



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E DE PROTEÇÃO SOLAR *IN VITRO* E DAS
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS *IN SILICO* DA ASSOCIAÇÃO DO
ÁCIDO FERÚLICO E NICOTINAMIDA

MAYARA KARLA DOS SANTOS NUNES

JOÃO PESSOA – PB

2024

MAYARA KARLA DOS SANTOS NUNES

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E DE PROTEÇÃO SOLAR *IN VITRO* E DAS
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS *IN SILICO* DA ASSOCIAÇÃO DO
ÁCIDO FERÚLICO E NICOTINAMIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de
Medicamentos como requisito para obtenção do título de
Doutora na área de concentração Farmácia.

ORIENTADORA: Profa. Dr^a Rita de Cássia da Silveira e Sá

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessoa

JOÃO PESSOA – PB

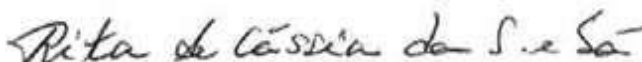
2024

MAYARA KARLA DOS SANTOS NUNES

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E DE PROTEÇÃO SOLAR *IN VITRO* E DAS
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS *IN SILICO* DA ASSOCIAÇÃO DO
ÁCIDO FERÚLICO E NICOTINAMIDA

APROVADA EM 06/12/2024:

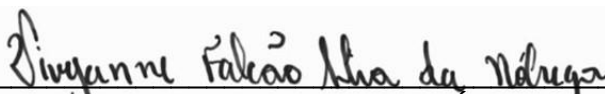
COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF.^a DR.^a RITA DE CÁSSIA SILVEIRA E SÁ (PRESIDENTE)



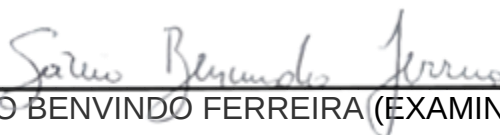
PROF. DR. ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO (EXAMINADOR INTERNO)



PROF.^a DR.^a VIVYANNE SANTOS SILVA DA NOBREGA (EXAMINADORA
INTERNA)



PROF.^a DR.^a IGARA OLIVEIRA LIMA (EXAMINADORA EXTERNA)



PROF. DR. SAVIO BENVINDO FERREIRA (EXAMINADOR EXTERNO)

Catálogo na publicação Seção de

N972a Nunes, Mayara Karla dos Santos.

Avaliação antimicrobiana, citotóxica e de proteção solar in vitro e das propriedades farmacológicas e toxicológicas in silico da associação do ácido ferúlico e nicotinamida / Mayara Karla dos Santos Nunes. - João Pessoa, 2024.
82 f. : il.

Orientação: Rita de Cássia Silveira e Sá. Coorientação: Hilzeth de Luna Freire Pessoa. Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Medicamentos - Desenvolvimento. 2. Antioxidante natural. 3. Compostos fenólicos. 4. Nicotinamida. 5. Ácido ferúlico. 6. Atividade antimicrobiana. I. Sá, Rita de Cássia Silveira e. II. Pessoa, Hilzeth de Luna Freire. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

Catálogo e Classificação

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

Dedico a meus país Veralúcia e Jalicio Nunes,
Aos meus avôs Maria José dos Santos e Severino Antônio
pela representação do sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

A educação sempre teve papel importante na minha vida. Desde pequena ouvia que só através dela eu seria capaz de alcançar meus maiores sonhos e objetivos. Hoje, realizo um deles. Dedico esse doutorado a todos que acreditam que só a educação é o caminho. Escolheu-se entrar nesse desafio foi para propagar a ideia e os valores que só a educação é capaz de trazer. Essa tese de doutorado é a prova de que nenhum sonho é inalcançável e de que só a educação cria pontes indestrutíveis.

Agradeço primeiramente a Deus por apontar o caminho e pela oportunidade dada para realização deste trabalho, tenho o prazer de colher os frutos desta conquista.

Se eu fui capaz de chegar até o doutorado foi graças aos meus pais, vocês sempre foram minha base na vida, no estudo e no mundo. Vocês são exemplos de que eu poderia chegar aonde quisesse e me dediquei especialmente para esse resultado todos os dias da minha vida. Esse doutorado é prova do amor e apoio incondicional de vocês. Agradeço ao meu irmão Caio César e minha cunhada pelo apoio nas horas que mais precisei.

Aos meus avós que sempre foram meu exemplo máximo de superação. Eles que nunca tiveram acesso à educação de qualidade, nem fizeram faculdade, mas me ensinaram muito sobre a vida e sobre persistir no que eu sonhasse. Se eu não desisti em meio às dificuldades foi para honrar a oportunidade que tive e vocês jamais puderam ter. Esse título não é só meu, mas também de vocês, os doutores da minha vida.

À UFPB por toda estrutura e portas que me foram abertas, pois foi nessa instituição que pude cursar a graduação, o mestrado e agora o doutorado. Foi uma experiência completa! Minha tese só se conclui hoje por todas as oportunidades que me foram dadas.

Agradeço às professoras Rita Sá e Hilzeth Pêssoa, aos docentes e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos. Aos colegas de doutorado pelas experiências vividas juntos, convívio agradável e pelo aprendizado imenso que tive ao longo das disciplinas cursadas.

A todos vocês meu muito obrigada!

Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.
Marie Curie

RESUMO

O ácido ferúlico se apresenta como um potente antioxidante natural que pode servir de matéria-prima para o surgimento de novas moléculas e/ou inovação tecnológica de substâncias com atividade farmacológica conhecida. O presente estudo investigou as propriedades farmacológicas e toxicológicas do ácido ferúlico (AF) da nicotinamida (NAM) e da associação dessas substâncias. Foram realizados ensaios *in silico* para previsão das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das substâncias e testes *in vitro* para determinar: a concentração mínima inibitória (CIM), a concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM), o mecanismo de ação antifúngico e a cinética de crescimento microbiano, o efeito hemolítico/ anti-hemolítico e o efeito de proteção solar. Os resultados demonstraram que o AF e a NAM apresentam bons parâmetros de farmacocinética e perfis ADMET adequados para diferentes aplicações terapêuticas. O AF apresentou baixo potencial citotóxico aos eritrócitos humanos e efeito de proteção solar foi considerado bom, sendo que para a NAM, o fator de proteção foi dose-concentração. Os dados dos testes antimicrobianos mostraram que as substâncias isoladas como associadas apresentaram efeito bactericida e bacteriostático nas linhagens *Enterococcus fecallis* ATCC 29212 e *Bacillus clausii* O/C (CNCM-I276). A NAM e a combinação sinérgica AF e NAM exibiram efeitos antifúngicos contra *C. albicans* ATCC 60193. A combinação sinérgica do AF e NAM não teve sua atividade antifúngica alterada na presença de ergosterol, porém, na presença de sorbitol, houve aumento do valor da CIM. A combinação sinérgica das substâncias testes com nistatina não mostrou efeito de antagonismo. Esses achados abrem um novo caminho para estudos de associação do AF com a NAM e possíveis combinações com antimicrobianos de referência e, relativamente, com baixa citotoxicidade. Mais investigações são necessárias para avaliar outros mecanismos de ação, incluindo combinações com medicamentos disponíveis e toxicidade em longo prazo em outros modelos relevantes.

Palavras-chave: Antioxidantes, Associação, Compostos fenólicos, Nicotinamida, Desenvolvimento de medicamentos.

ABSTRACT

Ferulic acid is a potent natural antioxidant that can serve as a raw material for the development of new molecules and/or technological innovation of substances with known pharmacological activity. This study investigated the pharmacological and toxicological properties of ferulic acid (FA) and nicotinamide (NAM) and the combination of these substances. In silico assays were performed to predict the pharmacokinetic and toxicological properties of the substances, and in vitro tests were performed to determine: minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC/MFC), antifungal mechanism of action and microbial growth kinetics, hemolytic/antihemolytic effect and sun protection effect. The results demonstrated that FA and NAM have good pharmacokinetic parameters and ADMET profiles suitable for different therapeutic applications. FA showed low cytotoxic potential to human erythrocytes and a good sun protection effect, while for NAM, the protection factor was dose-concentration. The data from the antimicrobial tests showed that the isolated substances as associated agents had bactericidal and bacteriostatic effects on the *Enterococcus fecalis* ATCC 29212 and *Bacillus clausii* O/C (CNCM-I276) strains. NAM and the synergistic combination of AF and NAM exhibited antifungal effects against *C. albicans* ATCC 60193. The synergistic combination of AF and NAM did not have its antifungal activity altered in the presence of ergosterol, however, in the presence of sorbitol, there was an increase in the MIC value. The synergistic combination of the test substances with nystatin did not show an antagonism effect. These findings open a new avenue for studies of the association of AF with NAM and possible combinations with reference antimicrobials and, relatively, with low cytotoxicity. Further investigations are needed to evaluate other mechanisms of action, including combinations with available drugs and long-term toxicity in other relevant models.

Keywords: Antioxidants, Association, Phenolic compounds, Nicotinamide, Drug development.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME -	absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AF -	Ácido ferúlico
AMH -	ágar Müller-Hinton
AM -	antimicrobianos comerciais
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
CMH -	Caldo Mueller-Hinton
CBM -	concentração bactericida mínima
CFM -	concentração fungicida mínima
CIFb -	Concentração Inibitória Fracionada do antifúngico padrão
CIFa -	Concentração Inibitória Fracionada do produto teste
CIM -	concentração mínima inibitória
EI -	inibidores enzimáticos
FA:NAM -	associação ácido ferúlico e nicotinamida
FPS -	fator de proteção solar
GPCR -	receptores acoplados à proteína G
ICIF -	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
ICM -	moduladores de canais iônicos
KI -	inibidores de quinases
LB -	meio Luria Bertani
NAD -	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP -	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAM -	nicotinamida
NRL -	ligantes de receptores nucleares
PEG 600 -	polietilenoglicol
PI -	inibidores de proteases
PVP -	polivinilpirrolidona
RPMI -	meio de cultura celular
UFC -	unidade formadora de colônia
UV -	ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias de biossíntese dos compostos fenólicos	15
Figura 2.	(2a) Estrutura química dos ácidos benzoicos (2b) Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos	16
Figura 3.	Estrutura química do ácido ferúlico	18
 ARTIGO 1		
Figura 1.	Fluxograma de seleção dos artigos a partir da base de dados PUBMED	45
 ARTIGO 2		
Figurs A e B.	Growth kinetics	49
Figure C.	Growth kinetics	50
 ARTIGO 3		
Figure 1a	Molecular structure FA CPK 3D	63
Figure 1b	Molecular structure NAM CPK 3D	63
Graph 1.	Comparison of absorption parameters	64
Graph 2.	Subcellular Location of the Compounds	65
Graph 3.	Hemolytic activity of FA on human red blood cells	68
Graph 4.	Evaluation of the osmotic fragility of FA in human red blood cells	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos selecionadas para a avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica 33

ARTIGO 1

Tabela 1. Síntese dos artigos selecionados para esta revisão integrativa 38

ARTIGO 2

Table 1. Antifungal activity of substances (FA, NAM, and FA:NAM mixture) against *Candida spp.* 48

Table 2. Effect of exogenous sorbitol (0.8 M) on the MIC of the molecules and caspofungin in the absence and presence of sorbitol (0.8 M) against the *C. albicans* strain ATCC 60193 49

Table 3. Effect of exogenous sorbitol (0.8 M) on the MIC of the molecules and caspofungin in the absence and presence of sorbitol (0.8 M) against the *C. Tropicalis* strain ATCC 750 49

Table 4. Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) after combination between AF, NAM e AF:NAM and Nystatin on *C. albicans* strain ATCC 90028 50

ARTIGO 3

Table 1. Molecular properties of the test substances according to Molinspiration© 62

Table 2. Metabolism parameters, toxicity, and biodegradability of the compounds 66

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of AF and NAM against bacterial strains. 66

Table 4. Determination of the sunscreen protection factor (SPF) of FA 70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. COMPOSTOS FENÓLICOS	16
2.2. ÁCIDO HIDROXICINÂMICOS	18
2.2.1. Ácido ferúlico	18
2.2.2. Abordagens científico-tecnológicas com o AF	20
2.3. NICOTINAMIDA	22
2.4. ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS <i>IN SILICO</i>	22
2.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚGICA	24
3. OBJETIVO	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	26
4. METODOLOGIA	27
4.1. LOCAL DA PESQUISA	27
4.2. SUBSTÂNCIAS TESTES	27
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
Espécies bacterianas e antifúngicas	27
a) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	28
b) Ação das moléculas ácido ferúlico (AF), nicotinamida (NAM) e mistura AF:NAM sobre a parede e membrana celular fúngicas	28
c) Cinética de crescimento e de morte antifúngica	29
d) Avaliação do índice de concentração inibitória fracionada (método checkerboard) do AF, NAM e da associação AF:NAM combinados a antifúngicos sintéticos	29
e) Concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	30
4.4. ENSAIOS COM ERITRÓCITOS HUMANOS	31
Avaliação do potencial hemolítico	31
Avaliação do efeito sobre a fragilidade osmótica	31
4.5. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)	32
4.6. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	32
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS	33
4.1. ARTIGO 1: Efeito antimicrobiano do ácido ferúlico: uma revisão integrativa de bioensaios	34
4.2. ARTIGO 2: Antifungal evaluation of the combination of ferulic acid and nicotinamide against <i>Candida spp.</i>	45
4.3. ARTIGO 3: <i>In Silico</i> and <i>In Vitro</i> Toxicity Assessment of Ferulic Acid and Nicotinamide: Analysis Using ADMET Tools and Effects on Bacteria, Erythrocytes, and Sun Protection	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história das civilizações a busca pelo tratamento para dores, males e enfermidades tem sido uma preocupação constante das populações. O uso de preparações a partir de fontes naturais, principalmente vegetal, é uma das práticas terapêuticas mais antigas da humanidade, tornando-se uma alternativa viável para os cuidados com a saúde e de fácil acesso. Além disso, muitas pessoas acreditam que a terapia pelas plantas não apresenta efeitos colaterais e toxicidade (Aleebrahim-Dehkordy *et al.*, 2017; Brima, 2017; Mbunde *et al.*, 2017; Odeyemi; Bradley, 2018; Tuasha; Petros; Asfaw, 2018).

A partir da compreensão dos dados obtidos pelas observações empíricas desses tratamentos e com o avanço tecnológico e a evolução dos povos, foram realizados estudos mais aprofundados. Portanto, a descoberta da identificação das funções biológicas, o isolamento e determinação estrutural de muitas macromoléculas e de seus ligantes naturais têm permitido o planejamento racional para novos alvos macromoleculares (Kumari; Luqman; Meena, 2019; Salehi *et al.*, 2019; Ruddaraju *et al.*, 2020). Dessa forma, a síntese de moléculas utilizando a combinação química emergiu como uma das principais ferramentas na busca por novas substâncias. A partir de moléculas com potencial para se tornarem futuros fármacos, foi possível a evolução da Química Tradicional para a Química Medicinal (Sangi, 2016).

A toxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância química ou biológica de causar danos ao organismo, dependendo da dose, do tempo de exposição e da sensibilidade individual de quem consome (Aleebrahim-Dehkordy *et al.*, 2017; Tuasha; Petros; Asfaw, 2018). Esse conceito está intrinsecamente ligado ao princípio de que "a dose faz o veneno", pois até mesmo as mesmas substâncias úteis podem se tornar tóxicas quando ingeridas em quantidades específicas. Ela pode se manifestar de forma aguda, com efeitos adversos imediatos, ou crônicos, quando uma exposição prolongada resulta em danos cumulativos aos sistemas corporais (Brima, 2017; Mbunde *et al.*, 2017; Odeyemi; Bradley, 2018). A toxicidade não se limita a deficiências diretamente dos tecidos ou órgãos; ela também pode interferir no equilíbrio metabólico, afetar a resposta imunológica e potencializar interações medicamentosas negativas, comprometendo a eficácia terapêutica e colocando em risco a saúde do indivíduo (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

Reiterando esse contexto, muitas pessoas, na tentativa de acelerar a diminuição dos sintomas ou a cura de determinadas condições, acabam administrando doses de medicamentos muito superiores às possíveis, acreditando erroneamente que essa prática irá aumentar a rapidez com que a substância se distribui pelo organismo. Ao ingerir doses excessivas, o risco de toxicidade aumenta significativamente, o que não apenas compromete a segurança do tratamento, mas também pode reduzir sua eficácia a longo prazo. A toxicidade resultante da superdosagem pode gerar efeitos colaterais graves, sobrecarregando o metabolismo e os sistemas de eliminação do corpo, como o fígado e os rins, além de diminuir a capacidade do organismo de resposta de forma adequada ao tratamento proposto (Sangi, 2016; Alonso-Castro *et al.*, 2017).

Uma solução para o problema colocado anteriormente poderia envolver modificações nas propriedades físico-químicas dos compostos para que possam apresentar melhor eficácia ou menos efeitos colaterais (Dimer *et al.*, 2013; Kinch, 2016). Devido à complexidade no desenvolvimento de novos

fármacos e aos altos custos, torna-se imprescindível o aprimoramento de um princípio ativo já conhecido e/ou comercializado, além do desenvolvimento de novas formulações e formas farmacêuticas que sejam mais baratas e que apresentem melhores resultados na terapia medicamentosa com menores efeitos adversos (Peter, 2023; Thapa; Kim, 2023).

A busca por novos fármacos ou alterações em suas propriedades físico-químicas para que possam apresentar melhor eficácia ou menos efeitos colaterais é uma constante na área farmacêutica. Dados recentes mostram que a cada ano há uma tendência crescente na aprovação de novas moléculas com melhores propriedades terapêuticas (Kinch, 2016). Todavia, exigências rigorosas de qualidade para novas moléculas ou alterações tecnológicas têm de ser cumpridas para que só assim possa ocorrer a comercialização (Bobo *et al.*, 2016; Van Norman, 2016).

Sabe-se que o ácido ferúlico (AF) é um ácido fenólico derivado do ácido cinâmico que está sendo estudado e vem apresentando bons resultados de eficácia e segurança. Ele apresenta alto potencial antioxidante e resultados satisfatórios como uma molécula auxiliar a ser utilizada no tratamento de algumas patologias (De Oliveira Silva; Batista, 2017). Entretanto, uma das limitações que dificulta a sua aplicação clínica é a baixa biodisponibilidade, pois como é um composto hidrofóbico, isto implica diretamente no seu potencial terapêutico ao ser administrado por via oral. Tendo em vista novas estratégias tecnológicas para aprimorar essa problemática e melhorar as suas propriedades farmacológicas, abordagens inovadoras emergem para refinar essa característica a fim de aumentar sua solubilidade aquosa (Nadal *et al.*, 2016).

Para superar essas limitações, diversas tecnologias têm sido exploradas que visam melhorar a solubilidade aquosa e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do ácido ferúlico. Essas abordagens buscam prolongar sua ação terapêutica e reduzir a necessidade de doses elevadas, minimizando efeitos adversos. Portanto, ao combinar o potencial antioxidante do ácido ferúlico com essas inovações tecnológicas, há uma perspectiva promissora para expandir sua aplicação clínica no tratamento de diversas patologias (Júnior *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias que aliem o potencial terapêutico de compostos naturais, como o ácido ferúlico, à aplicação de tecnologias inovadoras, pode representar uma abordagem promissora para enfrentar os desafios impostos pelas infecções fúngicas e bacterianas. Ao melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade desse composto, é possível não apenas otimizar sua ação antioxidante, mas também explorar suas propriedades antimicrobianas de maneira mais eficaz. Assim, a combinação de avanços tecnológicos com o uso de substâncias naturais surge como uma alternativa estratégica para ampliar as opções terapêuticas, especialmente em um cenário marcado pela crescente resistência antimicrobiana.

As infecções causadas por fungos e bactérias continuam a representar um grande desafio à saúde pública, especialmente com o aumento da resistência antimicrobiana, que torna muitos tratamentos tradicionais ineficazes. Esse cenário reforça a importância de se investir na pesquisa de novos candidatos em antifúngicos e antibacterianos. Substâncias com propriedades naturais, como os ácidos fenólicos, despertam grande interesse devido ao seu potencial terapêutico e à sua ação antioxidante, que podem desempenhar um papel crucial na defesa do organismo contra microrganismos patogênicos (WHO, 2022; Júnior *et al.*, 2020).

A descoberta de novos compostos com atividades antimicrobianas é essencial não apenas para tratar infecções emergentes, mas também para contornar a crescente resistência de cepas patogênicas. Tecnologias inovadoras têm sido empregadas para melhorar as propriedades de compostos bioativos, como o ácido ferúlico, melhorando sua solubilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Portanto, a busca por novos fármacos antimicrobianos, associados a estratégias tecnológicas de aprimoramento, é fundamental para combater infecções de maneira mais eficiente e segura, garantindo novas opções terapêuticas para as doenças (WHO, 2022).

Essa abordagem integrativa, entre a busca de novos compostos bioativos e a melhoria de suas propriedades, abre novas perspectivas no desenvolvimento de agentes antifúngicos e antibacterianos, essenciais para enfrentar os desafios atuais nesse contexto. Portanto, viabiliza-se o estudo da associação do AF com outras moléculas a fim de impulsionar o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos que o contenha em suas formulações.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Compostos fenólicos

Entre as diversas classes de moléculas presentes na natureza, os compostos fenólicos têm atraído grande interesse da comunidade científica nos últimos anos. Isso se deve às suas atividades farmacológicas notáveis, destacando-se especialmente a ação antioxidante. Além disso, esses compostos são capazes de inibir a oxidação lipídica, um processo associado ao desenvolvimento de diversas doenças, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, inflamações, entre outras. Essas propriedades tornam os compostos fenólicos potenciais aliados na prevenção e no tratamento dessas patologias (Auger *et al.*, 2004; Prateek *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Orak *et al.*, 2016; Damasceno *et al.*, 2017; Gabriele *et al.*, 2017).

Esses compostos são produzidos no metabolismo secundário das plantas. Os metabólitos secundários resultam da conversão de energia luminosa em energia química, permitindo às plantas responder a diversos fatores ambientais, sejam eles físicos ou biológicos, e também possibilitando a sua comunicação e interação com diferentes ambientes, atraindo ou repelindo-os, sustentando-os ou até destruindo-os (Maraschin; Vepoorte, 1999; Sato *et al.*, 2003; Castro; Kluge; Peres, 2005). Os três principais grupos de metabólitos secundários são: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Para os seres humanos, essas substâncias são responsáveis pelos efeitos terapêuticos das plantas que, no entanto, pode tornar-se tóxico dependendo da dose administrada. O princípio ativo de uma planta é uma mistura de substâncias que fornece ação farmacológica, diferenciando-se de um fármaco, que é uma substância química isolada e de estrutura bem definida (Merillon; Ramawat, 2007; Ramawat; Mathur, 2007; Dos Santos Almeida, 2017).

Quimicamente, os compostos fenólicos são compostos pela presença de pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (-OH). A síntese desses compostos ocorre por meio de duas principais rotas metabólicas: a via do ácido quiquímico e a via do acetato-malonato, resultando em uma biossíntese de origem mista (Figura 1). A via do ácido quiquímico é responsável pela produção da maioria dos compostos fenólicos nas plantas, enquanto a via do acetato-malonato, embora menos significativa, desempenha um papel importante na composição dos compostos fenólicos em fungos e bactérias (Figura 1) (Taiz *et al.*, 2015).

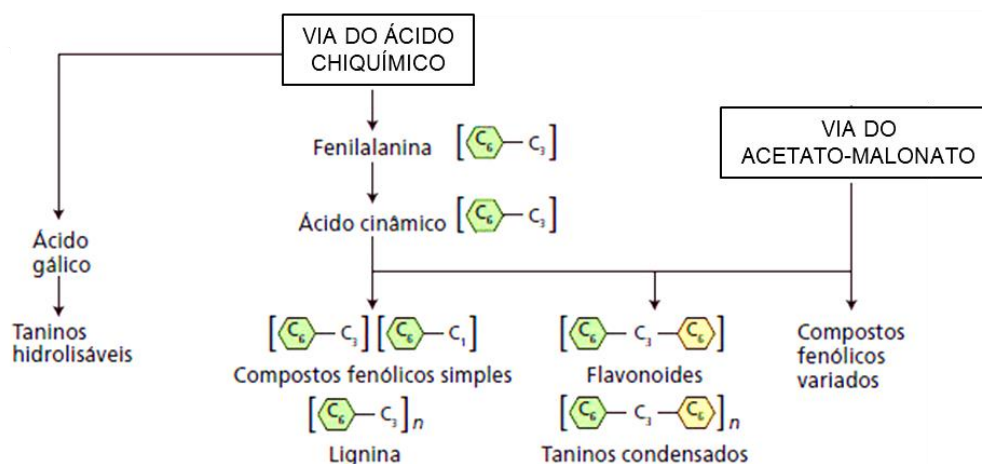


Figura 1. Vias de biossíntese dos compostos fenólicos.

FONTE: <http://www.ledson.ufla.br/metabolismo-secundario/compostos-fenolicos/>

Os compostos fenólicos abrangem uma vasta diversidade de substâncias, com cerca de 8.000 compostos já conhecidos e de interesse científico. Esses compostos são classificados em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (também chamados de ácidos fenólicos). Os flavonoides possuem uma estrutura formada por dois anéis aromáticos conectados por um heterociclo oxigenado. Com base no grau de hidrogenação e nas modificações desse heterociclo, os flavonóides podem ser subdivididos em flavanóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Normalmente, esses compostos estão ligados a açúcares, formando glicosídeos (Karakaya, 2004; De Souza; Casanova; Costa, 2015; Hussain *et al.*, 2019).

Os ácidos fenólicos, pertencentes ao grupo dos não flavonoides, incluem compostos benzoicos e cinâmicos. Esses compostos possuem um anel aromático com pelo menos um grupamento hidroxila e diferentes grupos funcionais, como aldeídos, álcoois ou ácidos, podendo formar ésteres com ácidos orgânicos ou se ligar a açúcares. Além disso, outros compostos fenólicos incluem estilbenos, lignanos e, em formas polimerizadas, taninos e ligninas. Muitas propriedades dos vegetais, como cor, adstringência e aroma, são atribuídas à presença de compostos fenólicos (Manach *et al.*, 2004, 2005; Landete, 2012; Tresserra-Rimbau; Lamuela-Raventos; Moreno, 2018).

