 1, p. 11-20, 1989.

TORTORANO, A. M.; PRIGITANO, A.; MORRONI, G.; BRESCINI, L.; BARCHIESI, F. et al. Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5543-5553, 2021.

TÓTH, R.; NOSEK, J.; MORA-MONTES, H. M.; GABALDON, T.; BLISS, J. M.; NOSANCHUK, J. D.; TURNER, S. A.; BUTLER, G.; VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSEER, A.. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 10.1128/cmr. 00111-18, 2019.

TSUKUDA, Y.; MIZUHARA, N.; USUKI, Y.; YAMAGUCHI, Y.; OGITA, A.; TANAKA, T.; FUJITA, K. Structure–activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with n-dodecanol and fluconazole. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 377-384, 2022.

TVERDEK, F. P.; KOFTERIDIS, D.; KONTOYIANNIS, D. P. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 14, n. 8, p. 765-776, 2016.

VIEIRA, J. N.; GONÇALVES, C. L.; VILLARREAL, J. P. V.; GONÇALVES, V. M.; LUND, R. G.; FREITAG, R. A.; NASCENTE, P. S. Chemical composition of essential oils from the apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity in vitro against *Candida* species from oral cavity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 432-437, 2019.

WEI, L.; HUA, R.; LI, M.; HUANG, Y.; LI, S.; HE, Y.; SHEN Z. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **Journal of Insect Science**, v.14, p.1-13, 2014.

WHALEY, S. G.; ROGERS, P. D. Azole resistance in *Candida glabrata*. **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, p. 1-10, 2016.

WHITE, R L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996

WOŹNIAK, M. Antifungal agents in wood protection - A review. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6392, 2022.

YU, C. Y.; ZHANG, J. F.; WANG, T. Star anise essential oil : chemical compounds, antifungal and antioxidant activities: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 1, p. 1-22, 2021.

YUTANI, M.; HASHIMOTO, Y.; OGITA, A.; KUBO, I.; TANAKA, T.; FUJITA, K. I. Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1707-1713, 2011.

ZHOU, J.; LI, J.; CHEONG, I.; LIU, N. N.; WANG, H. Evaluation of artemisinin derivative artemether as a fluconazole potentiator through inhibition of Pdr5. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 116293, 2021.

ZHU, P.; LI, Y.; GUO, T.; LIU, S.; TANCER, R. J.; HU, C.; LIAO, G. New antifungal strategies: Drug combination and co-delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 198, p. 114874, 2023.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 - Artigo submetido aos Anais da Academia Brasileira de Ciências



Antifungal Potential of *Trans*-Anethole against *Candida glabrata* (*N glabratus*) Strains: *In vitro* and *in silico* analysis

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	AABC-2024-1352
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	20-Nov-2024
Complete List of Authors:	Santos, José Roberto; Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas Medeiros, Cassio Ilan; Centro Universitário de Patos Lima, Edeltrudes; Universidade Federal da Paraíba, Pharmaceutical Sciences Teixeira, Bráulio; Centro Universitário Maurício de Nassau Filho, Abrahão; Universidade Federal de Campina Grande
Keyword:	anethole, antifungal activity, <i>Candida non-albicans</i> , molecular docking, pharmacology
Classifications:	Microbiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Anexo 2 - Artigo aceito na Revista Brasileira de Educação e Saúde – REBES

Revista Brasileira de Educação e Saúde-REBES
Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas-GVAA
ISSN: 2358-2391
DOI 10.18378/rebes.v14i3.10540



Artigo científico

Tratamento e manejo clínico das candidíases: uma breve revisão da literatura

Treatment and clinical management of candidiasis: a brief review of the literature

José Roberto Dantas de Andrade Santos¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², José Lucas Ferreira Marques Galvão³, Abrahão Alves de Oliveira Filho⁴

¹Doutorando do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. E-mail: jose roberto@ccs.ufpb.br.

²Doutora em Farmácia (Análises Clínicas) pela Universidade de São Paulo, SP. E-mail: edelolima@yahoo.com.br.

³Mestre em Farmacologia pelo Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. E-mail: luksfmgalvao_4@hotmail.com.

⁴Doutor em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. E-mail: abrahao.farm@gmail.com.

Resumo: As espécies de *Candida* são comensais e, portanto, fazem parte da flora humana normal e estão localizadas na pele e nos tratos gastrointestinal e genital. No entanto, também pode causar várias infecções em pacientes suscetíveis, incluindo pacientes idosos, hospitalizados ou imunossuprimidos. Este trabalho buscou avaliar o atual cenário dos tratamentos antifúngicos disponíveis para cada tipo de candidíase com enfoque nas características de cada uma das condutas clínicas e suas limitações. Além disso, apresenta novas perspectivas no desenvolvimento de novos compostos com atividade antifúngica e os desafios para a expansão das alternativas terapêuticas disponíveis atualmente. Para tanto foram realizadas buscas nas bases de dados: Scielo, Pubmed e Google acadêmico no período entre fevereiro e maio de 2024. Foram usadas as palavras-chave: *Antifungals, candidiasis classification, invasive candidiasis e new antifungals treatments*. A infecção invasiva por *Candida* é uma das infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo e são apontadas como uma das principais causas de infecções associadas à saúde. Além disso, o arsenal terapêutico contra a candidíase inclui basicamente quatro classes de antifúngicos: polienos, azóis, equinocandinas e a flucitosina, cada uma delas apresentando problemas que limitam seu uso clínico. Sendo assim, é essencial identificar mecanismos bioquímicos exclusivos para os fungos como alvos de descoberta de drogas, a fim de desenvolver outras gerações de terapias antifúngicas.