Os ácidos fenólicos são amplamente encontrados em frutas, vegetais, cereais e leguminosas, desempenhando um papel essencial em diversos processos biológicos, como pigmentação, crescimento, reprodução e defesa contra patógenos ou predadores (Lafay; Gil-Izquierdo, 2008; Oliveira; Bastos, 2011; Călinoiu; Vodnar, 2018; Shahidi; Peng, 2018). Esses compostos podem estar presentes tanto na forma livre quanto conjugados com ésteres, éteres e diversas outras moléculas, como açúcares simples, ácidos orgânicos e polímeros vegetais, sendo comumente encontrados como ésteres ou amidas (Gomes *et al.*, 2003; Fiuza *et al.*, 2004; De Moraes Arnoso; Da Costa; Schmidt, 2019). Os ácidos fenólicos são classificados com base em sua estrutura em dois grupos principais: ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos (Figura 2). Os ácidos benzóicos possuem uma estrutura com sete átomos de carbono (C6-C1), enquanto os ácidos cinâmicos possuem nove átomos de carbono (C6-C3), predominando na forma hidroxilada. Ambos os tipos podem apresentar diferentes graus de hidroxilação (Kumar; Goel, 2019; Abotaleb *et al.*, 2020)

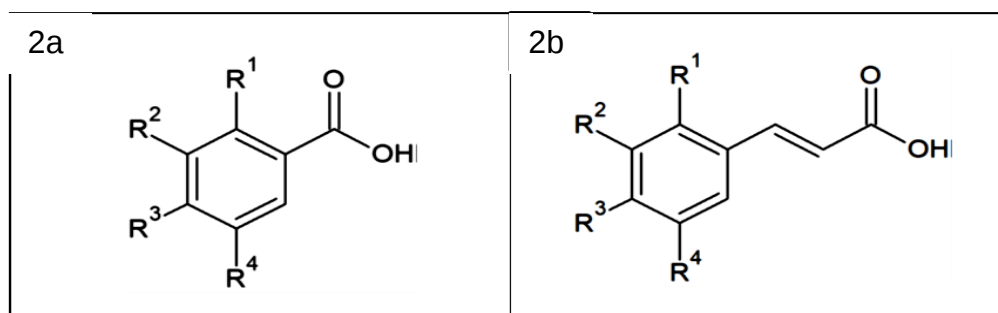


Figura 2. (2a) Estrutura química dos ácidos benzoicos. (2b) Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Fonte: SOARES, 2002.

Os principais ácidos hidrobenzoicos incluem o ácido gálico, elágico, protocatequímico e 4-hidrobenzoico. Já os derivados de ácidos hidroxicinâmicos, amplamente representados pelos ácidos

cafeico, ferúlico, sinápico e p-cumárico, pertencem à classe dos fenilpropanoides e constituem o maior grupo de ácidos fenólicos (Abotaleb *et al.*, 2020; Bhosale *et al.*, 2020).

2.2. Ácido hidroxicinâmico

Os ácidos hidroxicinâmicos são amplamente encontrados em alimentos e bebidas de origem vegetal, como café, erva-mate, maçã e ameixa, dentre outras frutas, crucíferas e cereais (Veras *et al.*, 2022). Eles raramente aparecem na forma livre, exceto em alimentos fermentados ou processados. Na dieta, esses compostos podem desempenhar um papel importante ao reduzir a proliferação e diferenciação de adipócitos, bem como diminuir a deposição e disfunção do tecido adiposo. O ácido cafeico é o mais comum entre eles, muitas vezes encontrado em sua forma esterificada (Cho *et al.*, 2010; Alam *et al.*, 2016).

A síntese dos ácidos hidroxicinâmicos na natureza ocorre por meio da via do ácido chiquímico, utilizando os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina, ou ambos como precursores. Esses aminoácidos são inicialmente convertidos em ácido p-cumárico, pela perda de um grupo amina. Em seguida, o ácido p-cumárico é hidroxilado, formando o ácido cafeico, que por sua vez, através de uma reação de metilação, gera o ácido ferúlico. Esses compostos possuem um esqueleto de carbono C6-C3, com uma ligação dupla na cadeia lateral, e podem existir nas configurações *cis* ou *trans* (El-Seedi *et al.*, 2012; Caparica *et al.*, 2020).

Os ácidos hidroxicinâmicos possuem baixa toxicidade e um elevado potencial biológico, exibindo atividades analgésica, antisséptica, antimicrobiana e antioxidante (Caddeo *et al.*, 2018; Tungmunthum *et al.*, 2018). No entanto, sua baixa solubilidade em água limita sua aplicação terapêutica e afeta negativamente a biodisponibilidade dos compostos (Ahmad *et al.*, 2019).

2.2.1. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (AF) [ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enoico] (Figura 3) é um dos ácidos fenólicos mais abundantes nas plantas, encontrado em altas concentrações em alimentos como feijão-marinho, linhaça, farelo de milho, farelo de trigo e aveia. Ele é especialmente rico, na forma de éster, nos farelos de arroz (Rosazza *et al.*, 1995). O AF se concentra na parede celular do revestimento exterior das sementes e é produzido através da biossíntese de lignina, a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina nas plantas.

O AF foi isolado pela primeira vez em 1866, a partir de uma resina comercial da planta *Ferula foetida*, e sua síntese química foi realizada em 1925. Seus efeitos biológicos começaram a ganhar destaque na década de 1970, quando pesquisadores japoneses identificaram as propriedades antioxidantes dos ésteres de AF extraídos do óleo de arroz (Zhao; Moghadasian, 2008).

O AF pode ser encontrado em diferentes formas, como monômero, dímero, oligômero livre ou polímero constituinte. Ele está ligado covalentemente a polissacarídeos, poliaminas e glicoproteínas por meio de ligações ésteres, ou ainda como éter associado à lignina (Duran; Padilla, 1993; Kroon; Williamson, 1999). Os isômeros do AF apresentam características distintas: o isômero *cis* é um líquido

oleoso de cor amarela, enquanto o *trans* se apresenta como um cristal branco, sendo o *trans* responsável por 90% de sua ocorrência natural (Wood; Fulcher; Stone, 1983).

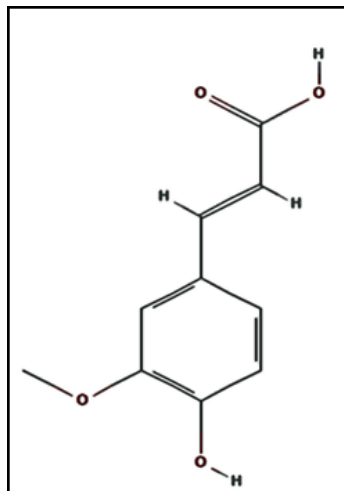


Figura 3. Estrutura química do ácido ferúlico

FONTE: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445858#section=2D-Structure&fullscreen=true>

O AF apresenta um elevado potencial fotoprotetor e regenerador celular, agindo como uma barreira na membrana celular, bloqueando a ação de radicais livres e reduzindo os efeitos nocivos dos dímeros de timina, conhecidos agentes carcinogênicos resultantes da exposição à radiação UV (Kawabata *et al.*, 2000; Du; Cao; Yu; 2011). Suas propriedades antioxidantes, que incluem a eliminação de radicais livres, fazem do AF o mais eficaz entre os ácidos hidroxicinâmicos. Isso ocorre devido à estabilização por ressonância do radical fenoxi, proporcionada pela conjugação da cadeia lateral estendida (Anselmi *et al.*, 2005).

O AF possui uma ampla gama de potenciais efeitos terapêuticos, úteis no tratamento de doenças como câncer, diabetes, além de doenças pulmonares e cardiovasculares. Ele possui ainda propriedades hepatoprotetoras, neuroprotetoras, fotoprotetoras, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Rechner; Pannala; Rice-Evans, 2001; D'Archivio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Azay-Milhau *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2020). A ação antioxidante do AF se destaca por sua capacidade de neutralizar três tipos principais de radicais livres: peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila. Essa neutralização reduz significativamente a degradação de proteínas e lipídios, especialmente causada pelo radical hidroxila (Kumar; Pruthi, 2014; Mancuso; Santangelo, 2014).

O AF também tem sido associado a diversas propriedades farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios (Zhao *et al.*, 2014), antitrombóticos (Hong *et al.*, 2016), antienvelhecimento (Hahn *et al.*, 2016) e contra a neurotoxicidade induzida por glutamato (Jin *et al.*, 2007) ou β -amilóide (Yan *et al.*, 2001). Além disso, foram observados efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral focal, doença de Alzheimer, lesão medular e acidente vascular cerebral (Hassanzadeh; Atyabi; Dinarvand, 2018; Kim; Park, 2019). No Japão, o AF é utilizado como antioxidante e conservante alimentar, enquanto na China, é empregado no tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Zhao; Moghadasian, 2008). O AF atua como inibidor da agregação plaquetária, da liberação de tromboxano e, no fígado, inibe a síntese de colesterol, prevenindo doenças coronarianas e

eventos cardiovasculares adversos (Li *et al.*, 2021). Dessa forma, o AF demonstra potencial para aplicação em diversas áreas, especialmente na farmacêutica.

A eficácia preventiva e terapêutica do AF depende de suas concentrações fisiológicas, influenciadas por suas propriedades farmacocinéticas (absorção, metabolismo, distribuição e eliminação). Estudos em ratos, utilizando perfusão *in situ* no intestino delgado ou infusão gástrica *in situ*, mostraram que o AF é bem absorvido na parte superior do intestino (Adam *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Em humanos, o AF foi rapidamente detectado no plasma após o consumo de tomates (Bourne; Rice-Evans, 1998) ou cerveja (Bourne *et al.*, 2000), com a excreção urinária total de seus metabólitos atingindo o pico 7 ou 8 horas após a ingestão desses alimentos. No entanto, a principal fonte de AF na dieta são os alimentos integrais, nos quais o composto está esterificado a arabinosilanos e hemiceluloses. Essa esterificação reduz sua biodisponibilidade, conforme observado em estudos com ratos (Adam *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Kishida; Matsumoto, 2019). Quando o AF é consumido em cereais integrais, apenas 3% da dose ingerida é excretada na urina, enquanto essa excreção chega a 50% quando o AF é administrado em sua forma livre (Adam *et al.*, 2002).

Em indivíduos adultos, após o consumo de cereais no café da manhã, Kern *et al.* (2003) demonstraram que o AF presente na fração solúvel dos cereais é rapidamente absorvido no intestino delgado, enquanto a fração insolúvel, esterificada com arabinosilanos, é direcionada ao cólon. Essa rápida absorção do AF pode ser atribuída à sua alta taxa de absorção no estômago (Konishi *et al.*, 2003). Independentemente da forma de como o AF foi administrado, seja livre ou esterificado com diferentes carboidratos, os metabólitos plasmáticos principais foram sulfatos ou sulfo-glucuronídeos do AF. A forma livre representou apenas entre 5% e 24% do total de metabólitos (Rondini *et al.*, 2002; 2004; Zhao *et al.*, 2004).

O AF é insolúvel em água e óleo, o que restringe suas aplicações (Bitencourt; Cabral; Meirelles; 2016; Shakeel *et al.*, 2017). Para melhorar sua lipossolubilidade e aumentar suas atividades biológicas, torna-se necessária uma modificação de sua estrutura química. Assim como outros derivados do ácido cinâmico, o AF exibe um perfil de segurança favorável, além de demonstrar alto potencial antioxidante e resultados promissores como adjuvante no tratamento de certos tipos de câncer (Muthusamy *et al.*, 2016). No entanto, sua baixa solubilidade em água, de 5970 mg/L a 25°C, representa uma barreira significativa para seu uso pela indústria farmacêutica (PubChem, 2023). Essa limitação pode exigir a administração de doses mais elevadas à necessidade, exigindo sua biodisponibilidade e tornando o tratamento menos eficiente. Para enfrentar esse desafio, diversas estratégias tecnológicas foram desenvolvidas, contornando a baixa solubilidade hídrica do AF e aprimorando seu potencial terapêutico, especialmente quando administrado por via oral.

2.2.2. Abordagens científico-tecnológicas com o AF

As formulações convencionais de AF, amplamente utilizadas em diversos contextos clínicos e para múltiplas atividades biológicas, apresentam limitações devido às restrições biofarmacêuticas, principalmente relacionadas à sua baixa solubilidade hídrica, o que compromete seu potencial terapêutico quando administrado por via oral. Diante desse desafio, torna-se evidente a necessidade de desenvolver estratégias tecnológicas que superem essas limitações. Nesse cenário, observa-se um

interesse crescente em pesquisas que exploram o uso do AF em associação com nanopartículas, nanocarreadores, cocristais e biomateriais, como a quitosana (Dasagrandhi *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2022).

Os sistemas de nanotecnologia aplicados a fitoquímicos oferecem uma oportunidade promissora para superar os desafios biofarmacêuticos apresentados por diversos medicamentos. No entanto, para alcançar a eficácia dos tecidos-alvo, é essencial que os cientistas desenvolvam nanoformulações que considerem como características específicas dos meios biológicos que serão administrados. Um exemplo disso é o AF encapsulado em cascas de grafeno, que se mostra menos tóxico e mais biocompatível do que as nanopartículas de magnetita revestidas com carbono amorfo, em estudos com células humanas de visão e pele (Zhong *et al.*, 2022)

Relatos indicam que dispersões sólidas de AF com polivinilpirrolidona (PVP) e lauril sulfato de sódio foram eficazes na redução do tempo de liberação do ácido. Observou-se uma maior eficiência de dissolução em dispersões sólidas contendo poloxamer 407 e PEG 600. Também foi observado que o AF nanoencapsulado com quitosana apresentou melhor biodisponibilidade (Huang; Yu; Ru, 2010; Franke, 2014; Nadal, 2016; Pareek; Gupta; Panwar, 2018).

Diversas estratégias foram empregadas para aumentar a fotoestabilidade da AF, incluindo sua incorporação em ciclodextrinas e β -ciclodextrinas (Anselmi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Kfoury *et al.*, 2016). Além disso, a formação de cocristais de AF tem sido relatada na literatura, utilizando coformadores para melhorar o perfil de dissolução de fármacos como lamotrigina, e com nicotinamida para aprimorar sua solubilidade aquosa (Swapna; Maddileti; Nangia, 2014; Thipparaboina *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020; O encapsulamento do AF em lipossomas, obtido a partir de resíduos de bagaço de cerveja, foi explorado para tratamentos de pele, enquanto extratos de própolis verdes ricos em AF, nanoestruturados, foram usados na cicatrização de feridas (Berretta *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2015; Bucci *et al.*, 2020; Beserra *et al.*, 2023). Também foi descrito que o desenvolvimento de complexos multicomponentes com ciclodextrinas e polímeros hidrofílicos aumentaram a estabilidade oxidativa do AF, especialmente em altas temperaturas, em formulações semissólidas (Duarte, 2020).

Nos últimos anos, diversas patentes foram registradas, demonstrando o crescente interesse no AF e nas nanoformulações associadas (Raj; Singh, 2022). As inovações na composição do AF têm superado algumas dificuldades, resultando em uma melhoria contínua na qualidade do produto final. No entanto, apesar de seus bons resultados em termos de eficácia farmacológica, a baixa solubilidade aquosa do AF permanece um fator limitante para sua administração oral. Nesse contexto, o estudo de associações mostra-se relevante, como o realizado por Bu *et al.* (2023), que cocrystalizou a AF com o antifúngico 5-fluorocitosina, e por Canturk (2018), que demonstrou um efeito sinérgico da combinação de AF com a caspofungina contra *C. albicans*.

Considerando que o cocrystal de AF com nicotinamida já foi relatado como eficaz na melhora da solubilidade e do perfil de dissolução do ácido (Júnior *et al.*, 2020), acredita-se que a combinação de substâncias pode potencializar suas propriedades biofarmacêuticas quando administrada por via oral. Assim, dado o papel crucial do aumento da solubilidade para melhorar a biodisponibilidade do AF, essa associação de substância surge como uma promessa de matéria-prima para o desenvolvimento de novas alternativas tecnológicas voltadas para a aplicação terapêutica do AF.

2.3. Nicotinamida

A nicotinamida (NAM) é uma forma de amida da vitamina B3 (niacina) e pode ser obtida tanto por síntese no organismo quanto por meio da dieta, em fontes de origem animal ou vegetal. A forma ácida, no caso o ácido nicotínico, é principalmente encontrado em fontes vegetais (Júnior *et al.*, 2020). Ele é rapidamente absorvido pelo epitélio gastrointestinal (Rex; Fink, 2008; Maiese *et al.*, 2009; Braid; Liu, 2020). A NAM é gerada pela conversão do ácido nicotínico no fígado ou pela hidrólise do β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). No organismo, a NAM atua como precursor da coenzima NAD e é fundamental para a síntese do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP) (Lin; Guarente, 2003; Maiese; Chong, 2003; Li *et al.*, 2004).

A NAM pode ser utilizada diretamente pelas células para sintetizar NAD, que desempenha um papel crucial na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, sendo essencial para a produção de ATP, e para a síntese e reparo do DNA (Hageman; Stierum, 2001; Magni *et al.*, 2004; Maiese, 2008, 2020). Essas vias celulares são fundamentais para o metabolismo energético e afetam tanto a fisiologia normal quanto os processos patológicos. A deficiência de NAM pode resultar em fadiga, perda de apetite, erupções pigmentadas e ulcerações orais. Em casos mais graves, a carência de NAM leva à pelagra, uma condição caracterizada por erupções cutâneas, ulcerações orais, distúrbios gastrointestinais e comprometimento cognitivo (Williams *et al.*, 2012; Csiszar *et al.*, 2019; Castro-Portuguez; Sutphin, 2020).

Um estudo de segurança avaliou o uso prolongado de NAM em doses de até 3 g por dia, não observando efeitos colaterais significativos (Berven *et al.*, 2023). Estudos anteriores, que utilizaram doses mais elevadas (1 a 12 g por dia, durante meses), relataram efeitos adversos como náusea e, em casos raros, complicações gastrointestinais (Knip *et al.*, 2000; Hwang; Song, 2020). A NAM também foi associada a efeitos anti-inflamatórios, ocorrendo como agente quimioprotetor na terapia do câncer e no tratamento de doenças neurodegenerativas e distúrbios metabólicos (Ungerstedt *et al.*, 2003; Nikas *et al.*, 2020; Maiese, 2021; Tosti *et al.*, 2023). Além disso, o NAM demonstrou atividade antimicrobiana, tanto isoladamente quanto em combinação com outros medicamentos e em conjugação com biomateriais, mostrando eficácia contra microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e bactérias da acne (Chaffin *et al.*, 1979; Zidan *et al.*, 2016; Vakilinezhad *et al.*, 2018; Xing *et al.*, 2019; Shih *et al.*, 2021).

2.4. Estudos farmacológicos e toxicológicos *in silico*

Os estudos farmacológicos e toxicológicos são essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. Tradicionalmente, essas investigações envolvem experimentos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, com o avanço das tecnologias computacionais, métodos *in silico* têm ganhado destaque. A aplicação de técnicas *in silico* oferece uma maneira rápida e econômica de prever características farmacocinéticas e toxicológicas de compostos químicos antes de sua síntese e teste experimental (Da Cruz Moschem; Gonçalves, 2022).

Essas ferramentas computacionais são amplamente aplicadas para prever a toxicidade de compostos antes da realização de estudos laboratoriais e clínicos. De fato, essas técnicas têm sido

validadas em diversas áreas da toxicologia (Mohamed *et al.*, 2017). O uso de métodos estatísticos sofisticados permite associar potenciais riscos à saúde, com triagens computacionais capazes de analisar mais de 100.000 compostos por dia. Essas triagens utilizam bibliotecas químicas contendo milhões de compostos ativos com atividade biológica de interesse, permitindo também a análise de propriedades toxicológicas desses compostos (Alzain *et al.*, 2022; Motta; Pinto; Araujo, 2023).

Durante o desenvolvimento inicial não clínico, os candidatos a medicamentos passam por diversas etapas cruciais, como a determinação de sua farmacocinética (disponibilidade do medicamento no organismo). Além disso, estudos preliminares de segurança, como avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade, são fundamentais para determinar a segurança de um composto, gerando as primeiras informações sobre sua tolerabilidade em diferentes sistemas biológicos. Essas informações são críticas para decisões futuras relacionadas ao avanço de compostos ao longo do desenvolvimento clínico (Mohamed *et al.*, 2017; Pradeepkiran; Sainath; Shrikanya, 2021).

Dentre os métodos mais utilizados, destacam-se as previsões de ADME, que descreve as quatro etapas cruciais pelas quais um fármaco passa após ser administrado (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), as ferramentas computacionais que empregam diferentes modelos matemáticos e as ferramentas computacionais para calcular propriedades relevantes, como coeficiente de partição lipofílico (logP), solubilidade, permeabilidade intestinal e outras métricas. Ferramentas específicas, como a SwissADME e o ADMETlab, são amplamente usadas para simular a farmacocinética de novos compostos e determinar sua adequação como fármacos candidatos a uso terapêutico na clínica (Pradeepkiran; Sainath; Shrikanya, 2021; Angeli *et al.*, 2023; Motta; Pinto; Araujo, 2023).

Uma ferramenta amplamente utilizada na previsão de propriedades farmacológicas é o *software* Molinspiration, que permite prever a afinidade de compostos por uma variedade de alvos moleculares. O Molinspiration é uma plataforma *online* e oferece uma interface acessível que permite aos pesquisadores calcular várias propriedades moleculares, como o logP, número de doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio, número de átomos rotacionais, peso molecular e outras propriedades que podem prever a atividade biológica de um composto. Entre os principais alvos preditos pelo Molinspiration estão receptores acoplados à proteína G (GPCR), moduladores de canais iônicos (ICM), inibidores de quinases (KI), ligantes de receptores nucleares (NRL), inibidores de proteases (PI) e inibidores enzimáticos (EI) (Hemalatha; Selvin; Girija, 2018; Chintakunta; Meka, 2020).

Além disso, o Molinspiration permite a avaliação do cumprimento da Regra de Lipinski, também conhecida como "Regra dos Cinco". Essa regra sugere que para um composto ter potencial como fármaco oral, ele deve seguir critérios específicos: número de violações da "Regra dos 5" de Lipinski, não mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, não mais que 10 aceptadores de ligação de hidrogênio, um peso molecular inferior a 500 daltons e um logP não superior a 5. Moléculas que violam essa regra tendem a ter menor biodisponibilidade oral (Shah; Seth, 2021; Chintakunta; Meka, 2020).

Os modelos *in silico* desempenham um papel central na triagem de novos compostos e na previsão de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas. Ferramentas como o Molinspiration e as plataformas de ADME ajudam a otimizar o desenvolvimento de novos medicamentos, reduzindo o tempo e os custos envolvidos no processo. No entanto, é importante ressaltar que os dados gerados por essas

ferramentas devem ser validados experimentalmente. Portanto, a combinação de abordagens *in silico* com estudos experimentais continua sendo essencial para o sucesso no desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes (Mohamed *et al.*, 2017; Pradeepkiran; Sainath; Shrikanya, 2021).

2.5. Atividade antibacteriana e antifúngica

As infecções bacterianas e fúngicas representam um desafio significativo para a saúde pública mundial. Apesar dos avanços na medicina a crescente resistência microbiana e a emergência de novas espécies patogênicas levantam preocupações sobre a eficácia dos tratamentos disponíveis. As bactérias e fungos patogênicos são responsáveis por uma variedade de doenças que afetam tanto a saúde humana quanto a animal, levando a complicações severas e, em muitos casos, à morte. Nesse contexto, a atividade antibacteriana e antifúngica é um campo de intensa pesquisa, visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e estratégias para combater a resistência antimicrobiana (Laxminarayan *et al.*, 2020; Okeke *et al.*, 2024).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados em duas categorias principais: antibacterianos, que atuam contra bactérias, e antifúngicos, que visam fungos. A atividade antibacteriana se refere à capacidade de um composto de inibir o crescimento ou eliminar bactérias patogênicas. Os mecanismos de ação desses compostos variam, podendo envolver a inibição da síntese da parede celular, a interferência na síntese de proteínas, e a inibição da síntese de ácidos nucleicos. Esta atividade é crucial, pois muitas infecções bacterianas podem levar a complicações graves, incluindo seps e morte (Spagnolo; Trujillo; Dennehy, 2021; Ghosh *et al.*, 2023; Muteeb *et al.*, 2023).

Da mesma forma, a atividade antifúngica é essencial, especialmente considerando que infecções fúngicas podem ser especialmente perigosas em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes oncológicos ou transplantados. Em particular, *C. albicans* tem emergido como uma espécie de destaque nas infecções fúngicas, com a OMS destacando sua crescente importância em seu relatório de 2022. Essa levedura é um patógeno oportunista que pode causar infecções em pacientes saudáveis, mas representa uma ameaça maior para aqueles com sistemas imunológicos comprometidos. As infecções por *C. albicans* podem variar de superficiais, como candidíase oral e vaginal, a infecções sistêmicas mais graves que afetam múltiplos órgãos (WHO, 2022; Giannella *et al.*, 2024; Pinho; Miranda; Costa-de-Oliveira; 2024).

Além disso, a crescente resistência de *C. albicans* a antifúngicos convencionais, como o fluconazol, tem gerado preocupações em ambientes clínicos, onde a eficácia do tratamento é vital para a sobrevivência do paciente. A resistência a medicamentos fúngicos pode resultar de múltiplos fatores, incluindo a exposição inadequada a antifúngicos e a presença de biofilmes, que são comunidades de microrganismos que se aderem a superfícies e são muito mais difíceis de tratar. O desenvolvimento de resistência a esses agentes, no entanto, tem aumentado, levando a uma necessidade crescente por novas substâncias com atividade antimicrobiana, que podem incluir compostos naturais e sintéticos (Fang *et al.*, 2023; Bassetti *et al.* 2024; Giannella *et al.*, 2024).