Palavras-chave: Antifúngicos. Micologia. Farmacologia.

Abstract: *Candida* species are commensal and are therefore part of the normal human flora and are located on the skin and in the gastrointestinal and genital tracts. However, it can also cause various infections in susceptible patients, including elderly, hospitalized, or immunosuppressed patients. This work sought to evaluate the current scenario of antifungal treatments available for each type of candidiasis, focusing on the characteristics of each clinical approach and their limitations. Furthermore, it presents new perspectives in the development of new compounds with antifungal activity and the challenges for expanding currently available therapeutic alternatives. To this end, searches were carried out in the following databases: Scielo, Pubmed and Google Scholar in the period between February and May 2024. The keywords



ScienceDirect

Dyes and Pigments

Volume 229, October 2024, 112294

2-Styryl-quinoline-4-carboxylic acids: Synthesis, characterization, and investigation of their optical properties and antimicrobial activity

Lidiane Gomes de Araújo ^a, Ashley A.S.S. de Jesus ^a, José Roberto Dantas ^b,
Edeltrudes de Oliveira Lima ^b, Boniek Gontijo Vaz ^c, Gabriel Franco dos Santos ^c,
Cláudia M. Zaccaron Cristiano ^a, Claudio Gabriel Lima-Junior ^a, Jéssika de Oliveira Viana ^a,
Karen C. Weber ^a, Euzébio Guimarães Barbosa ^d, Rodrigo Cristiano ^a  

[Show more](#) 

 Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2024.112294> 

[Get rights and content](#) 

Highlights

- Carboxylic acid functionalized styrylquinolines **1–10** were synthesized and characterized.
- Styrylquinolines show PL emission from violet to green with notable

Original Article

Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus saprophyticus* isoladas de produtos cárneos

A. F. Diniz^{a*} , B. Santos^a , L. M. M. O. Nóbrega^a , V. R. L. Santos^a , W. S. Mariz^a , P. S. C. Cruz^a , R. O. Nóbrega^b , R. L. Silva^b , A. F. R. Paula^b , J. R. D. A. Santos^b , H. L. F. Pessôa^b  and A. A. Oliveira-Filho^a 

^aUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Patos, PB, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract

Meat products represent an important component of the human diet and are a good source of nutrients. Food-borne microorganisms are the main pathogens that cause human diseases as a result of food consumption, especially products of animal origin. The objective of the present research was to verify the antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat products. For this, the analyses of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were performed in microdilution plates. The association of the product with antimicrobials was also studied using disk diffusion. And the anti-adherent activity, which was determined in the presence of sucrose, in glass tubes. Thyme oil showed a strong inhibitory activity against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. saprophyticus*, with the MIC values ranging from 64 to 512 µg/mL, and bactericidal effect for most strains, with MBC values ranging from 256 to 1,024 µg/mL. *T. vulgaris* oil exhibited varied interactions in association with the antimicrobials, with synergistic (41.67%), indifferent (50%) and antagonistic (8.33%) effects. Regarding the anti-adherent activity, the test product was effective in inhibiting the adherence of all bacterial strains under study. Therefore, thyme oil presents itself as an antibacterial and anti-adherent agent against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. saprophyticus*, being a natural product that can represent an interesting alternative in the efforts to combat foodborne diseases.

Choline Chloride–Urea Deep Eutectic Solvent/Cu–Mn Iminodiacetate Coordination Polymer as an Efficient Catalytic System for Synthesis of Morita–Baylis–Hillman Adducts with Antimicrobial Activity

Rhuan Karlos Santos Mendes, Emelly Suelen de Freitas Reis Santos, Sandro Dutra de Andrade, Girlyanderson Araújo da Silva, José Lucas Ferreira Marques Galvão, José Roberto Dantas de Andrade dos Santos, Edeltrudes de Oliveira Lima, Rodolfo B. da Silva, Rodrigo Cristiano, Fausthon Fred da Silva,* and Claudio Gabriel Lima-Junior*