Embora *C. albicans* seja a causa mais comum de candidíases invasivas — condições graves que podem afetar órgãos vitais como coração, sangue e cérebro — outras espécies não-albicans de *Candida* também têm sido associadas a casos de candidemia nos últimos 25 anos. Essa realidade levou

ao aumento significativo no número de estudos investigativos voltados para essas espécies. O relatório publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) destacou a gravidade dessa situação, com mais de 34.000 casos de infecção e 1.700 mortes. Nesse contexto, espécies como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram identificadas como resistentes a medicamentos e, portanto, descritas como potencialmente perigosas (Mccarty; White; Pappas, 2021; Pappas *et al.*, 2023; Bays *et al.*, 2024; Giannella *et al.*, 2024)

A luta contra infecções bacterianas e fúngicas é complexa e multifacetada. A atividade antibacteriana e antifúngica continua a ser um campo ativo de pesquisa, especialmente à luz da crescente resistência a medicamentos. A importância de patógenos emergentes reforça a necessidade constante de inovação no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. A busca por tratamentos eficazes e seguros deve ser uma prioridade, não apenas para melhorar os desfechos clínicos, mas também para preservar a eficácia dos tratamentos existentes e proteger a saúde pública global (Laxminarayan *et al.*, 2020; Okeke *et al.*, 2024; Bays *et al.*, 2024; Giannella *et al.*, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos não clínicos do ácido ferúlico, da nicotinamida e da associação dessas substâncias.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar o levantamento bibliográfico das atividades antimicrobianas do AF e associações com outros produtos;
- Avaliar *in silico* a biodisponibilidade oral teórica através do software Molinspiration Cheminformatics® e determinar a toxicidade teórica, utilizando o software admetSAR®;
- Avaliar o efeito microbiológico do AF, da NAM e da associação AF e NAM através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)
- Analisar a ação do AF, NAM e da associação AF e NAM sobre a parede celular fúngica;
- Determinar a curva de crescimento microbiana promovida pelo AF, NAM e da associação AF e NAM;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada do AF, NAM e da associação AF e NAM combinados a nistatina;
- Avaliar a citotoxicidade do AF sobre eritrócitos humanos oriundos de sangue dos tipos A, B e O e Rh positivo e negativo, utilizando os modelos de hemólise e fragilidade osmótica eritrocitária;
- Determinar o fator de proteção solar AF e da NAM.

4. METODOLOGIA

4.1. LOCAL DA PESQUISA

As atividades de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/PATOS – PB). As metodologias de análises *in vitro* que necessitaram de amostras biológicas (eritrócitos) foram doadas por voluntários e o estudo passou por aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas de Patos (FIP), sob o parecer nº 3.653.358, como preconizado pela Norma Operacional nº 001/2013 – Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução 466/12 – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

4.2. SUBSTÂNCIAS TESTES

O ácido ferúlico (AF) foi comprado da Pharmanostra (China) e a nicotinamida (NAM), da Purifarma (Brasil). Todas as matérias-primas apresentaram pureza superior a 99.5% e foram doadas pelo Prof. Dr. Fábio Santos de Souza do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB. As substâncias foram pesadas para garantir que as quantidades estivessem ajustadas para a proporção 1:1 molar. As quantidades foram então dissolvidas em DMSO.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Espécies bacterianas e antifúngicas

As atividades antibacteriana e antifúngica foram realizadas, respectivamente, em bactérias Gram-positivas, Gram negativas e fungos oriundos da *American Type Culture Collection* (ATCC) e de origem clínica, de acordo com o quadro abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Micro-organismos selecionadas para a avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica.

BACTÉRIAS	FUNGOS
<i>Staphylococcus aureus</i> 25619	<i>C. albicans</i> ATCC 60193
<i>Staphylococcus aureus</i> 25925	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
<i>Bacillus clausii</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
<i>Enterococcus fecalis</i> ATCC 29212	
<i>E. coli</i> 101	
<i>E. coli</i> 103	
<i>E. coli</i> 104	
<i>E. coli</i> 105	
<i>E. coli</i> 108	
<i>E. coli</i> 110	

a) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do AF, da NAM e da associação AF e NAM

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração possível para inibir o crescimento de cepas fúngicas, e foi determinada por meio da técnica de microdiluição descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). A suspensão de levedura foi preparada em caldo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* medium, Sigma, Darmstadt, Alemanha) e ajustada com turbidez equivalente a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, 530nm, abs. 0,08-0,13, sendo utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. Krusei*.

Para microdiluição foram usadas placas esterilizadas com 96 poços de fundo chato, que, inicialmente, receberam 100 µL de RPMI. Posteriormente, no primeiro poço de cada coluna foram inseridos 100 µL das substâncias em estudo, seguido do processo de microdiluição em série, proporcionando avaliação de concentrações que variaram de 1000 a 7,81 µg/mL. Na sequência, foram adicionados 100 µL do inóculo das cepas fúngicas em cada poço.

A nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) foi utilizada como controle positivo nos experimentos. Adicionalmente, foi conduzido um controle de viabilidade das cepas e um controle de esterilidade do meio de cultura para garantir a integridade dos ensaios. As placas de microdiluição foram incubadas por 24 horas a 35°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos de forma independente em três ocasiões distintas, assegurando a robustez dos dados. A avaliação dos resultados foi baseada na observação de agregados celulares no fundo dos poços, conforme descrito por Alves et al. (2020).

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) é definida como a menor concentração possível para inibir o crescimento de cepas fúngicas em meio sólido. Alíquotas de 20 µL correspondentes a CIM e duas concentrações múltiplas dessas alíquotas foram subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI1, Kasv Imp e Dist de Prod/Laboratórios LTDA, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas por 24 h a 35°C e a leitura dos resultados consistiu na observação visual do crescimento fúngico no meio de cultura. A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância tem atividade fungistática ($CFM/CIM > 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$) (Siddiqui et al., 2013).

Embasando-se na metodologia proposta por Alves et al. (2020), a partir da qual os autores sugeriram uma classificação com o intuito de verificar o potencial antifúngico de novos compostos que indiquem ação farmacológica contra espécies de *Candida*, foi então determinada a bioatividade dos compostos a partir dos valores do CIM e classificada de acordo com as seguintes categorias: a) bioatividade muito forte ($CIM < 3,515$ µg/ml); b) bioatividade forte (CIM entre 3,515 e 25 µg/ml); c) bioatividade moderada (CIM entre 26 -100 µg/ml); d) bioatividade fraca (CIM de 101 a 500 µg/ml); e) bioatividade muito fraca (CIM na faixa de 501-2000 µg/ml).

b) Ação das moléculas AF, NAM e da associação AF e NAM sobre a parede e membrana celular fúngicas

✓ Ensaio com Ergosterol

A técnica empregada nesta etapa é a mesma da microdiluição, diferindo-se no meio que será acrescido de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 400 µg/mL. Alguns

agentes antifúngicos agem sobre o ergosterol da membrana plasmática, formando complexos ou inibindo a biossíntese da membrana. Assim, o aumento da CIM na presença do ergosterol exógeno indicará uma atividade do agente em estudo sobre a membrana plasmática fúngica (De Sousa *et al.*, 2020). A nistatina foi utilizada como controle positivo, tendo em vista que sua atividade sobre a membrana plasmática já é bem estabelecida na literatura (Alder-Rangel *et al.*, 2020).

✓ Ensaio com Sorbitol

A técnica empregada nesta etapa é a mesma da microdiluição, diferenciando-se no meio, no qual foi acrescido sorbitol 0.8 M (D-sorbitol anidro) (INLAB, São Paulo, Brasil). Este é um protetor osmótico que atua na parede celular fúngica, assim, esse teste será responsável por comparar valores da CIM da substância em estudo na ausência e presença do sorbitol 0.8 M. O aumento do valor da CIM na presença do sorbitol indicará a parede celular como um dos possíveis alvos da substância em estudo. A caspofungina foi utilizada como controle positivo, devido à sua ação já conhecida sobre a parede celular (De Sousa *et al.*, 2020).

c) Cinética de crescimento e de morte antifúngica das moléculas AF, NAM e da associação AF e NAM em *Cândida albicans* ATCC 60193

Curvas de crescimento foram utilizadas para análise do tempo mínimo necessário para o início do crescimento microbiano. Em uma placa de microdiluição de 96 poços de fundo plano foi adicionado a cada poço o meio de cultura (RPMI) seguido das substâncias testes em concentrações correspondentes a CIM e CIMx2. Logo depois, 100 µL de inóculos de levedura das cepas de *Candida* foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 24 h a 35°C em leitor de microplacas (BIOTEK-EON) e os valores de absorbância foram lidos a 530 nm a cada hora. A nistatina foi utilizada como controle positivo nos ensaios. Também foi feito o controle de crescimento da cepa.

d) Avaliação do índice de concentração inibitória fracionada (método *checkerboard*) do AF, NAM e da associação AFe NAM combinados a nistatina em *Cândida albicans* ATCC 60193

O efeito de associação das substâncias AF, NAM e a mistura AF e NAM com o antifúngico padrão (nistatina) foi determinado a partir do método *Checkerboard* para derivação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Foram utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM's. Inicialmente, 50 µL de RPMI foram adicionados aos poços da microplaca esterilizada contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U" (ALAMAR®). Em seguida, 25 µL das substâncias testes foram adicionadas aos poços, no sentido horizontal e vertical (Nistatina) da microplaca, em concentrações variadas partindo das suas CIM's. Dessa forma, para as substâncias foram testadas concentrações correspondentes à sua CIM÷8, CIM÷4, CIM÷2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8. Finalmente, foram adicionados 100 µL do inóculo de *Candida*. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 24 h. O ICIF foi calculado através da soma da Concentração Inibitória Fracionada do produto teste (CIFa) com a Concentração Inibitória Fracionada do antifúngico padrão (CIFb). A CIFa, por sua vez, foi calculada através da relação CIMa combinada/CIMa isolada, enquanto a CIFb foi

calculada por meio da CIMb combinada/ CIMb isolada. O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (ICIF 0,5), antagonismo (ICIF > 4,0) e indiferença ($0,5 < \text{ICIF} < 4$) (57,58).

e) Concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do AF, da NAM e da associação AF e NAM

As bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB), constituído por: extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g, solubilizados em 1L de água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos. Para a obtenção do meio de cultura sólido, adicionou-se ágar 1,5 %.

As bactérias dos testes *in vitro* antibacteriano foram inoculadas em meio contendo peptonas e leveduras como fonte de nutrientes e incubadas a 37°C durante 24 h. Foram suspensas em água peptonada + leveduras e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo $1-5 \times 10^8$ UFC/mL (Roy, 1991; Hadacek e Greger, 2000).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias-teste foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços com fundo em formato de "U", conforme descrito por Gerhardt et al. (1994). Cada cepa microbiana testada foi analisada individualmente. O procedimento consistiu nos seguintes passos:

- Preparação da Placa: Inicialmente, os poços das microplacas foram preenchidos com 80 µL de Caldo Müller-Hinton (CMH).
- Adição das Soluções das Substâncias-Teste: Em seguida, 100 µL das soluções das substâncias-teste foram adicionados ao primeiro poço de cada linha. A partir deste, foram realizadas diluições seriadas em base 2 para obtenção de concentrações que variaram de 1000 µg/mL a 7,8 µg/mL.
- Inoculação dos Micro-organismos: Após a diluição das substâncias-teste, foram adicionados 20 µL das suspensões padronizadas dos micro-organismos (concentração ajustada em 0,5 na escala de McFarland) a cada poço, com exceção dos poços reservados para controles.

Os controles utilizados foram controle branco: poços contendo apenas CMH, sem substâncias-teste ou micro-organismos, para verificar a esterilidade do meio; controle positivo: poços com micro-organismos e antibióticos padrão, para garantir que as condições do experimento permitiam o crescimento e inibição bacteriana adequados; controle de crescimento: poços contendo apenas os micro-organismos em CMH, sem substâncias-teste, para verificar o crescimento bacteriano normal; controle de esterilidade: poços contendo as substâncias-teste em CMH, sem micro-organismos, para verificar a ausência de contaminação; controle de cor: utilizado para verificar a interferência de coloração das substâncias-teste nos resultados e controle negativo/solvente: incluindo o solvente utilizado na preparação das substâncias-teste, para assegurar que ele não interferia no crescimento bacteriano.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e após esse período cada microplaca foi avaliada sob três parâmetros diferentes: a) leitura visual do crescimento bacteriano; b) leitura espectrofotométrica em 590 nm; c) adição de 50 µL de uma solução de resazurina (5 µg/mL - Sigma), utilizada como indicador de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que em cada microplaca foram testadas duas substâncias-teste em triplicata.

A resazurina (fenoxazin-3-ona) é um corante indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Na sua forma oxidada, apresenta coloração azul e na forma reduzida, cor rosa. Foram pipetados 50 µL de solução de resazurina, na concentração de 5 µg/mL, nos poços das microplacas, que foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas ou até que ocorresse mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos poços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o aparecimento da cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da substância teste sem a mudança de coloração para rosa (Palomino *et al.*, 2002). Foto da reação resazurina.

Antes da adição do indicador resazurina nas microplacas para a leitura do ensaio de microdiluição, uma alíquota dos poços em que não se observou o crescimento bacteriano foi semeada em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (AMH), e incubadas durante 24 h a 37°C. Após esse período, foram observados os pontos onde ocorreram crescimento microbiano, para a determinação da CBM, que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura (Saga e Yamaguchi, 2009). Nos casos em que as concentrações testadas apresentaram crescimento bacteriano, foi determinado o efeito do antimicrobiano bacteriostático para a linhagem testada.

4.4. Ensaio com eritrócitos humanos com AF

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram obtidos a partir de coleta de sangue total em tubo de EDTA de voluntários (alunos do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande, PATOS – PB). A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade.

Avaliação do potencial hemolítico

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

Avaliação do efeito sobre a fragilidade osmótica

A avaliação do efeito sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. Soluções de cafeato de butila e pentila em diferentes concentrações foram incubadas em tubos contendo 2 ml de uma suspensão de eritrócitos por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este

tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em soluções hipotônicas de cloreto de sódio (0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 e 0,96%) e agitadas a 100 rpm, por uma hora a 22±2 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Dacie, 2001).

4.5. Determinação do fator de proteção solar (fps) do AF e da NAM

Para a determinação do fator de proteção solar (FPS), utilizou-se o método espectrofotométrico de amostras em solução adaptado por Mansur. O método propõe análise das soluções contendo substâncias testes que deverão ter concentração final de 3 mL, com as amostras sendo diluídas em etanol. Para tanto, as frações são previamente solubilizadas em água deionizada, levadas ao vortex e, posteriormente diluídas em solução alcoólica (Álcool etílico PA). As soluções foram submetidas à leitura de suas absorbâncias, utilizando cubetas de quartzo em espectrofotômetro na faixa do UV (290 a 320 nm), sendo feitas as leituras de 5 em 5nm. Em seguida, os valores de absorbância obtidos foram substituídos na equação adaptada por Mansur e colaboradores (1986), que relaciona produto entre o efeito eritematígeno (EE) e a intensidade da radiação (I), que é constante em cada comprimento de onda. Os testes foram feitos em triplicatas. Equação matemática utilizada no método de Mansur (Mansur *et al.*, 1986).

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde: FC = fator de correção (= 10);

EE(λ) = efeito eritematígeno da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

I(λ) = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

Abs(λ) = leitura da absorbância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

4.6. Análises *in silico*:

Foram utilizados os softwares Molinspiration e do admetSAR para prever propriedades farmacológicas, toxicológicas e ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) de produtos químicos. Os softwares estão disponíveis em: www.molinspiration.com e <http://lmmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>.

4.7. Análise estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e os resultados expressos como índices específicos, média mais ou menos o erro padrão da média ou desvio padrão, de acordo com a metodologia utilizada. As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Bonferroni. As variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Dunnet. As variáveis indicadas como

índices ou percentuais foram analisadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados pelo programa *Graphpad Prism*® versão 7.3 (*Graphpad software inc.*, USA).

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram organizados no formato de artigos científicos, com o objetivo de adequar a divulgação dos achados à prática científica internacional. Tal formato visa atender às normas de publicação adotadas por revistas científicas da área, proporcionando uma estrutura clara e objetiva, assim favorecendo a disseminação dos dados obtidos para a comunidade científica.

O formato dos artigos segue uma divisão clássica, com introdução, onde são descritos o contexto do estudo e os objetivos; metodologia, detalhando os procedimentos experimentais; resultados e discussão, onde são apresentadas as principais descobertas e a interpretação dos dados; e, por fim, conclusões, que sintetizam os principais achados e suas implicações científicas e práticas.

Essa abordagem facilita a transposição dos dados da tese promovendo a integração dos resultados do presente estudo com os avanços da literatura científica.

bioensaios

Antimicrobial effect of ferulic acid: an integrative review of bioassays

Efecto antimicrobiano del ácido ferúlico: una revisión integradora de bioensayos

Mayara Karla dos Santos Nunes¹, José Venâncio Chaves Júnior¹, Fábio Santos de Souza¹, Patrícia Neris Andrade¹, Ricardo Dias de Castro¹, Hilzeth de Luna Freire Pessoa¹, Rita de Cássia da Silveira e Sá¹.

RESUMO

Objetivo: Identificar na literatura científica ensaios biológicos, *in vitro*, sobre a ação antimicrobiana do ácido ferúlico (FA). **Métodos:** O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura, especialmente na base de dados PUBMED. Optou-se por realizar um estudo no período dos últimos 5 anos por conta das atualizações sobre a temática abordada. **Resultados:** Foram identificados um total de 682 nas base de dados, perfazendo uma amostra final de 09 trabalhos para a construção deste artigo. Atualmente as pesquisas no campo desenvolvimento de novos antimicrobianos com FA estão voltados a área de biomateriais. Sabe-se que o biomaterial que vem sendo mais utilizado nos estudos é a quitosana. Nesta revisão, 66,6% dos artigos selecionados contemplaram o uso de biofilmes e conjugados de FA e quitosana. As análises microbiológicas incluíram testes de concentração inibitória mínima e bactericida mínima. Foi possível verificar que o FA quando associado a quitosana apresenta melhor ação frente às cepas microbianas testadas. **Considerações finais:** o FA conjugado com a quitosana mostrou potenciais perspectivas de aplicação. No entanto, se faz necessário, mais pesquisas no âmbito multidisciplinar para o desenvolvimento de antimicrobianos e antibacterianos, que atualmente, são uma ameaça crescente à saúde global.

Palavras-chave: Ácido Ferúlico, Atividade Antimicrobiana, Biomateriais.

ABSTRACT

Objective: Identify in the scientific literature biological tests, *in vitro*, on the antimicrobial action of ferulic acid (FA). **Methods:** The present study is an integrative review of the literature, especially in the PUBMED database. It was decided to carry out a study over the last 5 years due to updates on the topic covered. **Results:** A total of 682 were identified in the databases, making a final sample of 09 works for the construction of this article. Currently, research in the field of developing new antimicrobials with FA is focused on the area of biomaterials. It is known that the biomaterial that has been most used in studies is chitosan. In this review, 66.6% of the selected articles included the use of biofilms and FA and chitosan conjugates. Microbiological analyzes included minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal tests. It was possible to verify that FA, when associated with chitosan, presents better action against the microbial strains tested. **Final considerations:** FA combined with chitosan showed potential application prospects. However, more multidisciplinary research is needed for the development of antimicrobials and antibacterials, which are currently a growing threat to global health.

Keywords: Ferulic Acid, Antimicrobial Activity, Biomaterials.

¹ Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa – PB.

RESUMEN

Objetivo: Identificar en la literatura científica pruebas biológicas, in vitro, sobre la acción antimicrobiana del ácido ferúlico (FA). **Métodos:** El presente estudio es una revisión integradora de la literatura, especialmente en la base de datos PUBMED. Se decidió realizar un estudio en los últimos 5 años debido a las actualizaciones en el tema tratado. **Resultados:** Se identificaron en las bases de datos un total de 682, conformando una muestra final de 09 obras para la construcción de este artículo. Actualmente, la investigación en el campo del desarrollo de nuevos antimicrobianos con FA se centra en el área de los biomateriales. Se sabe que el biomaterial que más se ha utilizado en estudios es el quitosano. En esta revisión, el 66,6% de los artículos seleccionados incluyeron el uso de biopelículas y conjugados de FA y quitosano. Los análisis microbiológicos incluyeron pruebas de concentración mínima inhibitoria y pruebas bactericidas mínimas. Se pudo verificar que la FA, cuando se asocia con quitosano, presenta mejor acción contra las cepas microbianas probadas. **Final Considerations:** Los FA combinados con quitosano mostraron perspectivas potenciales de aplicación. Sin embargo, se necesita más investigación multidisciplinaria para el desarrollo de antimicrobianos y antibacterianos, que actualmente representan una amenaza creciente para la salud mundial.

Palabras clave: Ácido Ferúlico, Actividad Antimicrobiana, Biomateriales.

INTRODUÇÃO

Os compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos, são um grupo de substâncias presentes na natureza em diversos vegetais, frutas e bebidas. Esses compostos são considerados metabólitos secundários produzidos em plantas com objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos, além de possuírem valores nutricionais e farmacológicos importantes para saúde humana. Na maioria, são potentes agentes antioxidantes e por isso têm sido um grande alvo de pesquisas científicas. Devido, principalmente, aos efeitos biofarmacológicos estudados em várias doenças, como no câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, entre outras (ANAND S, et al., 2022).

O ácido ferúlico (FA) ((E) -3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) ácido prop-2-enóico) é um derivado hidrocínâmico do ácido fenólico. Este é encontrado, assim como outros ácidos, em plantas como a *Angelica sinensis*, *Climinifuga recemosa* e *Ligusticum chuangxiong*, também é encontrado em algumas frutas como tomate e laranja e em maior concentração em cereais como trigo e milho. É isolado largamente dessas fontes por meios enzimáticos a fim de sua aplicação na indústria farmacêutica e alimentar principalmente por ser de um baixo custo (KACZMAREK-SZCZEPAŃSKA B, et al., 2021; RAJ ND e SINGH D, 2022).

O FA pode ser visto como um monômero, dímero, oligômero livre ou polímeros constituintes, ligados covalentemente por ligações ésteres com polissacarídeos, poliaminas e glicoproteínas e como éter ligado à lignina. Possui isomeria *cis/trans* que apresentam aspectos que se diferenciam entre si: o *cis* é um líquido oleoso amarelo e o *trans* um cristal branco e o mesmo corresponde a 90% da sua ocorrência na natureza (DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R, 2017).

Ralata-se que o FA apresenta baixa solubilidade em meios aquosos. Quando administrado via oral não é degradado pelo estômago e a maior parte do fitoquímico é absorvido por difusão passiva no cólon. Estudos já mostraram que a biodisponibilidade após ingestão oral representou 20% na sua forma inalterada, com picos de concentração plasmática em torno de 30 minutos, sendo excretado na urina na forma inalterada e glicosilada. No entanto, sua toxicidade oral é baixa apresentando LD50 de 2,1 e 2,4 g/kg em ratos fêmeas e machos, respectivamente (LI D, et al., 2021; ANAND S, et al., 2022).

Como um bom composto fenólico o FA e seus análogos são substâncias bioativas com múltiplas funções (ANAND S, et al., 2022). Seu alto poder antioxidante deve-se a eficiente capacidade de sequestrar radicais livres graças aos grupos hidroxila presente em sua estrutura que doam um elétron para o radical livre. A neutralização dos radicais livres é importante pois esses são instáveis e interações com macromoléculas como lipídeos e proteínas, pode levar à peroxidação lipídica acelerando a degradação oxidativa e gerar inflamação, entre outros malefícios à saúde humana (ZDUŃSKA K, et al., 2018). Entre os antioxidantes

mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente C e E, e os polifenóis. Em estudos realizados *in vitro*, muitos compostos polifenólicos naturais parecem ser melhores antioxidantes que as vitaminas C e E, além de terem a capacidade de quelar metais, especialmente cobre e ferro, atuando indiretamente como antioxidantes já que inibem a ação desses metais como catalisadores na formação de radicais livres (DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R, 2017).

Não só o FA, mas os seus derivados, principalmente os compostos sintetizados por reações de esterificação, têm alta da atividade antioxidante como, por exemplo, ferulatos de alquila, hexil, octil e 2-etil-1-hexil. Assim como a substância de partida, seus compostos relacionados inibiram a peroxidação lipídica. Esse potencial antioxidante do FA se relaciona com outras atividades como protetor de doenças cardiovasculares e neuroprotetoras, pois depende das células as quais estão sendo afetadas pelos radicais livres (DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R, 2017).

São várias as atividades citadas na literatura para o FA e algumas com possíveis mecanismos de ação abordados. Em ratos hipertensivos, o FA (50 mg/kg) foi capaz de atenuar a inflamação cardíaca e renal ao aumentar os níveis das enzimas superóxido dismutase e catalase, responsáveis pela neutralização de radicais livres (ALAM MdA, et al., 2013). São considerados também bons anti-inflamatórios (ANAND S, et al., 2022). Em modelo experimental de depressão, inibiu a ativação da microglia, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, a sinalização de NF- κ B e diminuiu o inflamassoma NLRP3, sugerindo que o mecanismo relacionado à ação anti-inflamatória estava envolvido com os efeitos semelhantes aos de antidepressivos em camundongos estressados. Protege eficazmente o organismo contra o estresse oxidativo induzido pelo álcool e por dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados (RUKKUMANI R, et al., 2004).

Devido sua estrutura química apresentar várias insaturações, o FA é um potencial absorvedor da luz ultravioleta (UV) que contribui para seu potencial antioxidante contra danos oxidativos às células, gerados pela radiação da luz UV (DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R, 2017). Assim, também pode ser aproveitado seu potencial uso em cosméticos na proteção solar como já acontece em outros tipos de formulações cosméticas de FA que são comercializadas (TEE-NGAM P, et al., 2013). Foi descoberto que houve o dobro de fotoproteção com os isômeros *trans* de FA em uma formulação na concentração de 0,5% ao reduzir eritemas e queimaduras solares em porcos (LIN FH, et al., 2005).

Todavia, apresenta atividade antioxidante mais elevada quando encapsulada em etossomas, que são esferas microscópicas de fosfolipídios, nanocarregadoras, atóxicas, biodegradáveis e podem ser modulados para encapsular substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (ALMEIDA MGC, 2018). Foi relatado que a ação sinérgica de microesferas de sílica carregadas com FA e conjugados a fibrina/quitosana/queratina melhorou o crescimento e a fixação celular e, consequentemente a cicatrização de feridas *in vitro*.

Outro aspecto que se pode destacar é o potencial antibacteriano dos ácidos fenólicos e seus metabólitos secundários contra cepas de bactérias gram-negativas e gram-positivas. A atividade antibacteriana tem sido atribuída à sua natureza hidrofóbica, o que aumenta seu potencial de permeabilidade e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS); ou seja, a atividade pró-oxidante que o ácido ferúlico também apresenta o torna um bom candidato antibacteriano (MAURYA DK e DEVASAGAYAM TPA, 2010; BORGES A, et al., 2013; DASAGRANDEHI C, et al., 2018; IBITOYE OB e AJIBOYE TO, 2019; STOMPOR-GORĄCY M e MACHACZKA M, 2021).

O FA exerceu efeitos inibitórios no biofilme de *Salmonella Enteritidis* pela diminuição da expressão dos genes relacionados à motilidade dos flagelos e pela interferência do ácido fenólico nas proteínas de montagem dos flagelos; além de apresentar ação antibiofilme em condições simuladas de processamento de alimentos, possibilitando aplicações na indústria alimentícia (XU JG, et al., 2022). Similarmente apresentou atividade antimicrobiana imediata e sustentada contra *Cronobacter sakazakii*, patógeno oportunista transmitido por alimentos que afeta recém-nascidos, bebês e adultos imunocomprometidos. Promoveu alterações na integridade da membrana do microorganismo, reduziu o pH intracelular e hiperpolarização da membrana, causando consequentemente disfunção da membrana celular e alterações na morfologia celular (SHI C, et al., 2016). Do ponto de vista médico, o ácido ferúlico impõe um papel importante nas estruturas e propriedades das enzimas digestivas, como a pepsina; portanto, pode ser um

ingrediente importante em formulações de produtos alimentícios para fins médicos especiais (STOMPOR-GORĄCY M e MACHACZKA M, 2021; RAJ ND e SINGH D, 2022).

O oxigênio é essencial para a produção de energia do metabolismo celular, ao menor consumo é reduzido e produz as espécies reativas de oxigênio. Entre todos os radicais livres gerados em organismos vivos, as ROS representam a classe mais importante (MAURYA DK e DEVASAGAYAM TPA, 2010). Devido ao papel ROS na ação antibacteriana de compostos à base de plantas, levantamos a hipótese de que o FA pode apresentar uma atividade antimicrobiana efetiva. Este estudo possui o objetivo de identificar na literatura científica ensaios biológicos, *in vitro*, sobre a ação antimicrobiana do FA.

MÉTODOS

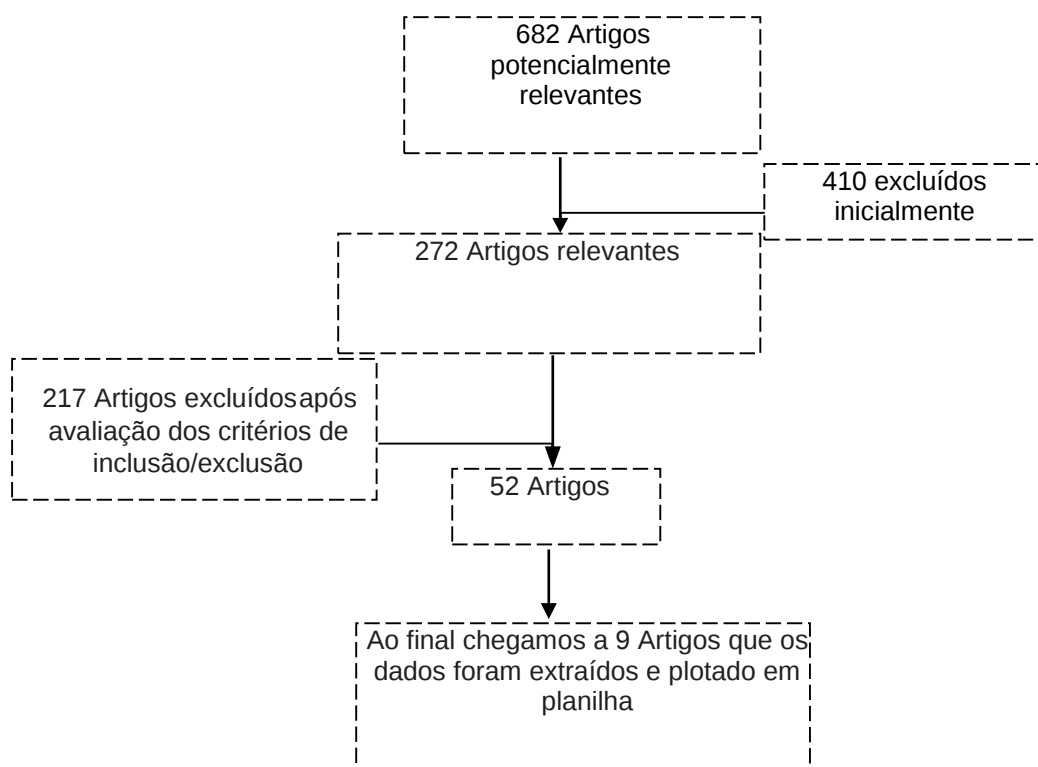
O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura, contendo avaliação de artigos científicos em que se buscou resultados de pesquisas originais, básica e que utilizaram de metodologias *in vitro*. Para a execução foi utilizado a questão norteadora: O Ácido Ferúlico apresenta atividade antimicrobiana efetiva? A pesquisa bibliográfica foi realizada no primeiro semestre de 2023, sendo realizada buscas na base de dados PUBMED, utilizando os descritores: (1) ferulic acid, (2) antimicrobial activity, usando-se entre eles o operador booleano “AND”.

Os critérios de inclusão aplicados foram: estudos de pesquisas originais com análises *in vitro*, texto completo disponível gratuitamente na base de dados, idioma inglês e publicados nos últimos 5 anos, conforme o período estabelecido: de primeiro trimestre de 2018 a primeiro trimestre de 2023. E como critérios de exclusão aplicou-se: artigos de revisão, artigos que não estejam disponíveis gratuitamente na íntegra, publicados em outros idiomas, fora do período requisitado, estudos duplicados, estudos com derivados da molécula de ácido ferúlico, estudos *in silico* e que não atendessem ao tema proposto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após busca na base de dados PUBMED, foram localizados 682 artigos. Destes foram excluídos 410 artigos por ultrapassarem o tempo delimitado; 3 por não estarem na língua inglesa, 217 por não tratarem da molécula ácido ferúlico, mas de derivados da substância, e artigos que não atenderam aos critérios de elegibilidade. Foram selecionados 52 artigos para leitura na íntegra, com amostra final de 9 artigos, esquematizados no fluxograma da **Figura 1**.

Figura 1. Fluxograma de seleção dos artigos a partir da base de dados PUBMED



Fonte: Nunes MKS, et al., 2024.

A **Tabela 1** apresenta de maneira resumida os dados extraídos dos artigos incluídos na amostra final, contendo: os autores e ano de publicação, objetivos, métodos, microorganismos testados, e conclusões relativas à ação antimicrobiana.

Com a análise dos estudos selecionados foi possível ter uma visão sobre as pesquisas realizadas nos últimos cinco anos com a molécula de ácido ferúlico para avaliação da atividade microbiológica. Observamos que a análise combinada do ácido ferúlico incorporado à biomateriais, em especial, a quitosana têm sido o foco das investigações científicas. Neste cenário, foi possível identificar que 66,6% das publicações encontradas reportaram a atividade antimicrobiana do ácido ferúlico conjugado à biofilmes de quitosana.

Apesar dos méritos farmacológicos do FA, suas características hidrofílicas limitam sua aplicabilidade na indústria farmacêutica devido à sua baixa estabilidade e baixa biodisponibilidade e, conseqüentemente, dificultam sua implementação na clínica, o que limita seu potencial terapêutico ao ser administrado por via oral. Supõe-se que este é um dos motivos pelo qual os pesquisadores têm empenhado esforços para o desenvolvimento de novas estratégias tecnológicas para aprimorar essa problemática. Uma das abordagens propostas para superar os problemas acima mencionados foi verificada, no uso de formulações à base de FA em carreadores nanoparticulados, como por exemplo nanoemulsões ou combinados com outros métodos como com a luz ultravioleta (UV-C), e também associado à substâncias que possam melhorar a solubilidade (DE OLIVEIRA EF, et al., 2021).

Tabela 1. Síntese dos artigos selecionados para esta revisão integrativa.

N	Autor e Ano	Objetivos	Métodos	Microorganismos	Conclusões
1	Dasagrandhi, et al., 2018	Investigar o potencial antibacteriano e antibiofilme da quitosana enxertada com ácido ferúlico	CIM, CBM, microdiluição em caldo e quantificação de materiais citoplasmáticos liberados da célula, atividade antibiofilme	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Ácido ferúlico conjugado apresentou atividade bactericida contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , enquanto que para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> apresentou atividade bacteriostática. O modo de ação antimicrobiana foi devido à atividade de dano à membrana celular, confirmada estrutural e funcionalmente. O Ácido ferúlico conjugado também mostrou propriedades inibidoras de biofilme para as bactérias de maneira dose-dependente.
2	Pattnaik, et al., 2018	Comparar o potencial antiplacoma e antibiofilme de nanopartículas de tripolifosfato de quitosana encapsuladas com ácido ferúlico (FANPs) com molécula isolada de ácido ferúlico contra <i>P. aeruginosa</i> PAO1	CIM, Ensaio de inibição da piocianina, Atividade estafilolítica de LasA, Análise da curva de crescimento, Ensaio antimotilidade, atividade anti-biofilme	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	As nanopartículas de tripolifosfato de quitosana encapsuladas com ácido ferúlico apresentaram eficácia de atenuação significativamente maior do que a molécula ácido ferúlico sozinha, sugerindo o papel de um sistema nanocarreador biocompatível para o direcionamento eficaz da virulência com liberação lenta e controlada de drogas encapsuladas.
3	Kot, et al., 2019	Avaliar a atividade antimicrobiana: trans -cinamaldeído, ácido ferúlico, ácido p -cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico, óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Melaleuca alternifolia</i> contra espécies patogênicas de <i>Aeromonas</i> isoladas de peixes	CIM e CBM	Dezesseis cepas pertencentes ao gênero <i>Aeromonas</i> , espécies: <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> , <i>Aeromonas sobria</i> .	Resultados indicam que todos os fitoquímicos utilizados apresentaram efeito inibitório contra três espécies de <i>Aeromonas</i> que podem ser patogênicas aos peixes, o que indica a possibilidade de seu uso como agentes antibacterianos ecologicamente corretos para prevenir e controlar <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>s. salmonicida</i> e <i>A. sobria</i> na aquicultura.
4	Pernin, et al., 2019	Avaliar a capacidade do ácido ferúlico e eugenol de inibir o crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em um sistema alimentar complexo realista, ou seja, uma emulsão de óleo em água.	CIM e concentração não inibitória	<i>Listeria monocytogenes</i>	Emulsificantes, como proteínas de soro de leite e Tween 80, têm um impacto negativo na atividade antimicrobiana do eugenol. A CIM do ácido ferúlico foi menos afetada pela adição de Tween 80. E em pH 5,5 é um antimicrobiano eficiente em baixas concentrações em tais sistemas, provavelmente porque é menos hidrofóbico.
5	Zhang, et al., 2019	Avaliar as propriedades antibacterianas de compostos fenólicos (ácido ferúlico, p-ácido cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico, (-)-epigallocatequina e fletina) isolados e para tratamentos de combinação binária. em <i>S. maltophilia</i>	CIM e checkerboard	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	As atividades antibacterianas dos polifenóis foram dependentes da estrutura, e o ácido cinâmico apresentou fortes efeitos inibitórios. É importante ressaltar que não observamos nenhum efeito sinérgico óbvio em todas as combinações binárias. O mecanismo antibacteriano foi relacionado ao dano à membrana, causado pela perda da integridade da membrana celular e alteração da morfologia celular.

6	Aragón-Gutiérrez, et al., 2020	Desenvolver filmes bioativos à base de copolímero de etileno álcool vinílico que inibam o crescimento microbiano e forneçam proteção contra a oxidação em produtos alimentícios por meio da incorporação de baixas quantidades de ácido ferúlico	método padrão JIS Z 2801	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	A atividade antioxidante significativa de todos os filmes ativos expostos a dois simuladores de alimentos, indicando que FA conservou seu bem as propriedades antioxidantes. As amostras de EVOH-FA apresentaram atividade antibacteriana <i>in vitro</i> contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , mostrando assim o potencial do ácido ferúlico como composto bioativo a ser utilizado no processamento de extrusão para aplicações de embalagens ativas.
7	Kaczmarek-Szczepańska, et al., 2021	Avaliar e determinar a influência da luz UVC nas propriedades de filmes à base de quitosana modificada por diferentes ácidos fenólicos: ferúlico, cafeico e tânico.	Método de diluição em caldo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	A adição de ácidos fenólicos melhora as propriedades físico-químicas dos filmes à base de quitosana e apresentam melhor atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Confirmamos que a esterilização de filmes de quitosana/ácidos fenólicos pela exposição à luz UVC é eficaz. Foram comparadas as propriedades físico-químicas dos materiais antes e depois da exposição, bem como sua atividade antimicrobiana. A quitosana composta com ácido ferúlico apresentou as propriedades mais adequadas para embalagens de alimentos.
8	Sivakumar, et al., 2021	Avaliar a ação sinérgica da queratina, quitosana e fibrina juntamente com o ácido ferúlico no processo de cicatrização de feridas.	Método de diluição em caldo	<i>Streptococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	A liberação controlada de ácido ferúlico por 3 dias e os resultados do estudo antimicrobiano mostraram que o biomaterial desenvolvido pode ser usado como curativo para feridas crônicas infectadas. O ensaio de cicatrização de feridas <i>in vitro</i> provou a ação sinérgica dos três componentes e foi confirmada por meio deste estudo, novas investigações nessa linha podem ser realizadas.
9	Anand, et al., 2022	Preparar e avaliar nanofibras híbridas à base de seda-sericina com diferentes proporções de policaprolactona e acetato de celulose carregados com ácido ferúlico para úlcera de pé diabético.	Método de Difusão em Disco de Ágar, Ensaio de Time Kill, atividade antibiofilme	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Os estudos antimicrobianos mostraram que as nanofibras preparadas possuíam boas atividades antimicrobianas e antibiofilme contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Com base nesses resultados, concluímos que a formulação de nanofibras desenvolvida teve excelentes propriedades de cicatrização de feridas em ratos induzidos por diabetes.

Fonte: Nunes MKS, et al., 2024.

Legenda: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima.

Este levantamento bibliográfico destaca-se por ser um tema atual, oportuno e que aumenta as expectativas em torno de substâncias naturais, como os ácidos fenólicos, que podem ser úteis no uso contra bactérias e fungos patógenos. Constatou-se que nos trabalhos os microorganismos estudados foram bactérias gram positivas, mas em sua maioria, gram negativas, principalmente as patogênicas humanas (*Pseudomonas aeruginosa*, as do gênero *Aeromonas*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Escherichia coli*).

Em relação aos testes escolhidos pelos autores para a realização da atividade antimicrobiana, foi possível verificar que a técnica mais utilizada foi a de concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração mais baixa que um agente antimicrobiano pode inibir completamente o crescimento dos microrganismos; é o método de diluição que possibilita estimar a concentração do microrganismo testado, através de macro ou microdiluição. Além disso, também foi possível saber a concentração bactericida mínima (CBM) que é uma estimativa da atividade bactericida, definida pela menor concentração de agente antimicrobiano necessário para matar 99,9% do inóculo final após 24 horas de incubação (BRIXNER B, et al., 2022).

Já observado a atividade antimicrobiana e anti-biofilme de 11 compostos fenilpropanóides e aldeídos fenólicos, incluindo ácido ferúlico, contra isolados de *S. aureus* resistentes a medicamentos onde houve diminuição da expressão de genes associados à formação de biofilme em comparação com o isolado resistente não tratado (MASTOOR S, et al., 2022). O FA também possui efeitos antivirais *in vitro* contra parvovírus suíno em células renais, pela diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos, de ROS mitocondrial, por aumentar, consequentemente, a viabilidade celular (MA X, et al., 2020).

O FA demonstrou ser útil como conservante natural em alimentos, inibiu significativamente a adesão de *S. flexneri* e a formação de biofilme, alterou drasticamente a expressão de genes associados a formação de biofilme, como genes de adesão, de regulação transcricional e de síntese e transporte de substâncias poliméricas extracelulares (KANG J, et al., 2020).

Atualmente, no cenário mundial, uma das maiores preocupações da saúde pública é o surgimento de agentes resistentes aos antimicrobianos; seja pelo uso indiscriminado de antibiótico ou por mutações genéticas. Cepas bacterianas resistentes continuam a aparecer e se espalhar, dado que a resistência antimicrobiana é um desafio multifacetado e em evolução o que desperta interesse em desenvolver novos biomateriais antimicrobianos eficazes (QIN Y e LI P, 2020; BRIXNER B, et al., 2022).

Como encontrado em nossa busca bibliográfica, a quitosana é um dos polímeros naturais que vem sendo amplamente utilizado na produção de novos biomateriais. Possui biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, não antigenicidade e suas diversas propriedades biológicas, tais como a atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, etc (DASAGRANDE C, et al., 2018; QIN Y e LI P, 2020; BRIXNER B, et al., 2022). O conjugado quitosana-FA teve efeito antibacteriano sinérgico com o antibiótico oxacilina contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) via inibição da expressão do gene *mecA* e a produção de PBP2a, que é uma determinante chave para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos, de maneira dose-dependente (EOM SH, et al., 2016).

A atividade antioxidante de conjugados quitosana-ácido hidroxicinâmico, ácido ferúlico, foi melhor do que a quitosana sem o ácido. O conjugado quitosana-ácido ferúlico inibiram significativamente a peroxidação lipídica no sistema de emulsão de ácido linoléico. Considera-se que, conjugados quitosana-ácido hidroxicinâmico podem ser úteis em aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica (ARAGÓN-GUTIÉRREZ A, et al., 2020). Em materiais fibrosos de ϵ -caprolactona e quitosana incorporados com AF exibiram boa atividade antioxidante. As fibras com quitosana e FA exibiram ação antibacteriana principalmente contra *S. aureus*. e vantajoso efeito antitumoral contra células tumorais cervicais humanas HeLa pela indução de apoptose nas células tumorais (YAKUB G, et al., 2019).

Sugere-se que o efeito antimicrobiano encontrado do AF nos estudos selecionados deve-se às alterações das propriedades da membrana (seja na carga, na permeabilidade intra ou extracelular e propriedades físico-químicas), alterações de hidrofobicidade, diminuição da carga superficial negativa

e ocorrência de ruptura local ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de substâncias intracelulares essenciais (BORGES A, et al., 2013). Vale ressaltar que, com este estudo, podemos enfatizar o potencial do FA como fonte natural de novos produtos antimicrobianos de amplo espectro e conjugado a novos biomateriais.

Membranas bacterianas compostas de celulose-quitosana enxertadas com ácido ferúlico podem encontrar aplicações na indústria alimentícia como material de embalagem para prolongar a vida útil dos alimentos e como materiais de curativo para feridas (HERNÁNDEZ-GARCÍA E, et al., 2022). Recentemente, outros biomateriais contendo FA foram relatados na literatura, como, por exemplo, a utilização de partículas de sílica nanoporosas ocas como transportadores de FA parecer ser promissor para liberação controlada deste na distribuição de medicamentos (YAMAGUCHI T, et al., 2023).

Filmes de poli (álcool vinílico) e poli (ácido láctico) com carvacrol e FA foram eficazes no controle do crescimento microbiano da carne bovina durante o armazenamento refrigerado e apresentaram funcionalidade adequada para fins de embalagem de alimentos e promoveram com sucesso a preservação da carne e à longo prazo (ANDRADE J, et al., 2022). Em animais de corte, como frango Tianfu desafiados com lipopolissacarídeo (LPS), a suplementação com FA preservou os níveis secretórios de imunoglobulina A (IgA), aumentou a expressão proteínas intestinais de junção estreita, Claudina-1 (CLDN-1) e Ocludina (OLDN), aumentou a proliferação epitelial na mucosa ileal e corrigiu os distúrbios da microflora ileal; ou seja, melhorou a função intestinal e a microflora em frangos pelo aumento da capacidade antioxidante e mantendo a integridade intestinal (TANG Z, et al., 2023).

A contaminação microbiana é um problema grave que diminui a qualidade dos alimentos e o FA apresenta-se como um composto natural promissor com ação antimicrobiana. Reforçando o que foi dito inicialmente, o FA é um bom absorvedor de luz UV e a combinação da exposição à luz com ácidos fenólicos aumenta a qualidade alimentar, se mostra como uma tecnologia de desinfecção promissora para aplicações na agricultura e no processamento de alimentos (DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R, 2017; KACZMAREK-SZCZEPAŃSKA B, et al., 2021). A combinação de FA com UV-A apresentou ação antifúngica associado à alterações nas funções celulares de *Saccharomyces cerevisiae* por induzir o aumento de modificações oxidativas de proteínas citosólicas, desencadeando assim a inativação de células de levedura (SHIRAI A, et al., 2022).

Nanocápsulas de etilcelulose contendo AF foram capazes de prevenir, tratar e reverter danos oxidativos e nitrosativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, bem como melhorar a biodisponibilidade e reduzir possíveis efeitos indesejáveis; incluindo resultados superiores na atividade antioxidante tornando possível a sua aplicação na prevenção, tratamento e reversão de doenças neurodegenerativas e associadas ao envelhecimento, síndromes metabólicas e processos inflamatórios (RAMPELOTTO CR, et al., 2022). Nanocápsulas poliméricas e lipídicas de FA apresentaram propriedades anticancerígena em linhagens celulares de câncer colorretal por regular genes apoptótico/anti-apoptótico BAX/Bcl-2; além de exibirem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias significativas (EL-GOGARY RI, et al., 2022). O ácido p-cumárico e o FA inibiram a proliferação de células cancerígenas colorretais por meio da regulação negativa do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico humano EGFR, semelhantes ao comportamento de medicamentos anticâncer (ROY N, et al., 2016).

Em suma, o ácido ferúlico, um fitoquímico de origem natural, ganhou grande importância como um potente agente terapêutico em virtude de sua fácil disponibilidade comercial, baixo custo e efeitos colaterais mínimos. Sua ação terapêutica é mediada principalmente pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Este ácido fenólico apresenta diferentes atividades tanto biológicas como farmacológicas. Notadamente, pôde-se evidenciar os efeitos: anti-inflamatório, antiapoptótico, anticancerígeno, antidiabético, hepatoprotetor, cardioprotetor, neuroprotetor, antifúngico, antibacteriano e até o efeito de proteção solar, etc. Esta revisão abordou particularmente os efeitos antimicrobianos do FA, *in vitro*, sob forma isolada e/ou conjugada à biomateriais; portanto, fornecemos uma compreensão mais atual e otimizada do seu potencial antimicrobiano, que poderá ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos e sua aplicação no futuro.

CONCLUSÃO

Diante do exposto nesta revisão, reiteramos a nossa hipótese e concluímos que o ácido ferúlico faz jus a ser considerado como um bom agente antimicrobiano isoladamente, conjugado à materiais biológicos e/ou associado à outras substâncias. Assim como outros metabólitos secundários dos compostos fenólicos, foi capaz de evitar a propagação de microorganismo e a formação de biofilmes. Em síntese, o ácido ferúlico apresentou atividade contra cepas bacterianas gram-negativas e gram-positivas e mostrou potenciais perspectivas de aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Posto isto, se faz necessário mais pesquisas no âmbito multidisciplinar para avanços no desenvolvimento e inovação tecnológica de antimicrobianos, sejam eles antibacterianos ou antifúngicos que, atualmente, são uma ameaça crescente à saúde mundial.

REFERÊNCIAS

1. ALAM MdA, et al. Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2013; 61 (3): 240-249.
2. ALMEIDA, MGC. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants, LISBOA. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica) – Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde. Centro Universitário de Lisboa, Lisboa, 2018; 78 p.
3. ANAND S, et al. Electrospun biomimetic multifunctional nanofibers loaded with ferulic acid for enhanced antimicrobial and wound-healing activities in STZ-Induced diabetic rats. *Pharmaceutics*, 2022; 15 (3): 302.
4. ANDRADE J, et al. Antimicrobial PLA-PVA multilayer films containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2022; 375: 131861.
5. ARAGÓN-GUTIÉRREZ A, et al. Melt-Processed Bioactive EVOH Films Incorporated with Ferulic Acid. *Polymers (Basel)*. 2020; 13(1): 68.
6. BORGES A, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013; 19 (4): 256-265.
7. BRIXNER B, et al. Antimicrobial activity of chitosan associated with essential oils in biomedical application: an integrative review. *Research, Society and Development*, 2022; 11 (14): e447111436563-e447111436563.
8. DASAGRANDHI C, et al. Antibacterial and Biofilm Modulating Potential of Ferulic Acid-Grafted Chitosan against Human Pathogenic Bacteria. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (8): 2157.
9. DE OLIVEIRA SILVA E e BATISTA R. Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017; 16 (4): 580-616.
10. DE OLIVEIRA EF, et al. Screening of antimicrobial synergism between phenolic acids derivatives and UV-A light radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2021; 214: 112081.
11. EL-GOGARY RI, et al. Ferulic acid nanocapsules as a promising treatment modality for colorectal cancer: Preparation and in vitro/in vivo appraisal. *Life Sci.* 2022; 298: 120500.
12. EOM SH, et al. Synergistic Antibacterial Effect and Antibacterial Action Mode of Chitosan-Ferulic Acid Conjugate against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26 (4): 784-789.
13. HERNÁNDEZ-GARCÍA E, et al. Active Starch-Polyester Bilayer Films with Surface-Incorporated Ferulic Acid. *Membranes (Basel)*. 2022; 12 (10): 976.
14. IBITOYE OB e AJIBOYE TO. Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Microb Pathog.* 2019; 126: 393-398.
15. KANG J, et al. Ferulic acid inactivates *Shigella flexneri* through cell membrane destruction, biofilm retardation, and altered gene expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2020; 68 (27): 7121-7131.
16. KACZMAREK-SZCZEPAŃSKA B, et al. The Physicochemical and Antibacterial Properties of Chitosan-Based Materials Modified with Phenolic Acids Irradiated by UVC Light. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (12): 6472.
17. KOT B, et al. Antibacterial activity of commercial phytochemicals against *Aeromonas* species isolated from fish. *Pathogens*, 2019; 8 (3): 142.
18. LI D, et al. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci.* 2021; 284:119921.
19. LIN FH, et al. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005; 125 (4): 826-832.
20. MA X, et al. Ferulic acid isolated from propolis inhibits porcine parvovirus replication potentially through Bid-mediate apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 2020; 83: 106379.
21. MASTOOR S, et al. Analysis of the Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity of Natural Compounds and Their Analogues against *Staphylococcus aureus* Isolates. *Molecules.* 2022; 27 (20): 6874.

22. MAURYA DK e DEVASAGAYAM TPA. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48 (12): 3369-3373.
23. RAJ ND e SINGH D. A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*, 2022; 5, 100063.
24. PATTNAIK S, et al. Ferulic acid encapsulated chitosan-tripolyphosphate nanoparticles attenuate quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *IET nanobiotechnology*, 2018; 12 (8): 1056-1061.
25. PERNIN A, et al. Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems. *Frontiers in Microbiology*, 2019; 10: 137.
26. QIN Y e LI P. Antimicrobial Chitosan Conjugates: Current Synthetic Strategies and Potential Applications. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (2): 499.
27. RAMPELOTTO CR, et al. Ferulic acid-loaded nanocapsules: Evaluation of mucosal interaction, safety and antioxidant activity in human mononucleated cells. *Toxicol In Vitro.* 2022; 78: 105259.
28. ROY N, et al. Plant Phenolics Ferulic Acid and P-Coumaric Acid Inhibit Colorectal Cancer Cell Proliferation through EGFR Down-Regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17 (8): 4019-23.
29. RUKKUMANI R, et al. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *J Physiol Pharmacol.* 2004; 55 (3): 551-61.
30. SHI C, et al. Antimicrobial Activity of Ferulic Acid Against *Cronobacter sakazakii* and Possible Mechanism of Action. *Foodborne Pathog Dis.* 2016; 13 (4): 196-204.
31. SHIRAI A, et al. Antifungal action of the combination of ferulic acid and ultraviolet-A irradiation against *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2022; 132 (4): 2957-2967.
32. SIVAKUMAR S, et al. Ferulic acid loaded microspheres reinforced in 3D hybrid scaffold for antimicrobial wound dressing. *Int J Biol Macromol.* 2021; 1 (77): 463-473.
33. STOMPOR-GORĄCY M e MACHACZKA M. Recent Advances in Biological Activity, New Formulations and Prodrugs of Ferulic Acid. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (23): 12889.
34. TANG Z, et al. Effects of Dietary Ferulic Acid on Intestinal Health and Ileal Microbiota of Tianfu Broilers Challenged with Lipopolysaccharide. *Molecules.* 2023; 28 (4): 1720.
35. TEE-NGAM P, et al. Simple and rapid determination of ferulic acid levels in food and cosmetic samples using paper-based platforms. *Sensors*, 2013; 13 (10): 13039-13053.
36. XU JG, et al. Comparative study on inhibitory effects of ferulic acid and p-coumaric acid on *Salmonella Enteritidis* biofilm formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022; 38 (8): 136.
37. YAKUB G, et al. Chitosan/ferulic acid-coated poly(ϵ -caprolactone) electrospun materials with antioxidant, antibacterial and antitumor properties. *Int J Biol Macromol.* 2018; 107 (Pt A): 689-702.
38. YAMAGUCHI T, et al. Time-Dependent Controlled Release of Ferulic Acid from Surface-Modified Hollow Nanoporous Silica Particles. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (13): 10560.
39. ZDUŃSKA K, et al. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018; 31 (6): 332-336.
40. ZHANG Y, et al. Structure-dependent inhibition of *Stenotrophomonas maltophilia* by polyphenol and its impact on cell membrane. *Frontiers in Microbiology*, 2019; 10: 2646.

Antifungal evaluation of the combination of ferulic acid and nicotinamide against *Candida* spp.

Mayara Karla dos Santos Nunes¹, José Venâncio Chaves Júnior¹, Fábio Santos de Souza², Patrícia Neris Andrade³, Ricardo Dias de Castro⁴, Hilzeth de Luna Freire Pessoa³, Rita de Cássia da Silveira e Sá⁵

¹Postgraduate Program in Drug Development and Technological Innovation (PPGDITM), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

²Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

³Department of Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

⁴Department of Dental Sciences, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

⁵Department of Physiology and Pathology, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract:

Background: Candidiasis is the most important cause of fungal infections in humans. Limitations of antifungals used in treatment are reported in the literature. Prolonged treatment often leads to drug resistance, necessitating alternatives to conventional antimicrobial therapy. In this context, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of ferulic acid (FA), nicotinamide (NAM), and the FA:NAM combination against strains of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*, and to determine their mode of action and synergistic effect when combined with the synthetic antifungal nystatin.

Materials and Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using a microdilution technique, and the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined via subculture sowing. The mode of action of AF, NAM e AF:NAM was established by verifying fungal growth in the presence of sorbitol or ergosterol. The fractional inhibitory concentration index (FIC) was determined using the checkerboard method.

Results: NAM and the FA:NAM combination exhibited antifungal effects against *C. albicans*. The antifungal test results remained unchanged in the presence of ergosterol; however, the MIC value of the FA:NAM combination against *C. albicans* increased eightfold (125 to 1000 µg/mL) in the presence of exogenous sorbitol. The combination of the test substances and nystatin showed no antagonism, allowing for the association of these compounds in the treatment of fungal infections.

Conclusion: It was found that NAM and the AF:NAM mixture have a fungicidal effect on *Candida* species and show no antagonism when combined with nystatin.

Key Word: Ferulic Acid; Nicotinamide; Antifungal; *Candida* spp.; Caspofungin.

Date of Submission: 19-02-2024 Date of Acceptance: 29-02-2024

I. Introduction

Candidiasis is the infection caused by members of the fungal genus *Candida*, which is part of the commensal microbiota and is an opportunistic pathogen for humans. It is often associated with the mortality of susceptible individuals, including elderly patients, oncology patients, transplant recipients, and immunosuppressed individuals^{1,2,3}.

This genus includes *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, *Candida auris*, and *Candida krusei*. Collectively, these species are the causative agents of non-albicans candidiasis. Despite this, many studies have shown that systemic infections by *Candida albicans* (*C. albicans*) have a higher gross mortality rate, reaching approximately 40%^{1,3,4,5}.

Ferulic acid (FA) is a phenolic compound found in plants, fruits, and vegetables. It is known to be a potent antioxidant that plays a crucial role in maintaining human health and preventing various diseases. Free radicals generated through oxidation in the body lead to prolonged cellular damage, which can cause cancer and/or exacerbate conditions such as diabetes, hypertension, circulatory problems, inflammation, etc. Therefore, the consumption of antioxidants is essential to prevent these chronic diseases caused by free radicals. Simultaneously, the prevention of fungal diseases is equally important for better control of human health^{6,7,8,9,10,11,12}.

It is known that there are some difficulties regarding the bioavailability of phenolic acids because they are hydrophobic compounds, and this directly affects their therapeutic potential when administered orally. In view of this, new technological strategies have emerged to enhance this issue and improve their pharmacological

properties, such as co-crystals. Co-crystals are homogeneous crystalline structures formed by the union of two or more substances in a single crystalline phase^{10,13,14,15,16}.

Co-crystals of ferulic acid (AF) are well-documented in the literature with pharmacological, therapeutic, and food potential. Therefore, the synergy of FA with other molecules, as well as with nicotinamide, seems to be quite promising^{17,18,19,20}. FA has shown in vitro antifungal activity by inducing apoptosis in *C. albicans* and *Candida glabrata* fungi, with more significant results when evaluated in combination with caspofungin, exhibiting a synergistic effect²¹.

Nicotinamide (NAM) is an amide form of vitamin B3, known as a safe agent that can be used in the treatment of various diseases. It has been reported that NAM exhibits antimicrobial activities, inhibiting the growth of *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, human immunodeficiency virus (HIV), and also shows significant antifungal activity against *C. albicans*, including fluconazole-resistant isolates^{22,23,24,25,26,27}.

In this context, this study aimed to evaluate the antifungal activity of the substances FA and NAM individually, as well as the mixture of FA with NAM (FA:NAM) against different *Candida spp.* It also investigated the mechanisms of action and the potential synergistic effect with the antifungal nystatin.

II. Material And Methods

Microorganisms and molecules

Reference *Candida spp.* strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 750, and *C. krusei* ATCC 6258. Nystatin, Caspofungin, Tween 80%, and ergosterol were obtained from Sigma-Aldrich® Chemical Co. d-sorbitol anhydrous from INLAB® (São Paulo, Brazil). Ferulic acid (FA) was purchased from Pharmanostra (China), and nicotinamide (NAM) from Purifarma (Brazil). All raw materials presented purity greater than 99.5%.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The MIC was determined by the microdilution technique, as previously described by the adapted method from the Clinical and Laboratory Standards Institute²⁸. Briefly, the biological activity of the test molecules was analyzed on *Candida spp.* strains through the serial microdilution technique in 96-well plates. Initially, the fungi were incubated in the presence of the test molecules diluted with DMSO and sterile distilled water (vehicle), analyzing the concentration range from 1000µg/mL to 7.8µg/mL for each molecule or mixture. Negative controls consisted of incubating *Candida spp.* strains only with the vehicle and/or culture medium. Nystatin (48 - 0.37µg/mL) was used as a positive control. After 24h at 35 ± 2°C, visible microbial cell growth was evaluated both qualitatively and using the TTC dye (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). MIC was defined as the lowest concentration of the test substance that inhibits visible microbial growth.

Antifungal Mechanism of Action

Action of FA, NAM, and FA:NAM mixture on fungal cell wall and membrane (Sorbitol test): For this assay, the MIC value was defined as the lowest concentration of the substance that inhibits visible microbial growth in the presence of sorbitol (D-sorbitol anhydrous) (INLAB, São Paulo, Brazil). The microdilution technique was used to compare the MIC values of the compounds against *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 750, and *C. krusei* ATCC 6258 strains in the absence and presence of 0.8M sorbitol. The plates were incubated at 35°C, and readings were taken 24 hours after incubation. The positive control for this assay was caspofungin at an initial concentration of 4.0µg/mL (caspofungin diacetate - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which is known to disrupt the yeast cell wall. Based on sorbitol's ability to act as an osmotic protector in the fungal cell wall, higher MIC values in the presence of sorbitol (standard medium) suggest that the cell wall is a likely cellular target of the compound under analysis.

Action of FA, NAM, and FA:NAM mixture on the fungal cell membrane effect (Ergosterol test): For this assay, the MIC was defined as the lowest concentration of the substance that inhibits visible microbial growth in the presence of exogenous ergosterol. The assay was performed using the microdilution technique in the presence of exogenous ergosterol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) at a concentration of 1008µM. The strains used in this test were *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 750, and *C. krusei* ATCC 6258. The plates were incubated at 35°C, and readings were taken after 24 hours. Nystatin was used as a positive control at an initial concentration of 48 µg/mL due to its known activity on yeast cell membranes, binding to membrane sterols and thereby disrupting membrane permeability.

Growth kinetics

Growth curves were employed to analyze the minimum time required for the initiation of microbial growth. In a flat-bottomed 96-well microdilution plate, each well received the culture medium (RPMI), followed by the substances FA, NAM, and FA:NAM at concentrations corresponding to MIC and 2x MIC. Then, 100µL of *C. albicans* ATCC 60193 yeast inoculum (2.5×10^3 CFU/mL) was added to each well. The plates were incubated for 24 hours at 35°C in a microplate reader (BIOTEK-EON), and absorbance values were read at 530nm every hour. Nystatin (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) was used as a positive control in assays at concentrations ranging from 1.5 to 12 µg/mL (1.61µM to 12.9µM). A growth control of the strain was also performed.

Synergy Assay – Checkerboard Method

The effect of the test substances alone and in combination with nystatin was determined using the checkerboard technique to derive the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index. Solutions of test products at certain concentrations (determined by their respective MICs) were used. Initially, 100µL of SDB was added to the wells. Then, 50µL of each test product at various concentrations (MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC, MIC ÷ 2, MIC ÷ 4, and MIC ÷ 8) were added horizontally (the substances under analysis) and vertically (nystatin). Finally, the fungal inoculum from the tested strains was added (2.5×10^3 UFC/mL). Growth and sterility controls were also performed. Results were visually read, and fungal growth was shown using the TTC dye. The assay was conducted in triplicate, and the microplate was incubated for 24 hours at 35°C^{29,30}. The FIC index was calculated as the sum of FIC A + FIC B, where A is the test substance, and B is nystatin. FIC A, in turn, is calculated using the MIC A combined/MIC A alone ratio, while FIC B = MIC B combined/MIC B alone ratio. This index was interpreted as follows: synergy (<0.5), additivity (0.5-1.0), indifference (>1), or antagonism (>4.0).

Statistical analysis

All assays were performed in triplicate in three independent experiments. Descriptive and inferential statistical analysis was conducted using appropriate tests with a significance level of 5%. Growth kinetics assays were carried out using GraphPad Prism® version 7.3 (GraphPad Software Inc., USA).

III. Result

Determination of MIC and MFC

Table 1 shows the results of the assay for determining the antifungal activity of the studied substances. NAM exhibited better results in both MIC (250µg/mL) and MFC (250µg/mL) against the *C. albicans* strain and maintained this outcome when combined with FA:NAM (250µg/mL). The MIC/MFC ratio indicated that the substances are fungicidal against the studied strains.

Table 1: Antifungal activity of substances (FA, NAM, and FA:NAM mixture) against *Candida spp.*

Substances	Strains								
	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. krusei</i>		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
FA	1000	1000	1	2000	2000	1	2000	2000	1
NAM	250	250	1	1000	1000	1	1000	1000	1
FA:NAM	250	250	1	1000	1000	1	1000	1000	1
Nystatin	1,5	1,5	1	1,5	1,5	1	1,5	1,5	1

Antifungal Mechanism of Action

The results showed that the antifungal properties of the substances are not related to the exogenous ergosterol pathway. In contrast, the antifungal properties of NAM and the FA:NAM mixture are related to the biosynthetic pathways of the cell wall; given that, the results showed that the MIC value against *C. albicans* increased fourfold for NAM (125 to 500µg/mL) and eightfold for the FA:NAM mixture (125 to 1000µg/mL) (Table 2). While in *C. tropicalis*, the MIC increased fourfold (500 to 2000µg/mL) for both NAM and the FA:NAM mixture (Table 3). This indicates that NAM and the FA:NAM mixture seem to act on the fungal cell wall, suggesting this mechanism as one of the possible targets. The caspofungin result worked as expected; the MIC value in the absence of sorbitol was 0.062µg/mL and increased significantly when in contact with sorbitol, presenting a value of 1.0µg/mL. Therefore, its mechanism of action via the fungal cell wall is confirmed.

Table 2: Effect of exogenous sorbitol (0.8 M) on the MIC of the molecules and caspofungin in the absence and presence of sorbitol (0.8 M) against the *C. albicans* strain ATCC 60193

<i>C. albicans</i>											
AF			NAM			FA:NAM			caspofungin		
Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol
4000	-	-	4000	-	-	4000	-	-	4	-	-
2000	-	-	2000	-	-	2000	-	-	2	-	-
1000	-	-	1000	-	-	1000	-	+	1	-	+
500	+	+	500	-	+	500	-	+	0.5	-	+
250	+	+	250	-	+	250	-	+	0,25	-	+
125	+	+	125	+	+	125	+	+	0,125	-	+
62,5	+	+	62,5	+	+	62,5	+	+	0,062	+	+
31,25	+	+	31,25	+	+	31,25	+	+	0,031	+	+

Observations: +, fungal growth; -, absence of fungal growth.

Table 3: Effect of exogenous sorbitol (0.8 M) on the MIC of the molecules and caspofungin in the absence and presence of sorbitol (0.8 M) against the *C. Tropicalis* strain ATCC 750

<i>C. tropicalis</i>											
AF			NAM			AF:NAM			caspofungina		
Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Concentration (µg/mL)	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol
4000	-	-	4000	-	-	4000	-	-	4	-	-
2000	-	-	2000	-	+	2000	-	+	2	-	-
1000	+	+	1000	-	+	1000	-	+	1	-	+
500	+	+	500	+	+	500	+	+	0.5	-	+
250	+	+	250	+	+	250	+	+	0,25	-	+
125	+	+	125	+	+	125	+	+	0,125	-	+
62,5	+	+	62,5	+	+	62,5	+	+	0,062	+	+
31,25	+	+	31,25	+	+	31,25	+	+	0,031	+	+

Observations: +, fungal growth; -, absence of fungal growth

Growth kinetics

It is known that an ideal microbial growth curve should be measured through a graph that expresses the number of viable cells over time, i.e., the recording of countable cells at certain time intervals³¹.

Our growth kinetics assay indicated that FA started to inhibit the growth of *C. albicans* ATCC 60193 after the 9th hour of incubation, while NAM and the FA:NAM mixture showed inhibition starting from the 8th hour (Figures A, B, C), for any evaluated concentration. This result is consistent with others already reported in the literature, reinforcing the fungicidal effect of the substances^{21,27}.

Figure A

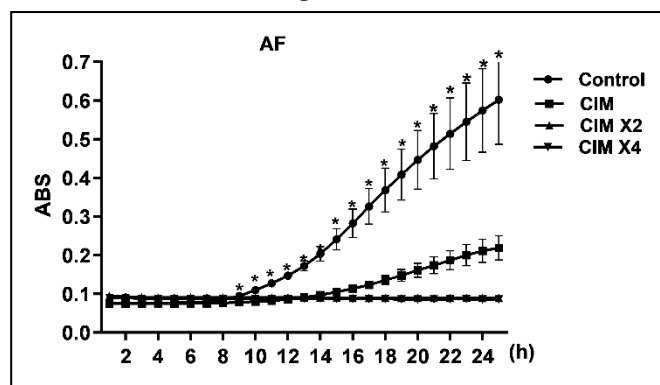


Figure B

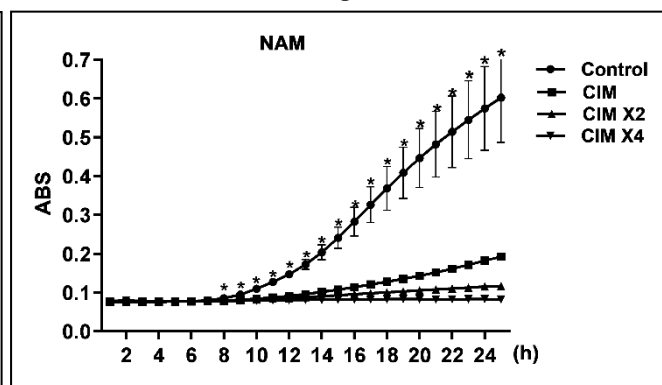
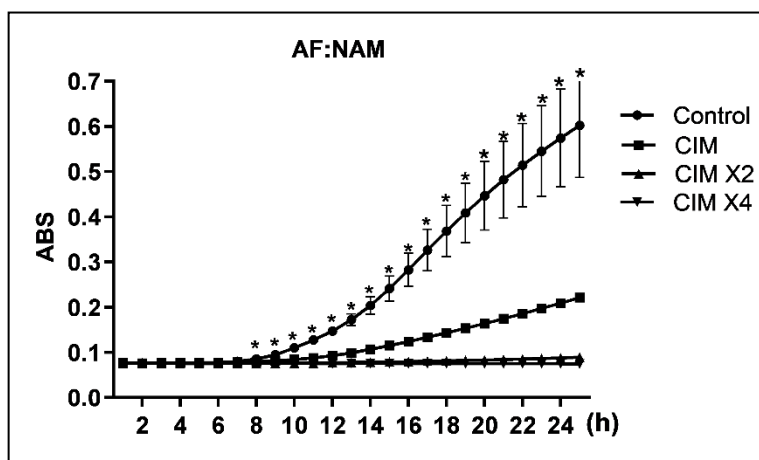


Figure C



Synergy Assay – Checkerboard Method

The combination of antifungals has been widely investigated due to its advantages in combating resistant infections. It increases effectiveness against target pathogens, minimizes the emergence of fungal resistance, and expands the spectrum of action. Consequently, it reduces the duration of antifungal therapy and shortens mortality rates^{32,33}.

Based on the combination assay, it was observed that there was no reduction in MIC values for *C. albicans* ATCC 90028 for the test substances. Considering that the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was equal to 0.5, it is evident that the combination of FA, NAM, FA:NAM, and nystatin exhibited an indifferent effect. These results are described in Table 4.

The above-mentioned results indicate relationships of indifference and consequently, the absence of antagonism among the tested compounds, suggesting the possibility of combining these compounds in the treatment of fungal infections without interfering with each other's mechanisms of action. However, further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to understand the safety and efficacy of this combination, supporting our hypothesis.

Table 4. Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) after combination between AF, NAM e AF:NAM and Nystatin on *C. albicans* strain ATCC 90028

	Fractional Inhibitory Concentration (FIC)	FICI=FIC _A + FIC _B
FA	FIC _A = 0,5	1 (Indifferent)
NAM	FIC _A = 0,5	1 (Indifferent)
FA:NAM	FIC _A = 0,5	1 (Indifferent)
Nystatin	FIC _B = 0,5	
Synergism: FICI ≤0,5; Indifferent 0,5 < ICIF ≤ 4; antagonism >4		

IV. Discussion

With the aim of studying the antifungal action of plant-derived products, we evaluated FA, NAM, and the combination of these two substances. FA, as a representative of phenolic compounds, exhibits various biopharmacological activities reported in the literature^{6,8,9,12,34}. Similarly, NAM also has therapeutic effects on various diseases, including anti-inflammatory action^{35,36}.

To enhance the effect of FA, by improving its solubility and consequently availability, we suggest that the combination with NAM could increase aqueous solubility. In our study, we aimed to explore the opportunity to combine these compounds, and them with nystatin, with the intention of increasing the efficacy of the anticandida medication. The effect against *Candida spp.* and the mechanisms of action in anticandida activity were investigated. No study has evaluated the effect of combining FA with NAM and the FA:NAM mixture with nystatin on *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* until now.

FA is a promising fungicide for food preservation, demonstrating efficacy against *Fusarium graminearum* by inhibiting ergosterol synthesis in the cell membrane in a dose-dependent manner. The fungal cell membrane is a crucial target for FA to exert its antifungal effect, supported by the loss of membrane integrity, leakage of cytoplasmic content, and the absence of essential components for membrane synthesis³⁷. It also inhibited and induced resistance against *P. expansum* in apples by biosynthesizing secondary metabolites in the phenylpropanoid metabolism, increasing gene expressions, and activities of enzymes involved in reactive oxygen species (ROS) metabolism³⁸.

Many plant secondary metabolites have antifungal and immunomodulatory effects. For instance, chlorogenic acid exhibits antifungal effects against phytopathogenic fungi through a mode of action dependent on ROS and alteration of fungal cell membrane permeability. Another phenolic acid, gallic acid, has antifungal effects against *C. albicans*, and FA shows anti-inflammatory action in bovine endometrium, primarily reducing pro-inflammatory cytokines. Therefore, plant secondary metabolites, particularly phenolic acids, have the potential for developing new antifungals^{39,40}.

The fungal cell wall plays a crucial role in protecting the cell from lysis and is important in pathogenesis. The main structural components of the fungal cell wall include β -glucans, chitin, and mannosylated proteins (manoproteins), which are efficiently regulated during cell growth⁴¹. Phenolic compounds isolated from *V. vinifera* have shown a strong ability to bind to proteins or glycoproteins. For example, caffeic acid in *C. albicans* inhibits the activity of the isocitrate enzyme, which is a key enzyme in the glyoxylate cycle and is an important virulence factor⁴².

Femonstrated that NAM treatment led to a decrease in the level of mannose in the outer layer of the cell wall and an increase in chitin; moreover, it can expose the underlying β -glucan in the intermediate layer of the cell wall²⁷. Previously, it was observed that agents affecting one component of the fungal cell wall often lead to modification of other cell wall components to compensate and try to maintain wall integrity. Therefore, our result corroborates with reports from the literature, as we showed that the FA:NAM mixture has a fungicidal effect by acting on the cell wall of *C. albicans* and *C. tropicalis*⁴³.

Indeed, it seems that this effect was due to NAM since FA alone did not demonstrate a direct action on the cell wall. However, when we analyzed the FA:NAM mixture in *C. albicans*, the MIC was higher than when exposed only to NAM; taken together, these data suggest that FA contributed to greater stress on the fungal cell wall. Another polyphenolic compound, quercetin, acts as an antifungal against *C. albicans* through a combined action damaging cell wall integrity, increasing permeability, and causing cell wall damage⁴⁴.

The study of the synergistic action of substances has been one of the possibilities to combat infections resistant to antifungals. Synergisms have been found between caffeic acid and fluconazole, thymol with nystatin, fluconazole with nystatin, and the essential oil of *Mentha suaveolens* with antifungal drugs against *C. albicans*^{45,46,47,48}. In our study, there was no synergistic effect of FA, NAM, or the FA:NAM mixture with nystatin. Despite this, the data show indifferent relationships and, consequently, an absence of antagonism, opening perspectives for the combination of these compounds for future use in the treatment of fungal infections.

Therefore, further *in vitro* and *in vivo* research is necessary for a more conclusive understanding of the suitability of FA and NAM as potential antifungal agents. New findings may assist in identifying interesting drug combinations with novel mechanisms of action.

V. Conclusion

In conclusion, this study demonstrated the fungicidal effect of FA and NAM on *Candida spp.* We consider that these effects are likely due to nicotinamide, but it is worth noting that the mechanism of action on the fungal cell wall and the time of inhibition of fungal growth were better when the FA:NAM mixture was used. Substantial evidence is available regarding the synergistic effect of ferulic acid and existing antifungal agents, which may become a promising anticandidal treatment. This study evaluated the combination of plant-derived substances and opened up different possibilities for the treatment of fungal infections against *Candida* species.

References

- [1]. Gallo M, Giovati L, Magliani W, Pertinhez TA, Conti S, Ferrari E, Spisni A, Ciociola T. Metabolic Plasticity of *Candida albicans* in Response to Different Environmental Conditions. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(7):723.
- [2]. Song N, Zhou X, Li D, Li X, Liu W. A Proteomic Landscape of *Candida albicans* in the Stepwise Evolution to Fluconazole Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(4):e0210521.
- [3]. Duarte, Allana Brunna Sucupira et al. Antifungal activity against *Candida albicans* of methyl 3, 5-dinitrobenzoate loaded nanoemulsion. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023;1-15.
- [4]. Harpf V, Rambach G, Würzner R, Lass-Flörl C, Speth C. *Candida* and Complement: New Aspects in an Old Battle. *Front Immunol*. 2020; 14:11:1471.
- [5]. Rivera-Yañez CR, Ruiz-Hurtado PA, Reyes-Realí J, et al. Antifungal Activity of Mexican Propolis on Clinical Isolates of *Candida* Species. *Molecules*. 2022;27(17):5651
- [6]. Chaudhary A, Jaswal VS, Choudhary S, et al. Ferulic acid: a promising therapeutic phytochemical and recent patents advances. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 2019;13(2):115-123.
- [7]. Kim, JK, Park, SU. A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. *Excli Journal*. 2019;18:132-138.
- [8]. Li D, Rui YX, Guo SD et al. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life sciences*. 2021; 284:119921.
- [9]. Ibitoye OB, Ajiboye TO. Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis*. 2019;126:393-398.
- [10]. Stompór-Gorący M, Machaczka M. Recent advances in biological activity, new formulations and prodrugs of ferulic acid. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(23):12889.
- [11]. Li X, Wu J, Xu F, et al. Use of ferulic acid in the management of diabetes mellitus and its complications. *Molecules*. 2022;27(18), 6010.
- [12]. Mishra T, Sharma C, Singh K, et al. An Insight Into The Pharmacological Profile Of Hydroxy Cinnamic Acid, An Active Constituent Of Ferulic Acid. *NVEO-NATURAL VOLATILES & ESSENTIAL OILS Journal| NVEO*. 2022;9(3):1-19.
- [13]. Akhtar MA, Mariotti CE, Conti B, et al. Electrophoretic deposition of ferulic acid loaded bioactive glass/chitosan as antibacterial and bioactive composite coatings. *Surface and Coatings Technology*. 2021;405:126657.
- [14]. Raj ND, Singh D. A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*. 2022; 100063.
- [15]. Bu FZ, Yu, YM, Shen YL, et al. Cocrystallization with nutrient ferulic acid towards reducing the dissolubility behaviors of antifungal drug 5-fluorocytosine: An integrated theoretical and experimental case research. *Journal of Molecular Structure*. 2023;1275:134601.
- [16]. Mehta J, Borkhataria C, Patel A, et al. Para-Hydroxy Benzoic Acid Cofomer Enable Enhanced Solubility, Dissolution, and Antifungal Activity of Ketoconazole Cocrystals. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2023; 1-14.
- [17]. Aitipamula S, Wong AB, Chow OS, et al. Pharmaceutical salts of haloperidol with some carboxylic acids and artificial sweeteners: hydrate formation, polymorphism, and physicochemical properties. *Crystal Growth & Design*. 2014; 14(5):2542-2556.
- [18]. Swapna B, Maddileti D, Nangia A. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability. *Crystal Growth & Design*. 2014; 14(11):5991-6005.
- [19]. Thipparaboina R, Kumar D, Mittapalli S, et al. Ionic, neutral and hybrid acid-base crystalline adducts of lamotrigine with improved pharmaceutical performance. *Crystal Growth & Design*. 2015;15(12):5816-5828.
- [20]. Júnior JVC, Dos Santos JAB, Lins TB, et al. A new ferulic acid–nicotinamide cocrystal with improved solubility and dissolution performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(3):1330-1337.
- [21]. Canturk Z. Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*. *J Food Drug Anal*. 2018;26(1):439-443.
- [22]. Chaffin WL, Barton RA, Jacobson EL, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*. 1979;139(3):883-888.
- [23]. Murray, Michael F. Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both *Mycobacterium tuberculosis* and human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(4):453-460.
- [24]. Prusty D, Mehra P, Srivastava S, et al. Nicotinamide inhibits *Plasmodium falciparum* Sir2 activity in vitro and parasite growth. *FEMS microbiology letters*. 2008;282(2):266-272.
- [25]. Libri V, Yandim C, Athanasopoulos S, et al. Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*. 2014;384(9942):504-513.
- [26]. Tcherniuk SO, Chesnokova O, Oleinikov IV, et al. Nicotinamide inhibits the growth of *P. falciparum* and enhances the antimalarial effect of artemisinin, chloroquine and pyrimethamine. *Molecular and biochemical parasitology*. 2017;216:14-20.
- [27]. Xing X, Liao Z, Tan F, Zhu Z, Jiang Y, Cao Y. Effect of Nicotinamide Against *Candida albicans*. *Front Microbiol*. 2019;10:595.
- [28]. Pa, Wayne. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard. CLSI document M27-A2, 2002.
- [29]. Eliopoulos GM, Moellering RC. 1991 Antimicrobial combinations, In: *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1991:34–441.
- [30]. Dutta NK, Dastidar SG, Asok Kumar A, et al. Antimycobacterial activity of the anti-inflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. *Braz J Micr*. 2004;35:316-323.
- [31]. Peleg M, Corradini MG. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011;51(10):917–45.
- [32]. Nóbrega JR, Sousa PMS, de Lira Mota KS, et al. Antifungal activity of carvacrol and antifungal agent combinations against non-*albicans* *Candida* species. *Scientia Plena*. 2019;15(10).
- [33]. Khalifa HO, Majima H, Watanabe A, Kamei K. In vitro characterization of twenty-one antifungal combinations against echinocandin-resistant and-susceptible *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*. 2021;7(2):108.
- [34]. Khanzada B, Akhtar N, Okla MK, et al. Profiling of Antifungal Activities and In Silico Studies of Natural Polyphenols from Some Plants. *Molecules*. 2021;26(23):7164.

- [35]. Ferreira RG, Matsui TC, Godin AM, et al. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. *European journal of pharmacology*. 2012;685(1-3):198-204.
- [36]. Ferreira RG, Matsui TC, Gomides LF et al. Niacin inhibits carrageenan-induced neutrophil migration in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2013;386:533-540.
- [37]. Yan H, Meng X, Lin X, et al. Antifungal activity and inhibitory mechanisms of ferulic acid against the growth of *Fusarium graminearum*. *Food Bioscience*. 2023;52:102414.
- [38]. Guo M, Li C, Huang R, et al. Ferulic acid enhanced resistance against blue mold of *Malus domestica* by regulating reactive oxygen species and phenylpropanoid metabolism. *Postharvest Biology and Technolog*. 2023;202:112378.
- [39]. Parvu M, Vlase L, Parvu AE, et al. Phenolic compounds and antifungal activity of *Hedera helix* L.(Ivy) flowers and fruits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2015;43(1):53-58.
- [40]. Zhou X, Zeng M, Huang F, Qin G, Song Z, Liu F. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023;107(14):4471-4492.
- [41]. Hasim S, Coleman JJ. Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. *Future Med Chem*. 2019;11(8):869-883.
- [42]. Simonetti G, Brasili E, Pasqua G. Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. against Human Pathogens. *Molecules*. 2020;25(16):3748.
- [43]. García R, Bermejo C, Grau C, et al. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(15):15183-15195.
- [44]. Lee HS, Kim Y. Myricetin Disturbs the Cell Wall Integrity and Increases the Membrane Permeability of *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(1):37-45.
- [45]. Stringaro A, Vavala E, Colone M, et al. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:125904.
- [46]. Dai L, Zang C, Tian S, et al. Design, synthesis, and evaluation of caffeic acid amides as synergists to sensitize fluconazole-resistant *Candida albicans* to fluconazole. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(1):34-37.
- [47]. de Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:417.
- [48]. Sardi JDCO, Gullo FP, Freires IA, et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;86(4):387-391.

***In Silico* and *In Vitro* Toxicity Assessment of Ferulic Acid and Nicotinamide: Analysis Using ADMET Tools and Effects on Bacteria, Erythrocytes, and Sun Protection**

Avaliação *In Silico* e *In Vitro* da Toxicidade do Ácido Ferúlico e da Nicotinamida: Análise com ferramentas ADMET e Efeitos em Bactérias, Hemácias e de Proteção Solar

Evaluación *In Silico* e *In Vitro* de la Toxicidad del Ácido Ferúlico y la Nicotinamida: Análisis con Herramientas ADMET y Efectos en Bacterias, Eritrocitos y Protección Solar

DOI: 10.55905/oelvXXnX

Receipt of originals: 04/11/2024

Acceptance for publication: 11/11/2024

Mayara Karla dos Santos Nunes

Master in Cellular and Molecular Biology

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: mayarakarlasn@hotmail.com

Aleson Pereira de Sousa

Ph.D. in Drug Development and Technological Innovation

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: aleson_155@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Ph.D. in Pharmacology of Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Patos Campus

Address: Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, Paraíba, ZIP Code: 58708-110

E-mail: abrahao.farm@gmail.com

José Venâncio Chaves Júnior

Ph.D. in Drug Development and Technological Innovation

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: josevenanciocjr@gmail.com

Fábio Santos de Souza

Ph.D. in Pharmacology of Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: fabio.santos.souza@academico.ufpb.br

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Ph.D. in Pharmacology of Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: margarethdiniz.ufpb@gmail.com

Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Ph.D. in Pharmacology of Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: hilzeth@gmail.com

Rita de Cássia da Silveira e Sá

Ph.D. in Pharmacology of Natural and Synthetic Bioactive Products

Institution: Federal University of Paraíba (UFPB) - Campus I

Address: Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ZIP Code: 58051-900

E-mail: rdritasilveira@gmail.com

ABSTRACT

The study addresses the properties of ferulic acid (FA) and nicotinamide (NAM), which are widely explored due to their antioxidant and anti-inflammatory effects, beneficial for cosmetic and pharmaceutical applications. The objective was to assess the toxicity of these substances, both *in silico* and *in vitro*, to predict safety and efficacy. Using software such as Molinspiration© and admetSAR©, pharmacokinetic properties, including absorption and toxicity, were calculated. The *in vitro* analyses involved cytotoxicity assays in human erythrocytes and antibacterial activity tests. Results indicated that both compounds comply with Lipinski's "Rule of 5," suggesting potential for adequate absorption. Regarding toxicity, FA and NAM showed low human toxicity, though FA exhibited considerable environmental toxicity. *In vitro* tests revealed that FA demonstrated bacteriostatic activity against Gram-positive bacteria and a dose-dependent effect on human erythrocytes, with higher hemolysis observed at high concentrations. Additionally, FA provided effective sun protection, reaching a sun protection factor (SPF) of 25.01 at all tested concentrations. It is concluded that FA and NAM have promising safety and efficacy profiles, with FA standing out as a potential photoprotective and antimicrobial agent, while NAM exhibits neuroprotective properties due to its permeability through the blood-brain barrier.

Keywords: Ferulic Acid, Nicotinamide, Toxicity, ADMET, Cytotoxicity, Photoprotection.

RESUMO

O estudo aborda as propriedades do ácido ferúlico (AF) e da nicotinamida (NAM), amplamente explorados devido aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios que são úteis em aplicações cosméticas e farmacêuticas. O objetivo foi avaliar a toxicidade dessas substâncias, tanto *in silico* quanto *in vitro*, visando prever segurança e eficácia. Utilizando softwares como Molinspiration© e admetSAR©, foram calculadas propriedades farmacocinéticas, incluindo absorção e toxicidade. As análises *in vitro* envolveram ensaios de citotoxicidade em hemácias humanas e testes de atividade antibacteriana. Resultados apontaram que ambos os compostos estão em conformidade com a “Regra dos 5” de Lipinski, indicando potencial para absorção adequada. Em relação à toxicidade, AF e NAM apresentaram baixa toxicidade humana, mas o AF mostrou uma toxicidade ambiental considerável. Nos testes *in vitro*, o AF demonstrou atividade bacteriostática frente a bactérias Gram-positivas e apresentou efeito dose-dependente em hemácias humanas, com maior hemólise observada em altas concentrações. Além disso, o AF ofereceu proteção solar eficaz, atingindo um fator de proteção (FPS) de 25,01 em todas as concentrações testadas. Conclui-se que o AF e a NAM possuem perfis promissores de segurança e eficácia, com o AF destacando-se como um possível agente fotoprotetor e antimicrobiano, enquanto a NAM apresenta propriedades neuroprotetoras devido à sua permeabilidade à barreira hematoencefálica.

Palavras-chave: Ácido Ferúlico, Nicotinamida, Toxicidade, ADMET, Citotoxicidade, Fotoproteção.

RESUMEN

El estudio aborda las propiedades del ácido ferúlico (AF) y la nicotinamida (NAM), ampliamente explorados debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, útiles en aplicaciones cosméticas y farmacéuticas. El objetivo fue evaluar la toxicidad de estas sustancias, tanto *in silico* como *in vitro*, para prever su seguridad y eficacia. Utilizando software como Molinspiration© y admetSAR©, se calcularon propiedades farmacocinéticas, incluyendo absorción y toxicidad. Los análisis *in vitro* incluyeron ensayos de citotoxicidad en eritrocitos humanos y pruebas de actividad antibacteriana. Los resultados indicaron que ambos compuestos cumplen con la "Regla de 5" de Lipinski, lo que sugiere un potencial de absorción adecuado. En cuanto a la toxicidad, AF y NAM mostraron baja toxicidad humana, aunque el AF presentó una toxicidad ambiental considerable. En las pruebas *in vitro*, el AF demostró actividad bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas y presentó un efecto dependiente de la dosis en eritrocitos humanos, con una mayor hemólisis observada en concentraciones altas. Además, el AF ofreció protección solar eficaz, alcanzando un factor de protección (FPS) de 25,01 en todas las concentraciones probadas. Se concluye que el AF y la NAM poseen perfiles prometedores de seguridad y eficacia, destacándose el AF como un posible agente fotoprotector y antimicrobiano, mientras que la NAM presenta propiedades neuroprotectoras debido a su permeabilidad en la barrera hematoencefálica.

Palabras clave: Ácido Ferúlico, Nicotinamida, Toxicidad, ADMET, Citotoxicidad, Fotoprotección.

1 INTRODUCTION

Ferulic acid (FA) and nicotinamide (NAM) are molecules widely studied due to their bioactive properties, which have potential applications in cosmetic, pharmaceutical, and food products (Cavalcanti *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2024). FA is a phenolic compound found in various plants, with antioxidant effects that help protect cells against oxidative damage, enhancing the body's defense against chronic diseases (Losada-Barreiro *et al.*, 2022). On the other hand, NAM plays a crucial role in the synthesis of NAD⁺, an essential coenzyme in energy metabolism and the maintenance of cellular integrity (Morganti *et al.*, 2023). The combined use of these molecules has been explored for their potential synergy in antioxidant and anti-inflammatory properties, benefiting different areas of biomedical research (Dănilă *et al.*, 2024; Kumari *et al.*, 2024).

However, for the safe application of these molecules, it is essential to investigate their non-clinical toxicity, especially through *in silico* and *in vitro* assays, which provide initial safety information without the immediate need for human studies (Wu *et al.*, 2020; Bassan *et al.*, 2021;). *In silico* assessments use computational tools, such as Molinspiration© and admetSAR© software (ADMET:Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity), which allow the prediction of pharmacokinetic and toxicological properties of compounds before conducting laboratory assays (Palmeira *et al.*, 2019). This approach is cost-effective and efficient, providing essential data for the safe direction of experimental studies (Lima *et al.*, 2024).

In parallel, *in vitro* assays are widely used to investigate the toxicity on eukaryotic and prokaryotic cells, including erythrocytes and bacteria, as a way to understand the effects these compounds may have on specific biological systems (Morganti *et al.*, 2023). These *in vitro* tests complement *in silico* assessments, allowing for a more detailed characterization of the toxicity and potential safety of these compounds (Lima *et al.*, 2024).

Therefore, our objective was to evaluate AF and NAM *in silico* and *in vitro* to determine their molecular properties, ADMET profiles, and identify possible antibacterial and sun protection effects.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *IN SILICO* ANALYSIS

2.1.1 Molinspiration©

Cheminformatics has emerged as a powerful tool in evaluating the molecular properties of bioactive compounds. In this study, we used the Molinspiration© software to calculate crucial molecular properties, such as the ethanol-water partition coefficient (miLogP) and the topological polar surface area (TPSA). The miLogP coefficient indicates a compound's lipophilicity, influencing its absorption and distribution in the body, while the TPSA provides insights into polarity and molecular interaction capacity—key factors for biological activity (Cocco *et al.*, 2020). These properties are fundamental for compound screening in pharmaceutical development and for assessing their safety.

Additionally, for a more in-depth visualization, three-dimensional molecular structures were generated using Galaxy Visualizer. This tool enables graphical representation of molecules, facilitating the analysis of structural interactions and the prediction of biological behavior (Lima *et al.*, 2024). For this purpose, the Molinspiration© software was used, known for its online property calculation tools available at www.molinspiration.com.

2.1.2 admetSAR©

The theoretical toxicity assessment was conducted using the admetSAR© software, which provides information on various parameters based on its predictions, including mutagenic potential according to the Ames test, carcinogenic risk, toxicity in *Tetrahymena pyriformis*, acute oral toxicity, class III carcinogenicity classification, and the lethal dose 50 (LD50) in rats. This study is based on the *in silico* screening of ADME/T parameters (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1>) (CHENG *et al.*, 2012). Predictions related to the 'micronucleus test' and 'reproductive toxicity' were calculated in version 2.0 of the admetSAR© software, developed by Yang and his team (2019) (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>).

2.2 *IN VITRO* ANALYSIS

2.2.1 Test Substances

Ferulic acid (FA) was purchased from Pharmanostra (China) and nicotinamide (NAM) from Purifarma (Brazil). All raw materials had a purity greater than 99.5%.

2.2.2 Antibacterial Effect

For the evaluation of the antibacterial effect, both Gram-positive and Gram-negative bacteria from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and clinical isolates were used: *Staphylococcus aureus* 25619, *Staphylococcus aureus* 25925, *Bacillus clausii* O/C (CNCM-I276), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* 101, 103, 104, 105, 108, and 110. The bacteria were cultured in Luria-Bertani (LB) medium, prepared with yeast extract, tryptone, and NaCl, and autoclaved.

The bacterial inoculum was adjusted to 0.5 McFarland ($1-5 \times 10^8$ CFU/mL) after incubation at 37 °C for 24 hours. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined in 96-well plates with serial dilutions of the substances (from 200 to 6.25 µg/mL), with chloramphenicol and DMSO as controls. After incubation at 37 °C for 24 hours, resazurin was used to assess bacterial growth, with the MIC being the lowest concentration that completely inhibited growth.

For the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), the MIC dilutions and higher concentrations were cultured in LB with 1.5% agar. The MBC was considered the lowest concentration that eliminated bacterial growth after incubation.

2.2.3 Effect on Human Erythrocytes

Human erythrocytes from blood types A, B, and O were obtained from healthy donors at the Biochemistry Laboratory of the Academic Unit of Biological Sciences, from the Center of Health and Rural Technology (CSTR) at the Federal University of Campina Grande (UFCG/PATOS – PB). The handling and disposal of the erythrocytes were carried out in accordance with the safety standards followed by the mentioned unit. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Integrated Faculties of Patos (FIP), under approval number 3.653.358, as outlined by Operational Standard No. 001/2013 – Guidelines for Research Involving Human Beings and Resolution 466/12 – National Ethics Commission in Research (CONEP) of the National Health Council of the Ministry of Health.

To evaluate the hemolytic effect and osmotic fragility of blood types A, B, and O, blood was collected, and the erythrocytes were isolated by centrifugation in 0.9% NaCl solution and suspended to a final concentration of 0.5%.

For the hemolytic test, the substances were added to the erythrocyte suspension at concentrations of 50, 100, 500, and 1000 µg/mL. Negative (no substance) and positive (1%

Triton X-100) controls were included. After incubation at 22°C for 1 hour, hemolysis was measured by spectrophotometry at 540 nm.

In the osmotic fragility analysis, the erythrocytes were incubated with the substances at the same concentrations, and after centrifugation, they were resuspended in 0.24% NaCl solution. Hemolysis was again quantified by spectrophotometry at 540 nm. All tests were performed in triplicate, and the results were expressed as percentage mean values.

2.2.4 Determination of Sun Protection Factor (SPF) Effect

The determination of the sun protection factor (SPF) was performed using the spectrophotometric method adapted by Mansur. The samples, containing the test substances, were prepared at a final concentration of 3 mL and diluted in ethanol. Initially, the fractions were solubilized in deionized water, vortexed, and then diluted in an alcoholic solution (ethanol, analytical grade). Absorbances were measured using a spectrophotometer with quartz cuvettes in the UV range (290 to 320 nm), with readings taken every 5 nm. The absorbance values obtained were inserted into the equation adapted by Mansur, which relates the erythemalogenic effect (EE) to the intensity of radiation (I). The tests were performed in triplicate. The mathematical equation used in Mansur's method is based on Mansur *et al.* (1986).

(1)

$$\text{Spectrophotometric SPF} = FC \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Where:

FC = correction factor (= 10);

EE(λ) = erythemalogenic effect of solar radiation at each wavelength (λ);

I(λ) = intensity of solar radiation at each wavelength (λ);

Abs(λ) = absorbance reading obtained from the sample at each wavelength (λ).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1.1. THEORETICAL MOLECULAR PROPERTIES - Molinspiration©

According to Lipinski's "Rule of 5," which suggests that a molecule should meet ideal values in four parameters, each being multiples of 5, in order to be a good drug, FA and NAM did not violate any of the required criteria. Both substances met the established parameters analyzed by the Molinspiration© cheminformatics tool, as shown in Table 1.

Table 1. Molecular properties of the test substances according to Molinspiration©

MOLECULAR PROPERTIES	FA	NAM
number of violations of Lipinski's Rule of 5 (nviolations)	0	0
molecular mass (daltons)	194,16	122,13
miLogP	1,25	0,28
number of hydrogen bond donos (nOHNH)	2	2
number of oxygen and nitrogen atoms (nON)	4	3

Legend: The table shows the number of violations of Lipinski's Rule of 5 (nviolations), molecular mass (daltons), miLogP, number of hydrogen bond donors (nOHNH), and number of oxygen and nitrogen atoms (nON) for FA and NAM. Both substances meet the criteria for drug-like molecules with no violations of the Rule of 5. Source: Nunes *et al.*, 2023.

Both compounds met the recommended limit of 500 daltons, a factor that favors absorption. The miLogP values were within the ideal limit for human absorption (miLogP < 5) (Oyanna; Clarke, 2024). These parameters suggest that both FA and NAM have suitable characteristics for absorption. It is known that lipophilic compounds with a LogP between 1 and 3 tend to exhibit better bioavailability profiles in *in vivo* studies, as well as reduce the likelihood of rapid elimination by the body (Oyanna; Clarke, 2024).

In addition to its pharmacokinetic relevance, LogP is considered a central parameter in the evaluation of the environmental fate of chemical compounds, helping to understand the persistence and bioaccumulation of substances in aquatic and terrestrial ecosystems (Zeng *et al.*, 2024).

Recent studies emphasize the accuracy of computational tools for predicting LogP, such as the Molinspiration© software, whose correlation with experimental LogP values has been demonstrated across various classes of chemicals (Madden *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022). These findings reinforce the reliability of miLogP for *in silico* modeling in pharmacological and environmental studies.

For good cellular permeability and oral absorption, the rule suggests that the molecule should have no more than 5 hydrogen bond donors and 10 hydrogen bond acceptors (Das; Mehta; Nayak, 2020). The test compounds have donor and acceptor values within these limits, indicating that they can efficiently cross cell membranes. With ideal numbers of nOHNH and nON, AF and NAM are more balanced between lipophilicity and water solubility, enhancing their bioavailability and absorption by the body (Wu *et al.*, 2020).

Molinspiration© also generates molecular structures in 3D visualization from the SMILES notation (Simplified Molecular Input Line Entry System), allowing for an accurate three-dimensional representation. In the CPK 3D model, each atom is represented by a sphere

with a size proportional to its van der Waals radius, facilitating the visualization of the molecule's shape and volume. In this system, distinct colors are assigned to different chemical elements, providing an intuitive and detailed visual differentiation (Figures 1.a and 1.b).

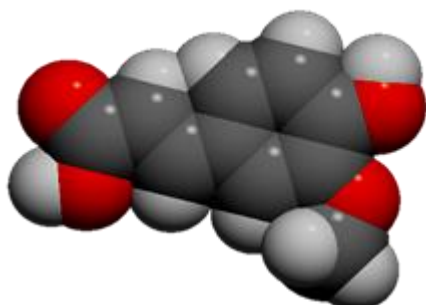


Figure 1.a: Molecular structure of FA in CPK 3D visualization, generated in Molinspiration's Galaxy Visualizer. Legend: The structure displays atoms in conventional coloring: oxygen in red, carbon in gray, and hydrogen in white, highlighting the spatial profile of the molecule. Source: Nunes et al., 2024.

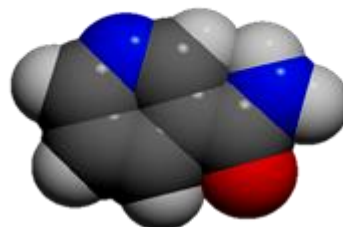


Figure 1.b: Molecular structure of NAM in CPK 3D visualization, generated in Molinspiration's Galaxy Visualizer. Legend: The arrangement of atoms emphasizes the spatial configuration of the molecule, with the presence of an amide group and a pyridine ring structure. Source: Nunes et al., 2024.

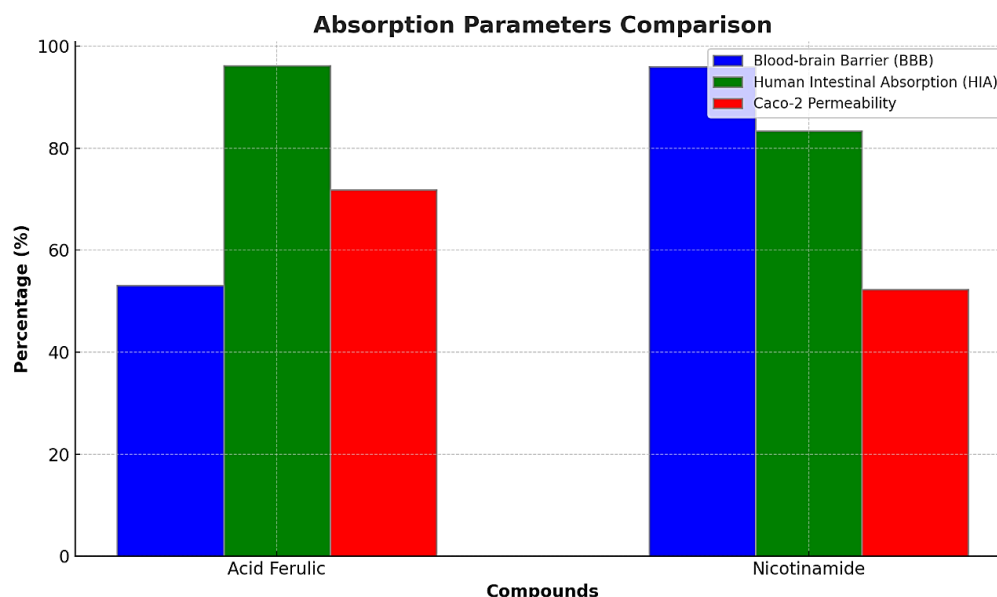
3.1.2. THEORETICAL TOXICITY - admetSAR©

To predict the ADMET profile of the compounds, the online platform admetSAR© was used. The chemical structures of the compounds were submitted for analysis in SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) format, allowing for a detailed evaluation of parameters: Absorption (ability to cross the blood-brain barrier, intestinal absorption, cell permeability, and interaction with P-glycoprotein (Graph 1); Distribution (subcellular localization – Graph 2); Metabolism (interaction with cytochrome P450 enzymes); Excretion (biodegradability); and Toxicity (human and environmental).

Graph 1 shows that the absorption profiles of FA and NAM vary, reflecting differences in their molecular characteristics and interactions with physiological barriers. NAM has a higher permeability to the blood-brain barrier (BBB) compared to AF, with values around 80% and 60%, respectively. This profile suggests that NAM has a greater potential for distribution to the central nervous system (CNS). The ability to cross the BBB is crucial for substances targeting the CNS, such as medications for neurological disorders (Maiese *et al.*, 2021).

NAM also stands out in studies of neuroprotection and DNA repair, as it can activate sirtuins and participate in DNA damage recovery, suggesting a role in therapies for neurodegenerative diseases and conditions related to cellular aging (Maiese *et al.*, 2021).

Graph 1. Comparison of absorption parameters



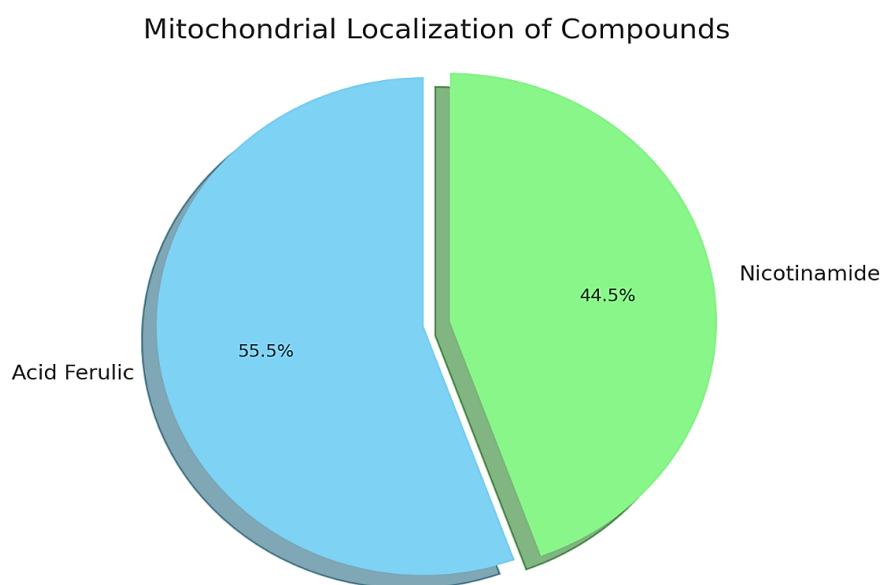
Legend: The graph shows the percentage of each compound's permeability across three different barriers: the Blood-brain Barrier (BBB), Human Intestinal Absorption (HIA), and Caco-2 Permeability. Source: Nunes et al., 2024.

However, for compounds like FA, which are more focused on antioxidant and anti-inflammatory systemic effects, permeability to the blood-brain barrier (BBB) may not be an essential requirement for human intestinal absorption (HIA). Both compounds show significant absorption, with FA recording a higher value of nearly 90%, compared to approximately 80% for NAM. This data is promising, as it indicates that both compounds are well absorbed in the gastrointestinal tract, a desirable characteristic for orally administered compounds. Studies show that FA has good intestinal absorption but is rapidly metabolized in the liver and intestine, which may limit its systemic bioavailability despite its high initial absorption (Zheng *et al.*, 2024). In the case of FA, it appears to act as modulators in oxidative and inflammatory pathways, offering cellular protection (Ye *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2023; Dos Santos Nunes *et al.*, 2024).

Regarding Caco-2 permeability, it was observed that both compounds exhibit favorable behavior, but FA still has a relative advantage compared to NAM. Thus, FA's higher permeability in Caco-2 cells reinforces its elevated bioavailability in the gastrointestinal tract, corroborating the HIA data. This suggests that this pharmacokinetic property may be associated with its lower molecular weight and spatial distribution, which favors passive diffusion (Ling *et al.*, 2023).

Graph 2 represents the subcellular location, showing a pie chart that illustrates the percentage of FA and NAM. The results indicate that FA has a greater presence in the mitochondria compared to NAM, and this difference in location may suggest that the acid has more relevant or specific functions in the mitochondria, which could influence its biological effect, especially in processes related to cellular metabolism, energy production, its antioxidant role, and cellular protection (Ye *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2023).

Graph 2. Subcellular Location of the Compounds



Legend: The pie chart shows the percentage of FA and NAM in mitochondria, indicating that FA has a greater presence in this cytoplasmic organelle compared to NAM. Source: Nunes *et al.*, 2024.

For a better comparison of the metabolism, toxicity, and excretion data of the compounds, the results are presented in Table 2.

Although both compounds are safe from a human toxicity perspective, FA exhibits high environmental toxicity, particularly for aquatic species. This suggests the need for caution when discarding or using it in applications that may lead to environmental pollution. While NAM is less toxic to the environment, it is not biodegradable, which could lead to bioaccumulation issues if not properly managed (Table 2).

Table 2. Metabolism parameters, toxicity, and biodegradability of the compounds

PARAMETERS	FA	NAM
CYP450 metabolism: CYP2C9 (Substrate)	No (74,64%)	No (73,95%)
CYP450 metabolism: CYP2C9 (Substrate)	No (89,22%)	No (78,89%)
CYP450 metabolism: CYP2C9 (Substrate)	No (62,89%)	No (76,13%)
CYP450 metabolism: CYP2C9 (Substrate)	No (75,13%)	No (70,84%)
CYP450 metabolism: CYP2C9 (Substrate)	No (57,93%)	No (90,77%)
Ames toxicity	Non-toxic (91,32%)	Non-toxic (91,75%)
Carcinogenicity	Non-carcinogenic (90,76%)	Non-carcinogenic (84,04%)
Fish Toxicity (FHMT)	High (93,25%)	Low (82,94%)
Bee Toxicity (HBT)	High (76,40%)	Low (77,65%)
Biodegradability	Yes (75,54%)	No (93,90%)

Legend: This table presents a comparison between two groups (FA and NAM) regarding various toxicological and environmental parameters. The columns indicate the presence or absence of specific characteristics for each parameter, followed by the corresponding percentage for each group. The parameters include CYP450 metabolism (CYP2C9), Ames toxicity, carcinogenicity, fish toxicity (FHMT), bee toxicity (HBT), and biodegradability. The data reflect differences in toxicity and biodegradability characteristics between the groups, with higher toxicity for fish and bees in the FA group, and a higher biodegradability rate in the FA group compared to NAM. Source: Nunes et al., 2024.

3.2.1. ANTIBACTERIAL ACTIVITY

The antibacterial activity results of AF and NAM were determined using the MIC and MBC by broth microdilution. The compounds did not show bactericidal effects against the tested ATCC strains of *Staphylococcus aureus* and clinical *Escherichia coli* isolates. However, a bacteriostatic effect was observed against the *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Bacillus clausii* O/C (CNCM-I276) strains (Table 3). The combination of AF and NAM did not alter the MIC and MBC values for the tested strains, indicating that there was no synergistic effect or enhancement of the bacteriostatic efficacy, although the MIC values for NAM were lower.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of AF and NAM against bacterial strains.

Bacterial strain	FA		NAM		FA associated with NAM	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1.100	1.100	1.000	1.000	1.100	1.100
<i>Bacillus clausii</i> O/C (CNCM-I276)	1.100	1.100	1.000	1.000	1.100	1.100

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values of FA, NAM and their combination (FA associated with NAM) against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Bacillus clausii* O/C (CNCM-I276). Source: Nunes et al., 2024.

NAM showed a better effect on the bacteria; although the pro-oxidant effect of FA has already been reported, generating reactive oxygen species (ROS) inside bacterial cells, leading to oxidative stress that interferes with cell division and metabolic processes in Gram-positive bacteria (Manta, 2021; Sousa, 2023; Fleck *et al.*, 2023). This oxidative stress induction mechanism is particularly effective against bacteria that lack robust antioxidant systems, such as Gram-positive bacteria, which may explain the lack of effect of FA on *Escherichia coli* strains (Oliveira, 2020; Dos Santos Nunes *et al.*, 2024).

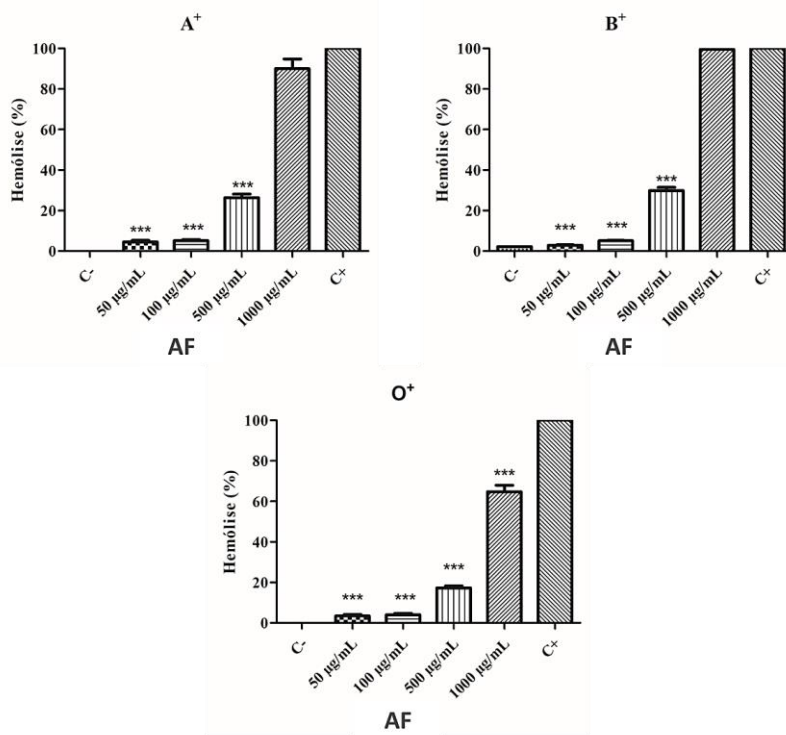
Generally, Gram-positive bacteria exhibit greater sensitivity to antibiotics compared to Gram-negative bacteria. This behavior is expected, as Gram-negative bacteria have an additional outer membrane that acts as a selective barrier, limiting the penetration of various molecules with the potential to cause cellular damage. Furthermore, the periplasmic space of Gram-negative bacteria contains enzymes, such as β -lactamases, that hydrolyze and inactivate exogenous substances, contributing to resistance against a wide range of antimicrobial agents (Begum *et al.*, 2021).

3.2.2. EVALUATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY AND OSMOTIC FRAGILITY

The effect of AF on human red blood cells from blood types A, B, and O was evaluated, as shown in graphs 3 and 4.

The results of graph 3 suggest that FA has a hemolytic effect on red blood cells from different blood types (A^+ , B^+ , and O^+), and this effect increases as the concentration of the substance rises. FA induces hemolysis in a dose-dependent manner, meaning that low concentrations of FA (50 and 100 pg/mL) cause little to no hemolysis, while higher concentrations (500 and 1000 pg/mL) result in significant increases in hemolysis. Blood type O^+ is the most susceptible to FA-induced hemolysis, especially at concentrations of 1000 pg/mL.

Graph 3. Hemolytic activity of FA on human red blood cells

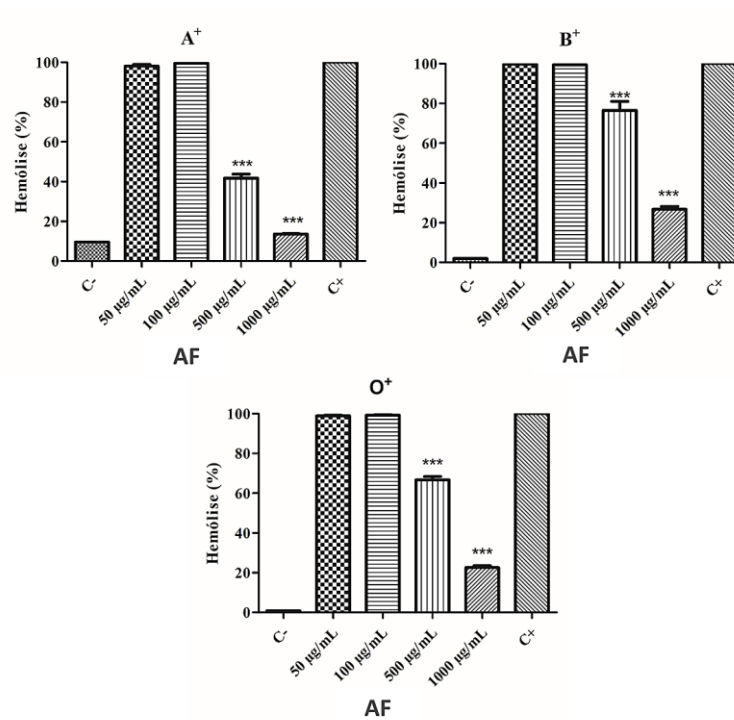


Legend: The graph shows the dose-dependent hemolytic effect of FA on red blood cells from blood types A⁺, B⁺, and O⁺. Higher concentrations of FA (500 and 1000 µg/mL) result in a significant increase in hemolysis, with blood type O⁺ being the most susceptible, particularly at 1000 µg/mL. Lower concentrations (50 and 100 µg/mL) cause minimal or no hemolysis. Source: Nunes et al., 2024.

In Graph 4, we observe that AF, especially at 1000 µg/mL, demonstrates considerable protection in red blood cells, suggesting a potential protective effect on red blood cells from blood types A⁺, B⁺, and O⁺. These findings may indicate that FA has membrane-stabilizing properties that increase with dose, reducing the susceptibility of red blood cells to rupture. The effectiveness of FA across different blood types appears to be similar, as all types showed a significant reduction in hemolysis at higher concentrations.

These results are promising for the use of FA as a potential protective agent in situations involving oxidative or inflammatory cellular damage, but further studies are needed to understand the specific mechanism of action and whether the protective effect is maintained *in vivo*. Additionally, it would be relevant to investigate the effect of FA at intermediate concentrations between 500 and 1000 µg/mL, to determine the minimum effective dose and ensure safe and effective therapeutic application. However, as the concentration increases, there is a trend toward increased hemolysis, although it remains below the positive control.

Graph 4. Evaluation of the osmotic fragility of FA in human red blood cells



Legend: Osmotic fragility of AF in human red blood cells. This graph shows the effect of AF on the Legend: osmotic fragility of human red blood cells. As the concentration of AF increases, the red blood cells' resistance to hemolysis under varying osmotic conditions is assessed, suggesting potential membrane-stabilizing properties. The data indicate the dose-dependent effect of AF on red blood cell integrity, with higher concentrations leading to changes in osmotic fragility. Source: Nunes et al., 2024.

The response profile is similar across blood types A⁺, B⁺, and O⁺, suggesting that FA may have a mechanism of action independent of blood type, although further studies are needed to confirm this hypothesis. For future applications, it would be important to investigate the molecular mechanisms underlying this protective effect at low concentrations and identify the factors that lead to the toxic effect at high concentrations. This could provide insights into the safe use of FA and help define safe dosages to avoid hemolysis in potential clinical applications.

3.3.3. EVALUATION OF THE SUNSCREEN PROTECTION FACTOR (SPF) EFFECT OF FA

Table 4 shows the quantitative results of the sunscreen protection of AF using the method adapted by Mansur.

Table 4. Determination of the sunscreen protection factor (SPF) of FA

	50µg/mL	100µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL
Dynamine	11,974	20,001	25,01	25,01
FA	25,01	25,01	25,01	25,01

Legend: This table shows the SPF values for AF at concentrations of 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, and 1000 µg/mL, compared with dynamine. At all tested concentrations, AF consistently showed an SPF of 25.01, while dynamine demonstrated a dose-dependent increase in SPF, with the highest value recorded at 100 µg/mL. Source, Nunes et al., 2024.

The SPF of FA is 25.01 at all tested concentrations, from the lowest (50 µg/mL) to the highest (1000 µg/mL). These values suggest that it has a highly effective sunscreen protection capacity that is not dependent on concentration. From the lowest concentration, FA already provides the maximum possible UV protection *in vitro*.

The stability of the SPF of AF at all concentrations suggests that it could be a very efficient sunscreen filter, capable of offering effective UV protection at low doses. This is advantageous for product development, as it allows for the use of smaller amounts of FA to achieve the same level of protection, reducing costs and potential side effects. The fact that FA does not increase its SPF with higher concentrations suggests that it may have a UV protection mechanism that quickly reaches its saturation point.

The results suggest that FA is a promising candidate for use in sunscreens due to its high SPF even at low concentrations. This implies a significant advantage in cosmetic or skincare formulations, as UV protection can be achieved with smaller doses. Furthermore, products containing FA could be less harsh on the skin and have a lower chance of inducing side effects due to the reduced amount of active ingredient required.

4. CONCLUSION

With this study, it is concluded that:

- ✓ FA and NAM exhibit suitable ADMET profiles for different therapeutic applications. However, the environmental toxicity of FA requires control measures to minimize ecological damage, and the limited biodegradability of NAM should be considered for prolonged use.
- ✓ FA demonstrated bacteriostatic activity against Gram-positive bacteria. In human red blood cells, it showed a dose-dependent effect, although it can be considered to have low harmful potential. Furthermore, AF demonstrates a high potential as an efficient photoprotective agent, offering maximum UV protection even at low concentrations.

In summary, the results of this *in silico* and *in vitro* study indicate that AF and NAM exhibited relevant biological activity and low toxic potential. Therefore, they can be considered promising substances for the development and technological innovation of pharmaceutical products.

REFERÊNCIAS

- BASSAN, ARIANNA *et al.* In silico approaches in organ toxicity hazard assessment: current status and future needs in predicting liver toxicity. **Computational Toxicology**, v. 20, p. 100187, 2021.
- BEGUM, SHIFA *et al.* A review on antibiotic resistance and way of combating antimicrobial resistance. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 087-097, 2021.
- CAVALCANTI, GABRIELA R. *et al.* Ferulic acid activity in topical formulations: technological and scientific prospecting. **Current pharmaceutical design**, v. 27, n. 19, p. 2289-2298, 2021.
- CHENG, FEIXIONG *et al.* AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **J Chem Inf Model**, v. 52, n. 11, p.3099-3105, 2012.
- CHENG, LISA; WONG, HARVEY. Food effects on oral drug absorption: application of physiologically-based pharmacokinetic modeling as a predictive tool. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 672, 2020.
- COCCO, DANIEL ROTELLA *et al.* Use of computational methods for pharmacological and toxicological analysis of velutin. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 5, n. 2, p. 88-89, 2020.
- DĂNILĂ, ELENA *et al.* Formulation and Characterization of Niacinamide and Collagen Emulsion and Its Investigation as a Potential Cosmeceutical Product. **Cosmetics**, v. 11, n. 2, p. 40, 2024.
- DAS, TORSIA; MEHTA, CHETAN H.; NAYAK, USHA Y. Multiple approaches for achieving drug solubility: an in silico perspective. **Drug discovery today**, v. 25, n. 7, p. 1206-1212, 2020.
- DOS SANTOS NUNES, MAYARA KARLA *et al.* Antimicrobial effect of ferulic acid: an integrative review of bioassays. **Electronic Journal Acervo Saúde**, v. 24, n. 4, p. e16186-e16186, 2024.
- FLECK, NATAÍS *et al.* Antimicrobial effect of aqueous extract rich in polyphenols from jabuticaba skin on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 26, p. e2022087, 2023.
- KUMAR, MUKUL *et al.* Ferulic acid: extraction, estimation, bioactivity and applications for human health and food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2024.
- KUMAR, VIKAS *et al.* A decade of machine learning-based predictive models for human pharmacokinetics: Advances and challenges. **Drug discovery today**, v. 27, n. 2, p. 529-537, 2022.
- KUMARI, HEMA *et al.* Microbial transformation of some phytochemicals into value-added products: A review. **Fitoterapia**, p. 106149, 2024.
- LIMA, ZILKA NANES *et al.* Non-clinical toxicological analysis of dichlorinated phenylacrylate isomers: Ethyl (2E)-2-cyano-3-(2, 6-dichlorophenyl) acrylate e Ethyl (2E)-2-cyano-3-(2, 4-dichlorophenyl) acrylate. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 2, p. e3271-e3271, 2024.
- LOSADA-BARREIRO, SONIA *et al.* Biochemistry of antioxidants: Mechanisms and pharmaceutical applications. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 3051, 2022.
- LING, XIAO *et al.* Effects of cross-linking of rice protein with ferulic acid on digestion and absorption of ferulic acid. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 74, n. 3, p. 313-326, 2023.
- MADDEN, JUDITH C. *et al.* A review of in silico tools as alternatives to animal testing: principles, resources and applications. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 4, p. 146-172, 2020.

MAGOTRA, ASMITA *et al.* Physicochemical, pharmacokinetic, efficacy and toxicity profiling of a potential nitrofuranyl methyl piperazine derivative IIIM-MCD-211 for oral tuberculosis therapy via *in-silico–in-vitro–in-vivo* approach. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 48, p. 151-160, 2018.

MAIESE, KENNETH. Nicotinamide as a foundation for treating neurodegenerative disease and metabolic disorders. **Current neurovascular research**, v. 18, n. 1, p. 134, 2021.

MANSUR, JOÃO DE SOUZA *et al.* Determination of the sun protection factor by spectrophotometry. **An. Bras. Dermatol**, p. 121-4, 1986.

MANTA, MARTINS MARÍLIA *et al.* Phenolic compounds in the inhibition of bacterial biofilm. **ASSOCIATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIBIOTICS IN**, p. 94, 2021.

MORGANTI, PIERFRANCESCO *et al.* Biopolymer-and Natural Fiber-Based Biomimetic Tissues to Realize Smart Cosmeceuticals and Nutraceuticals Using an Innovative Approach. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 11, p. 2525, 2023.

OLIVEIRA, WARLEY CAMPOS DE. **Evaluation of cytotoxicity and antimicrobial/antibiofilm potential of phenolic acids against microorganisms associated with endodontic infections. 2020. 37 p.** Bachelor's Thesis (Dentistry). São Paulo State University – Araçatuba, São Paulo, 2020.

OYANNA, VICTORIA O.; CLARKE, JOHN D. Mechanisms of intestinal pharmacokinetic natural product-drug interactions. **Drug Metabolism Reviews**, p. 1-17, 2024.

PALMEIRA, JÚLIA TAVARES *et al.* Analysis of the properties of cis-calamenene related to dentistry: an in silico study. **Uningá Journal**, v. 56, n. S5, p. 87-97, 2019.

PATHAK, MANASH PRATIM *et al.* Safety evaluation of an oat grain alkaloid gramine by genotoxicity assays. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 147-154, 2018.

SILVEIRA, MÁRCIA LILIANE RIPPEL *et al.* Physicochemical characteristics, bioactive compounds, and antioxidant potential of red raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.). **LATIN AMERICAN ECONOMY OBSERVATORY**, v. 21, n. 9, p. 12241-12262, 2023.

SOUSA, ANA ISABEL SANTOS. **Antimicrobial effect of phenolic compounds from wine on pathogenic microorganisms of importance in the cured meat products industry. 2023. 114 p.** Master's Thesis in Food Engineering. University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, 2023.

WU, FENGXU *et al.* Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 726, 2020.

YANG, HONGBIN *et al.* admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2019.

YE, LEI *et al.* Protective effects of ferulic acid on metabolic syndrome: A comprehensive review. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 281, 2022.

ZENG, HANG *et al.* Predicting bioaccumulation of nanomaterials: modeling approaches with challenges. **Environment & Health**, v. 2, n. 4, p. 189-201, 2024.

ZHENG, MENGLI *et al.* The Antioxidant Properties, Metabolism, Application and Mechanism of Ferulic Acid in Medicine, Food, Cosmetics, Livestock and Poultry. **Antioxidants**, v. 13, n. 7, p. 853, 2024.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu de forma pioneira ao aprofundar e ampliar o conhecimento sobre a associação do ácido ferúlico (AF) e da nicotinamida (NAM), duas substâncias com alto potencial farmacológico, especialmente por suas propriedades antioxidantes. O estudo forneceu dados que reforçaram a atividade citotóxica dessas substâncias frente a micro-organismos patogênicos de relevância clínica, utilizando ensaios *in vitro*, e explorou mais especificamente suas propriedades fungicidas, antibacterianas e fotoprotetoras.

Embora o AF seja reconhecido na literatura por suas atividades farmacológicas promissoras, um obstáculo significativo identificado foi sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que limita sua biodisponibilidade em formulações orais. Essa lacuna foi abordada neste estudo por meio da investigação da associação entre AF e NAM.

O estudo também trouxe evidências importantes sobre o efeito sinérgico do AF com a nistatina, sugerindo que essa combinação pode ser uma abordagem vantajosa no tratamento de infecções fúngicas, como a candidíase. Embora os resultados preliminares sejam encorajadores, há uma necessidade de pesquisas mais abrangentes para validar essas estratégias de tratamento fúngico em contextos clínicos mais amplos.

Os resultados obtidos abrem novas perspectivas para inovação tecnológica e desenvolvimento de medicamentos com destaque para o potencial uso da associação AF em formulações antimicrobianas com baixo potencial tóxico. Assim, este trabalho oferece uma importante contribuição ao fornecer dados não clínicos que podem fundamentar futuras investigações científicas e o desenvolvimento de novos fármacos.

Adicionalmente, o AF e a NAM demonstraram um efeito fotoprotetor e apresentaram baixa toxicidade em eritrócitos humanos, indicando que essas substâncias podem ser seguras para uso, ao menos nos modelos avaliados. Essas características tornam as substâncias exitosas para aplicação em formulações dermatológicas e farmacêuticas de fotoproteção e tratamento de infecções.

A partir dos resultados deste estudo, é possível vislumbrar um horizonte promissor no campo de desenvolvimento e inovação de fármacos. A associação entre o ácido ferúlico (AF) e a nicotinamida (NAM) destacou-se como uma abordagem inovadora e estratégica para superar limitações farmacológicas tradicionais, como a baixa solubilidade e biodisponibilidade do AF. Esse avanço não apenas possibilita uma maior eficácia terapêutica, mas também amplia as possibilidades de aplicação.

Esses resultados reforçam a importância de investir em estudos translacionais que conectem descobertas laboratoriais a aplicações práticas, possibilitando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas inovadoras. O avanço no conhecimento sobre as propriedades fotoprotetoras, antimicrobianas e segurança dessas substâncias fornece bases sólidas para futuro.

Nesse sentido, o trabalho não apenas contribui para a ciência fundamental, mas também aponta para uma evolução tecnológica capaz de impactar positivamente a saúde pública. O desenvolvimento de novos medicamentos a partir dessas descobertas pode oferecer soluções

eficazes, seguras e acessíveis para o tratamento de infecções, doenças dermatológicas e outros desafios médicos, destacando o papel da inovação como um pilar essencial na criação de terapias mais eficazes. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que as substâncias:

- ✓ Demonstraram serem vantajosas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com potencial terapêutico significativo.
- ✓ Apresentaram atividade fungicida contra espécies de *Candida albicans*, atuando por meio de um mecanismo de ação que afeta a parede celular dos fungos.
- ✓ Mostraram-se citotóxicas contra os micro-organismos patogênicos avaliados, evidenciando seu poder de combate às infecções.
- ✓ Exibiram baixa toxicidade em células humanas, indicando um perfil de segurança animador para uso terapêutico.

5. REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. *et al.* Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 221, 2020.
- ADAM, A. *et al.* The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1962-1968, 2002.
- AHMAD, N. A. *et al.* Synthesis, characterisation and antioxidant properties of ferulate-based protic ionic liquids: experimental and modelling approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 278, p. 309-319, 2019.
- ALAM, M. D. A. *et al.* Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, p. 1-13, 2016.
- ALDER-RANGEL, A. *et al.* The third international symposium on fungal stress—ISFUS. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 235-252, 2020.
- ALEEBRAHIM-DEHKORDY, E. *et al.* Medicinal plants, effective plant compounds (compositions) and their effects on stomach cancer. **International journal of preventive medicine**, v. 8, n. 1, p. 96, 2017.
- ALVES, B. S.; COSTA, R. A. M.; SOUSA, T. C. Desenvolvimento, estudo de estabilidade e avaliação da atividade antifúngica da saliva artificial com extrato de aloe vera. 2020.
- ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Medicinal plants from North and Central America and the Caribbean considered toxic for humans: the other side of the coin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- ALZAIN, A. A. *et al.* Identification of novel Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors for malaria using *in silico* studies. **Scientific African**, v. 16, p. e01214, 2022.
- ANGELI, A. *et al.* Synthesis, Biological and *In Silico* Studies of Griseofulvin and Usnic Acid Sulfonamide Derivatives as Fungal, Bacterial and Human Carbonic Anhydrase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2802, 2023.
- ANSELM, C. *et al.* Interaction of ferulic acid derivatives with human erythrocytes monitored by pulse field gradient NMR diffusion and NMR relaxation studies. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n. 2, p. 109-117, 2005.
- AUGER, C. *et al.* Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters. **Life Sciences**, v. 74, n. 19, p. 2365-2377, 2004.
- AZAY-MILHAU, J. *et al.* Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): a comparative *in vitro* study with the effects of caffeic and ferulic acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 755-760, 2013.
- BATISTA, E. K. F. *et al.* Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 413-419, 2015.
- BASSETTI, M. *et al.* Invasive fungal diseases in adult patients in intensive care unit (FUNDICU): 2024 consensus definitions from ESGCIP, EFISG, ESICM, ECMM, MSGERC, ISAC, and ISHAM. **Intensive Care Medicine**, v. 50, n. 4, p. 502-515, 2024.
- BAYS, D. J. *et al.* Epidemiology of Invasive Candidiasis. **Clinical Epidemiology**, p. 549-566, 2024.
- BERRETTA, A. A. **Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BERVEN, H. *et al.* NR-SAFE: a randomized, double-blind safety trial of high dose nicotinamide riboside in Parkinson's disease. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 7793, 2023.

BESERRA, F. P. *et al.* Brazilian green propolis-based nanostructured system and its use in diabetic rats of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA) - infected wounds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 385 (S3) 452; 2023.

BHOSALE, P. B. *et al.* Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: a narrative review. **Translational Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 7619, 2020.

BITENCOURT, R. G.; CABRAL, F. A.; MEIRELLES, A. J. A. Ferulic acid solubility in supercritical carbon dioxide, ethanol and water mixtures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 103, p. 285-291, 2016.

BRAIDY, N.; LIU, Y. NAD⁺ therapy in age-related degenerative disorders: A benefit/risk analysis. **Experimental Gerontology**, v. 132, p. 110831, 2020.

BRIMA, E. I. Toxic elements in different medicinal plants and the impact on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, p. 1209, 2017.

BOBO, D. *et al.* Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. **Pharmaceutical Research**, v. 33, p. 2373-2387, 2016.

BOURNE, L. *et al.* Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. **Free Radical Research**, v. 32, n. 3, p. 273-280, 2000.

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of ferulic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 222-227, 1998.

BU, FAN-ZHI *et al.* Cocrystallization with nutrient ferulic acid towards reducing the dissolubility behaviors of antifungal drug 5-fluorocytosine: An integrated theoretical and experimental case research. **Journal of Molecular Structure**, v. 1275, p. 134601, 2023.

BUCCI, P. L. *et al.* Encapsulación en liposomas de ácido ferúlico obtenido de residuos de bagazo cervicero para su utilización en tratamientos dérmicos. **Revista Jornadas de Investigación**, p. 28, 2020.

CADDEO, C. *et al.* Tocopherol-loaded transfersomes: *In vitro* antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1-2, p. 34-41, 2018.

CĂLINOIU, L. F.; VODNAR, D. C. Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1615, 2018.

CANTURK, Z. Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 439-443, 2018.

CAPARICA, R. *et al.* *In vitro* cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. **Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 63-74, 2020.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. 2005.

CASTRO-PORTUGUEZ, R.; SUTPHIN, G. L. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. **Experimental Gerontology**, v. 132, p. 110841, 2020.

CHAFFIN, W. L. *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 139, n. 3, p. 883-888, 1979.

CHEN, YUN-YU *et al.* Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 955-963, 2012.

CHEN, H. *et al.* Microstructures and pharmaceutical properties of ferulic acid agglomerates prepared by different spherical crystallization methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 574, p. 118914, 2020.

CHINTAKUNTA, R.; MEKA, G. Synthesis, *in silico* studies and antibacterial activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1-6, 2020.

CHO, AE-SIM *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937-943, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement, M100-S15. 2008

CSISZAR, A. *et al.* Role of endothelial NAD⁺ deficiency in age-related vascular dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 316, n. 6, p. H1253-H1266, 2019.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. London: Churchill Livingstone. 2001.

DA CRUZ MOSCHEM, J; GONÇALVES, P. R. Toxicologia in silico como possibilidade para análise de impacto toxicológico: In silico toxicology as a possibility for toxicological impact analysis. **Health and Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 42-63, 2022.

DAMASCENO, S. S. *et al.* Chemical properties of caffeic and ferulic acids in biological system: implications in cancer therapy. A review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 20, p. 3015-3023, 2017.

D'ARCHIVIO, M. *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DASAGRANDE, C. *et al.* Antibacterial and biofilm modulating potential of ferulic acid-grafted chitosan against human pathogenic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2157, 2018.

DE MORAES ARNOSO, B. J.; DA COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

DE OLIVEIRA SILVA, E.; BATISTA, R. Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: A review on their structures, occurrence, and potential health benefits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 4, p. 580-616, 2017.

DE SOUSA, J. P. *et al.* Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 489-494, 2020.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, p. 1520-1526, 2013.

DOS SANTOS ALMEIDA, D. F. L.. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

DU, N.; CAO, S.; YU, Y. Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 19, p. 1697-1703, 2011

DUARTE, F. Í. C. **Desenvolvimento de complexos de inclusão multicomponentes com ácido ferúlico e obtenção de membrana para avaliação da liberação em formulações semissólidas**. 2020. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

EL-SEEDI, H. R. *et al.* Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10877-10895, 2012.

FANG, T. *et al.* Unexpected Inhibitory Effect of Octenidine Dihydrochloride on *Candida albicans* Filamentation by Impairing Ergosterol Biosynthesis and Disrupting Cell Membrane Integrity. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1675, 2023.

FERREIRA, F. G. *et al.* Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009.

FIUZA, S. M. *et al.* Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3581-3589, 2004.

FRANKE, G. H. SCL-90®-S. **Symptom-Checklist-90®-Standard-Manual**. Göttingen: Hogrefe, 2014.

GABRIELE, E. *et al.* New sulfurated derivatives of cinnamic acids and rosmarinic acid as inhibitors of STAT3 and NF-κB transcription factors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1012-1028, 2017.

GIANNELLA, M. *et al.* Invasive fungal disease in the immunocompromised host: changing epidemiology, new antifungal therapies and management challenges. **Clinical Microbiology and Infection**, 2024.

GOMES, C. A. *et al.* Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 46, p. 5395-401, 2003.

GHOSH, D. *et al.* Quandary of antibiotics and multidrug resistance development: a molecular genetics-based dilemma. In: **Lantibiotics as Alternative Therapeutics**. Academic Press, 2023. p. 1-23.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAGEMAN, G. J.; STIERUM, R. H. Niacin, poly (ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 475, n. 1-2, p. 45-56, 2001.

HAHN, H. J. *et al.* Pretreatment of ferulic acid protects human dermal fibroblasts against ultraviolet A irradiation. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 740-748, 2016.

HASSANZADEH, P.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Nanoencapsulation: A promising strategy for biomedical applications of ferulic acid. **Biomedical Reviews**, v. 28, p. 22-30, 2018.

HEMALATHA, K.; SELVIN, J.; GIRIJA, K. Synthesis, *in silico* molecular docking study and antibacterial evaluation of some novel 4-anilino quinazolines. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 125-132, 2018.

HONG, Q. *et al.* Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 1-8, 2016.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. R50-R57, 2010.

HUSSAIN, M. B. *et al.* Bioavailability and metabolic pathway of phenolic compounds. In: **Plant physiological aspects of phenolic compounds**. IntechOpen, 2019.

HWANG, E. S.; SONG, S. B. Possible adverse effects of high-dose nicotinamide: mechanisms and safety assessment. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 687, 2020.

JIN, Y. *et al.* Neuroprotection by sodium ferulate against glutamate-induced apoptosis is mediated by ERK and PI3 kinase pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 12, p. 1881-1890, 2007.

CHAVES JÚNIOR, J. V. *et al.* A new ferulic acid–nicotinamide cocrystal with improved solubility and dissolution performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 3, p. 1330-1337, 2020.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KAWABATA, K. *et al.* Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 15-21, 2000.

KERN, S. M. *et al.* Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 6050-6055, 2003.

KFOURY, M. *et al.* Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chemistry**, v. 196, p. 518-525, 2016.

KHADKA, P. *et al.* Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 304-316, 2014.

KIM, J. K.; PARK, S. U. A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. **Excli Journal**, v. 18, p. 132-138, 2019.

KINCH, M. S. 2015 in review: FDA approval of new drugs. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1046-1050, 2016.

KISHIDA, K.; MATSUMOTO, H. Urinary excretion rate and bioavailability of chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid in non-fasted rats maintained under physiological conditions. **Heliyon**, v. 5, n. 10, 2019.

KNIP, M1 *et al.* Safety of high-dose nicotinamide: a review. **Diabetologia**, v. 43, p. 1337-1345, 2000.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 11, p. 2317-2324, 2003.

KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86-93, 2014.

KUMARI, P.; LUQMAN, S.; MEENA, A. Application of the combinatorial approaches of medicinal and aromatic plants with nanotechnology and its impacts on healthcare. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 475-489, 2019.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 301-311, 2008.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936-948, 2012.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. e51-e60, 2020.

LI, D. *et al.* Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. **Life Sciences**, v. 284, p. 119921, 2021.

LI, F.; CHONG, Z. Z.; MAIESE, K. Navigating novel mechanisms of cellular plasticity with the NAD⁺ precursor and nutrient nicotinamide. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 9, n. 4, p. 2500-2520, 2004.

LIN, SU-JU; GUARENTE, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 241-246, 2003.

LIMA, J. S. *et al.* Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da SOCERJ**, v. 16, n. 4, p. 225-233, 2003.

LI, W. *et al.* Pharmacokinetic comparison of ferulic acid in normal and blood deficiency rats after oral administration of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* and their combination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3583-3597, 2012.

MAGNI, G. *et al.* Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, p. 19-34, 2004.

MAIESE, K.; CHONG, Z. Z. Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 5, p. 228-232, 2003.

MAIESE, K. Triple play: Promoting neurovascular longevity with nicotinamide, WNT, and erythropoietin in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 218-232, 2008.

MAIESE, K *et al.* The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3446-3485, 2009.

MAIESE, K. New Insights for nicotinamide: Metabolic disease, autophagy, and mTOR. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 25, p. 1925, 2020.

MAIESE, K. Nicotinamide as a foundation for treating neurodegenerative disease and metabolic disorders. **Current Neurovascular Research**, v. 18, n. 1, p. 134, 2021.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANACH, C. *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Agricultural and Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 230S-242S, 2005.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185-195, 2014.

MANSUR, J. S. *et al.* Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol**, p. 121-4, 1986.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Secondary metabolism engineering. Optimization of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Biotechnol. Sci. Dev**, v. 10, p. 24-28, 1999.

MBUNDE, M. V. N. *et al.* Ethnobotanical survey and toxicity evaluation of medicinal plants used for fungal remedy in the Southern Highlands of Tanzania. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 84, 2017.

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

MERILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. Understanding the Regulatory Mechanism of Secondary Metabolite Production. **Biotechnology: Secondary Metabolites**, p. 1830, 2007.

MOHAMED, M. A. *et al.* In silico assessment of the druggability of two novel germacranolides isolated from *Capparis decidua* (Forsk.) as carbonic anhydrase II inhibitors. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 1, p. 093-097, 2017.

MOTTA, L. F.; PINTO, C. H. S.; ARAUJO, L. F. Análise Farmacocinética e Toxicológica in silico para Derivados do Ácido Cinâmico. In: **OPEN SCIENCE RESEARCH X**. Editora Científica Digital, 2023. p. 749-765.

MUTEEB, G. *et al.* Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, p. 1615, 2023.

MUTHUSAMY, G. *et al.* Ferulic acid reverses ABCB1-mediated paclitaxel resistance in MDR cell lines. **European journal of pharmacology**, v. 786, p. 194-203, 2016.

NADAL, J. M. *et al.* Dispersões sólidas atomizadas contendo ácido ferúlico: análise comparativa de três carreadores, dissolução *in vitro*, potencial antioxidante e efeito antiplaquetário *in vivo*. **Desenvolvimento de Medicamentos e Farmácia Industrial**, v. 42, n. 11, pág. 1813-1824, 2016.

NIKAS, I. P.; PASCHOU, S. A.; RYU, H. S. The role of nicotinamide in cancer chemoprevention and therapy. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 477, 2020.

ODEYEMI, S.; BRADLEY, G. Medicinal plants used for the traditional management of diabetes in the Eastern Cape, South Africa: pharmacology and toxicology. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2759, 2018.

OKEKE, I. N. *et al.* The scope of the antimicrobial resistance challenge. **The Lancet**, v. 403, n. 10442, p. 2426-2438, 2024.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 77-82, 2006.

ORAK, H. H. *et al.* Antioxidant potential and phenolic compounds of some widely consumed Turkish white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 4, 2016.

PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical safety and efficacy of novel antifungal, fosmanogepix, for the treatment of candidaemia: results from a Phase 2 trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 10, p. 2471-2480, 2023.

PAREEK, V.; GUPTA, R.; PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 90, p. 739-749, 2018.

PETER J. Advancements in Drug Formulation: Innovations Shaping the Future of Medicine. **Journal of Pharmaceutical Research and Clinical Practice**, v. 6(3). p. 62–65, 2023.

PINHO, S.; MIRANDA, I. M.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S. Global Epidemiology of Invasive Infections by Uncommon Candida Species: A Systematic Review. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 8, p. 558, 2024.

PRADEEPKIRAN, J. A.; SAINATH, S. B.; SHRIKANYA, K. V. L. *In silico* validation and ADMET analysis for the best lead molecules. In: **Brucella Melitensis**. Academic Press, 2021. p. 133-176.

PRATEEK S. *et al.* Cinnamic acid derivatives: a new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 403-423, 2011.

PubChem Open Chemistry Database, NIH, NLM. Ferulic acid. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>. Acesso: fev. 2023.

RAJ, N. D.; SINGH, D. A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. **Health Sciences Review**, p. 100063, 2022.

RAMAWAT, K. G.; MATHUR, M. Factors affecting production of secondary metabolites. In: **Biotechnology: secondary metabolites**. Enfield: Science Publishers Inc., 2007. p. 59-102.

RANGEL, M. *et al.* Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

RECHNER, A. R.; PANNALA, A. S.; RICE-EVANS, C. A. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids *in vivo*. **Free Radical Research**, v. 35, n. 2, p. 195-202, 2001.

REX, A.; FINK, H. Pharmacokinetic aspects of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in rats. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 13, n. 10, p. 3735-3741, 2008.

RONDINI, L. *et al.* Sulfated ferulic acid is the main *in vivo* metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3037-3041, 2002.

RONDINI, L. *et al.* Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4338-4343, 2004.

ROSAZZA, J. P. N. *et al.* Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 457-471, 1995.

ROY, C. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infection. **Antibiotics in laboratory medicine**, 1991.

RUDDARAJU, L. K. *et al.* A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 42-59, 2020.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **Jmaj**, v. 52, n. 2, p. 103-108, 2009.

- SALEHI, B. *et al.* Cucurbita plants: from farm to industry. **Applied Sciences**, v. 9, n. 16, p. 3387, 2019.
- SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, p. 995-1006, 2016.
- SATO, F. *et al.* Secondary metabolites and biotechnology in plants. In: **Agrobiotechnology and plant tissue culture. Proceedings of the Asia-Pacific Conference on Plant Tissue Culture and Agrobiotechnology, Singapore, December 2000**. Science Publishers, Inc., 2003. p. 97-104.
- SHAH, A.; SETH, A. K. In silico identification of novel flavonoids targeting epidermal growth factor receptor. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 18, n. 1, p. 75-82, 2021.
- SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. **Journal of Food Bioactives**, v. 4, p. 11-68-11-68, 2018.
- SHAKEEL, F. *et al.* Solubility and thermodynamics of ferulic acid in different neat solvents: Measurement, correlation and molecular interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 236, p. 144-150, 2017.
- SHIH, Y. H. *et al.* Activation of deoxyribonuclease I by nicotinamide as a new strategy to attenuate tetracycline-resistant biofilms of cutibacterium acnes. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 819, 2021.
- SIDDIQUI, Z. N. *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.
- DE SOUZA, J. E.; CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Bioavailability of phenolic compounds: A major challenge for drug development? **Rev. Fitos**, v. 9, p. 1-72, 2015.
- SPAGNOLO, F.; TRUJILLO, M.; DENNEHY, J. J. Why do antibiotics exist? **MBio**, v. 12, n. 6, p. e01966-21, 2021.
- SWAPNA, B.; MADDILETI, D.; NANGIA, A. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 11, p. 5991-6005, 2014.
- TAIZ, L. *et al.* **Plant physiology and development**. Sinauer Associates Incorporated, 2015.
- THAPA, R. K.; KIM, J. OH. Nanomedicine-based commercial formulations: Current developments and future prospects. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 53, n. 1, p. 19-33, 2023.
- THIPPARABOINA, R. *et al.* Ionic, neutral, and hybrid acid-base crystalline adducts of lamotrigine with improved pharmaceutical performance. **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 12, p. 5816-5826, 2015.
- TOSTI, G. *et al.* The Role of nicotinamide as chemo-preventive agent in NMSCs: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 16, n. 1, p. 100, 2023.
- TRESSERRA-RIMBAU, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; MORENO, J. J. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. **Biochemical Pharmacology**, v. 156, p. 186-195, 2018.
- TUASHA, N.; PETROS, B.; ASFAW, Z. Medicinal plants used by traditional healers to treat malignancies and other human ailments in Dalle District, Sidama Zone, Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2018.
- TUNG MUNNITHUM, D. *et al.* Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.
- UNGERSTEDT, J. S.; BLOMBÄCK, M.; SÖDERSTRÖM, T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 131, n. 1, p. 48-52, 2003.
- VAKILINEZHAD, M. A. *et al.* Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer's disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 165-177, 2018.
- VAN NORMAN, G. A. Drugs, devices, and the FDA: part 1: an overview of approval processes for drugs. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 1, n. 3, p. 170-179, 2016.

- VERAS, K. S. *et al.* Oral Pharmacokinetics of Hydroxycinnamic Acids: An Updated Review. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2663, 2022.
- WANG, J. *et al.* Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1069-1075, 2011.
- WILLIAMS, A. C. *et al.* Nicotinamide, NAD (P)(H), and methyl-group homeostasis evolved and became a determinant of ageing diseases: hypotheses and lessons from pellagra. **Current Gerontology and Geriatrics Research**, v. 2012, 2012.
- WOOD, P. J.; FULCHER, R. G.; STONE, B. A. Studies on the specificity of interaction of cereal cell wall components with Congo Red and Calcofluor. Specific detection and histochemistry of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan. **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 2, p. 95-110, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. World Health Organization, 2022.
- XING, X. *et al.* Effect of nicotinamide against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 595, 2019.
- YAN, J. J. *et al.* Protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 89-96, 2001.
- YAN, N. *et al.* Pharmacokinetic study of ferulic acid following transdermal or intragastric administration in rats. **Aaps Pharmscitech**, v. 21, p. 1-7, 2020.
- ZAGO, J. A. A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 828-833, 2009.
- ZHAO, S. *et al.* Preparation of ferulic acid from corn bran: Its improved extraction and purification by membrane separation. **Food and Bioprocess Processing**, v. 92, n. 3, p. 309-313, 2014.
- ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Digestion and absorption of ferulic acid sugar esters in rat gastrointestinal tract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5534-5539, 2003.
- ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 11, p. 3083-3088, 2004.
- ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 691-702, 2008.
- ZHONG, B. *et al.* Graphene-encapsulated magnetic nanoparticles for safe and steady delivery of ferulic acid in diabetic mice. **Chemical Engineering Journal**, v. 435, p. 134466, 2022.
- ZIDAN, A. S.; AHMED, O. A. A.; ALJAEID, B. M. Nicotinamide polymeric nanoemulsified systems: a quality-by-design case study for a sustained antimicrobial activity. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1501-1516, 2016.