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 45911–45919



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This work shows the synthesis of a series of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives via an efficient green approach involving the use of a new catalyst system, a mixture of copper–manganese iminodiacetate 1D coordination polymer (Cu/Mn-IDA) and choline chloride–urea deep eutectic solvent (ChCl/urea 1:2). The adducts **2a–2i** were obtained in good to excellent yields (59–97%) with shorter reaction times. The results demonstrate for the first time the synergistic catalytic effect of the combination of deep eutectic solvent and coordination polymer on the Morita–Baylis–Hillman reactions. The catalyst recyclability was investigated, and it was found that Cu/Mn-IDA maintains consistent performance for at least four catalytic cycles. The synthesized compounds were evaluated for their *in vitro* antimicrobial activity against four bacteria and eight fungi species. Among all, **2a**, **2b**, **2d**, **2e**, and **2g** showed antifungal and antibacterial activities in 70–83% of the strains tested. The adduct **2e** exhibited significant antifungal activity with a minimum inhibitory concentration value of 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ compared to the standard drug fluconazole (minimum inhibitory concentration, 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Anexo 6 - Artigo publicado na *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*

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

Aceitação 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: andreaezevedos@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: braulioiteixiramobile@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@lftf.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: luksfmgalva_4@hotmail.com



REVISTA
OBSERVATORIO
DE LA ECONOMÍA
LATINOAMERICANA

REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA
Curitiba, v.21, n.9, p. 11610-11625. 2023

ISSN: 1696-8352

José Roberto Dantas de Andrade Santos

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Lot. Cidade Universitária - PB, CEP: 58051-900
E-mail: joserobertodasantos@gmail.com

Nayana da Rocha Oliveira

Mestranda em Farmacologia
Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Endereço: Campus I, Cidade Universitária, Castelo Branco, João Pessoa – PB
E-mail: nayrochy@hotmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima

Doutora em Ciências Farmacêuticas
Instituição: Universidade Federal da Paraíba
Endereço: Campus I, Lot. Cidade Universitária - PB, CEP: 58051-900
E-mail: edelolima@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: O uso de antimicrobianos é muitas vezes necessário no manejo das doenças infecciosas bucais. Infelizmente, essas drogas ocasionam com frequência efeitos colaterais desagradáveis, sendo o mais grave a resistência microbiana. Nesse contexto, produtos derivados de plantas surgem como fontes abundantes de novos compostos biologicamente ativos, de maior potência, eficácia e segurança. Na odontologia, uma das aplicações mais estudadas para esses produtos tem sido justamente no manejo das doenças infecciosas bucais. Objetivo: Realizar um levantamento dos ensaios clínicos que avaliaram a eficácia de produtos derivados de plantas no controle do biofilme ou na prevenção e/ou tratamento das principais doenças infecciosas bucais. Metodologia:

Anexo 7 - Trabalho apresentado ao *Brazil France Symposium on Medicinal Chemistry*

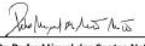


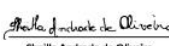
Anexo 8 - Trabalho apresentado na 12ª Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde - Fiocruz



A Fiocruz Pernambuco certifica que o trabalho intitulado "**Potencial antibacteriano e antifúngico da cianobactéria *Spirulina labyrinthiformis* Kütz. ex Gomont.**", cujo os autores são "**Clarice Pimentel Souto Maior, Clarice Pimentel Souto Maior, José Roberto Dantas de Andrade Santos, Vitória Costa Dias, Edeltrudes de Oliveira Lima, Roberto Sassi e Cristiane F. da Costa Sassi**", foi APRESENTADO na modalidade **Pôster**, na **12ª Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde**, realizada no período de 04 a 08 de novembro de 2024 no Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz Pernambuco).

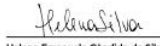
Recife, 08 de Novembro de 2024

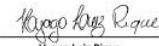

Dr. Pedro Miguel dos Santos Neto
Diretor do IAM/ Fiocruz PE


Sheilla Andrade de Oliveira
Vice-direção de Ensino


Zúlia Maria Medeiros
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em BBS Fiocruz PE


Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Vice-Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em BBS Fiocruz PE


Helena Emanuel Cândia da Silva
Coordenadora da XII Semana de
Biociências e Biotecnologia em Saúde


Hyago Luiz Rique
Coordenador da XII Semana de
Biociências e Biotecnologia em Saúde

Anexo 9 - Ficha do produto da cepa padrão de *Candida glabrata*



***Candida glabrata* (Anderson) Meyer et Yarrow**

90030™

Product Sheet

Description

An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Strain designation: NCCLS 84

Deposited As: *Torulopsis glabrata* (Anderson) Lodder et de Vries

Type strain: No

Storage Conditions

Product format: Freeze-dried

Storage conditions: 2°C to 8°C

Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

BSL 1

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies and procedures as well as any other applicable regulations as enforced by your local

Anexo 10 - Ficha do produto da cepa padrão de *Candida parapsilosis*



Description

An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Strain designation: CBS 604 [CCRC 20515, DBVPG 6150, DMS 5784, IBL 2545, IFO 1396, IGC 2545, JCM 1785, NBRC 1396, NCYC 601, NRRL Y-12969, UCD 61-27]

Deposited As: *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice

Type strain: Yes

Storage Conditions

Product format: Freeze-dried

Storage conditions: 2°C to 8°C

Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

BSL 1

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies