UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

NAIZA SARAIVA FARIAS

CANFENO: SÍNTESE DE DERIVADOS VIA ARILAÇÃO HECK-MATSUDA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO FRENTE A *Candida* spp.

CRATO/CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

CANFENO: SÍNTESE DE DERIVADOS VIA ARILAÇÃO HECK-MATSUDA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO FRENTE A *Candida* spp.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Química Biológica.

Orientadora: Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Coorientadora: Dra. Maria Audilene de Freitas

CRATO/CE

2026

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO AUTOR ATRAVÉS DO SISTEMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

Farias, Naiza Saraiva

F224c CANFENO: SÍNTESE DE DERIVADOS VIA ARILAÇÃO HECK-MATSUDA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO FRENTE A *Candida* spp. / Naiza Saraiva Farias. Crato - CE, 2026.

101p. il.

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Coorientador(a): Prof.ª Dr.ª Maria Audilene de Freitas

1.Heck-Matsuda, 2.Terpenos, 3.Atividade antifúngica, 4.*Candida albicans* , 5.*Candida tropicalis*; I.Título.

CDD: 572.8

https://www.urca.br/ficha-catalografica/ficha.html

NAIZA SARAIVA FARIAS

CANFENO: SÍNTESE DE DERIVADOS VIA ARILAÇÃO HECK-MATSUDA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO FRENTE A *Candida* spp.

.

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Química Biológica.

Dissertação defendida em: 23 de fevereiro de 2026

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA
Data: 10/04/2026 14:57:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

(Orientadora - Universidade Regional do Cariri – URCA)

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARIA AUDILENE DE FREITAS
Data: 10/04/2026 17:00:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Maria Audilene de Freitas

(Coorientadora - Universidade Regional do Cariri – URCA)

Documento assinado digitalmente
gov.br
FABIOLA FERNANDES GALVAO RODRIGUES
Data: 15/04/2026 20:06:56-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

(Membra Titular Interna – Universidade Regional do Cariri – URCA)

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro

(Membra Titular Externa – Universidade Federal do Cariri -UFCA)

Profa. Dra. Antonia Thassya Lucas dos Santos

(Membra Suplente Interna – Universidade Regional do Cariri – URCA)

Profa. Dra. Viviane Bezerra da Silva

(Membra Suplente Externa ao programa - Universidade Regional do Cariri – URCA)

Dedico este trabalho a minha família e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha trajetória acadêmica até aqui.

“Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que não conheço e comunicar ou anunciar a novidade” - Paulo Freire.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 –Estrutura do canfeno.....33

MANUSCRITO: Eficácia antifúngica contra cepas de *Candida* spp. e síntese via arilação Heck-Matsuda de derivados do tipo aril-canfeno

Figura 1- Curva de crescimento fúngico de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* expostas ao canfeno, derivados e ao fluconazol de forma intrínseca e combinada.....44
Figura 2 - Efeito do canfeno, derivados e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.....46
Figura 3 - Transição morfológica de *Candida albicans*.....47
Figura 4 - Transição morfológica de *Candida tropicalis*.....48
Figura 5 - Esquema de numeração e atribuição completa dos sinais de RMN de H^1 (vermelho) e C^{13} (azul) (a). Principais correlações HMBC (b) e NOESY (c) observadas para o aduto HM **3a**.....50

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1 - Espectro de massa do composto **3a**.....87
Figura S2 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3a**.....87
Figura S3 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3a**.....88
Figura S4 - Espectro RMN H,H-COSY do composto **3a** em $CDCl_3$.....88
Figura S5 - Espectro NOESY RMN do composto **3a** em $CDCl_3$.....89
Figura S6 - Espectro HMQC RMN do composto **3a** em $CDCl_3$.....89
Figura S7 - Espectro HMBC RMN do composto **3a** em $CDCl_3$.....90
Figura S8 - Espectro de massa do composto **3b**.....90
Figura S9 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3b**.....91
Figura S10 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3b**.....91
Figura S11 - Espectro RMN H,H-COSY do composto **3b** em $CDCl_3$.....92
Figura S12 - Espectro RMN NOESY do composto **3b** em $CDCl_3$.....92
Figura S13 - Espectro RMN HMQC do composto **3b** em $CDCl_3$.....93
Figura S14 - Espectro RMN HMBC do composto **3b** em $CDCl_3$.....93

Figura S15 - Espectro de massa do composto **3c**.....94
Figura S16 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3c**.....94
Figura S17 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3c**.....95
Figura S18 - Espectro de massa do composto **3d**.....95
Figura S19 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3d**.....96
Figura S20 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3d**.....96
Figura S21 - Espectro de massa do composto **3e**.....97
Figura S22 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3e**.....97
Figura S23 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3e.**.....98
Figura S24 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3f**.....98
Figura S25 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3f**.....99
Figura S26 - Espectro de massa do composto **3e**.....99
Figura S27 - Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3g**.....100
Figura S28 - Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3g.**.....100

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

Tabela 1 - Escopo da diversificação em estágio final do canfeno (**1**) via arilação Heck-Matsuda.....42

Tabela 2 – Concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) do canfeno, derivados, fluconazol e suas combinações contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (μg/mL).....45

Esquema 1 - Justificativa para a formação de adutos HM (*E*)-**3a-g**.....51

AB – Ágar Bacteriológico

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CA – *Candida albicans*

CAN - Canfeno

$CDCl_3$ - Clorofórmio deuterado

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

COSY - Correlated Spectroscopy

CM - Concentração Matriz

CSD - Caldo Sabouraud Dextrose

CT - *Candida tropicalis*

DMSO - dimethyl sulfoxide

EtOH - Etanol

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing

FCZ – Fluconazol

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HM – Heck Matsuda

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HRMS - High-Resolution Mass Spectrometry

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

CI_{50} – Concentração inibitória de 50 %

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

NaCl – Cloreto de sódio

NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OMS – Organização Mundial de Saúde

p - Para

PDA - Potato Dextrose Ágar

Pd(OAc) - Acetato de Paládio

PNs - Produtos Naturais

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

S1- Supplementary Information

URM - University Recife Mycology

YPD - Yeast extract Peptone Dextrose

$ZnCO_3$ - Carbonato de Zinco

δ - Deslocamento químico em ppm

υ - upsilon

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 19
1.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA 19
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO 21
2. OBJETIVOS 22
2.1. OBJETIVO GERAL 22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
2.3. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS 22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 25
3.1. INFECÇÕES FÚNGICAS 25
3.2. GÊNERO *Candida* 25
3.2.1. *Candida albicans* 26
3.2.2. *Candida tropicalis* 27
3.2.3. Virulência fúngica e indução da transição morfológica 27
3.3. ANTIFUNGOTERAPIA E RESISTÊNCIA 28
3.3.1. Antifúngicos e mecanismos de ação 28
3.3.2. *Candida* spp. e mecanismos de resistência aos antifúngicos 30
3.4. O USO DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS COMO FONTE TERAPÊUTICA 31
3.4.1. Terpenos 32
3.4.2. Canfeno 32
3.5. SÍNTESE POR ARILAÇÃO DE HECK-MATSUDA 33
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA 35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 64
5.1. ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA 64
5.2. CONCLUSÕES GERAIS 66
5.3. PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS 67
6. REFERÊNCIAS 68
7. ANEXOS e APÊNDICES 77

Canfeno: síntese de derivados via arilação Heck-Matsuda e avaliação do potencial antifúngico frente a *Candida* spp.

O aumento de infecções em humanos ocasionadas por *Candida* spp., aliada ao aumento da resistência aos antifúngicos emerge a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas capazes de combater tais infecções e reverter esse cenário. Nesse sentido, destaca-se o desenvolvimento de pesquisas com produtos de origem natural, sintética e semissintética. Com base nessa perspectiva e nas propriedades antimicrobianas do canfeno, um composto oriundo do óleo essencial de diversas plantas, o objetivo desse trabalho foi realizar a síntese e caracterização de derivados do canfeno e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* desses compostos frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A síntese foi realizada por meio da técnica de arilação de Heck-Matsuda, através da reação entre a molécula do canfeno e sais de diazônio e a caracterização feita por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e espectroscopia de infravermelho. Para a avaliação da atividade antifúngica foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, em concentrações que variaram de 512 a 1 µg/mL, a partir da qual foi determinada a curva de crescimento fúngico e a concentração inibitória de 50% dos compostos sozinhos e, em concentração subinibitória, combinados ao fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada por subcultivo da microdiluição em placas de Petri e os ensaios de transição morfológica foram feitos por cultivo em câmaras úmidas. Como resultados da síntese, a reação proporcionou a formação de sete derivados aril-canfeno (adutos HM **3a-g**) com rendimentos bons (48%) e excelentes (98%), respectivamente, em tempo de reação curto e condições aeróbicas moderadas. Para os ensaios antifúngicos, além do canfeno, foram utilizados os derivados aduto HM **3a** e o aduto HM **3b**. Como resultados, contra *C. albicans* o canfeno apresentou efeito em concentração mais baixa que o fármaco controle, fluconazol, não se observando o mesmo contra *C. tropicalis*. Os derivados aduto HM **3a** e o aduto HM **3b** apresentaram efeito inferior ao fluconazol contra ambas as cepas. No entanto, analisando as concentrações em que inibiram 50 % do crescimento fúngico, considera-se que esses compostos demonstram ação antifúngica relevante. Em associação com o fluconazol, o canfeno e o aduto HM **3a** foram capazes de potencializar a ação desse fármaco contra *C. albicans*. E contra *C. tropicalis*, todos os compostos em combinação como o fluconazol, potencializaram discretamente o efeito desse fármaco, havendo efeito fungicida nas combinações canfeno e fluconazol e aduto HM **3a** e fluconazol, ambas na concentração de 512 µg/mL. Quanto ao fator de virulência, transição morfológica, contra *C. albicans*, apenas o canfeno na concentração de 1024 µg/mL foi capaz de inibir esse mecanismo de virulência. Já contra *C. tropicalis*, a transição morfológica foi totalmente inibida pela ação dos compostos em ambas as concentrações avaliadas (512 µg/mL e 1024 µg/mL). Dessa forma, a síntese deu origem a novos derivados do canfeno e derivados já descritos anteriormente na literatura, a caracterização estrutural por RMN e FTIR permitiu validar a identidade química dos compostos. Os resultados dos ensaios antifúngicos sugerem potencial bioativo do canfeno e derivados frente a *C. albicans* e *C. tropicalis*. No entanto, a adição de um grupo aril (conjugado com olefina na posição C-8) na estrutura do canfeno é prejudicial à sua eficácia antifúngica contra as cepas de *Candida* spp. avaliadas. Contribuindo para a redução da atividade antifúngica observada nos adutos HM **3a-b.**

Palavras-Chave: Heck-Matsuda. Terpenos. Atividade antifúngica. *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Transição morfológica.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)

Camphene: synthesis of derivatives via Heck-Matsuda arylation and evaluation of antifungal potential against *Candida* spp.

The increase in human infections caused by *Candida* spp., combined with the increase in resistance to antifungal drugs, highlights the need to develop new therapeutic approaches capable of combating these infections and reversing this scenario. In this sense, the development of research with products of natural, synthetic and semi-synthetic origin stands out. Based on this perspective and the antimicrobial properties of camphene, a compound originating from the essential oil of several plants, The objective of this work was to carry out the synthesis and characterization of camphene derivatives and evaluate the in vitro antifungal activity of these compounds against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The synthesis was carried out using the Heck-Matsuda arylation technique, through the reaction between the camphene molecule and diazonium salts and the characterization carried out by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and infrared spectroscopy. To evaluate antifungal activity, the broth microdilution technique was used in 96-well plates, at concentrations ranging from 512 to 1 µg/mL, from which the fungal growth curve and the 50% inhibitory concentration of the compounds alone and, in subinhibitory concentration, combined with fluconazole were determined. The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was determined by subculturing the microdilution in Petri dishes, and morphological transition tests were performed by culturing in humid chambers. As results of the synthesis, the reaction provided the formation of seven aryl-camphene derivatives (HM **3a-g** adducts) with good (48%) and excellent (98%) yields, respectively, in short reaction time and moderate aerobic conditions. For antifungal assays, in addition to camphene, the adduct derivatives HM **3a** and HM **3b** were used. As a result, against *C. albicans*, camphene showed an effect at a lower concentration than the control drug, fluconazole, but the same was not observed against *C. tropicalis*. The derivatives adduct HM **3a** and adduct HM **3b** showed a lower effect than fluconazole against both strains. However, analyzing the concentrations at which they inhibited 50% of fungal growth, these compounds are considered to demonstrate relevant antifungal activity. In association with fluconazole, camphene and the HM adduct **3a** were able to potentiate the action of this drug against *C. albicans*. Against *C. tropicalis*, all compounds in combination with fluconazole slightly enhanced the effect of this drug, with a fungicidal effect observed in the combinations of camphene and fluconazole and adduct HM **3a** and fluconazole, both at a concentration of 512 µg/mL. As for the virulence factor, morphological transition, against *C. albicans*, only camphene at a concentration of 1024 µg/mL was able to inhibit this virulence mechanism. Against *C. tropicalis*, the morphological transition was completely inhibited by the action of the compounds at both concentrations evaluated (512 µg/mL and 1024 µg/mL). In this way, the synthesis gave rise to new camphene derivatives and derivatives previously described in the literature. Structural characterization by NMR and FTIR allowed the chemical identity of the compounds to be validated. The results of antifungal tests suggest the bioactive potential of camphene and derivatives against *C. albicans* and *C. tropicalis*. However, the addition of an aryl group (conjugated with olefin at position C-8) in the camphene structure is detrimental to its antifungal efficacy against strains of *Candida* spp. evaluated. Contributing to the reduction in antifungal activity observed in HM **3a-b** adducts.

Keywords: Heck-Matsuda. Terpenes. Antifungal activity. *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Morphological transition.

Acknowledgments: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Ceará Foundation for Support to Scientific and Technological Development (FUNCAP).

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

As infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* representam um crescente desafio para os sistemas de saúde em nível global, especialmente em populações imunocomprometidas e hospitalizadas. O aumento da resistência aos antifúngicos de uso clínico, como o fluconazol, compromete a eficácia dos tratamentos disponíveis e contribui para o crescimento dessas infecções. Com isso, cresce também a busca por novas moléculas bioativas com potencial antifúngico, sejam elas de origens naturais ou sintéticas. O canfeno, é uma molécula presente em óleos essenciais de plantas como como *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus carnosus* (Tomilho) e *Zingiber officinale* (Gengibre). Alguns estudos farmacológicos demonstram que esse composto possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumoral e expectorantes, características que despertam o interesse de investigação como fonte de novas moléculas com aplicação antifúngica. Assim, este trabalho realizou a síntese de moléculas derivadas do canfeno com o objetivo de avaliar o potencial antifúngico dessas moléculas frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis,* consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2022, como patógenos fúngicos prioritários no contexto de saúde global. Como resultados dessa investigação, constatamos que a combinação do canfeno e de seus derivados com o fluconazol, um antifúngico convencional utilizado pelos sistemas de saúde, demonstrou potencializar a ação desse fármaco, sendo este resultado bastante relevante, considerando o aumento da resistência a esse medicamento e a busca por reverter os mecanismos dessa resistência. Além disso, o canfeno e seus derivados inibiram a transição morfológica de *C. tropicalis*, um importante fator de virulência associado a invasão de tecidos de humanos e alguns animais durante a infecção. Assim, acreditamos que os resultados desta investigação são de suma importância para a comunidade cientifica e a sociedade em geral, pois sugerem potencial bioativo do canfeno e derivados para o desenvolvimento de aplicações terapêuticas e reversão da resistência fúngica de espécies de *Candida* ao fluconazol.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

O desenvolvimento de métodos sintéticos confiáveis e versáteis para a montagem eficiente de moléculas estruturalmente complexas e diversas, com relevância biológica e farmacológica, tem aumentado significativamente dentro da química orgânica (Zhang *et al*., 2023). Considerando essa perspectiva, realizamos a síntese de derivados do canfeno, por meio do método de reação por arilação de Heck-Matsuda. O canfeno, molécula de partida para a síntese, é um constituinte do óleo essencial de plantas como *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) e *Zingiber officinale* (Gengibre) (Okhale *et al*., 2021; Hachlafi *et al*., 2023), e de acordo com estudos da literatura apresenta algumas propriedades biológicas como ação antimicrobiana, antiinflamatória e anticancerígena (Gadotti; Huang; Zamponi, 2021; Stamatiou *et al*., 2024; Girola *et al*., 2015). O canfeno utilizado para o estudo foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich®. Reações do tipo Heck são estratégias sintéticas de acoplamento que forma ligações C-C entre alcenos e haletos de arila/alquenila sob a ação de um catalisador de paládio e uma base, essas reações são versáteis e dão origem a diversos intermediários essenciais para a indústria farmacêutica e química (Anju; Neetha; Anilkumar, 2022).

Entre os tipos de reação Heck, está a reação por arilação de Heck-Matsuda, técnica que emprega a substituição de haletos de arila por sais reativos de arenodiazônio, fornecendo vantagens únicas em relação a clássica reação de Heck, como ser executada com ou sem ligantes de fosfina, assim como, sem a necessidade de bases. Além disso, possui tempo de reação reduzido devido à alta reatividade dos sais de arenodiazônio, e alto rendimento e eficiência, demonstrado na síntese de produtos naturais e de moléculas sintéticas relevantes (Souza-Ferrari *et al*., 2021; Oliveira; Correia, 2021; Shen *et al*., 2025; Matelienė *et al*., 2023).

O processo de síntese realizado neste estudo deu origem a sete derivados do canfeno, com rendimentos que variaram entre 48 e 98 %. Após esse processo, selecionamos o canfeno e os derivados aril-canfeno de maior rendimento, o aduto HM **3a** (95 %) e o aduto HM **3b** (98%), para avaliarmos o potencial antifúngico desses compostos frente a duas espécies do gênero *Candida*, sendo estas *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Os testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados de acordo com métodos padrões universais estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e pelo EUCAST (*European Committee on*

Antimicrobial Susceptibility testing) baseado em ensaios de microdiluição em caldo e disco difusão em ágar (Houšť; Havlíček; Spížek, 2020; Wiederhold, 2021).

Nesse estudo, utilizamos a técnica de microdiluição em caldo, ensaio de avaliação *in vitro*, no qual, placas contendo 96 poços são preenchidas com volumes idênticos de culturas líquidas de inóculo e droga, mas aumentando gradualmente a concentração da droga e com inóculo definido. Os resultados são determinados como a menor concentração da droga que inibe crescimento dos microrganismos, conhecida como MIC/CIM (Concentração Inibitória Mínima), que pode ser expressa em mg/L ou µg/mL (Magréault *et al*., 2022). Essa técnica é considerada o padrão ouro dos testes de susceptibilidade antifúngica (Houšť; Havlíček; Spížek, 2020).

Através desse método realizamos ensaios para verificar a curva de crescimento fúngico e a concentração inibitória de 50 % (IC_{50}) de acordo com as metodologias proposta pelo CLSI (2017), por Coutinho *et al*. (2008) e Morais-Braga *et al*. (2016). Esses ensaios possibilitaram avaliar a ação intrínseca dos compostos e em combinação com o fluconazol frente as cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*. A escolha do fluconazol, medicamento antifúngico pertencente a classe dos azóis, se justifica por ser o fármaco de primeira linha utilizado no tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* e pelo surgimento crescente de resistência a esse medicamento (Czajka *et al*., 2023).

A curva de crescimento fúngico da ação intrínseca e combinada foi estabelecida pela ordem crescente das concentrações analisadas. A partir desse ensaio foi possível, através de análise estatística, determinar a $IC_{50,}$ que consiste na capacidade que os compostos sozinhos ou associados ao fluconazol podem agir eliminando 50 % da população fúngica.(CLSI, 2017).

Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi utilizada a metodologia proposta por Fonseca *et al*. (2022). Esse ensaio é realizado através da subcultura das placas de microdiluição em placas contendo ágar Sabouraud. Os valores da CFM estabelecem a menor concentração de uma droga ou composto que inviabiliza o funcionamento das células fúngicas (Benkova; Soukup; Marek, 2020). Assim, nesta pesquisa, avaliamos se os compostos testados, isoladamente ou em combinação, apresentam ação fungicida, ou seja, se conseguem eliminar as células fúngicas, ou fungistática, quando apenas inibem o crescimento das colônias fúngicas sem comprometer permanentemente a viabilidade celular.

Espécies de *Candida* desenvolvem uma série de mecanismos que contribuem para a colonização e infecção no organismo humano. Entre esses mecanismos, está a transição morfológica, capacidade que espécies desse gênero possuem de transitar entre estados morfológicos distintos, como de levedura, hifas e pseudo-hifas (Czechowicz; Nowicka;

Nowicka, 2022; Costa *et al*., 2024). Visando a inibição desse mecanismo em *C. albicans* e *C. tropicalis*, realizamos o ensaio de inibição de transição morfológica de acordo com a metodologia de Carneiro *et al.* (2020). Esse teste foi realizado em câmaras úmidas contendo lâminas de microscopia estéreis, no qual colocamos os compostos na Concentração Matriz - CM (1024 μg/mL) e na CM/2 (512 μg/mL). Nas lâminas foram vertidas as soluções contendo meio empobrecido de nutrientes e os compostos nas respectivas concentrações. As câmaras foram colocas em estufa, e após o período de 24 horas, com auxílio de um microscópio óptico e software computacional verificamos se os compostos foram ou não capazes de inibir a transição morfológica das espécies analisadas.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação está estruturada nos seguintes tópicos:

- **Introdução geral**: é dividida nos subtópicos estratégias de pesquisa e estrutura da dissertação, e aborda uma discussão sobre os procedimentos metodológicos adotados para essa pesquisa,
- **Objetivos**: está subdividido em: objetivo geral, objetivos específicos e objetivos e questionamentos, e apresenta a finalidade e motivação desse estudo.
- **Fundamentação teórica**: é estruturada em 11 subtópicos e faz uma contextualização embasada na literatura sobre os eixos teóricos que fundamentam essa pesquisa.
- **Produção cientifica**: encontra-se a produção de um manuscrito que apresenta e divulga os resultados obtidos nesse estudo. Esse manuscrito foi traduzido a língua inglesa e posteriormente submetido a Revista ACS Omega, com Fator de Impacto 4,3.
- **Considerações finais**: composta por: aspectos gerais da produção científica, conclusões gerais e perspectivas de investigações futuras. De modo geral, destaca os resultados obtidos respondendo aos objetivos inicialmente estabelecidos e apresenta a contribuição do estudo e os possíveis direcionamentos para dar continuidade a essa investigação e futuramente gerar aplicabilidade prática.
- **Referências**: apresenta todas as fontes consultadas para a elaboração desse trabalho.
- **Apêndices e Anexos**: apresenta o material suplementar do manuscrito.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar derivados do canfeno e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* desses compostos frente a estirpes de *Candida* spp.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar a diversificação em estágio final do canfeno por meio da arilação Heck-Matsuda;
- Realizar a caracterização estrutural através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Identificar a Concentração capaz de inibir 50 % do crescimento de microrganismos (CI_{50}) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos e do fluconazol, classificando o tipo de ação (fungistática, fungicida ou ambas – dependente de concentração);
- Avaliar o efeito antifúngico (CI_{50} e CFM) resultante da combinação dos compostos, em concentração subinibitória, com o antifúngico fluconazol;
- Verificar a existência de efeito antivirulência pela ação dos compostos em relação a transição morfológica (pleomorfismo) de *Candida* spp.

2.3. OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

Infecções fúngicas são consideradas um grave problema de saúde em diversos países. Dados estimam que cerca de 6,5 milhões de pessoas são acometidas anualmente por infecções fúngicas invasivas e 3,8 milhões morrem em decorrência dessas infecções (Denning, 2024). Esse cenário crítico é influenciado por fatores como número crescente de pessoas imunossuprimidas, resistência aos antifúngicos aliada a opções terapêuticas limitadas e o surgimento de patógenos resultantes de alterações climáticas (Schikora-Tamarit; Gabaldón, 2024).

Um relatório elaborado pela Organização Mundial da Saúde - OMS em 2022, divulgou uma lista de patógenos fúngicos prioritários no contexto global, visando

direcionar esforços e priorizar o desenvolvimento de estudos e investimentos na área de infecções fúngicas e de resistência aos antifúngicos. Nesse relatório, os patógenos fúngicos foram classificados em três grupos de acordo com o nível de prioridade, sendo eles: crítico, alto e médio. Entre as espécies prioritárias, estão espécies do gênero *Candida*, descritas em todas as categorias (Loh; Lam, 2023; OMS, 2022).

Espécies desse gênero fúngico colonizam a microbiota humana de forma comensal, no entanto, podem se tornar patógenos oportunistas em indivíduos com sistema imune enfraquecido. Cerca de 90 % das infecções ocasionadas por *Candida* são atribuídas a espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), sendo *C. albicans* responsável por cerca de 50 % dessas infecções (Liu; Shao, 2024; Ahmady *et al.*, 2024).

O tratamento atualmente é condicionado a cinco classes de medicamentos: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e pirimidinas (Hetta *et al*., 2025). No entanto, o uso contínuo e profilático desses medicamentos tem levado ao desenvolvimento de resistência em várias espécies de *Candida* (Sharma; Nahar; Puri, 2025).

Considerando esse contexto, emerge a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam eficazes no tratamento dessas infecções. Entre as possíveis abordagens, destaca-se a utilização de compostos naturais, sintéticos e de terapia combinada (Khan *et al*., 2021). Ao contrário dos antibióticos, que são em maioria de origem natural, os medicamentos antifúngicos mais utilizados são de origem sintética (Vanreppelen *et al*., 2023). Embora compostos naturais apresentem menos efeitos colaterais, biocompatibilidade e custo reduzido de isolamento, a síntese de compostos fornece como vantagens, garantia de pureza, facilidade de produção em larga escala e um acervo de bibliotecas para triagens iniciais (Khan *et al*., 2021; Fernandes *et al*., 2021).

Diante dessa perspectiva, esse trabalho motivou-se pela necessidade de pesquisar e avaliar a ação antifúngica de substâncias, na tentativa de encontrar agentes bioativos e contribuir para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Assim, em parceria com o Grupo de estudos em Síntese Química Pura e Aplicada - GESQUIM, do departamento de química da Universidade Federal Da Paraíba (UFPB) foi realizada a síntese e caracterização de derivados do canfeno, com o objetivo de avaliar o perfil de atividade antifúngica desses compostos.

O canfeno é um monoterpeno presente no óleo essencial de plantas como *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus carnosus* (Tomilho) e *Valeriana officinalis* (Valeriana). Alguns estudos farmacológicos demonstram que esse composto possui

propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumoral e expectorantes (Carvalho *et al*., 2021; Hachlafi *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2022).

Dessa forma, essa investigação buscou responder aos seguintes questionamentos:

- O canfeno e derivados apresentam atividade antifúngica frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*? Para isso foi verificado se os compostos seriam capazes de agir sozinhos, de forma intrínseca, na inibição dessas cepas.
- Se possuem atividade antifúngica intrínseca, essa atividade é fungicida ou fungistática? Considerando que medicamentos antifúngicos fungicidas são capazes de eliminar a população fúngica e os fungistaticos, não eliminam, apenas inibem o crescimento da população fúngica.
- Se não apresentarem ação antifúngica intrínseca, podem apresentar ação em combinação com o antifúngico fluconazol? Considerando que a terapia combinada tem se mostrado uma alternativa para o combate de infecções fúngicas, avaliamos se os compostos podem ser utilizados como adjuvantes do fluconazol.
- A transição entre morfologias distintas como de leveduras para hifas é um importante fator de virulência em espécies como *C. albicans* e *C. tropicalis.* Considerando essa característica o canfeno e derivados podem atuar frente a inibição da transição morfológica dessas espécies?
- Com base na ausência ou presença de atividade antifúngica dos derivados, a inserção de um anel aromático e de grupamentos químicos favorece ou não o potencial bioativo desses compostos? Dado que, modificações estruturais podem aprimorar uma molécula original e melhorar o seu potencial bioativo.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. INFECÇÕES FÚNGICAS

Apesar de pouco estudados e compreendidos, os fungos possuem impacto significativo na saúde humana, causando infecções que acometem bilhões de pessoas e resultam em milhões de mortes anualmente (Brown *et al*., 2024). A falta de atenção a esse grupo de microrganismos e sua capacidade de patogênese é associada, principalmente a sua natureza oportunista, que permite organismos não virulentos se tornarem patogênicos e causarem infecções quando há perda da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (José; Periselneris; Brown, 2020; Rokas, 2022).

À medida que cresce o número de pessoas idosas, de pacientes gravemente doentes e de pessoas com comprometimento no sistema imune, aumenta a ocorrência de infecções fúngicas (Govrins; Lass-Flör, 2024). Além disso, a pandemia da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2), conhecida como COVID 19, resultou no aumento de coinfecções e superinfecções causadas por espécies dos gêneros fúngicos, *Aspergillus*, *Candida* e *Mucorales* (Hoenigl *et al*., 2022).

Infecções fúngicas podem ser superficiais ou sistêmicas, sendo superficiais quando acometem principalmente pele, mucosas e cavidade oral do hospedeiro e sistêmicas quando afetam tecidos profundos podendo levar ao estado de sepse (Hetta *et al*., 2025; Wu *et al*., 2022; Di Cosola *et al*., 2021).

Embora causem impactos severos a saúde humana, as infecções fúngicas são constantemente negligenciadas pelos órgãos de saúde pública e devido a isso, podem a vir sobrecarregar os sistemas de saúde (Smith *et al*., 2023). Esse fato reforça a necessidade de pesquisar sobre patógenos fúngicos, a fim de contribuir com a segurança global de saúde e aumentar a capacidade de desenvolver estratégias eficazes para o enfrentamento e controle das infecções fúngicas (Al Aboody; Mickymaray 2020; Thambugala *et al*., 2024).

3.2. GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo *Ascomycota* e inclui cerca de 200 espécies, das quais, aproximadamente 30 possuem relevância clínica (Tamo, 2020; Katsipoulaki *et al*., 2024**)**. *Candida* spp. são leveduras comensais que habitam a microbiota humana e

colonizam a pele e os tratos gastrointestinal, reprodutivo e respiratório dos indivíduos (Ahmed *et al*., 2022; Ahmady *et al*., 2024). Apesar de comensais, espécies desse gênero são consideradas oportunistas e podem se tornar patogênicas causando infecções quando há disfunções no sistema imune e ou disbiose na microbiota do hospedeiro (Lionakis; Drummond; Hohl, 2023). As infecções causadas por *Candida* spp. podem ser superficiais, como a candidíase cutânea e mucosa ou sistêmica, como a candidemia (Lu *et al*., 2023; Junior *et al*., 2024).

Entre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é responsável pela maioria dessas infecções (Zhang *et al*., 2024), entretanto, espécies como *Nakaseomyces glabrata* (denominada anteriormente como *C. glabrata), C. parapsilosis*, *C. tropicalis,* a recente *C. auris*, *C. dubliniensis* e *Pichia kudriavzevii* (anteriormente chamada *C. krusei*), se destacam atualmente no cenário clínico, devido apresentarem casos de infecção com altos índices de falha terapêutica, fator associado ao desenvolvimento de estratégias de virulência e resistência aos antifúngicos (Lim *et al*., 2021; Gómez-Gaviria; Ramírez-Sotelo; Mora-Montes, 2022; Gaffar; Valand; Girija, 2025).

3.2.1. *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo oportunista, categorizado pela OMS como patógeno de prioridade crítica, sendo uma das espécies de fungos mais comuns presentes na microbiota humana. Por ser comensal, *C. albicans* coloniza de forma assintomática a cavidade oral, pele e os tratos genital e gastrointestinal de indivíduos saudáveis (OMS, 2022; Macías-Paz *et al*., 2023).

No entanto, devido à natureza oportunista, pode causar infecções que vão desde superficiais a sistêmicas em indivíduos que apresentam comprometimento no sistema imune, como pacientes com HIV, câncer, em tratamento prolongado com antibióticos ou receptores de transplante de órgãos (Parambath *et al*., 2024; Wang *et al*., 2024).

C. albicans é responsável por aproximadamente 50 % das infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. (Zhang *et al*., 2024). A principal infecção associada a essa espécie é a candidíase vulvovaginal, que acomete cerca de 75 % das mulheres ao menos uma vez durante a idade reprodutiva (Kadosh; Mundodi, 2020; Macalpine; Lionakis, 2024). Além disso, *C. albicans* é responsável por provocar cerca de 40 % das infecções nosocomiais da corrente sanguínea, a nível global (Khan *et al*., 2021).

Essa espécie é polimórfica e pode existir em três formas: levedura, hifas e pseudo-hifas. Tanto a forma de levedura quanto a forma filamentosa hifal são essenciais para sua

patogênese (Kumar; Kumar, 2023; D'Enfert *et al*., 2021). A forma de levedura está envolvida na disseminação da infecção, enquanto a forma filamentosa é considerada invasiva, permitindo *C. albicans* penetrar as barreiras do hospedeiro e acessar os tecidos profundos (Zaongo *et al.*, 2023; Liang *et al*., 2023).

A formação de filamentos hifais é uma das principais características de *C. albicans* (Xiong; Goerlich; Mitchell, 2024) e essa capacidade de alternância entre a forma de levedura e a forma filamentosa/hifal, dificulta o tratamento antifúngico e aumenta a gravidade e persistência da candidíase (Pavic *et al.*, 2024). O azóis são a classe de primeira escolha para o tratamento de infecções ocasionadas por *C. albicans*, no entanto, é crescente a resistência de *C. albicans* a essa classe de antifúngicos (Fattouh *et al*., 2024).

3.2.2. *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é um fungo oportunista, categorizado pela OMS como patógeno fúngico de alta prioridade, e considerada uma das espécies mais patogênicas do gênero *Candida* (OMS, 2022; Siqueira *et al*., 2025). Assim como *C. albicans*, *C. tropicalis* é comensal e habita a cavidade oral, a pele e os tratos gastrointestinal e reprodutivo humano, e pode se tornar patogênica em condições clínicas específicas e causar infecções superficiais e ou sistêmicas (Wang *et al*., 2020; Xu, 2021).

Além disso, *C. tropicalis* também é encontrada nas formas de levedura, hifa e pseudo-hifas. E a capacidade de formar hifas e pseudo-hifas facilita a invasão tecidual e a patogênese dessa espécie (Queiroz *et al.*, 2023; Santos; Ishida, 2023).

C. tropicalis é o principal agente de infecções em pacientes com neutropenia e em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), além de ser comumente identificada como causa de candidemia e candidíase invasiva (Oliveira *et al*., 2020). Infecções por *C. tropicalis* são consideradas persistentes e resultam em maior permanência hospitalar e maior índice de mortalidade em relação a outras espécies de *Candida* (Oliveira *et al*., 2020; Sharma; Chakrabarti, 2023). Estudos recentes apontam que *C. tropicalis* tem apresentado perfil de resistência aos azóis, especialmente ao fluconazol, antifúngico mais utilizado na prática clínica (Siqueira *et al*., 2025; Silva-Rodrigues *et al*., 2024).

3.2.3. Virulência fúngica e indução da transição morfológica

A virulência é definida como o grau de dano que um microrganismo pode provocar e corresponde a uma medida resultante da interação entre micróbio, hospedeiro e ambiente. Além disso, não é uma característica constante, podendo ser intensificada, perdida ou restaurada (Siscar-Lewin; Hube; Brunke, 2022; Ciurea *et al*., 2020; Rokas, 2022). Essa virulência é determinada por alguns fatores, chamados fatores de virulência, que permitem a adesão e invasão pelos microrganismos patogênicos as células hospedeiras, suprimindo ou evitando as defesas imunológicas para o estabelecimento do processo infeccioso (Tsolis; Bäumler, 2020).

A expressão de adesinas e invasinas, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilme e a transição morfológica são alguns fatores de virulência de *Candida* spp. (Farhan *et al*., 2024; Robbins; Cowen, 2025; Singh *et al.*, 2021). Dentre esses, a transição morfológica é um fator crucial para a virulência e o estabelecimento de infecções ocasionadas por espécies de *Candida*, que possuem a capacidade de transitar entre formas morfológicos distintas, como de levedura para hifas ou pseudo-hifas (Szerencsé *et al*., 2020; Queiroz *et al*.,2023; Lew; Lin 2021).

Apenas algumas espécies de *Candida* são capazes de realizar transição morfológica da forma de levedura para forma filamentosa, entre elas, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis.* Espécies como *C. parapsilosis* e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) não formam hifas verdadeiras, no entanto, podem transitar entre as formas de levedura e pseudo-hifas, já *C. glabrata (Nakaseomyces glabrata*) não é capaz de formar hifas ou pseudo-hifas. Estudos recentes, demonstram que *C. auris* considerada incapaz de realizar filamentação, pode expressar pseudo-hifas em condições especificas (Ciurea *et al*., 2020; Gómez-Gaviria, Baruch-Martínez; Mora-montes, 2024; Gaffar; Valand; Girija, 2025).

Essa mudança de morfologia de *Candida* spp. pode ser desencadeada por fatores externos e internos, como alterações genéticas e epigenéticas, ausência de nutrientes, temperatura elevada (37 °C), níveis elevados de CO_2 e *N* -acetilglucosamina, pH alcalino/neutro, presença de soro e hipoxia (Kumpakha; Gordon, 2022; Padder *et al*., 2022).

3.3. ANTIFUNGOTERAPIA E RESISTÊNCIA

3.3.1. Antifúngicos e mecanismos de ação

Atualmente o tratamento das infecções fúngicas é limitado principalmente a cinco classes de antifúngicos, azóis, equinocandinas, análogos de pirimidina, polienos e alilaminas (Hoenigl *et al.*, 2024; Hetta *et al*., 2025).

Os azóis são a classe de medicamentos antifúngicos mais comumente utilizada na prática clínica. Os medicamentos pertencentes a essa classe, atuam inibindo a ação da enzima lanosterol 14α-desmetilase, responsável pela modificação do lanosterol em ergosterol, um dos principais componentes da membrana celular fúngica. Com o bloqueio da síntese do ergosterol, há o acúmulo de esteróis tóxicos e a integridade da membrana fúngica é prejudicada (Ahmady *et al*., 2024; Gaffar; Valand; Girija, 2025).

Os azóis são divididos em dois grupos: Imidazóis (clotrimazol, cetoconazol econazol, miconazol e tioconazol) e Triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol e posaconazol). Dentre esses, o fluconazol é o antifúngico mais comumente utilizado no tratamento das infecções fúngicas devido fatores como baixa toxicidade ao hospedeiro, alta solubilidade em água, aumento de biodisponibilidade e baixo custo (García-García; Boróbia, 2021; Jamiu *et al*., 2021; Siqueira *et al*., 2025).

As equinocandinas, classe derivada de produtos naturais semissintéticos exibe ação fungicida e atua na inibição da biossíntese da enzima β-(1,3) -d–glucano sintase, uma das principais enzimas da parede celular fúngica. Essa ação resulta em um desequilíbrio estrutural na parede celular do fungo, ocasionando inibição do crescimento ou morte por instabilidade osmótica. Caspofungina, micafungina e anidulafungina são exemplos de medicamentos pertencentes a essa classe (Puumala *et al.*, 2024; Czajka *et al*., 2023).

Flucitosina (ou 5-flucitosina), um derivado sintético de pirimidina é absorvido na célula fúngica pela enzima citosina permease e convertido em 5- fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina desaminase. O 5-FU é um composto tóxico que atua inibindo a síntese de RNA e DNA (Carmo *et al*., 2023; Hetta *et al*., 2025). A flucitosina é usada em combinação com a anfotericina B, sendo recomendado o uso combinado em infecções especificas (Barantsevich; Barantsevich, 2022).

Os polienos são antifúngicos fungicidas oriundos de bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces.* Esse medicamento tem como alvo a membrana da célula fúngica, atuando através da formação de poros no ergosterol que vão promover o vazamento de solutos/íons promovendo consequentemente a morte das células fúngicas. Os principais polienos são a anfotericina B e a nistatina (Ahmady *et al*., 2024; Hetta *et al*., 2025).

As alilaminas são agentes antifúngicos que atuam de forma semelhante aos azóis, inibindo a biossíntese do ergosterol, no entanto, através de mecanismos distintos. Essa

classe tem como alvo a enzima esqualeno epoxidase que está presente nas etapas iniciais da via de síntese do ergosterol (Halat *et al*., 2022; Vanreppelen *et al.*, 2023). As alilaminas possuem ação fungicida contra dermatófitos e fungistática contra *Candida* spp. tendo como principais representantes a terbinafina e a naftifina (Hetta *et al*., 2025; Fernandes *et al*., 2021).

3.3.2. *Candida* spp. e mecanismos de resistência aos antifúngicos

Dada a escassez de antifúngicos, a resistência fúngica aos medicamentos disponíveis para a terapia antifúngica é um problema emergente (Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023). A resistência aos antifúngicos é dividida em resistência intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é uma característica inerente de algumas espécies fúngicas que não são suscetíveis a alguns antifúngicos, independente de exposição prévia. Já a resistência adquirida ocorre ao longo do tempo, como resultado da exposição a medicamentos antifúngicos em espécies previamente suscetíveis (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Gupta; Venkataraman, 2022).

Os fungos desenvolvem resistência aos antifúngicos por meio de diversos mecanismos (Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023). Em espécies de *Candida*, os mecanismos de resistência aos azóis frequentemente descrito são mutações ou superexpressão dos genes *ERG11* que codificam a lanosterol 14-α-desmetilase e a regulação positiva das bombas de efluxo, *MDR* e *CDRs* (Hetta *et al*., 2025; Sharma; Nahar; Puri, 2025).

À medida que houve um crescimento no número de espécies de *Candida* resistentes aos azóis, a aplicação de equinocandinas no tratamento de infecções causadas por essas espécies foi expandida. A forma mais comum de resistência de *Candida* spp. as equinocandinas é a ocorrência de mutações em regiões especificas dos genes *FKS*, que codificam a enzima β1-3 glucano sintase, resultando na diminuição da sensibilidade a esses medicamentos (Czajka *et al*., 2023; Mroczyńska; Brillowska-Dąbrowska, 2020).

A 5-flucitosina é eficaz contra várias espécies de *Candida*, e a resistência a esse medicamento é reduzida quando utilizada em combinação com a anfotericina B. No entanto, o uso prologado de monoterapia com flucitosina aumenta a ocorrência de resistência (Barantsevich; Barantsevich, 2022; Padda; Pammar, 2024). Entre os mecanismos envolvidos nesse processo, estão mutações nos genes *FCY1*, *FCY2* e *FUR1* responsáveis pela ativação da citosina permease, citosina desaminase ou uracil fosforibosiltransferase (Ahmady *et al*., 2024; Sigera; Denning, 2023).

A resistência aos polienos é rara, mesmo essa classe estando disponível a décadas para uso terapêutico. No entanto, em *Candid*a spp. a resistência é associada principalmente a mutações na família de genes *ERG*, que atuam na biossíntese do ergosterol. Alterações na biossíntese do ergosterol pode levar a diminuição desse componente e ao acúmulo de esteróis alternativos (Carolus *et al*., 2020; Lee; Robbins; Cowen, 2023).

Assim como nos polienos, a resistência as alilaminas é pouco relatada, no entanto, há estudos que expõem a resistência da terbinafina a dermatófitos, tendo como principais mecanismo mutações pontuais nos genes *ERG1* (Sagatova, 2021).

O desenvolvimento de novos antifúngicos é dificultado pela natureza eucariótica dos fungos, o que reduz o número de alvos específicos, aumenta o risco de reações adversas e indica a necessidade de identificar mecanismos bioquímicos exclusivo dos patógenos para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (Saini *et al*., 2025; Fernandes *et al*., 2021).

3.4. O USO DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS COMO FONTE TERAPÊUTICA

Produtos naturais (PNs) são compostos biologicamente ativos oriundas de fontes naturais como plantas, microrganismos e organismos marinhos (Zhang *et al*., 2024). Ao longo da história, os PNs e seus derivados sintéticos e semissintéticos têm desempenhado um papel significativo na descoberta de medicamentos e no tratamento de doenças (Gallo *et al*., 2023; Najmi *et al*., 2022).

As plantas destacam-se por serem uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos (Naeem *et al.*, 2022). A utilização desses compostos como fonte terapêutica foi possível através dos avanços da química moderna que permitiu o isolamento, a identificação e a caracterização de moléculas bioativas especificas dos PNs (Lanier; Andersen; Hamberger, 2023; Gangwal; Lavecchia, 2025). Essas moléculas podem ser utilizadas diretamente como fármacos, ou sofrerem determinada(s) modificação (ões) estrutural (ais) que permita o aprimoramento do composto original, a fim de atender as exigências terapêuticas, desempenhando, assim, um papel fundamental na descoberta de novos fármacos (Chopra; Dhingra, 2021).

Entre os diversos medicamentos oriundos de PNs aprovados e distribuídos pelo mercado farmacêutico, está a anfotericina B, um antifúngico oriundo da bactéria *Streptomyces nodosus*, a Citarabina (Ara-C), um agente antileucêmico oriundo da esponja

marinha *Cryptotheca crypta*, e o Paclitaxel, um agente anticancerígeno isolado da planta T*axus brevifolia* (Chaachouay; Zidane, 2024; Chopra; Dhingra, 2021).

3.4.1. Terpenos

Os terpenos, são uma classe de compostos de origem natural encontrado nas plantas e constitui uma das maiores famílias de compostos naturais descritos no mundo, com cerca de 80.000 moléculas identificadas (He *et al.*, 2020; Liu *et al*., 2023). Essa classe, ajuda na proteção das plantas contra estresses abióticos e bióticos e apresenta diversas aplicações no setor industrial (Khanam *et al*., 2025). São formados por unidades de isopreno (C5H8) que garantem a diversidade estrutural dessa classe (Masyita *et al*., 2022; Aljaafari *et al*., 2021).

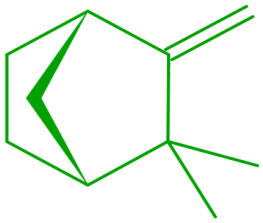
De acordo com a quantidade dessas unidades os terpenos são classificados em: Hemi (C_5), mono- (C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}) e tetra- (C_{40}) terpenos (Sousa *et al*., 2023; Montero-Fernández *et al*., 2025). Dentre essa classificação, destacam-se os monoterpenos, grupo com maior diversidade estrutural e predominantemente encontrados em óleos essenciais, devido baixo peso molecular (Alvarenga *et al*., 2023; Masyita *et al*., 2022). De acordo com sua estrutura são classificados em: alifáticos (sem anel), monocíclicos (um anel) e bicíclicos (dois anéis) (Siddiqui *et al*., 2024).

Muitos monoterpenos e derivados são utilizados pela indústria farmacêutica, como fonte de medicamentos utilizados no tratamento de diversa doenças. Evidências cientificas mostram que compostos pertencentes a esse grupo apresentem uma variedade de atividades farmacológicas, entre elas, atividade antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, anticoagulante, analgésica, anticancerígena e hipoglicêmica (Wojtunik-Kulesza, 2022; Paulino *et al*., 2022; Alvarenga *et al*., 2023).

3.4.2. Canfeno

O canfeno (Figura 1) é um monoterpeno bicíclico (2,2-dimetil-3-metileno-biciclo) de forma molecular $C_{10}H_{16}$ encontrado no óleo essencial de plantas como, *Rosmarinus officinalis* (Alecrim); *Valeriana officinalis* (Valeriana) e *Zingiber officinale* (gengibre) (Feng *et al*., 2019; Okhale *et al*., 2021. Hachlafi *et al*., 2023).

Figura 1 - Estrutura do canfeno



Fonte: Farias *et al*., 2026 (adaptado).

Esse composto é aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como aditivo alimentar e de fragrâncias (Self *et al*., 2022). Além disso, tem sido amplamente utilizado como substância de partida para a síntese de biomoléculas (Yang *et al*., 2020).

Estudos da literatura cientifica apontam que o canfeno possui propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, analgésicas, antinoceptivas, anticancerígenas, expectorantes e cardioprotetoras (Gadotti; Huang; Zamponi, 2021; Stamatiou *et al*., 2024; Girola *et al*., 2015).

3.5. SÍNTESE POR ARILAÇÃO DE HECK-MATSUDA

A síntese e derivatização a partir de produtos naturais, é uma estratégia importante para a descoberta de novos moléculas com potencial bioativo. Nesse sentido. diversas técnicas são empregadas para esse processo, entre elas, a diversificação em estágio tardio, que proporciona a redução das rotas sintéticas, rápidas alterações nas propriedades das moléculas e via de obtenção mais eficiente (Hong, Luo; Lei, 2020).

Um método que possibilita essa diversificação em estágio tardio é a reação de Heck, método sintético importante dentro da química orgânica que se caracteriza pelo acoplamento entre alcenos e haletos de arila, catalisado por paládio para a formação de ligações C-C. Esse tipo de reação é uma das estratégias mais versáteis e populares para a formulação de moléculas complexas, utilizada na síntese de produtos naturais, químicos e farmacêuticos (Wang *et al.*, 2021; Vucetic *et al*., 2022). Apesar do bom rendimento, essa reação necessita de ligantes fosfina, altas temperaturas e períodos longos de reação (Souza-Ferrari *et al*., 2021).

A presença de pelo menos um grupo arila em moléculas farmacológicas e terapeuticamente ativas destaca a importância das reações de arilação (Bibi; Khan; Hassan, 2022). Entre essas reações está a reação por arilação de Heck-Matsuda, uma

variação prática e versátil da reação de Heck, que consiste em substituir haletos de arila por sais reativos de arenodiazônio (Oliveira *et al*., 2020; Souza-Ferrari *et al*., 2021).

Os sais de arenodiazônio são altamente reativos, o que reduz o tempo de reação e caracteriza uma das vantagens dessa reação. Além disso, a reação de Heck-Matsuda possui excelentes rendimentos, e pode ser executada com ou sem ligantes de fosfina, assim como, sem a necessidade de bases (Oliveira; Correia, 2021; Matelienė *et al*., 2023).

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

MANUSCRITO – Eficácia antifúngica contra cepas de *Candida* spp. e síntese via arilação Heck-Matsuda de derivados do tipo aril-canfeno

Autores: Naiza Saraiva Farias, Laryssa de Souza-Salgado, Francisco Bernardo de Barros, Maria Alicy Neres de Oliveira, Francildo dos Santos Silva, Marcia Jordana Ferreira Macedo, João Pedro Alves Torres, Henrique Douglas Melo Coutinho, Jailton de Souza-Ferrari, Maria Audilene de Freitas, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga.

Revista: ACS omega

Fator de impacto: 4.3

Situação: Aceito

RESUMO

O rápido crescimento das infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. associadas à resistência antimicrobiana requer o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para combater essas infecções. O canfeno é um composto derivado dos óleos essenciais de várias plantas e possui propriedades antimicrobianas. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi realizar a diversificação em estágio avançado do canfeno por meio da arilação Heck-Matsuda (HM) altamente estereosseletiva e avaliar a atividade antifúngica desses derivados contra *Candida* spp. A reação proporcionou acesso direto a sete derivados de aril-canfeno (adutos HM **3a-g**) com rendimentos bons a excelentes (48 a 98 %), em tempos de reação curtos sob condições moderadas e aeróbicas. Para os ensaios antifúngicos foram selecionados o canfeno e os derivados com maior rendimento, o aduto HM **3a** e o aduto HM **3b.** Dentre os compostos, o canfeno apresentou a melhor atividade antifúngica intrínseca, superando o fluconazol (FCZ) contra *o C. albicans.* Em associação com o FCZ, tanto o canfeno quanto o aduto HM **3a** potencializaram significativamente a ação do fármaco, com redução expressiva da Concentração Inibitória média (IC_{50}). Nos ensaios para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), apenas a combinação canfeno e FCZ foi fungicida para *C. albicans*. Já para *C. tropicalis* houve ação fungicida pelas combinações do canfeno e FCZ e do aduto HM **3a** e FCZ. A transição morfológica de levedura para hifas e/ou pseudohifas em *C. albicans* foi inibida apenas pelo canfeno. Em *C. tropicalis,* a filamentação foi completamente inibida pela ação do canfeno e seus derivados nas concentrações avaliadas. Em conjunto, estes resultados sugerem que o canfeno e seus adutos HM (**3a-b**) avaliados, podem ser candidatos promissores para o desenvolvimento de agentes antifúngicos, especialmente, em terapias combinadas com fluconazol.

Palavras-chave: Diversificação em estágio avançado. Reação Heck-Matsuda. Terpenos. *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Resistência a fungos. Antipleomorfismo

1. INTRODUÇÃO

Candida spp. são fungos comensais e oportunistas que estão presentes na microbiota humana, colonizando principalmente a pele e os tratos gastrointestinal e reprodutivo humano. Em condições normais do corpo humano essas espécies não causam nenhum dano ao hospedeiro, no entanto, podem se tornar patógenos oportunistas quando há alterações na microbiota ou sistema imune do hospedeiro, levando ao desenvolvimento de infecções que vão desde superficiais a sistêmicas [1-2].

A capacidade de escapar da resposta imune do hospedeiro é um fator crucial para a patogenicidade de *Candida* spp. Alterações na morfologia, expressão de adesinas, formação de biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas estão entre os principais fatores que promovem a colonização, adesão, invasão e danos ao organismo humano [3-5]. Esses mecanismos associados ao aumento expressivo de indivíduos com o sistema imune comprometido têm levado ao crescimento vertiginoso de infecções fúngicas ocasionadas por *Candida* spp. [6-7].

Apesar do alto impacto que essas infecções causam à saúde e ao bem-estar humano as opções terapêuticas são limitadas a cinco classes de medicamentos: azóis, análogos de pirimidina equinocandinas, flucitosina e polienos [8-9]. A classe dos azóis é comumente preferida para o tratamento de infecções por *Candida*, com destaque para o fluconazol, fármaco bastante utilizado pelo sistema de saúde devido ao seu baixo custo e à sua baixa toxicidade [10-11]. No entanto, espécies de *Candida* tem desenvolvido resistência a essas classes de medicamentos, sendo a resistência aos azóis mais prevalente em função do seu amplo uso e da sua natureza fungistática [12-13].

Assim, o aumento das infecções associadas à resistência fúngica constitui um grave problema para os sistemas de saúde e exige o desenvolvimento urgente de novas moléculas bioativas com potencial antifúngico [14]. Portanto, as investigações de produtos naturais ou produtos sintéticos de base biológica tornaram-se boas alternativas para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, seja de forma intrínseca ou em combinação com outros medicamentos [15-16].

O canfeno pertence à classe dos terpenos e é originário dos óleos essenciais de plantas, como alecrim (*Rosmarinus officinalis*), valeriana (*Valeriana officinalis*) e gengibre (*Zingiber officinale*) [17-19]. Investigações biológicas demonstraram que esse composto e seus derivados têm propriedades antimicrobianas, analgésicas e antitumorais descritas [20-23], especialmente derivados do tipo canfeno-tiossemicarbazona contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* [24-25].

Apesar do potencial biológico do canfeno para o desenvolvimento de novos protótipos antimicrobianos, apenas um único estudo explorou a derivatização estrutural em estágio final

desse produto natural [26]. Dado o nosso interesse em explorar a arilação de Heck-Matsuda (HM) como uma estratégia para a diversificação estrutural em estágio final de produtos naturais biorrelevantes [27], decidimos revisitar a síntese de derivados do tipo aril-canfeno de base biológica por meio dessa abordagem para entender seu escopo e estereosseletividade.

Portanto, considerando o cenário de aumento das infecções causadas por *Candida* spp., o aumento da resistência fúngica, a necessidade de desenvolver novos agentes antifúngicos e as propriedades biológicas do canfeno, o objetivo deste estudo foi explorar a diversificação em estágio final do canfeno por meio da arilação HM e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do canfeno e seus derivados, isolados e combinados com fluconazol, contra cepas de *Candida* spp.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. **Estudos químicos**

2.1.1. Seção Experimental

Todos os detalhes experimentais, métodos gerais (cromatografia e instrumentação) empregados nos estudos sintéticos da diversificação estrutural de estágio final do canfeno e a tabulação dos dados analíticos e espectrais de cada composto podem ser encontrados no arquivo de Informações Suplementares (S.I.).

2.1.2. Síntese química

Procedimento geral para a arilação Heck-Matsuda do canfeno (1). Para a síntese dos derivados do tipo aril-canfeno foi realizado um procedimento típico: Um tubo de ensaio de 20 mL sob uma atmosfera de ar (frasco aberto) equipado com uma barra de agitação magnética (4,4 x 9,8 mm) foi carregado, nesta ordem, com uma solução de canfeno (**1**; 68. 12 mg; 0,5 mmol; 1,0 equiv.) em 3 mL de etanol absoluto, $ZnCO_3$ (94 mg; 0,75 mmol; 1,5 equiv.) e $Pd(OAc)_2$ (11,2 mg; 0,05 mmol; 0,1 equiv.; 10 mol%). A mistura foi agitada por aproximadamente 5 minutos a 40 °C para formar o pré-catalisador, depois disso o sal de arenediazônio correspondente (**2a-g**; 0,75 mmol; 1,5 equiv.) foi adicionado em uma porção e a mistura de reação foi agitada a 40 °C até que a análise de TLC indicasse o consumo completo da olefina. Após 1 h, a mistura foi filtrada através de uma pequena almofada de sílica gel (3,0 x 3,0 cm) eluída com acetato de etila (4 x 10 mL) e concentrada no vácuo. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia em coluna flash (em gel de sílica; 3,0 x 12 cm) com

hexano/Et2O (98:2, v/v) como eluente para fornecer os adutos HM **3a-b** ou apenas hexano como eluente para fornecer os adutos HM **3c-g**. Os dados espectrais completos de cada composto podem ser encontrados no arquivo S.I. Os dados analíticos e espectroscópicos dos derivados do tipo aril-canfeno **3b-e** são semelhantes aos relatados anteriormente [26]. Os dados físicos e espectroscópicos de **3f-g** estão sendo descritos aqui pela primeira vez.

2.2. Ensaios antifúngicos *in vitro*

2.2.1. Compostos, meios de cultura e reagentes

Para os ensaios antifúngicos, além do canfeno, foram selecionados os seus derivados aduto HM **3a** e aduto HM **3b** em função da disponibilidade quantitativa de material. O antifúngico fluconazol foi a droga de escolha para atuar como controle e foi adquirido da VIRUPAKSHA ORGANIC LIMITED (Gaddapotharam Village – Índia).

Para os ensaios antifúngicos foram utilizados os meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Himedia, Mumbai, Índia) e Caldo Sabouraud Dextrose (CSD, KASVI, Laboratórios Conda SA, Madrid, Espanha) duplamente concentrado, preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. O Potato Dextrose Ágar (PDA, KASVI, Laboratórios Conda SA, Madrid, Espanha), o Ágar Bacteriológico (AB, ISOFAR, Rio de Janeiro, Brasil) e o Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD, Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram utilizados para a análise da transição morfológica. Todos os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave vertical, a 121 °C por 15 min. Além disso, para análise da transição morfológica também foram utilizados Soro Fetal Bovino Estéril (Laborclin, Paraná, Brasil) e Tween 80 PS (Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo, Brasil).

Os compostos e o fluconazol foram pesados em 0,01 g e dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), posteriormente diluídos em meio CSD para compor a concentração inicial de 1024 µg/mL.

2.2.2. Microrganismos

Foram utilizadas duas cepas fúngicas: a linhagem padrão *Candida albicans* INCQS 40006 (CA INCQS 40006) – ATCC 10231, obtida da Coleção de Culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), e a linhagem isolada *Candida tropicalis* URM 4262 (CT URM 4262) proveniente da

Coleção de Culturas da Micoteca de Recife (URM – University Recife Mycology) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

2.2.3. Preparo do inóculo

Para os ensaios de microdiluição as cepas fúngicas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio ASD a 35 ºC por 24 h. Posteriormente, os microrganismos foram adicionados a tubos de ensaio contendo 4 mL de solução salina (0,9 % NaCl) e ajustados e comparados com o padrão de turbidez da escala de McFarland a 0,5 (1×10^{8} UFC/mL) [28]. Para os ensaios da inibição de virulência fúngica, as leveduras foram reativadas em meio YPD acrescido de 5 % de soro fetal bovino, e posteriormente cultivadas em meio ASD a 37 °C por 24 h.

2.2.4. Curva de crescimento fúngico e determinação da Concentração Inibitória de 50 % (IC_{50})

Para determinação da curva de crescimento fúngico e da Concentração Inibitória de 50% (IC_{50}) foi utilizado o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 100 µL das substâncias ou fluconazol em concentrações que variaram de 512 a 1 µg/mL, e 100 µL de CSD contendo inóculo fúngico [28 com modificações nas concentrações]. Os dois últimos poços foram utilizados para verificar o controle de crescimento fúngico (11°) e de esterilidade (12°). Além disso, também foram feitas placas de controle de diluição dos produtos, contendo salina em substituição do inóculo fúngico. Posteriormente, todas as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h, e logo após, lidas em espectrofotômetro ELISA (Termoplate®, Kasuaki, China) em comprimento de onda de 630 nm [29].

2.2.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi determinada para avaliar o efeito intrínseco e combinado dos compostos e do fluconazol frente a viabilidade celular das linhagens de *Candida*. Placas contendo ASD foram divididas em quadrantes por um cartão guia fixado na parte externa inferior da placa. Para cada quadrante foram transferidos 10 µL da solução da placa de microdiluição preparada para esse teste. Logo após, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após esse período foi realizado leitura visual, visando verificar a presença ou ausência de crescimento das colônias

de *Candida.* A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento das colônias fúngicas [30].

2.2.6. Avaliação da atividade combinada dos compostos com fluconazol

Para avalição do efeito modificador da ação do fluconazol foi utilizado o método proposto por Coutinho e colaboradores [31] com algumas modificações. Os compostos foram testados com base na Concentração Matriz subinibitória (CM/8). As placas foram preenchidas com 100 µL de solução contendo meio, composto e inóculo e 100 µL de fluconazol diluído em concentrações que variaram de 512 a 1 µg/mL. Também foram realizados controle de crescimento, esterilidade e diluição dos compostos com o fluconazol. Todas as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h, e posteriormente realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 630 nm (ELISA, Termoplate®, Kasuaki, China) [29].

2.2.7. Efeito dos compostos e do fluconazol na transição morfológica de *Candida*.

Esse ensaio foi realizado para verificar se os compostos e o fluconazol são capazes de inibir a transição do estado morfológico de levedura para hifa nas linhagens de *Candida.* Para isso, câmaras úmidas foram preparadas com lâminas de microscopia estéreis. Soluções de 3 mL contendo meio PDA empobrecido com AB, Tween e Concentrações Matriz - CM (1024 µg/mL) e CM/2 (512 µg/mL) dos compostos e do fluconazol foram vertidas nas lâminas. Após solidificar, foram feitas subculturas fúngicas com duas estrias paralelas, sendo posteriormente cobertas com lamínula estéril e incubadas a 37 °C por 24 h. Também foram realizados controle de crescimento contendo apenas PDA empobrecido com AB e Tween. Após esse período as lâminas foram então visualizadas em microscópio óptico L-2000I-TRINO/6633 (Bioval, São Paulo, Brasil) nas objetivas de 4x e 10x e feita a captura das imagens. O comprimento total das estrias e filamentos expressos nas imagens foram analisados no software ToupView (ToupTek Photonics® - China) [32] com modificações.

2.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software *GraphPad prism* 9.0. Os dados foram expressos em médias geométricas e a significância estatística foi avaliada por ANOVA bidirecional seguido do teste *post hoc* de *Bonferroni* onde (p<0,05 e p<0,0001 são considerados

significativos e $p>5$ não significativo). Os valores de CI_{50} foram obtidos por regressão não linear.

Cinco imagens aleatórias de acordo com cada concentração foram selecionadas para realizar a medição do comprimento total das estrias e das estruturas hifais e ou pseudohifais. O comprimento médio dos filamentos foi calculado e analisado por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*, os valores foram verificados de acordo com a concentração do produto [32].

3. RESULTADOS

3.1.Química

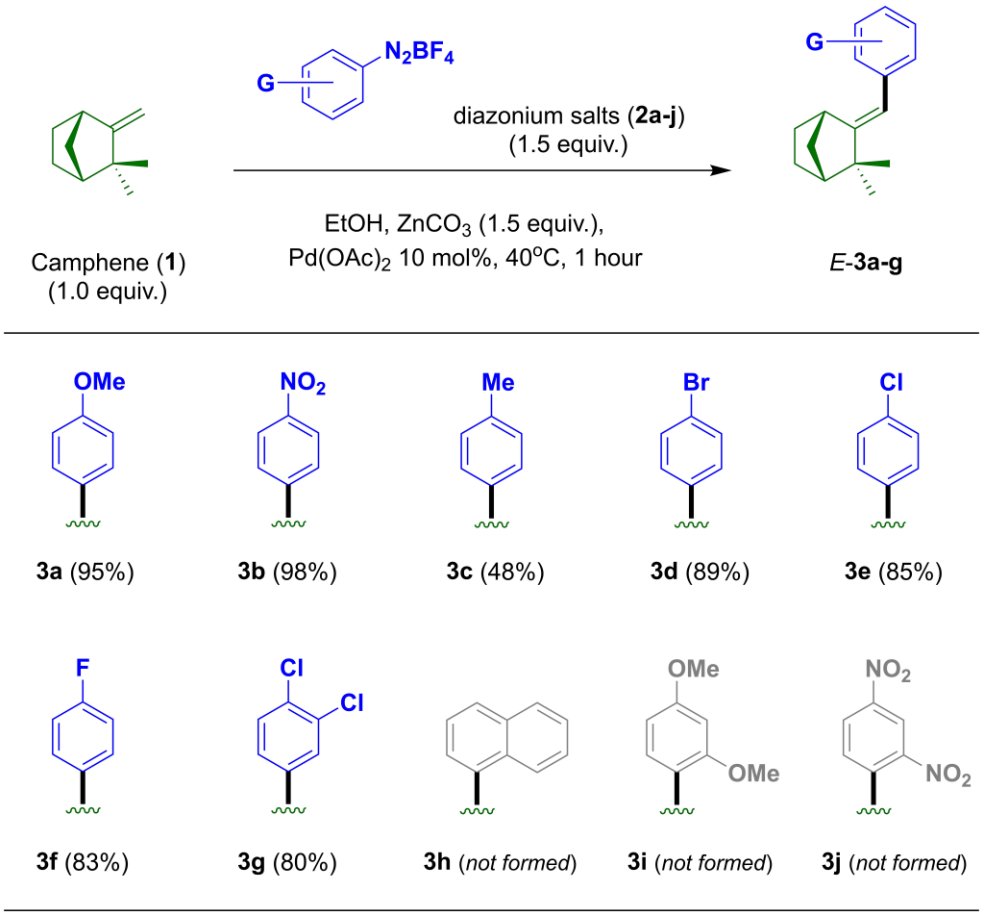
Síntese Química

O canfeno (**1**) é um monoterpeno abundante que está disponível comercialmente nas formas enantiomericamente pura e racêmica. No entanto, o custo comercial mais alto de suas versões opticamente ativas limita seu uso em estudos de otimização sintética e esforços de triagem biológica para a descoberta de medicamentos em estágio inicial. Além disso, embora a arilação HM do canfeno já tenha sido investigada no passado [26] , os rendimentos moderados obtidos e os tempos de reação de algumas horas deixaram espaço para otimização sintética adicional. Portanto, neste trabalho, revisitamos o escopo sintético da arilação HM do (±)-canfeno (**1**) com o objetivo de acessar derivados de aril-canfeno potencialmente relevantes para a prospecção antifúngica com baixo custo operacional e alta eficiência sintética.

Os estudos sintéticos começaram com a reação de Heck-Matsuda entre o (±)-canfeno (1) e o tetrafluoroborato de 4-metoxibenzenediazônio (**2a**) como parceiros de acoplamento modelo (Tabela 1). Inicialmente, motivado pela viabilidade de um protocolo relatado anteriormente [26], o sistema catalítico de Zhuangyu usando $Pd(OAc)_2$ (0,9 mol%) foi verificado (Tabela S1, entrada 1, consulte S.I. para obter detalhes). Entretanto, em nossas mãos, não foi possível replicar a funcionalidade desse sistema catalítico. Alterar o sistema catalítico orgânico-aquoso para um apenas orgânico, usando apenas EtOH como solvente, também não teve efeito (Tabela S1, entrada 2, S.I.). Por outro lado, o estudo do efeito da polaridade do álcool sobre o desempenho do meio de reação, o uso de condições de temperatura ambiente e a avaliação de 1,0-1,5 equiv. de algumas bases inorgânicas e 5-10 mol% de $Pd(OAc)_2$ possibilitaram a síntese do aduto HM (**3a**) em rendimentos baixos a moderados em apenas 1 hora (Tabela S1, entradas 3-9, consulte S.I. para obter detalhes). O isômero (*E*)-**3a** foi detectado

como o único produto por espectroscopia de RMN de ^{1}H. Com base nesses estudos, o EtOH foi estabelecido como o solvente de escolha, e a proporção estequiométrica ideal entre olefina e sal de diazônio foi verificada como 1,0:1,5, usando $Pd(OAc)_2$ (10 mol%) como pré-catalisador (entradas 7-8). Uma triagem adicional de 1,5 equiv. de bases inorgânicas conhecidas (Tabela S1, entradas 10-13, consulte o S.I. para obter detalhes), sob condições de aquecimento a 40 °C, mostrou a melhor eficiência sintética para a preparação de **3a** com 95 % de rendimento, usando $ZnCO_3$ como base (entrada 13). Tentativas de ajustar as condições de arilação HM, como a redução da carga de $Pd(OAc)_2$ de 10 para 5 mol % e a diminuição da quantidade de sal de diazônio de 1,5 para 1,2 equiv., provocaram uma deterioração significativa do rendimento (Tabela S1, entradas 14-15, consulte S.I. para obter detalhes).

Tabela 1- Escopo da diversificação em estágio final do canfeno (1) via arilação Heck-Matsuda



Com as condições adequadas estabelecidas, o escopo desse processo de arilação de Heck-Matsuda foi avaliado (Tabela 1). Inicialmente, o foco foi avaliar o efeito eletrônico dos substituintes em vários sais de diazônio. As reações de (±)-canfeno (**1**) com sais de

arenediazônio ricos e deficientes em elétrons (**2**) forneceram os derivados correspondentes do tipo aril-canfeno (adutos HM **3a-g**) como um único isômero geométrico, identificado como *E*, com rendimentos que variam de moderados a excelentes (até 98 %). Independentemente das influências estéricas, um baixo rendimento químico foi verificado apenas para o sal de *p*-metilbenzenodiazônio **2c** na síntese do aduto HM **3c** (48 %; Tabela 1). Entretanto, a redução da carga de $Pd(OAc)_2$ de 10 para 5 mol% possibilitou a obtenção desse aduto de HM também com um rendimento moderado (62 %; Tabela 1S, entrada 20, consulte S.I. para obter detalhes). A quimiosseletividade completa foi obtida na presença de sais de diazônio substituídos por halogênio (**3d-3g**; Tabela 1). Por exemplo, o derivado **3d** do 4-bromofenil-canfeno foi obtido com 89 % de rendimento e com alta estereosseletividade, tornando esse aduto HM um substrato valioso para outras reações de acoplamento cruzado. Ao contrário do efeito do elétron, o efeito estérico dos substituintes nos sais de arenediazônio teve um impacto dramático no processo de arilação de HM. A arilação de **1** com os sais de arenodiazônio orto-substituídos (**2h-j**) não produziu os adutos HM esperados, e a olefina permaneceu sem reação em todos os casos (**3h-j**; Tabela 1). Além disso, os rendimentos foram geralmente mais altos para os sais *para*-substituídos do que para os *meta*-substituídos, o que sugere uma clara dependência entre a eficiência sintética e o efeito estérico. Por fim, semelhante ao que foi observado para **3a**, apenas os isômeros *E* foram observados para os outros adutos HM, indicando que a arilação HM foi altamente estereosseletiva em favor da geometria *E*.

3.1. Ensaios antifúngicos

Os resultados obtidos a partir da análise da curva de crescimento fúngico e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) são apresentados na Figura 1 e Tabela 2. A Figura 1A mostra a curva de crescimento fúngico de CA INCQS 40006 e de CT URM 4262 em função das concentrações testadas de cada composto intrinsecamente. Para CA INCQS 40006, o fluconazol (FCZ), medicamento controle, inibiu o crescimento celular fúngico em 100% a uma concentração de 512 µg/mL. O canfeno (CAN) apresentou percentual de inibição de 98% (256 µg/mL), o derivado aduto HM **3a** inibiu o crescimento das células fúngicas em 86,5% (512 µg/mL) e o aduto HM **3b** inibiu em 82% (512 µg/mL). Para CT URM 4262, o FCZ apresentou 100% de inibição a uma concentração de 512 µg/mL. Na mesma concentração, o CAN apresentou 99% de inibição do crescimento fúngico, o aduto HM **3a** apresentou 86% e o aduto HM **3b** apresentou 74%.

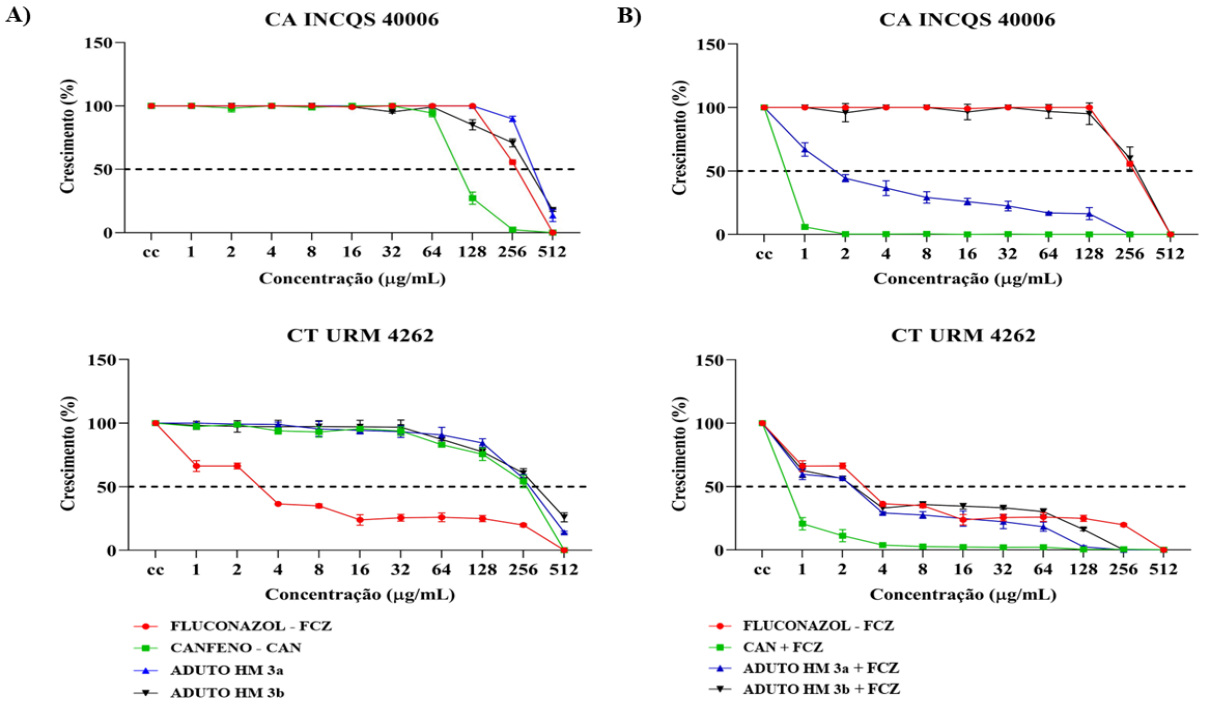


Figura 1. Curva de crescimento fúngico de *C. albicans* e *C. tropicalis* expostas ao canfeno, derivados e ao fluconazol de forma intrínseca e combinada. **A**. CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **B**. CT: *Candida tropicalis*; URM: – University Recife Mycology. CC: Controle de crescimento fúngico; FCZ: Fluconazol; CAN: Canfeno; HM: Heck Matsuda.

A Figura 1B mostra a curva de crescimento fúngico do CA INCQS 40006 e CT URM 4262 frente à ação combinada dos compostos com FCZ. Na atividade combinada contra CA INCQS 40006, a combinação CAN+FCZ potencializou o efeito inibitório da droga, alcançando 100% de inibição do crescimento fúngico na concentração de 16 µg/mL. A combinação aduto HM **3a**+FCZ também potencializou a ação do fármaco, com 100% de inibição do crescimento fúngico na concentração de 256 µg/mL. O aduto HM **3b**+FCZ não apresentou resultados significativos, obtendo 100% de inibição do crescimento fúngico na mesma concentração do medicamento (512 µg/mL). Contra CT URM 4262, a combinação CAN e FCZ inibiu o crescimento celular fúngico em 96% a uma concentração de 4 µg/mL. O aduto HM **3a**+FCZ apresentou 100% de inibição (256 µg/mL), resultado semelhante ao obtido contra CA INCQS 40006, e a combinação aduto HM **3b**+FCZ apresentou 99% de inibição (256 µg/mL).

A Tabela 2 apresenta os valores de CI_{50} obtidos através da curva de crescimento fúngico. Na atividade intrínseca, contra CA INCQS 40006, o FCZ exibiu CI_{50} a uma concentração de 256,7 µg/mL, o CAN obteve CI_{50} duas vezes menor que o FCZ, com 106,9 µg/mL. O aduto HM **3a** obteve uma CI_{50} mais elevada do que o FCZ, com 371,8 µg/mL, tal como o aduto HM **3b**, com uma CI_{50} de 323,0 µg/mL. Para CT URM 4262, o FCZ apresentou CI_{50} na concentração

de 3,177 μg/mL, enquanto o CAN obteve uma CI_{50} aproximadamente 70 vezes superior, com 222,3 μg/mL. O aduto HM **3a** apresentou uma CI_{50} superior à do FCZ, com 268,0 μg/mL, assim como o aduto HM **3b**, com uma CI_{50} de 294,3 μg/mL.

Na atividade combinada contra CA INCQS 40006, o CAN associado ao FCZ reduziu a CI_{50} deste fármaco de 256,7 μg/mL para 0,4901 μg/mL, e a combinação aduto HM **3a**+FCZ reduziu para 2,021 μg/mL. A combinação do aduto HM **3b**+FCZ aumentou a CI_{50} de 256,7 μg/mL para 272,7 μg/mL. Contra CT URM 4262, o CAN associado ao FCZ reduziu a CI_{50} de 3,177 μg/mL para 0,2832 μg/mL. O aduto HM **3a**+FCZ foi capaz de reduzir para 1,962 μg/mL, e o aduto HM **3b**+FCZ para 2,670 μg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do canfeno, derivados, fluconazol e suas combinações contra *Candida albicans* e *C. tropicalis* (μg/mL).

	CA INCQS 40006	**CT URM 4262**
FCZ	256.7	3.177
CANFENO	106.9	222.3
ADUTO HM 3a	371.8	268.0
ADUTO HM 3b	323.0	294.3
CAN + FCZ	0.4901	0.2832
ADUTO HM 3a + FCZ	2.021	1.962
ADUTO HM 3b + FCZ	272.7	2.670

CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: – University Recife Mycology; FCZ: Fluconazol; CAN: Canfeno; HM: Heck Matsuda. CAN + FCZ: Canfeno combinado com fluconazol; aduto HM **3a** + FCZ: aduto HM **3a** combinado com fluconazol; aduto HM **3b** + FCZ: aduto HM **3b** combinado com fluconazol.

Nos ensaios de CFM não foi possível observar efeito fungicida pela ação intrínseca dos compostos ou do FCZ; entretanto, nas combinações CAN+FCZ contra CA INCQS 40006 e CT URM 4262 e aduto HM **3a**+FCZ contra CT URM 4262, a CFM foi observado na concentração de 512 μg/mL.

Para a análise da transição morfológica, foi utilizado como parâmetro a alteração da forma de levedura para forma filamentosa (expressão de hifas e ou pseudo-hifas). Os resultados estatísticos são observados na Figura 2 A e B. O crescimento de hifas é expresso no controle do crescimento de ambas as cepas. O FCZ inibiu em 100% o desenvolvimento destas estruturas em CA INCQS 40006 e CT URM 4262 em todas as concentrações avaliadas. A Figura 2A mostra os resultados obtidos contra CA INCQS 40006; o CAN inibiu o crescimento dos

filamentos em 100% na CM, mas na CM/2 o resultado não foi significativo. O aduto HM **3a** reduziu cerca de 17% a transição morfológica de CA INCQS 40006 na CM. Em contraposição, houve um leve estímulo ao crescimento de filamentos na CM/2. O aduto HM **3b** não apresentou resultados significativos frente a inibição e redução das estruturas filamentosas de CA INCQS 40006. Já contra CT URM 4262 (Figura 2B), os compostos inibiram completamente a expressão do pleomorfismo, tanto na CM quanto na CM/2.

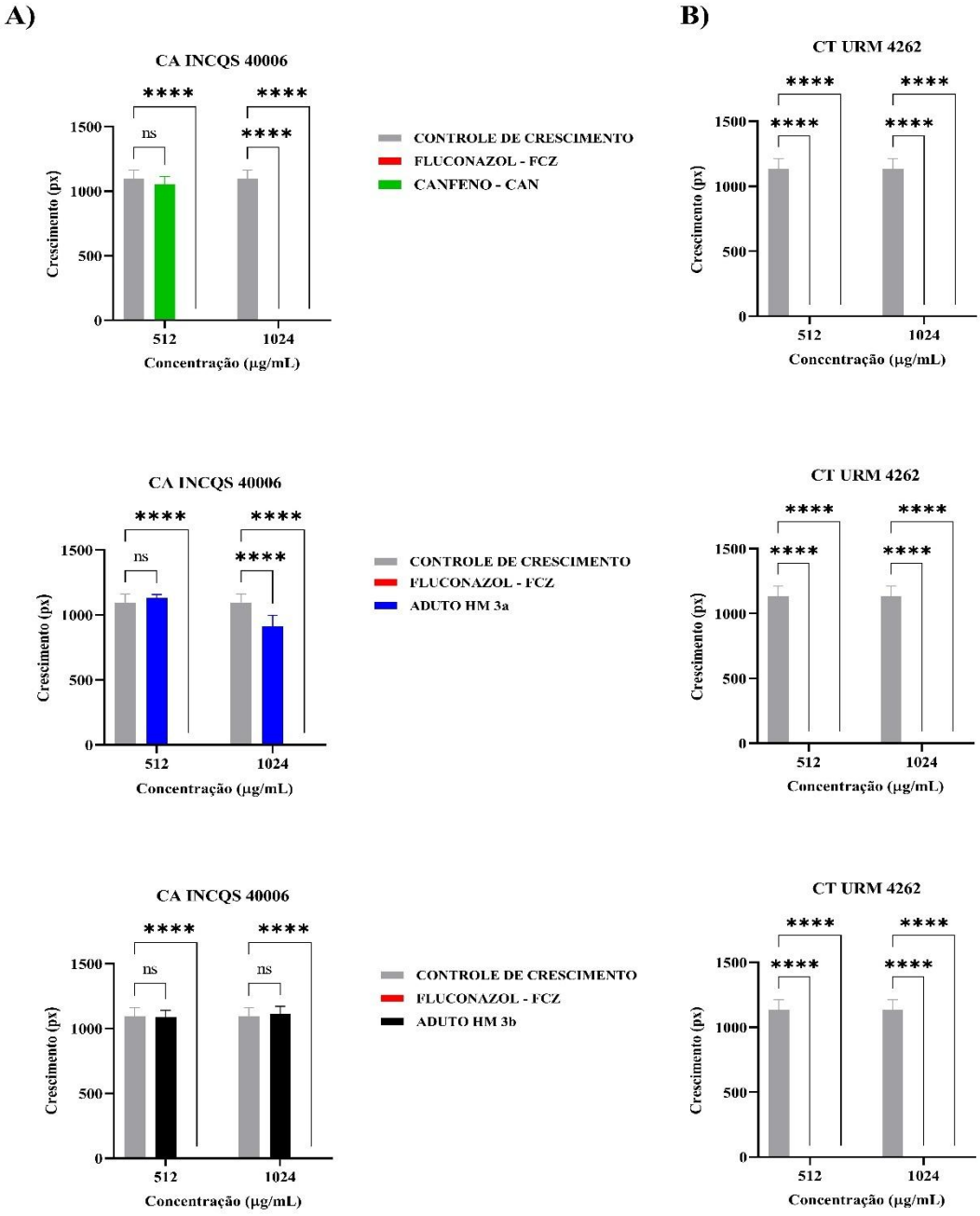


Figura 2. Efeito do canfeno, derivados e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis.* **A**. CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **B**. CT:

Candida tropicalis; URM: – University Recife Mycology. FCZ: Fluconazol; CAN: Canfeno; HM: Heck Matsuda; ns: não significativo; **** $p < 0,0001$—significância estatística.

As Figuras 3 e 4, obtidas por meio de microscopia óptica, validam os resultados estatísticos apresentados. A transição morfológica é adequadamente expressa no controle de crescimento do CA INCQS 40006 na Figura 3A. As Figuras 3 (B e C) mostram os resultados obtidos pelo FCZ, onde foi observada inibição total dos filamentos hifais e/ou pseudohifais em ambas as concentrações avaliadas. O CAN inibiu o pleomorfismo de CA INCQS 40006 na CM, conforme mostrado na Figura 3D, e reduziu levemente na CM/2 (Figura 3E).

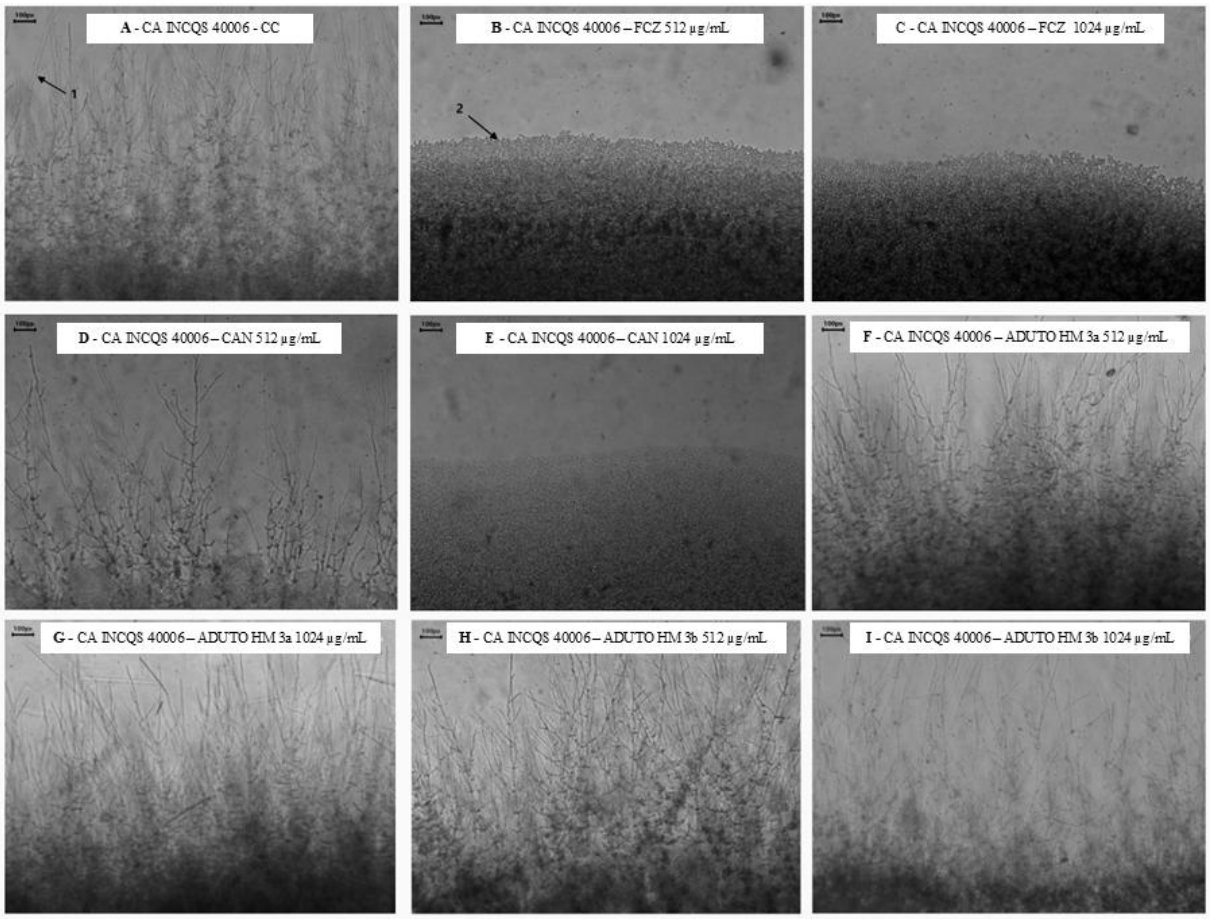


Figura 3. Transição morfológica de *Candida albicans*. CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; CC: Controle de crescimento; FCZ: fluconazol; CAN: Canfeno; HM: Heck Matsuda. As setas indicam estruturas filamentosas (**1**) e células de levedura (**2**). **A:** Controle de crescimento; **B-C**: FCZ (512 e 1024 µg/mL); **D-E**: CAN (512 e 1024 µg/mL); **F-G**: aduto HM **3a** (512 e 1024 µg/mL); **H-I**: aduto HM **3b** (512 e 1024 µg/mL). As imagens foram captadas através de microscopia óptica com ampliação de 10x.

A Figura 4A mostra o controle do crescimento do CT URM 4262, onde a emissão de estruturas filamentosas é evidente. As Figuras 4 (B e C) demonstram a inibição dos filamentos

pela ação do FCZ. A inibição total do crescimento dessas estruturas pela ação dos compostos nas concentrações CM e CM/2 é visualizada nas Figuras 4D a 4I.

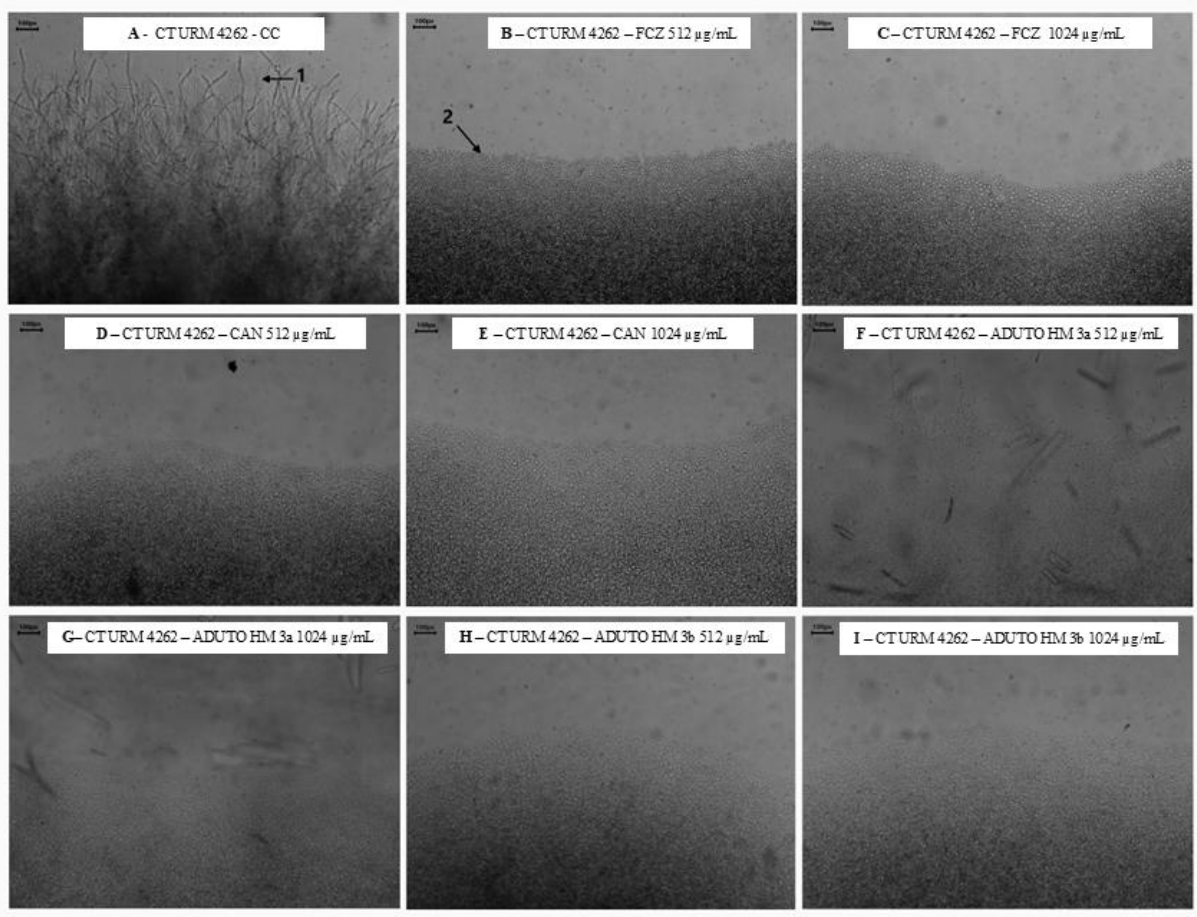


Figura 4. Transição morfológica de *Candida tropicalis*. CT: *Candida tropicalis*; URM: – University Recife Mycology; CC: Controle de crescimento; FCZ: fluconazol; CAN: Canfeno; HM: Heck Matsuda. As setas indicam estruturas filamentosas (**1**) e células de levedura (**2**). **A:** Controle de crescimento; **B-C**: FCZ (512 e 1024 µg/mL) **D-E**: CAN (512 e 1024 µg/mL); **F-G**: aduto HM **3a** (512 e 1024 µg/mL); **H-I**: aduto HM **3b** (512 e 1024 µg/mL). As imagens foram captadas através de microscopia óptica com ampliações de 10x

4. DISCUSSÃO

Estudos químicos

A fórmula molecular do aduto HM **3a** (derivado do tipo aril-canfeno) foi estabelecida como C17H22O por HRMS e análise elementar (consulte S.I. para obter detalhes). Essa constatação também foi apoiada por 15 sinais no espectro de RMN ^{13}C atribuíveis a dois grupos metil, um grupo metóxi, dois carbonos olefínicos, três grupos metileno, um carbono quaternário alifático, dois carbonos alifáticos CH e quatro sinais de carbonos aromáticos (com dois sinais de átomos de carbono magneticamente equivalentes), de acordo com os dados relatados na

literatura para compostos do tipo canfeno 8-substituído (Yong *et al*., 1991). Os dados de RMN 1D para **3a** apresentaram muitas semelhanças com os dados para o canfeno (**1**), exceto pelo desaparecimento de um dos sinais relacionados aos hidrogênios olefínicos H-8, que foi substituído na posição C-8 pelo grupo *p*-metoxifenil, dando origem ao aparecimento de sinais de hidrogênios aromáticos e metoxílicos. A presença de grupos aromáticos e olefínicos também foi confirmada pela espectroscopia de infravermelho do derivado **3a** (υ = 3038, 2952, 1509 e 1462 cm^{-1}).

A regioquímica e a geometria *E* da ligação dupla do derivado do tipo aril-canfeno **3a** foram atribuídas sem ambiguidade por meio de uma investigação espectroscópica de RMN abrangente usando métodos 2D e foram estendidas aos outros adutos de HM (**3b-g**). Uma combinação de experimentos H,H-COSY, HSQC, HMBC e NOESY permitiu uma atribuição de sinal completa para os compostos **3a** (Figura 5a). O esquema de numeração refere-se à atribuição de sinal usada nas Informações de apoio (Tabela S2) e na discussão. A correlação de longo alcance HMBC entre H-8 (δ_H 5,95) e C-12 (δ_C 157,49), bem como entre H-8 (δ_H 5,95) e C-10 (δ_C 29,23), estabeleceu a conectividade e, consequentemente, a regioquímica (Figura 5b). Por fim, a geometria *E* foi determinada com base nas correlações de efeito Overhauser nuclear (nOe) observadas no espectro NOESY entre o hidrogênio vinílico, H-8 (δ_H 5,95), e o grupo metil mais próximo e mais desprotegido pelo efeito anisotrópico da ligação dupla, H-10 (δ_H 1,12), bem como entre os hidrogênios *orto* do anel aromático, H-12 (δ_H 7,18-7,21), com ambos os hidrogênios vinílicos, H-8 (δ_H 5,95), e o hidrogênio mais desprotegido na cabeça de ponte, H-1 (δ_H 1,94-1,95) (Figura 5c).

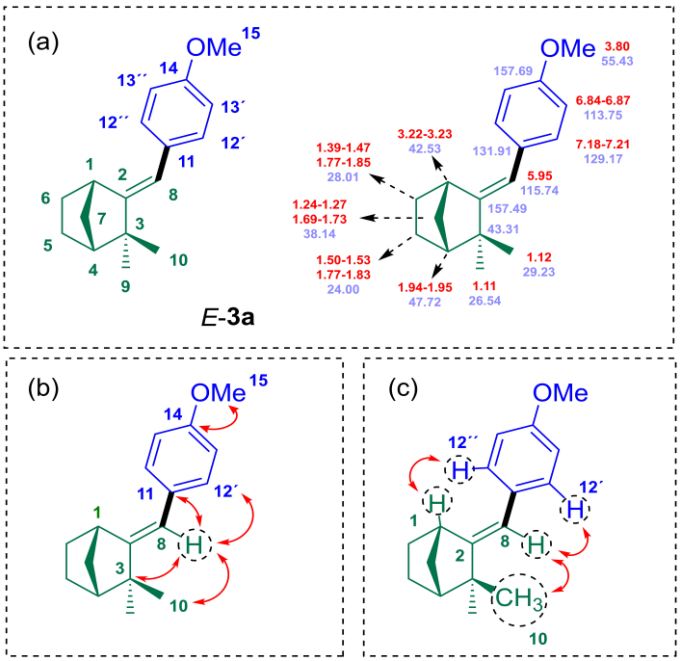
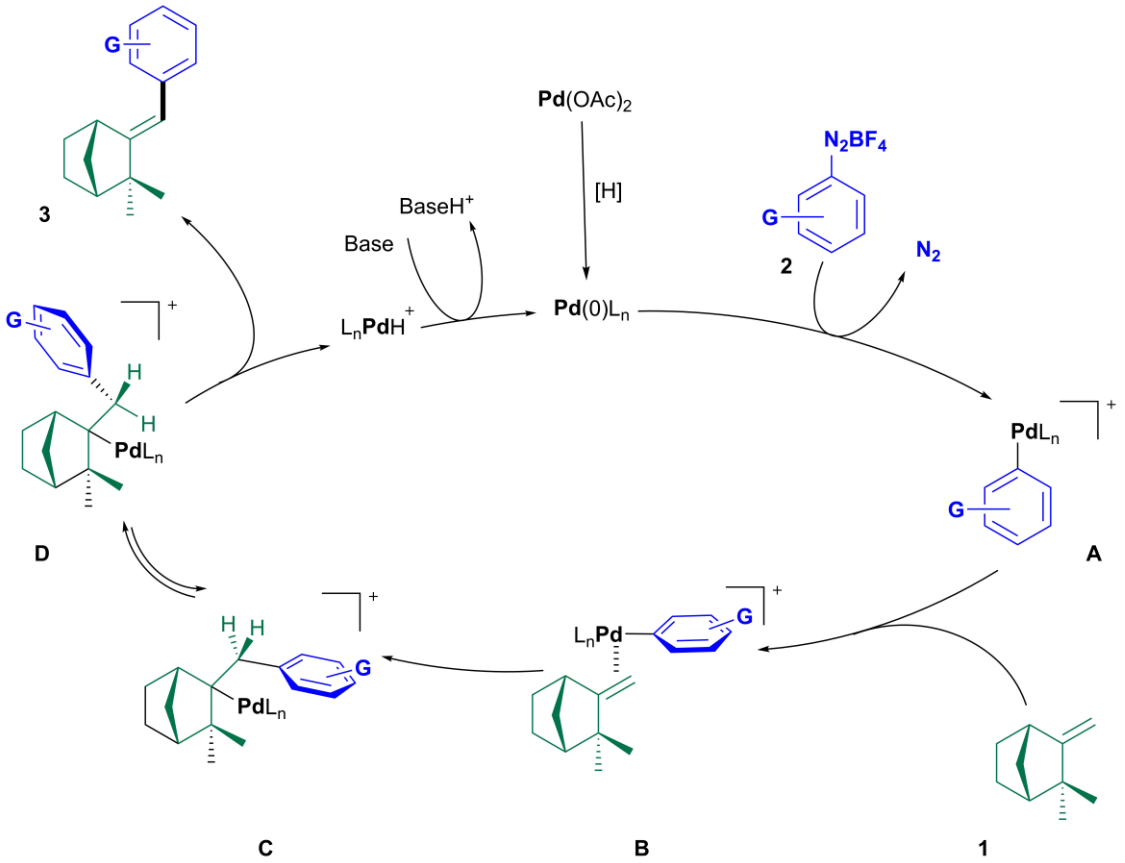


Figura 5. Esquema de numeração e atribuição completa dos sinais de RMN de ^{1}H (vermelho) e ^{13}C (azul) (**a**). Principais correlações HMBC (**b**) e NOESY (**c**) observadas para o aduto HM **3a.**

Uma justificativa plausível para a arilação HM do canfeno (**1**) é proposta na Figura 6. O mecanismo começa com a adição oxidativa de espécies de Pd zero-valente [Pd(0)Ln] ao sal de arenodiazônio **2**, com extrusão de nitrogênio molecular e formação do intermediário reativo catiônico areno-paládio **A**. Com base na regioquímica e na estereosseletividade observadas no aduto HM do tipo (*E*)-**3**, pode-se propor que o intermediário areno-paládio se aproxime da olefina a partir da face menos congestionada estericamente do sistema bicíclico, a ponte menor, conforme mostrado na representação **B** do sistema de ciclo catalítico proposto. Essa abordagem deve minimizar as interações estéricas e favorecer o arranjo adequado para o estágio de inserção migratória estereosseletiva, conforme indicado em **C**. Portanto, na etapa de *β-syn*-eliminação, o grupo arila deve assumir preferencialmente uma posição que minimize as interações estéricas e permita o alinhamento sintético entre o paládio e o hidrogênio benzílico (conformador **D**), o que favorece a etapa de *β-syn*-eliminação e produz o aduto HM **3** com uma geometria *E*.

Esquema 1. Justificativa para formação de adutos HM (*E*)-**3a-g**



Ensaios antifúngicos

Estudos anteriores demonstram propriedades antimicrobianas do canfeno e derivados frente a microrganismos infecciosos [20, 23-24]. Com base nessas propriedades, avaliamos o potencial antifúngico do canfeno e seus derivados, frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis.*

Candida albicans e *C. tropicalis* são considerados pela OMS patógenos fúngicos prioritários no contexto de ameaça a saúde humana, sendo caracterizados com índice de patogenia crítico e alto, respectivamente [35]. Ao avaliar a concentração capaz de inibir em 50 % o crescimento das células fúngicas de *C. albicans* e *C tropicalis*, o CAN apresentou efeito superior ao FCZ, contra *C. albicans*, já a ação dos seus derivados foi inferior à desse fármaco. Contra *C. tropicalis*, tanto o canfeno quanto os seus derivados apresentaram ação significativamente inferior à do FCZ. Apesar desses resultados, é preciso considerar que os

valores de concentrações obtidos são significativamente relevantes dentro do contexto clínico [36].

A ação isolada do canfeno contra *Candida* spp. já foi relatado em alguns estudos. Salgueiro e colaboradores, por exemplo, utilizando a técnica de microdiluição em caldo [37], avaliaram o potencial antifúngico do canfeno obtido das plantas *Thymus camphoratus* e *T. carnosus* contra *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, obtendo CIM e CFM variando de 8,9 a 17,8 mg/mL (8.900 µg/mL a 17.800 µg/mL). A ação isolada do canfeno extraído do óleo essencial de *Salvia lavandulifolia* também foi avaliada contra *C. albicans* [34], onde, segundo os autores, o canfeno apresentou CIM e CFM >2,0 mg/mL (>2000 µg/mL). Comparativamente, em nossos estudos, a ação isolada do canfeno 1 (CAN) e dos adutos HM **3a-b** mostrou CFM ≥ 1024 µg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Esses resultados, principalmente em relação ao CFM, sugerem uma ação semelhante à relatada anteriormente na literatura [34, 37].

Vale ressaltar que, em nossa avaliação, a determinação do CFM também foi obtida pela combinação dos compostos com fluconazol (FCZ), indicando uma forte interação entre os compostos (1, **3a-b**) e esse medicamento. Nessa perspectiva, Jiang e colaboradores apontam que a terapia combinada demonstra ser uma estratégia eficaz na busca de novos alvos sinérgicos que possam aumentar a eficácia do FCZ e diminuir a resistência fúngica [38], considerando que o caráter fungistático e o uso contínuo e profilático desse fármaco são fatores determinantes para o aumento da resistência a esse medicamento [39].

Ainda considerando esta perspectiva, Yan e colaboradores afirmam que várias moléculas pequenas, que demonstraram ter nenhuma ou fraca atividade antifúngica [40], restauram efetivamente a eficácia da atividade antifúngica deste medicamento quando combinadas com FCZ. Além de restaurar a ação antifúngica, a combinação também pode potencializar seu efeito [41]. Os resultados encontrados neste estudo confirmam essa afirmação, onde a associação CAN+FCZ e aduto HM **3a**+FCZ diminui significativamente a IC_{50} do FCZ e dos compostos contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. A combinação aduto HM **3b**+FCZ apresentou leve potencialização do efeito contra *C. tropicalis* e antagonizou o efeito contra *C. albicans.*

Alguns estudos também mostraram sinergismo na combinação de CAM (1) e FCZ contra o crescimento planctônico e formação de biofilme em *C. albicans* [42]. No entanto, é importante ressaltar que nenhum estudo na literatura relata a análise da combinação de CAM (1) e FCZ contra *C. tropicalis*. Além disso, até onde sabemos, esta é também a primeira

investigação a avaliar a ação dos adutos HM **3a** e **3b** em cepas de *Candida*, intrinsecamente e em combinação com FCZ.

Um dos principais fatores de virulência presente em *C. albicans* e *C. tropicalis* é a capacidade alternar entre formas morfológicas distintas, como de levedura para hifas e ou pseudo-hifas [43]. Sinais ambientais como temperatura, nível de CO_2, pH, *N*-acetilglucosamina e nutrição desencadeiam essa plasticidade estrutural. Uma rede de vias de sinalização regula esses estímulos, desempenhando um papel essencial na transição morfológica das espécies de *Candida* [44-46].

No presente estudo, a transição morfológica de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi completamente inibida pela ação do FCZ nas concentrações avaliadas (1024 e 512 µg/mL). O FCZ atua inibindo a síntese do ergosterol – um componente essencial para manter a integridade da membrana e para a formação de hifas [38, 48]. Foi reconhecido que danos nos genes envolvidos neste processo resultam na inibição do crescimento destas estruturas filamentosas. [38, 47, 48]. Além disso, o FCZ também é capaz de causar disfunção mitocondrial em células de *Candida*, prejudicando a virulência dessas espécies, uma vez que a manutenção mitocondrial é essencial para a transição levedura-hifa [49-50]. É importante notar que o CAM (1) inibiu a emissão de hifas e/ou pseudohifas em *C. albicans* apenas na maior concentração avaliada, e os seus adutos HM **3a-b** não inibiram nem reduziram significativamente estas estruturas filamentosas. Contra *C. tropicalis*, os compostos inibiram completamente o crescimento de hifas e/ou pseudohifas em ambas as concentrações testadas.

A ação inibitória do canfeno (CAM, 1) e seus adutos HM **3a-b** na transição morfológica de *C. tropicalis* pode estar associada a danos à integridade da membrana desta espécie devido à natureza terpênica desses compostos, uma classe de metabólitos bem conhecida por causar danos à estrutura e funções da membrana celular de *Candida* [51]. Os resultados do teste de transição morfológica mostraram que os compostos tiveram efeitos variados nas cepas avaliadas. Estas descobertas estão alinhadas com estudos recentes que destacam que, apesar das semelhanças entre *C. albicans* e *C. tropicalis*, estas espécies exibem comportamentos e respostas filamentosas distintos [52]. Esse comportamento tem sido relacionado a fatores como características intrínsecas e redes regulatórias divergentes [52], o que também pode explicar as diferenças observadas em nossos resultados.

Karuppayil e colaboradores também relataram a ação inibitória do canfeno (CAM, 1) na morfogênese de *C. albicans* (3 mM – 408,72 µg/mL) [42]. Além disso, o canfeno apresenta atividade intrínseca contra a formação de biofilme com percentual de inibição de 70% (48 mM

– 6.539,52 µg/mL) e, quando combinado com FCZ, atinge 80% de inibição (1,5 mM - 204,36 µg/mL) [42].

Biofilmes são comunidades microbianas que aderem às superfícies e tecidos do hospedeiro, representando um dos principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da *Candida*; a filamentação é uma das principais etapas na formação desses biofilmes [53]. Na sequência desses estudos, Salgueiro e colegas também avaliaram a ação do canfeno na formação de tubos germinativos em *C. albicans*, um estágio essencial para a filamentação [37]. No entanto, a ação isolada desse composto não alcançou a mesma eficácia (91% de inibição a 0,28 mg/mL - 280 µg/mL) em comparação com os óleos essenciais das plantas das quais foi extraído, *T. camphoratus* (cerca de 91% a 0,07 mg/mL - 70 µg/mL) e *T. carnosus* (cerca de 98% de inibição a 0,07 mg/mL - 70 µg/mL) [37].

No geral, tanto isoladamente como em combinação com fluconazol (FCZ), o canfeno (CAM, 1) apresentou uma atividade antifúngica superior em comparação com os adutos HM **3a-b**. Nessa perspectiva, Silva e colaboradores destacam que diferentes moléculas podem exercer diferentes efeitos sobre uma mesma célula, dependendo de seus respectivos mecanismos de ação [54]. A molécula de canfeno, por ter uma massa molecular relativamente menor do que a de seus componentes, pode interagir e atravessar a membrana celular do fungo com mais facilidade. Além disso, associado a essa característica, o fato de o canfeno ser um monoterpeno também pode explicar esse resultado, uma vez que, de acordo com a literatura, os monoterpenos atuam na célula fúngica através da desestabilização da membrana celular, por meio da interação com o ergosterol, aumentando a fluidez e a permeabilidade da membrana [55-56].

Dessa forma, os resultados encontrados nesta investigação sugerem que a adição de um grupo aril conjugado com olefina na posição C-8 da estrutura do canfeno é prejudicial à sua eficácia antifúngica contra as cepas de *Candida* spp. avaliadas. A inserção do grupo aril na estrutura do canfeno pode ter causado vários efeitos, incluindo aumento do tamanho molecular, maior impedimento estérico, alteração da estabilidade metabólica em um ambiente fúngico e mudanças na solubilidade e permeabilidade devido aos grupos aril-hidrofóbicos. Esses efeitos, isolados ou em conjunto, provavelmente contribuíram para a redução da atividade antifúngica observada nos adutos HM **3a-b.**

Estudos sobre a relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de imidazol e tiazol revelam características moleculares que influenciam a atividade antifúngica desses compostos, tais como volume molecular, substituições em anéis aromáticos, incluindo posições (*para, orto, meta*), e a natureza eletrônica dos substituintes (retirantes ou doadores de elétrons) [57-58].

Embora sejam compostos completamente diferentes daqueles citados nos estudos, a derivação realizada nesta investigação deu origem a compostos com volumes moleculares relativamente maiores em comparação com a molécula precursora (CAM 1) e com substituintes arílicos de natureza eletrônica diferente, o aduto HM **3a** com um grupo doador de elétrons (OMe) e o aduto HM **3b** com um grupo retirador de elétrons (NO_2). No entanto, apenas uma análise aprofundada da relação estrutura-atividade pode esclarecer os mecanismos que influenciaram a redução do efeito antifúngico dos derivados de aril-canfeno.

Apesar desta redução em comparação com a própria molécula de canfeno, os resultados obtidos pelos adutos HM **3a-b** podem ser considerados relevantes. A atividade antifúngica exibida por estes compostos pode estar relacionada com a presença de grupos funcionais específicos, tais como aril substituintes metoxi e nitro.

De acordo com Korol e colaboradores [59], a presença de grupos como metóxi e nitro em posições especificas de anel benzeno pode aumentar significativamente a inibição do crescimento fúngico de *Candida.* Em linha com esta perspectiva, Sousa e colaboradores relataram que compostos antifúngicos à base de ácido benzóico [60], contendo grupos nitro ligados a um anel aromático nas suas moléculas, exibiam atividade antifúngica contra as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei.* Da mesma forma, Khabnadideh e colaboradores descrevem que a adição de um grupo metoxi em porções arila de derivados azólicos foi decisiva para a eficácia antifúngica [61].

5. CONCLUSÃO

Em resumo, revisitou-se e ampliou-se as reações de acoplamento cruzado de Heck-Matsuda entre canfeno e sais de arenediazônio para fornecer derivados do tipo aril-canfeno com regioquímica controlada e alta estereosseletividade, usando $Pd(OAc)_2$ como catalisador, EtOH como solvente, $ZnCO_3$ como base e condições aeróbicas e sem ligantes. A metodologia desenvolvida representa uma abordagem contemporânea para a diversificação estrutural em estágio final do canfeno, fornecendo produtos que apresentam potencial biológico, como os explorados neste trabalho.

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica demonstram que o canfeno (CAN, 1) teve um efeito antifúngico superior nos seus adutos HM **3a-b** e exibiu ação antifúngica intrínseca contra *C. albicans* em concentrações mais baixas em comparação com FCZ (fluconazol). Além de apresentar ação fungicida contra *C. albicans e C. tropicalis* quando associado ao FCZ. Seus derivados apresentaram atividade antifúngica intrínseca moderada, mas

quando combinados ao FCZ potencializaram a ação dessa droga em quase todas as combinações. A transição morfológica de levedura para hifa foi inibida em *C. albicans* pela ação do CAN na maior concentração avaliada. Contra *C. tropicalis*, esta transição foi completamente inibida pela ação de todos os compostos nas concentrações testadas, indicando potencial contra este mecanismo de virulência presente em *C. tropicalis*.

Portanto, a capacidade de intensificar a ação do FCZ contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, e de inibir a transição morfológica de *C. tropicalis*, sugere o potencial bioativo desses compostos, especialmente o canfeno, no desenvolvimento de aplicações terapêuticas e na reversão da resistência fúngica de espécies de *Candida* ao fluconazol. Estudos futuros para avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades descritas e, posteriormente, ensaios *in vivo* são de extrema importância. Esses estudos complementarão esta pesquisa e indicarão possível uso farmacológico. Além disso, também será pertinente avaliar o efeito antifúngico de outros adutos HM sintetizados que não foram abordados nesta investigação antifúngica.

INFORMAÇÕES DOS AUTORES

Autores Correspondentes:

Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0002-5898-1257; e-mail: flaviana.morais@urca.br

Maria Audilene de Freitas – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0003-4900-7417; e-mail: audbiologa@hotmail.com

Jailton de Souza-Ferrari – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, Campus I, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil; https://orcid.org/0000-0002-7757-7209; e-mail: jferrari@quimica.ufpb.br

Autores:

Naiza Saraiva Farias – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0001-7938-6011; e-mail: naiza.farias@urca.br

Laryssa de Souza-Salgado – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, Campus I, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil; https://orcid.org/0009-0003-0188-8224; e-mail: lrss.souza@hotmail.com

Francisco Bernardo de Barros – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0001-8093-9920; e-mail: bernardobarros1989@gmail.com

Maria Alicy Neres de Oliveira – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0009-0002-7625-8254; e-mail: alicy.neres@urca.br

Márcia Jordana Ferreira Macedo – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0002-3749-7116; e-mail: marciajordana.macedo@urca.br

Francildo dos Santos Silva – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0002-4775-6986; e-mail: francildo.santos@urca.br

João Pedro Alves Torres – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, Campus I, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil; https://orcid.org/0009-0006-1229-8686; e-mail: jpalvestorres@gmail.com

Henrique Douglas Melo Coutinho – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil; https://orcid.org/0000-0002-6634-4207; e-mail: hdmcoutinho@urca.br

Contribuições dos autores:

N.S.F: ensaio antimicrobiano, investigação, curadoria de dados, redação ─ rascunho original; F.B.B: ensaio, investigação e revisão antimicrobiana; M.A.N.O: ensaio antimicrobiano, investigação; M.J.F.M: ensaio antimicrobiano, investigação; F.S.S: ensaio antimicrobiano, investigação; L.D.S.-S. e J.P.A.T: realizaram a síntese química; J.D.S-F. elaborou e supervisionou todas as etapas dos estudos químicos, forneceu financiamento, administração do projeto, contribuiu com amostras, reagentes, recursos e participou da redação do manuscrito do artigo; HDMC: gerenciamento de projetos; MAF: Supervisão; M.F.B.M-B: metodologia, supervisão de curadoria de dados, redação, revisão e edição.

Agradecimentos:

Os autores agradecem às agências de pesquisa brasileiras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba - FAPESQ-PB (Chamada nº 10/2021), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (Processo nº 437691/2018-7) pelo apoio financeiro. L.d.S.-S. e J.P.A.T. agradecer também às bolsas de pesquisa concedidas pela Universidade Federal da Paraíba (PIBIC/UFPB).

REFERÊNCIAS

1. Ahmed, N.; Mahmood, M. S.; Ullah, M. A.; Araf, Y.; Rahaman, T. I.; Moin, A. T.; Hosen, M. J. COVID-19-Associated Candidiasis: Possible Patho-Mechanism, Predisposing Factors, and Prevention Strategies. *Curr. Microbiol*. **2022,** *79* (5), 127. DOI: 10.1007/s00284-022-02824-6

2. Lionakis, M. S.; Drummond, R. A.; Hohl, T. M. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. *Nat Rev Immunol* **2023**, *23*, 433-452. DOI: 10.1038/s41577-022-00826-w.

3. Raposa, J.; Vazquez, J. A. New pharmacotherapeutic strategies for drug-resistant *Candida* infections: a review. *Expert Opin. Pharmacother*. **2025**, *2*, 1-11. DOI: 10.1080/14656566.2024.2433605

4. Robbins, N.; Cowen, L. E. *Candida*. *Curr. Biol*. **2025**, *35* (11), R522-R526. DOI: 10.1016/j.cub.2025.01.063

5. Farhan, M. S.; Abdullah, B. A.; Mamdwooh, A. E.; Numan, R. S. Review of Virulence Factors in *Candida*. *J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* **2024**, *3* (2), 75–82. DOI: 10.55544/jrasb.3.2.15

6. Harpf, V.; Rambach, G.; Würzner, R.; Lass-Flörl, C.; Speth, C. *Candida* and Complement: New Aspects in an Old Battle. *Front. Immunol*. **2020**, *11*, 1471. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01471

7. Ahmady, L.; Gothwal, M.; Mukkoli, M. M.; Bari, V. K. Antifungal drug resistance in *Candida*: a special emphasis on amphotericin B. *APMIS.* **2024**, *132* (5), 291-316. DOI: 10.1111/apm.13389

8. Kaur, J.; Nobile, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol*. **2023,** *71*, 102237. DOI: 10.1016/j.mib.2022.102237

9. Hetta, H. F.; Melhem, T.; Aljohani, H. M.; Salama, A.; Ahmed, R.; Elfadil, H.; Alanazi, F. E.; Ramadan, Y. N.; Battah, B.; Rottura, M.; Donadu, M. G. Beyond Conventional Antifungals: Combating Resistance Through Novel Therapeutic Pathways. *Pharmaceuticals* **2025**, *18* (3), 364. DOI: 10.3390/ph18030364

10. Siqueira, A. C.; Bernardi, G. A.; Arend, L. N. V. S.; Cordeiro, G. T.; Rosolen, D.; Berti, F. C. B.; Ferreira, A. M. M.; Vasconcelos, T. M.; Neves, B. C.; Rodrigues, L. S.; Dalla-Costa, L. M. Azole Resistance and *ERG11* Mutation in Clinical Isolates of *Candida tropicalis*. *J. Fungi* **2025**, *11* (1), 24. DOI: 10.3390/jof11010024

11. Paul, S.; Singh, S.; Sharma. D.; Chakrabarti, A.; Rudramurthy, S. M.; Ghosh, A. K. Dynamics of *in vitro* development of azole resistance in *Candida tropicalis*. *J. Global Antimicrob. Resist.* **2020,** *22*, 553-561. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.04.018

12. Assress, H. A.; Selvarajan, R.; Nyoni, H.; Mamba, B. B.; Msagati, T. A. M. Antifungal Azoles and Azole Resistance in the Environment: Current Status and Future Perspectives – A Review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2021**, *20*, 1011-1041. DOI: 10.1007/s11157-021-09594-w

13. Jangir, P.; Kalra, S.; Tanwar, S.; Bari, V. K. Azole resistance in *Candida auris*: mechanisms and combinatorial therapy. *APMIS*. **2023**, *131* (8), 442-462. DOI: 10.1111/apm.13336

14. Heard, S. C.; Wu, G.; Winter, J. M. Antifungal natural products. *Curr. Opin. Biotechnol*. **2021**, *69*, 232-241. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.02.001

15. Freitas, T. S.; Xavier, J. D. C.; Pereira, R. L. S.; Rocha, J. E.; Muniz, D. F.; da Silva, P. T.; da Hora, J. P.; Dos Santos, H. S.; Bandeira, P. N.; Nogueira, C. E. S.; Teixeira, A. M. R.; Coutinho, H. D. M. Direct antibacterial and antibiotic resistance modulatory activity of chalcones synthesized from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. *FEMS Microbiol. Lett*. **2020**, *367* (15), fnaa124. DOI: 10.1093/femsle/fnaa124

16. Fernandes, C. M.; Dasilva, D.; Haranahalli, K.; McCarthy, J. B.; Mallamo, J.; Ojima, I.; Poeta, M. D. The Future of Antifungal Drug Therapy: Novel Compounds and Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65* (2), e01719-20. DOI: 10.1128/AAC.01719-20

17. Feng, Y.-X.; Wang, Y.; Chen, Z.-Y.; Guo, S. S.; You, C.-X.; Du, S.-S. Efficacy of bornyl acetate and camphene from *Valeriana officinalis* essential oil against two storage insects. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26* (16), 16157-16165. DOI: 10.1007/s11356-019-05035-y

18. Hachlafi, N. E.; Aanniz, T.; Menyiy, N. E.; Baaboua, A. E.; Omari, N. E.; Balahbib, A.; Shariati, M. A.; Zengin, G.; Fikri-Benbrahim, K.; Bouyahya, A. *In Vitro* and *in Vivo* Biological Investigations of Camphene and Its Mechanism Insights: A Review. *Food Rev. Int.* **2021**, *39* (4), 1799-1826. DOI: 10.1080/87559129.2021.1936007

19. Okhale, S. E.; Ugbabe, G. E.; Nwanosike, E. M.; Okoro, I. Comparative study on the essential oils of *Curcuma longa* L., *Zingiber officinale* Roscoe and *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. *J. Pharmacognosy Phytother.* **2021**, *13* (1), 1-6.

20. de Freitas, B. C.; Queiroz, P. A.; Baldin, V. P.; do Amaral, P. H.; Rodrigues, L. L. F.; Vandresen, F.; Caleffi-Ferracioli, K. R.; Scodro, R. B. L.; Cardoso, R. F.; Siqueira, V. L. (-)-Camphene-based derivatives as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. *Future Microbiol*. **2020**, *15*, 1527-1534. DOI: 10.2217/fmb-2020-0131

21. Stamatiou, R.; Anagnostopoulou, M.; Ioannidou-Kabouri, K.; Rapti, C.; Lazou, A. Camphene as a Protective Agent in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants* **2024**, *13*, 405. DOI: 10.3390/antiox13040405

22. Gadotti, V. M.; Huang, S.; Zamponi, G. W. The terpenes camphene and alpha-bisabolol inhibit inflammatory and neuropathic pain via Cav3.2 T-type calcium channels. *Mol. Brain*. **2021**, *14* (1), 166. DOI: 10.1186/s13041-021-00876-6

23. Girola, N.; Figueiredo, C. R.; Farias, C. F.; Azevedo, R. A.; Ferreira, A. K.; Teixeira, S. F.; Capello, T. M.; Martins, E. G.; Matsuo, A. L.; Travassos, L. R.; Lago, J. H. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2015**, *467* (4), 928-934. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.041

24. De Carvalho, H. C.; Ieque, A. L.; Valverde, T. L.; Baldin, V. P.; Meneguello, J. E.; Campanerut-Sá, P. A. Z.; Vandresen, F.; Lopes, L. D. G.; Souza, M. R. P.; Santos, N. C. S.; Siqueira, V. L. D.; Caleffi-Ferracioli, K. R.; Scodro, R. B. L.; Cardoso, R. F. Activity of (-)-Camphene Derivatives Against *Mycobacterium tuberculosis* in Acidic pH. *Med. Chem.* **2021**, *17* (5), 485-492. DOI: 10.2174/1573406415666191106124016

25. Souza, M. R. P.; Coelho, N. P.; Baldin, V. P.; Scodro, R. B. L.; Cardoso, R. F.; da Silva, C. C.; Vandresen, F. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Nat. Prod. Res*. **2018**, *33* (23), 3372-3377. DOI: 10.1080/14786419.2018.1478829

26. Yong, W.; Yi, P.; Zhuangyu, Z.; Hongwen, H. Arylation of Camphene with Arenediazonium Salts Catalyzed by Palladium Acetate. *Synthesis* **1991**, *1991* (11), 967-969. DOI: 10.1055/s-1991-26619

27. de Souza-Ferrari, J.; Silva-Júnior, EA.; Vale, J. A.; Simões, L. A. A.; de Moraes-Júnior, MO.; Dantas, B. B.; de Araújo, D. A. M. A late-stage diversification via Heck-Matsuda arylation: Straightforward synthesis and cytotoxic/antiproliferative profiling of novel aryl-labdane-type derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *52*, 128393. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128393

28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard, 4th ed.; CLSI Document M27-A4; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2017.

29. Morais-Braga, M. F. B.; Sales, D. L.; Carneiro, J. N. P.; Machado, A. J. T.; Dos Santos, A. T. L.; de Freitas, M. A.; Martins, G. M. A. B.; Leite, N. F.; de Matos, Y. M. L. S.; Tintino, S. R.; Souza, D. S. L.; Menezes, I. R. A.; Ribeiro-Filho, J.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. *Microb. Pathog*. **2016**, *95*, 200-207. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.04.013

30. Fonseca, V. J. A.; Braga, A. L.; de Almeida, R. S.; da Silva, T. G.; da Silva, J. C. P.; de Lima, L. F.; Dos Santos, M. H. C.; Silva, R. R. D. S.; Teixeira, C. S.; Coutinho, H. D. M.; Morais-Braga, M. F. B. Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.)

DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis. Arch. Microbiol*. **2022,** *204* (6), 346. DOI: 10.1007/s00203-022-02959-x

31. Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M.; Lima, E. O.; Falcão-Silva, V. S.; Siqueira-Júnior, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* **2008**, *54* (4), 328-330. DOI: 10.1159/000151267

32. Carneiro, J. N. P.; da Cruz, R. P.; Campina, F. F.; Costa, M. D. S.; Dos Santos, A. T. L.; Sales, D. L.; Bezerra, C. F.; da Silva, L. E.; de Araujo J. P.; do Amaral, W.; Rebelo, R. A.; Begnini, I. M.; de Lima, L. F.; Coutinho, H. D. M.; Morais-Braga, M. F. B. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. *Food Chem. Toxicol*. **2020,** *135*, 110987. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110987

33. Orhan, I. E.; Özçelik, B.; Kartal, M.; Kan, Y. Antimicrobial and Antiviral Effects of Essential Oils from Selected Umbelliferae and Labiatae Plants and Individual Essential Oil Components. *Turk. J. Biol.* **2012**, *36* (3), 239–246. DOI:10.3906/biy-0912-30

34. Cutillas, A.-B.; Carrasco, A.; Martinez-Gutierrez, R.; Tomas, V.; Tudela, J. Composition and Antioxidant, Antienzymatic and Antimicrobial Activities of Volatile Molecules from Spanish *Salvia lavandulifolia* (Vahl) Essential Oils. *Molecules* **2017**, *22*, 1382. DOI: 10.3390/molecules22081382

35. World Health Organization (WHO). *WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action*; World Health Organization: Geneva, 2022.
36. Houghton, P. J.; Howes, M. J.; Lee, C. C.; Steventon, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. Ethnopharmacol*. **2007**, *110* (3), 391-400. DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.032

37. Alves M.; Gonçalves, M. J.; Zuzarte, M.; Alves-Silva, J. M.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Salgueiro, L. Unveiling the Antifungal Potential of Two Iberian Thyme Essential Oils: Effect on *C. albicans* Germ Tube and Preformed Biofilms. *Front Pharmacol*. **2019,** *10*, 446. DOI: 10.3389/fphar.2019.00446

38. Lu, H.; Shrivastava, M.; Whiteway, M.; Jiang, Y. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. *Crit. Rev. Microbiol*. **2021**, *47* (3), 323-337. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1884641

39. Jamiu, A. T.; Albertyn, J.; Sebolai, O. M.; Pohl, C. H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med. Mycol*. **2021**, *59* (1),14-30. DOI: 10.1093/mmy/myaa031

40. Xie, F.; Hao, Y.; Liu, J.; Bao, J.; Ni, T.; Liu, Y.; Chi, X.; Wang, T.; Yu, S.; Jin, Y.; Li, L.; Zhang, D.; Yan, L. Discovery of Novel Thiosemicarbazides Containing 1,3,5-Triazines Derivatives as Potential Synergists against Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2334. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112334

41. Yin, S.; Li, L.; Su, L.; Li, H.; Zhao, Y.; Wu, Y.; Liu, R.; Zou, F.; Ni, G. Synthesis and *in vitro* synergistic antifungal activity of analogues of *Panax stipulcanatus* saponin against

fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Carbohydr. Res*. **2022,** *517*, 108575. DOI: 10.1016/j.carres.2022.108575

42. Thakre, A. D.; Mulange, S. V.; Kodgire, S. S.; Zore, G. B.; Karuppayil, S. M. Effects of Cinnamaldehyde, Ocimene, Camphene, Curcumin and Farnesene on *Candida albicans*. *Av. Microbiol.* **2016**, *6*, 627-643. DOI: 10.4236/aim.2016.69062.

43. Satala, D.; Juszczak. M.; Wronowska, E.; Surowiec, M.; Kulig, K.; Kozik, A.; Rapala-Kozik, M.; Karkowska-Kuleta, J. Similarities and differences among species closely related to *Candida albicans*: *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, and *C. auris*. *Cell. Microbiol*. **2022**, *2022*, 2599136. DOI: doi.org/10.1155/2022/2599136

44. Bing, J.; Guan, Z.; Zheng, T.; Ennis, C. L.; Nobile, C. J.; Chen, C.; Chu, H.; Huang, G. Rapid Evolution of an Adaptive Multicellular Morphology of *Candida auris* during Systemic Infection. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 2381. DOI:10.1038/s41467-024-46786-8

45. Khan, F.; Bamunuarachchi, N. I.; Tabassum, N.; Jo, D. M.; Khan, M. M.; Kim, Y. M. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling* **2021**, *37* (6), 626-655. DOI: 10.1080/08927014.2021.1948538

46. Villa, S.; Hamideh, M.; Weinstock, A.; Qasim, M. N.; Hazbun, T. R.; Sellam, A.; Hernday, A. D.; Thangamani, S. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. **2020,** *20* (1), foaa005. DOI: 10.1093/femsyr/foaa005

47. Yang, S.; Peng, X.; Ren, B.; Luo, Y.; Xu, X. Small molecule II-6s synergises with fluconazole against *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2023,** *62* (1), 106820. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106820

48. Fattouh, N.; Hdayed, D.; Geukgeuzian, G.; Tokajian, S.; Khalaf, R. A. Molecular mechanism of fluconazole resistance and pathogenicity attributes of Lebanese *Candida albicans* hospital isolates. *Fungal Genet. Biol*. **2021**, *153*, 103575. DOI: 10.1016/j.fgb.2021.103575

49. Huang, M.; Song, D.; Zhou, L.; Jiao, Z.; Yang, L.; Yang, Y.; Peng, J.; Guo, G. Unveiling the roles of *CaSDH8* in *Candida albicans*: Implications for virulence and azole resistance. *Virulence*. **2024**, *15* (1), 2405000. DOI:10.1080/21505594.2024.2405000

50. Zhu, X.; Jin, F.; Yang, G.; Zhuang, T.; Zhang, C.; Zhou, H.; Niu, X.; Wang, H.; Wu, D. Mitochondrial Protease Oct1p Regulates Mitochondrial Homeostasis and Influences Pathogenicity through Affecting Hyphal Growth and Biofilm Formation Activities in *Candida albicans*. *J. Fungi* **2024**, *10* (6), 391. DOI: 10.3390/jof10060391

51. Soliman, S.; Alnajdy, D.; El-Keblawy. A. A.; Mosa, K. A.; Khoder, G.; Noreddin, A. M. Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-*Candida* Drugs. *Pharmacogn. Rev*. **2017**, *11* (22), 104-122. DOI: 10.4103/phrev.phrev_8_17

52. Ke, C-L.; Lew, S. Q.; Hsieh, Y.; Chang, S.-C.; Lin, C.-H. Convergent and divergent roles of the glucose-responsive kinase SNF4 in *Candida tropicalis*. *Virulence*. **2023,** *14* (1), 2175914. DOI: 10.1080/21505594.2023.2175914

53. Pereira, R.; Fontenelle, R. O. S.; de Brito, E. H. S.; de Morais, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J. Appl. Microbiol*. **2021**, *131* (1):11-22. DOI: 10.1111/jam.14949

54. Barros, D. B.; Nascimento, N.S.; Souza, A. P.; Barros, A.V.; Borges, Y. W. B; Silva, W. M. N.; Motta, A. B.S.; Pinto, J. E. L.; Sampaio, M. G. V.; Barbosa, M. F. S.; Fonseca, M. C.; Silva, L. A.; Lima, L. O.; Borges, M. G. S. A.; Oliveira, M. B. M.; Correia, M.T.S.; Castellano, L. R. C.; Guerra, F. Q. S.; Silva, M.V. Antifungal Activity of Terpenes Isolated from the Brazilian Caatinga: A Review. *Braz. J. Biol.* **2023**, *83*, e270966. DOI: 10.1590/1519-6984.270966

55. Vasconcelos, P. G. S.; Lee, K. M.; Abuna, G. F.; Costa, E. M. M. B.; Murata, R. M. Monoterpene Antifungal Activities: Evaluating Geraniol, Citronellal, and Linalool on *Candida* Biofilm, Host Inflammatory Responses, and Structure–Activity Relationships**.** *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1394053. DOI: 10.3389/fphar.2024.1394053

56. Raj, N.; Fakhri, K. U.; Pathak, P.; Ahmedi, S.; Manzoor, N. Monoterpenes as Potential Antifungal Molecules against *Candida* Cell Membranes: *In-Vitro* and *In-Silico* Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2023**, *43* (6), 2703–2718. DOI: 10.1080/07391102.2023.2294183

57. Bouchal, B.; Abrigach, F.; Takfaoui, A.; Errahhali, M. E.; Errahhali, M. E.; Dixneuf, P. H.; Doucet, H.; Touzani, R.; Bellaoui, M. Identification of Novel Antifungal Agents: Antimicrobial Evaluation, SAR, ADME–Tox and Molecular Docking Studies of a Series of Imidazole Derivatives. *BMC Chem.* **2019**, *13* (1), 100. DOI: 10.1186/s13065-019-0623-6

58. Zapadka, M.; Łączkowski, K. Z.; Budzyńska, A.; Maciejewski, M.; Dekowski, P.; Kupcewicz, B. Interpretable Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) for Identification of Potent Antifungal Activity Agents towards *Candida albicans* ATCC 2091. *Mol Divers*. **2025**, *29*. DOI: 10.1007/s11030-025-11404-2

59. Korol, N.; Molnar-Babilya, D.; Slivka, M.; Onysko, M. A Brief Review of Heterocyclic Compounds with Promising Antifungal Activity against *Candida* Species. *Org. Commun.* **2022**, *15* (4), 304–323. DOI: 10.25135/acg.oc.141.2210.2609

60. Duarte, A. B. S.; Perez-Castillo, Y.; Andrade, P. N.; de Castro, R. D.; de Sousa, D. P. 3,5-Dinitrobenzoate and 3,5-Dinitrobenzamide Derivatives: Mechanistic, Antifungal, and *In Silico* Studies. *J. Chem.* **2022**, *2022*, 2336175. DOI: 10.1155/2022/2336175

61. Emami, L.; Faghih, Z.; Ataollahi, E.; Sadeghian, S.; Rezaei, Z.; Khabnadideh, S. Azole Derivatives: Recent Advances as Potent Antibacterial and Antifungal Agents. *Curr. Med. Chem.* **2023**, *30* (2), 220-249. DOI: 10.2174/0929867329666220407094430

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O crescente número de infecções fúngicas em humanos representa um fardo significativo para a saúde global e é favorecido pelo aumento de pessoas imunossuprimidas, resistência aos antifúngicos e mudanças climáticas. Espécies do gênero *Candida* são responsáveis por uma ampla gama dessas infecções. Resistência aos antifúngicos aliada a opções terapêuticas limitadas e as semelhanças existentes entre a células fúngicas e a célula humana evidenciam a complexidade desse problema. Nesse sentido, é urgente a busca por novas abordagens terapêuticas capazes de combates infecções, e o canfeno, molécula de partida para a síntese de novos compostos utilizados nesse trabalho, apresenta na literatura diversas atividades biológicas, dentre elas, atividade antimicrobiana.

O canfeno, adquirido comercialmente, deu origem a vários derivados com bons rendimentos, por diversificação em estágio final através da reação de arilaçao de Heck-Matsuda. As estruturas desses derivados foram analisadas por espectro RMN e FTIR e apenas os dois derivados com maior rendimento foram selecionados para análise da atividade antifúngica. Nos ensaios antifúngicos, verificou-se efeitos distintos. Na atividade intriseca, o canfeno apresentou ação superior à do fluconazol contra *C. albicans*, e seus derivados apresentaram efeitos inferiores. Contra C. *tropicalis* nenhum dos compostos apresentou ação superior à do fluconazol. No entanto, os valores de concentração obtidos por todos os compostos são considerados clinicamente relevantes. Os resultados distintos, podem ser explicados pelas características morfológicas e fisiológicas intrínsecas de cada espécie, o que pode influenciar e determinar respostas diferentes aos mecanismos de ação dos compostos avaliados.

Ao avaliar a ação dos compostos em combinação com o fluconazol, na tentativa de melhorar o efeito desse medicamento e reverter a resistência das espécies estudadas, verificou-se que o HM **3a** e o canfeno aumentaram significativamente a eficácia do fluconazol, reduzindo a IC_{50} do fármaco. Na análise de inibição da transição morfológica, o canfeno foi capaz de inibir esse mecanismo em *C. albicans* na maior concentração avaliada, no entanto, os derivados não apresentaram efeito inibitório. Já contra *C. tropicalis* houve inibição total da transição morfológica, por ação de todos os compostos.

Dessa forma, os resultados encontrados nesta investigação sugerem que a adição de um grupo aril conjugado com olefina na posição C-8 da estrutura do canfeno é prejudicial à sua eficácia antifúngica contra as cepas de *Candida* spp. avaliadas. A inserção do grupo aril na estrutura do canfeno pode ter causado vários efeitos, incluindo aumento do tamanho molecular, maior impedimento estérico, alteração da estabilidade metabólica em um ambiente fúngico e mudanças na solubilidade e permeabilidade devido aos grupos aril-hidrofóbicos. Esses efeitos, isolados ou em

conjunto, provavelmente contribuíram para a redução da atividade antifúngica observada nos adutos HM **3a-b.** No entanto, tanto o canfeno, quanto seus derivados, avaliados intrinsicamente ou em combinação com o fármaco fluconazol, apresentaram potencial antifúngico frente a *C. albicans* e *C. tropicalis*, com efeito em concentrações significativamente relevantes.

5.2. CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os objetivos e questionamentos que direcionaram esta pesquisa, conclui-se que:

- A diversificação em estágio final do canfeno por meio da arilação Heck-Matsuda forneceu sete derivados do tipo aril-canfeno com regioquímica controlada e alta estereosseletividade, usando $Pd(OAc)_2$ como catalisador, EtOH como solvente, $ZnCO_3$ como base e condições aeróbicas e sem ligantes.
- Os adutos HM do canfeno obtiveram rendimentos que variaram entre 48 e 98 %, tendo as suas estruturas analisadas e confirmadas por espectro RMN e FTIR.
- O canfeno, apresentou efeito antifúngico intrínseco superior ao dos seus derivados, tanto contra *C. albicans*, quanto contra *C. tropicalis*.
- Apesar de exibirem efeito antifúngico dependente do aumento de concentração, os derivados aril-canfeno, demonstraram ação em concentrações clinicamente relevantes.
- O canfeno e derivados HM **3a e 3b** potencializaram o efeito do fluconazol contra *C. tropicalis*. Contra *C. albicans*, apenas o canfeno e o HM **3a** foram capazes de potencializar o efeito desse fármaco.
- A transição morfológica (pleomorfismo) de *C. tropicalis* foi totalmente inibida pela ação dos compostos. Já contra *C. albicans* apenas o canfeno, na maior concentração avaliada, foi capaz de inibir o pleomorfismo.
- De modo geral, o canfeno apresentou efeito antifúngico superior aos derivados aril-canfeno. No entanto, os derivados também demonstraram efeito relevante quando combinados com fluconazol, indicando que as modificações estruturais não comprometeram totalmente o potencial antifúngico em associação ao fármaco.

5.3. PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Estudos adicionais são essenciais para complementar essa investigação e então poder considerar ou não o uso terapêutico dos compostos avaliados. Como perspectivas futuras, seria relevante realizar ensaios como a metodologia de *Checkerboard* para verificar o tipo de interação com o fluconazol e, de permeabilidade da membrana, visando verificar a ação desses compostos na membrana fúngica. Além disso, também seria pertinente ensaios para averiguar a citotoxicidade desses compostos. Dependente dos resultados obtidos nessas e outras possíveis investigações, como ADMET e *dockagem* molecular, seria interessante considerar análises *in vivo* do potencial adjuvante do canfeno e derivados frente a reversão dos mecanismos de resistência aos antifúngicos utilizados na prática clínica.

6. REFERÊNCIAS

AHMADY, L. *et al*. Antifungal drug resistance in *Candida*: a special emphasis on amphotericin B. **Apmis**, v. 132, n. 5, p. 291-316, 2024.

AHMED, N. *et al*. COVID-19-associated candidiasis: possible patho-mechanism, predisposing factors, and prevention strategies. **Current Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 127, 2022.

AL ABOODY, M. S.; MICKYMARAY, S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 45, 2020.

ALJAAFARI, M. N. *et al*. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 628, 2021.

ALVARENGA, J. F. R. *et al*. Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 10, p. 1352-1389, 2023.

ANJU, P. J.; NEETHA, M.; ANILKUMAR, G. Recent Advances on N-Heterocyclic Carbene-Palladium-catalyzed Heck Reaction. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 4, p. e202103564, 2022.

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

BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 718, 2022.

BENKOVA, M.; SOUKUP, O.; MAREK, J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 4, p. 806-822, 2020.

BIBI, R.; KHAN, I. U.; HASSAN, A. Steric evaluation of Pyox ligands for asymmetric intermolecular Heck-Matsuda reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 111, p. 154204, 2022.

BROWN, G. D. *et al*. The pathobiology of human fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 11, p. 687-704, 2024.

CARMO, A. *et al*. Antifungals: From pharmacokinetics to clinical practice. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 884, 2023.

CARNEIRO, J. N. P. *et al.* GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. **Food and chemical toxicology**, v. 135, p. 110987, 2020.

CAROLUS, H. *et al*. Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CARVALHO, H. C. *et al*. Activity of (-) -camphene derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* in acidic pH. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 485-492, 2021.

CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. Plant-derived natural products: a source for drug discovery and development. **Drugs and Drug Candidates**, v. 3, n. 1, p. 184-207, 2024.

CHEN, H. *et al*. Reversal of azole resistance in *Candida albicans* by oridonin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 296-302, 2021.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.

CIUREA, C. N. *et al*. *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard-fourth edition. CLSI document M27- A4. Wayne, PA. 2017.

COSTA, M. S. *et al*. *In vitro* evaluation of fungal susceptibility and inhibition of virulence by diosgenin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 7, p. e202400444, 2024.

COUTINHO, H. D. M. *et al*. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

CZAJKA, K. M. *et al*. Molecular mechanisms associated with antifungal resistance in pathogenic *Candida* species. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 2655, 2023.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428-e438, 2024.

D'ENFERT, C. *et al*. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS microbiology reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa060, 2021.

DI COSOLA, M. *et al*. *Candida albicans* and oral carcinogenesis. A brief review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 476, 2021.

ESFAHANI, A. *et al*. Up-regulation of CDR1 and MDR1 efflux pump genes and fluconazole resistance are involved in recurrence in *Candida albicans*-induced vulvovaginal candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 109, n. 1, p. 116242, 2024.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I.; MOHAMED, A. A. A Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin**.** **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, p. 3266, 2023.

FARHAN, M. S. *et al*. Review of virulence factors in *Candida*. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 75-82, 2024.

FATTOUH, N. *et al*. UPC2 mutations and development of azole resistance in *Candida albicans* hospital isolates from Lebanon. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 38, p. 341-348, 2024.

FENG Y. X. *et al*. Efficacy of bornyl acetate and camphene from *Valeriana officinalis* essential oil against two storage insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 16, p.16157-16165, 2019.

FERNANDES, C. M. *et al*. The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 10.1128/aac. 01719-20, 2021.

FONSECA, V. J. A. *et al*. Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 346, 2022.

GADOTTI, V. M.; HUANG, S.; ZAMPONI, G. W. The terpenes camphene and alpha-bisabolol inhibit inflammatory and neuropathic pain via Cav3. 2 T-type calcium channels. **Molecular brain,** v. 14, p. 1-10, 2021.

GALLO, K. *et al*. SuperNatural 3.0—a database of natural products and natural product-based derivatives. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D654-D659, 2023.

GAFFAR, N. R.; VALAND, N.; GIRIJA, U. V. Candidiasis: Insights into Virulence Factors, Complement Evasion and Antifungal Drug Resistance. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 272, 2025.

GANGWAL, A.; LAVECCHIA, A. Artificial Intelligence in Natural Product Drug Discovery: Current Applications and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2025.

GARCÍA-GARCÍA, I.; BOROBIA, A. M. Current approaches and future strategies for the implementation of pharmacogenomics in the clinical use of azole antifungal drugs. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 509-514, 2021.

GIROLA, N. *et al*. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 928-934, 2015.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; RAMÍREZ-SOTELO, U.; MORA-MONTES, H. M. Non-albicans *Candida* species: immune response, evasion mechanisms, and new plant-derived alternative therapies. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 11, 2022.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; BARUCH-MARTÍNEZ, D. A.; MORA-MONTES, H. M. Exploring the Biology, Virulence, and General Aspects of *Candida dubliniensis.* **Infection and Drug Resistance**, p. 5755-5773, 2024.

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

GUPTA, A. K.; VENKATARAMAN, M. Antifungal resistance in superficial mycoses. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 33, n. 4, p. 1888-1895, 2022.

HALAT, D. H. *et al*. Allylamines, benzylamines, and fungal cell permeability: a review of mechanistic effects and usefulness against fungal pathogens. **Membranes**, v. 12, n. 12, p. 1171, 2022.

HACHLAFI, N. EL. *et al*. *In vitro* and *in vivo* biological investigations of camphene and its mechanism insights: a review. **Food Reviews International**, v. 39, n. 4, p. 1799-1826, 2021.

HE, H., *et al.* Discovery of the cryptic function of terpene cyclases as aromatic prenyltransferases**.** **Nature Communications**, v. 11, n. 3958, 2020.

HETTA, H. F. *et al*. Beyond Conventional Antifungals: Combating Resistance Through Novel Therapeutic Pathways. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 3, p. 364, 2025.

HOENIGL, M. *et al*. COVID-19-associated fungal infections. **Nature microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1127-1140, 2022.

HONG, B.; LUO, T.; LEI, X. Late-stage diversification of natural products. **ACS central science**, v. 6, n. 5, p. 622-635, 2020.

HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.

HOENIGL, M. *et al.* Novel antifungals and treatment approaches to tackle resistance and improve outcomes of invasive fungal disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. e00074-23, 2024.

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.

KATSIPOULAKI, M. *et al*. *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 2, p. e00021-23, 2024.

KHAN, F. *et al.* Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. **Biofouling**, v. 37, n. 6, p. 626-655, 2021.

KHANAM, S. *et al*. Plant-based secondary metabolites as natural remedies: a comprehensive review on terpenes and their therapeutic applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, p. 1587215, 2025.

KUMAR, D.; KUMAR, A. Molecular determinants involved in *Candida albicans* biofilm formation and regulation. **Molecular Biotechnology**, v. 66, n. 7, p. 1640-1659, 2024.

KUMPAKHA, R.; GORDON, D. M. Inhibition of morphological transition and hyphae extension in *Candida* spp. by occidiofungin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 3038-3048, 2022.

JAMIU, A. T. *et al*. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical mycology**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.

JOSÉ, R. J.; PERISELNERIS, J. N.; BROWN, J. S. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. **Medicine**, v. 48, n. 6, p. 366-372, 2020.

JUNIOR, J. M. N. *et al*. Clinical and epidemiological aspects of *Candida* yeast infections and rational use of antifungals. **Future Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 577-584, 2024.

LANIER, E. R.; ANDERSEN, T. B.; HAMBERGER, B. Plant terpene specialized metabolism: complex networks or simple linear pathways? **The Plant Journal**, v. 114, n. 5, p. 1178-1201, 2023.

LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 5, 2023.

LEW, S. Q.; LIN, C-H. *N*-acetylglucosamine-mediated morphological transition in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Current Genetics**, v. 67, n. 2, p. 249-254, 2021.

LIANG, X. *et al.* Artemisinins inhibit oral candidiasis caused by *Candida albicans* through the repression on its hyphal development. **International Journal of Oral Science**, v. 15, n. 1, p. 40, 2023.

LIM, S. J. *et al.* Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. **Medical mycology**, v. 59, n. 12, p. 1127-1144, 2021.

LIMA, R. *et al*. The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment. **Frontiers in fungal biology**, v. 3, p. 957021, 2022.

LIONAKIS, M. S.; DRUMMOND, R. A.; HOHL, T. M. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 7, p. 433-452, 2023.

LIU, C.; SHAO, J. Therapy of traditional Chinese medicine in *Candida* spp. and *Candida* associated infections: A comprehensive review. **Fitoterapia**, p. 106139, 2024.

LIU, X. *et al*. Making small molecules in plants: a chassis for synthetic biology-based production of plant natural products. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 65, n. 2, p. 417-443, 2023.

LOCKHART, S. R.; CHOWDHARY, A.; GOLD, J. A. W. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 818-832, 2023.

LOH, J. T.; LAM, K-P. Fungal infections: Immune defense, immunotherapies and vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 196, p. 114775, 2023.

LU, H. *et al*. Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 199, p. 114960, 2023.

MACALPINE, J.; LIONAKIS, M. S. Host-microbe interaction paradigms in acute and recurrent vulvovaginal candidiasis. **Cell Host & Microbe**, v. 32, n. 10, p. 1654-1667, 2024.

MACIAS-PAZ, I. U. *et al. Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 55, n. 2, p. 189-198, 2023.

MACHADO, T. Q. *et al.* A narrative review of the antitumor activity of monoterpenes from essential oils: An update. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 6317201, 2022.

MAGRÉAULT, S. *et al*. When and how to use MIC in clinical practice?. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1748, 2022.

MASYITA, A. *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food chemistry**: v. 13, p. 100217, 2022.

MATELIENĖ, L. *et al*. Reactivity Patterns of Olefins in the Matsuda-Heck-Reaction and their Impact on the Formation of Pd-Nanoparticles. **ChemistrySelect**, v. 8, n. 20, p. e202301407, 2023.

MONTERO-FERNÁNDEZ, I. *et al*. Bioactive Potential of Terpenes from Mediterranean Scrub Plants: A Review. **Molecules**, v. 30, n. 21, p. 4268, 2025.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al. Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti–*Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 200-207, 2016.

MROCZYŃSKA, M.; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. Review on current status of echinocandins use. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 227, 2020.

NAEEM, A. *et al*. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022.

NAJMI, A. *et al*. Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.

OLIVEIRA, V. C. *et al.* Enantioselective Heck-Matsuda Reactions of Spirocyclopentenyl Hydantoins Directed by Non-Covalent Interactions: Total Synthesis of the (S, S)-VPC01091. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 362, n. 16, p. 3395-3406, 2020.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Genebra: OMS, 2022.

OKHALE, S. E. *et al*. Comparative study on the essential oils of *Curcuma longa* L., *Zingiber officinale* roscoe and *Xylopia aethiopica* (dunal) A. Rich. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 13, p. 1-6, 2021.

OLIVEIRA, C. C.; CORREIA, C. R. D. Enantioselective Heck-Matsuda Reactions: From Curiosity to a Game-Changing Methodology. **The Chemical Record**, v. 21, n. 10, p. 2688-2701, 2021.

OLIVEIRA, J. S. *et al*. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: A journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 377-388, 2020.

PADDA, I. S.; PARMAR, M. Flucytosine. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2024.

PADDER, S. A. *et al*. Metabolic flexibility and extensive adaptability governing multiple drug resistance and enhanced virulence in *Candida albicans*. **Critical reviews in microbiology**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2022.

PANIGRAHY, S. K.; BHATT, R. KUMAR, A. Targeting type II diabetes with plant terpenes: the new and promising antidiabetic therapeutics. **Biologia**, v. 76, n. 1, p. 241-254, 2021.

PARAMBATH, S. *et al*. *Candida albicans*—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae045, 2024.

PAULINO, B. N. *et al*. Beyond natural aromas: The bioactive and technological potential of monoterpenes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 128, p. 188-201, 2022.

PAVIC, A. *et al*. Long-chain 4-aminoquinolines inhibit filamentation and increase efficacy of nystatin against *Candida albicans* infections *in vivo*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2024.

PUUMALA, E. *et al*. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. e00142-23, 2024.

QUEIROZ, S. S. *et al*. Current advances in *Candida tropicalis*: Yeast overview and biotechnological applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 2069-2087, 2023.

ROBBINS, N.; COWEN, L. E. *Candida*. **Current Biology**, v. 35, n. 11, p. R522-R526, 2025,

ROKAS, A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 607-619, 2022.

SAGATOVA, A. A. Strategies to better target fungal squalene monooxygenase. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 49, 2021.

SAINI, V. *et al*. Recent Advances in the Development of Antifungal Agents: Beyond Azoles, Polyenes, and Echinocandins. **ACS Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1271-1295, 2025.

SANTOS, M. M.; ISHIDA, K. We need to talk about *Candida tropicalis*: Virulence factors and survival mechanisms. **Medical mycology**, v. 61, n. 8, p. myad075, 2023.

SHARMA, M.; CHAKRABARTI, A. Candidiasis and other emerging yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 17, n. 1, p. 15-24, 2023.

SHARMA, R; NAHAR, A.; PURI, S. *Candida albicans* enhances iron uptake to maintain fluconazole resistance. **Infection and Immunity**, v. 93, n. 3, p. e00002-25, 2025.

SELF, J. L. *et al*. Camphene as a Mild, Bio-Derived Porogen for Near-Ambient Processing and 3D Printing of Porous Thermoplastics. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, n. 43, p. 49244-49253, 2022.

SHEN, Y. *et al*. Palladium-Catalyzed Heck-Matsuda Reaction of Morita-Baylis-Hillman Alcohols with Aryl Triazenes: Unexpected Role of Nitric Acid as the Promoter. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 28, n. 12, p. e202401386, 2025.

SIDDIQUI, T. *et al*. Terpenoids in essential oils: Chemistry, classification, and potential impact on human health and industry. **Phytomedicine plus**, v. 4, n. 2, p. 100549, 2024.

SIGERA, L. S. M.; DENNING, D. W. Flucytosine and its clinical usage. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.

SILVA-RODRIGUES, G. *et al*. Geraniol Potentiates the Effect of Fluconazole against Planktonic and Sessile Cells of Azole-Resistant *Candida tropicalis*: *In Vitro* and *In Vivo* Analyses. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, p. 1053, 2024.

SISCAR-LEWIN, S.; HUBE, B.; BRUNKE, S. Emergence and evolution of virulence in human pathogenic fungi. **Trends in microbiology**, v. 30, n. 7, p. 693-704, 2022.

SINGH, D. P. *et al*. Non- *Candida albicans Candida* species: virulence factors and species identification in India. **Current Medical Mycology**, v. 7, n. 2, p. 8, 2021.

SIQUEIRA, A. C. *et al*. Azole Resistance and ERG11 Mutation in Clinical Isolates of *Candida tropicalis* .**Journal of Fungi**, v. 11, n. 1, p. 24, 2025.

SOUSA, D. P. *et al.* Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

SOUZA-FERRARI, DE J. *et al*. A late-stage diversification via Heck-Matsuda arylation: Straightforward synthesis and cytotoxic/antiproliferative profiling of novel aryl-labdane-type derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 52, p. 128393–128393, 2021.

STAMATIOU, R. *et al*. Camphene as a Protective Agent in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. **Antioxidants**, v. 13, n. 4, p. 405, 2024.

SZERENCSÉS, B. *et al*. Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-13, 2020.

SZYMAŃSKI, M. *et al*. Echinocandins–structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876-894, 2022.

SCHIKORA-TAMARIT, M. À.; GABALDÓN, T. Recent gene selection and drug resistance underscore clinical adaptation across *Candida* species. **Nature Microbiology,** v. 9, p. 284–307, 2024.

SMITH, D. J. *et al*. Public health research priorities for fungal diseases: a multidisciplinary approach to save lives. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 8, p. 820, 2023.

TAMO, S. B. *Candida* infections: clinical features, diagnosis and treatment. **Infectious Diseases and Clinical Microbiology**, v. 2, p. 91-103, 2020.

THAMBUGALA, K. M. *et al*. Humans vs. Fungi: An Overview of Fungal Pathogens against Humans. **Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 426, 2024.

TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Gastrointestinal host-pathogen interaction in the age of microbiome research. **Current opinion in microbiology**, v. 53, p. 78-89, 2020.

VANREPPELEN, G. *et al.* Sources of antifungal drugs. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 171, 2023.

VUCETIC, N. *et al*. Competing commercial catalysts: Unprecedented catalyst activity and stability of Mizoroki-Heck reaction in a continuous packed bed reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 433, p. 134432, 2022.

WANG, F. *et al*. Antifungal activities of Equol against *Candida albicans in vitro* and *in vivo*. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2404256, 2024.

WANG, M-L. *et al*. Mizoroki–Heck reaction of unstrained aryl ketones via ligand-promoted C–C bond olefination. **Organic Letters**, v. 23, n. 6, p. 2147-2152, 2021.

WANG, Q. *et al*. Molecular epidemiology of *Candida tropicalis* isolated from urogenital tract infections. **Microbiologyopen**, v. 9, n. 11, p. e1121, 2020.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal susceptibility testing: a primer for clinicians. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2021. p. ofab444

WOJTUNIK-KULESZA, K. A. Toxicity of selected monoterpenes and essential oils rich in these compounds. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1716, 2022.

WU, Y. *et al*. Probiotics: potential novel therapeutics against fungal infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 793419, 2022.

XU, J. Is natural population of *Candida tropicalis* sexual, parasexual, and/or asexual?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 751676, 2021.

YANG L, *et al*. Antioxidant Properties of Camphene-Based Thiosemicarbazones: Experimental and Theoretical Evaluation. **Molecules,** v. 25, n. 5, p. 1192, 2020.

ZHANG, C-W. *et al*. Antifungal natural products and their derivatives: a review of their activity and mechanism of actions. **Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine**, v. 7, p. 100262, 2023.

ZHANG, J. *et al*. Natural products and derivatives for breast cancer treatment: From drug discovery to molecular mechanism. **Phytomedicine**, p. 155600, 2024.

ZHANG, C. *et al*. Clinical manifestations and treatment of candidemia caused by different *Candida* species: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1234, 2024.

ZAONGO, S. D. *et al. Candida albicans* can foster gut dysbiosis and systemic inflammation during HIV infection. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, p. 2167171, 2023.

XIONG, l. GOERLICH, K. MITCHELL, A. P. Regulatory features of *Candida albicans* hemin-induced filamentation, ***G3 Genes|Genomes|Genetics***, v.14, n, 5, 2024.

APÊNDICES

Apêndice 1- Material suplementar

INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Eficácia antifúngica contra cepas de *Candida* spp. e síntese por arilação de Heck-Matsuda de derivados do tipo aril-canfeno

Naiza Saraiva Farias[1], Laryssa de Souza-Salgado[2], Francisco Bernardo de Barros[1], Maria Alicy Neres de Oliveira[1], Márcia Jordana Ferreira Macedo[1], Francildo dos Santos Silva[1], João Pedro Alves Torres[2], Henrique Douglas Melo Coutinho[1], Jailton De Souza-Ferrari[2]*, Maria Audilene de Freitas[1]*, and Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga[1] *

[1] Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Rua Coronel Antônio Luís, Crato, Ceará, 63105-000, Brasil

[2] Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil

*Para quem deve ser endereçada a correspondência:

jferrari@quimica.ufpb.br audbiologa@hotmail.com flaviana.morais@urca.br

O SI é composto por 25 páginas, 2 tabelas e 28 figuras.

ÍNDICE

1.	**Informações gerais**	S3-S4
2.	**Otimização das condições da reação de Heck-Matsuda**	S5-S5
3.	**Dados de RMN 1D e 2D para o aduto HM 3a em $CDCl_3$**.....	S6-S6
4.	**Dados analíticos e espectrais dos derivados do tipo aril-canfeno**	S7-S10
5.	**Cópias dos espectros de RMN em 1D e 2D e do HRMS**	S11-S24
6.	**Referências complementares** ….....	S25-S25

1. Informações gerais

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente; eram de pureza analítica e utilizados sem purificação adicional. A temperatura ambiente (TA) refere-se a um valor padrão de 25 °C. Todas as reações foram agitada com barras magnéticas revestidas de teflon e monitoradas por cromatografia em camada fina (CCF). Todas as reações foram realizadas em recipientes de 10 mL à luz do ar (recipientes abertos).Os ensaios analíticos por cromatografia em coluna de sílica (TLC) foram realizados em placas de alumínio pré-revestidas com gel de sílica Macherey-Nagel (ALUGRAM Xtra Sil G/UV254) (0,20 mm de espessura) e visualizados sob luz UV (λ = 254 nm). As composições do eluente ou do solvente são expressas em (v/v). Todas as evaporações foram realizadas sob pressão reduzida em evaporadores rotativos, com temperaturas do banho não superiores a 45 °C. A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em coluna de fluxo rápido (CC), utilizando gel de sílica Neon (230–400 mesh) e utilizando o procedimento cromatográfico descrito na literatura por Still e colaboradores[1]. Os compostos purificados foram submetidos a uma secagem adicional sob alto vácuo (0,010–0,005 mbar). Os rendimentos referem-se a compostos purificados por cromatografia e espectroscopia (RMN de H1 e 13C). As temperaturas acima da temperatura ambiente foram mantidas por meio de um banho de óleo mineral em uma placa de aquecimento.

Todos os sais de arildiazônio empregados nesta pesquisa são bem conhecidos e sintetizados de acordo com protocolos estabelecidos na literatura por diazotização de anilina e outras aminas aromáticas apropriadas [2-3].

Os pontos de fusão foram registados utilizando um aparelho GEHAK 1.01 PF1500 e não estão corrigidos. As análises elementares de combustão foram realizadas utilizando um instrumento Perkin-Elmer modelo CHN 2400.

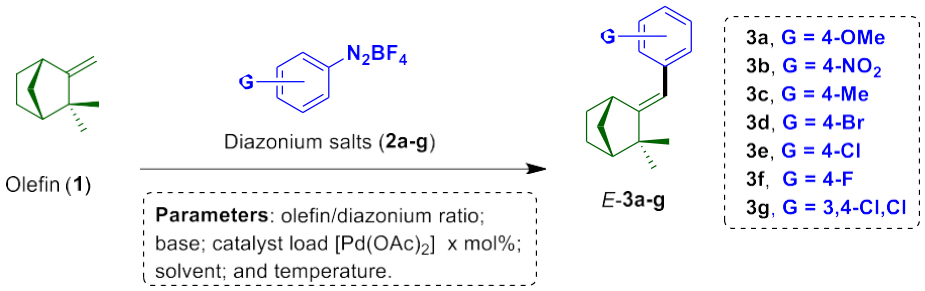
A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um espectrofotômetro IR Prestige-21 FTIR (Shimadzu) utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR), e os espectros são apresentados em cm^{-1}. As análises por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foram realizadas em um espectrômetro de massa microTOFII ESI-TOF (Bruker) ou no LCMS-9050 APCI-TOF (Shimadzu). Os espectros de RMN (ressonância magnética nuclear) unidimensional e bidimensional utilizados para determinar a identidade e a pureza dos compostos sintetizados foram obtidos em espectrômetros Bruker AVANCE III Hb (400 ou 500 MHz para ^{1}H e 101 ou 126 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos são expressos em partes por milhão (ppm) a partir do TMS (0 ppm) e referenciados ao prótio residual no solvente de RMN ($CHCl_3$ = δ 7,28 para RMN de ^{1}H e 77,16 ppm para RMN de ^{13}C) como padrão interno. As constantes de acoplamento (J) são expressas com uma precisão de 0,1 Hertz (Hz). As descrições dos padrões de acoplamento dos sinais de RMN de ^{1}H baseiam-se na aparência óptica dos sinais e não refletem necessariamente a interpretação fisicamente

correta. Em geral, as informações sobre o desvio químico referem-se ao centro do sinal. No caso de multipletos, são fornecidos intervalos. As abreviações utilizadas para indicar a multiplicidade de um determinado sinal são s (singuleto), d (duplet), t (triplet), q (quarteto), dd (duplo duplet), m (multiplet) e sl (sinal grande).

Os compostos sintetizados 3a-g apresentaram pureza de pelo menos 95%, conforme determinado por análises elementares por combustão CHN (resultados com desvio de até 0,4% em relação aos valores teóricos).

2. Otimização das condições da reação de Heck-Matsuda

Tabela S1 – Estudos de otimização da reação de Heck-Matsuda do canfeno (**1**)



Entrada	Olefina: Diazonina (equiv.)	Base (equiv.)	$Pd(OAc)_2$ (mol%)	Solvente	T (ºC)	t (h)	rendimento (%)
1	1.5 : 1.0	-	0.9	EtOH(95%)	40	3	- (**3a**)
2	1.5 : 1.0	-	0.9	EtOH	40	3	- (**3a**)
3	1.2 :1 .0	NaOAc (1.0)	5	MeOH	rt	3	- (**3a**)
4	1.2 : 1.0	$ZnCO_3$ (1.0)	5	MeOH	rt	3	5 (**3a**)
5	1.2 : 1.0	$Zn(AcO)_2$ (1.0)	5	MeOH	rt	3	- (**3a**)
6	1.0 1.5	NaOAc (1.5)	10	MeOH	rt	1	35 (**3a**)
7	1.0 : 1.5	NaOAc (1.5)	10	EtOH	rt	1	62 (**3a**)
8	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	rt	1	65 (**3a**)
9	1.0 : 1.5	$Zn(AcO)_2$ (1.5)	10	EtOH	rt	1	4 (**3a**)
10	1.0 : 1.5	NaOAc (1.5)	10	EtOH	40	1	23 (**3a**)
11	1.0 : 1.5	$CaCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	37 (**3a**)
12	1.0 : 1.5	K_2CO_3 (1.5)	10	EtOH	40	1	48 (**3a**)
13	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	95 (**3a**)
14	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	53 (**3a**)
15	1.0 : 1.2	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	73 (**3a**)
16	1.0 : 1.5	ZnCO3 (1.5)	10	EtOH	40	1	98 (**3b**)
17	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	85 (**3b**)
18	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	2.5	EtOH	40	1	92 (**3b**)
19	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	48 (**3c**)
20	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	62 (**3c**)
21	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	89 (**3d**)
22	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	90 (**3d**)
23	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	85 (**3e**)
24	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	80 (**3e**)
25	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	83 (**3f**)
26	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	66 (**3f**)
27	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	10	EtOH	40	1	80 (**3g**)
28	1.0 : 1.5	$ZnCO_3$ (1.5)	5	EtOH	40	1	62 (**3g**)

3. Dados de RMN em 1D e 2D para o aduto HM 3a em $CDCl_3$

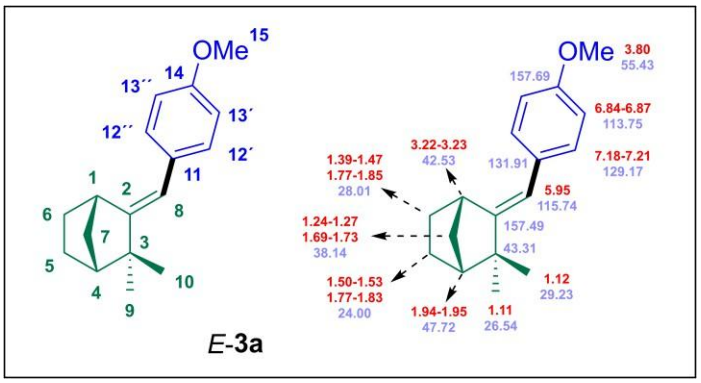
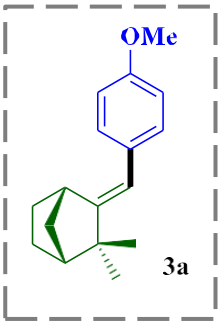


Tabela S2. Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (101 MHz) para o aduto HM **3a** em $CDCl_3$

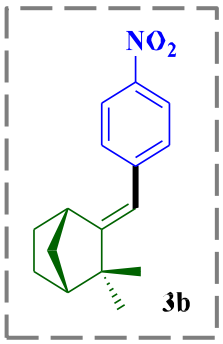
No.	δ_C, mult*	δ_H, mult*	H,H-COSY	HMBC (H→C)	NOESY
1	42.53, CH	3.22-3.23, m	H-6, 7, 8 (^4J)	C-3, 4	H-4, 6, 12
2	157.49, C				
3	43.31, C				
4	47.72, CH	1.94-1.95, m	H-5, 7	C-6, 2	H-5, 9
5a	24.00, CH_2	1.50-1.53, m	H-4, 6		
5b		1.77-1.83, m	H-4, 6		
6a	28.01, CH_2	1.39-1.47, m	H-1, 5		
6b		1.77-1.85, m	H-1, 5		
7a	38.14, CH_2	1.24-1.27, m	H-1, 4		
7b		1.69-1.73, m	H-1, 4		
8	115.74, CH	5.95, s	H-1 (^4J)	C-3, 10, 11, 12	H-10, 12
9	26.54, CH_3	1.11, s		C-2, 3, 4	
10	29.23, CH_3	1.12, s		C-2, 3, 4	H-8
11	131.91, C				
12´	129.17, CH	7.18-7.21, m	H-13´, 13´´	C-13´, 13´´, 14	H-8, 13´, 13´´
12´´	129.17, CH	7.18-7.21, m	H-13´, 13´´	C-13´, 13´´, 14	H-8, 13´, 13´´
13´	113.75, CH	6.84-6.87, m	H-12´, 12´´	C-8, 12´, 12´´, 14	H-12´, 12´´, 15
13´´	113.75, CH	6.84-6.87, m	H-12´, 12´´	C-8, 12´, 12´´, 14	H-12´, 12´´, 15
14	157.9, C				
15	55.43, OCH_3	3.80, s		C-14	

* Utilizou-se a HSQC para confirmar as atribuições de hidrogênio aos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono.

4. Dados analíticos e espectrais dos derivados do tipo aril-canfeno

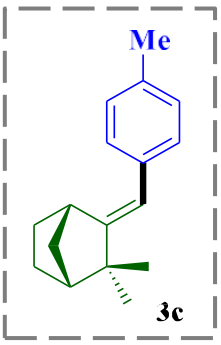


Aduto HM 3a, (±)-*3-((E)-4-metoxibencilideno)-2,2-dimetilbiciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM de canfeno e purificado por cromatografia flash em coluna (hexano/éter dietílico 98:2, v/v) para gerar o 3a como um sólido branco amorfo. Rendimento 95% (114.9 mg); mp 88–91 ºC; TLC: Rf = 0.60 (hexano/éter dietílico – 98:2); IR (ATR) ν/cm^{-1} 3010, 2952, 1888, 1509, 1462, 1358, 1243, 823; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.18-7.21 (2H, *m*); 6.84-6.87 (2H, *m*); 5.95 (1 H, *s*); 3.80 (3H, *s*); 3.22-3.23 (1H, *m*); 1.94-1.95 (1H, *m*); 1.69-1.85 (3H, *m*); 1.39-1.53 (2H, *m*); 1.24-1.27 (1H, *m*); 1.12 (3H, *s*); 1.11 (3H, *s*); ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ157.69; 157.49; 131.91; 129.17; 115.74; 113.75; 55.43; 47.72; 43.31; 42.53; 38.14; 29.23; 28.01; 26.54; 24.00; HRMS (ESI-TOF) *m/z*, calcd. para $C_{17}H_{22}O$ $[M + H]^+$: 242.1671, encontrado: 243.1743. Análise elementar calculada para $C_{17}H_{22}O$: C, 84.25; H, 9.15%, encontrado: C, 84.27; H, 9.13%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura [4].

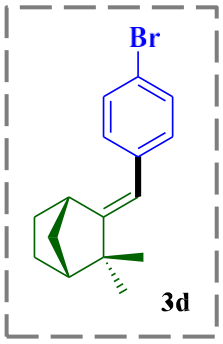


aduto HM 3b, (±)-*2,2-dimetil-3-((E)-4-metilbencilideno)biciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna de flash (hexano/éter dietílico 98:2, v/v), obtendo-se 3b na forma de um sólido amorfo amarelado. Rendimento 96% (126.2 mg); mp 90–92 ºC; TLC: Rf = 0.43 (hexano/éter dietílico – 98:2); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3382, 1650, 1589, 1512, 1340, 1081, 875; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15-8.17 (2H, *m*); 7.34-7.37 (2H, *m*); 6.06 (1H, *s*); 3.23-3.24 (1H, *m*); 2.00-2.01(1H, *m*); 1.83-1.91 (1H, *m*); 1.72-1.81 (2H,*m*); 1.49-1.57 (3H, *m*); 1.39-1.46 (1H, *m*); 1.30-1.34 (1H, *m*); 1.14-1.15 (6H, *s*); ^{13}C RMN

(101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.95; 146.08; 145.52; 128.50; 123.78; 115.23; 47.49; 44.15; 42.97; 38.23; 29.04; 27.80; 26.24; 23.82; HRMS (ESI-TOF) *m/z*, calc. para $C_{16}H_{19}NO_2$ $[M + H]^+$: 257.1416, encontrado: 258.1488. Análise elementar calculada para $C_{16}H_{19}NO_2$: C, 74.86; H, 7.44; N, 5.44%, encontrado: C, 74.89; H, 7.42; N, 5.41%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura [4].

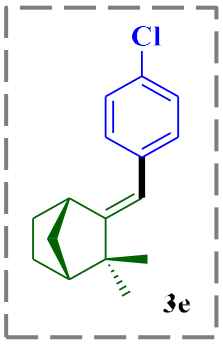


aduto HM 3c, (±)-*2,2-dimetil-3-((E)-4-metilbenzilideno)bicíclico[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna de flash (hexano), obtendo-se o composto 3c na forma de um líquido viscoso incolor à temperatura ambiente e de um sólido quando refrigerado (abaixo de 20 ºC). Rendimento 62% (54.0 mg); TLC: Rf = 0.70 (hexano/éter dietílico 98:2, v/v); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3021, 2957, 2862, 1660, 1512, 1459, 1359, 803; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.15-7.23 (4H, *m*). 6.04 (1H, *s*). 3.29-3.31 (1H, *m*). 2.38 (3H, *s*). 2.00-2.01 (1H, *m*). 1.74-1.90 (3H, *m*). 1.45-1.58 (2H, *m*). 1.29-1.32 (1H, *m*). 1.18 (6H, *s*); ^{13}C RMN (101 MHz. $CDCl_3$) δ 158.40. 136.28.135.18. 128.97. 128.02. 116.26. 47.73. 43.33. 42.63. 38.12. 29.25. 28.03. 26.48. 24.00. 21.22; HRMS (APCI-TOF) *m/z*, calcd. para $C_{17}H_{22}$ $[M + H]^+$: 226.3630, encontrado: 227.1783. Análise elementar calculada para $C_{17}H_{22}$: C, 90.20; H, 9.80%, encontrado: C, 90.23; H, 9.78%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura [4].

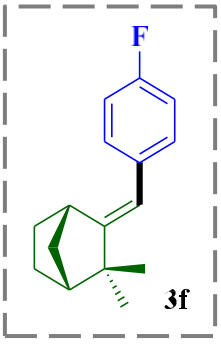


aduto HM 3d, (±)-*3-((E)-4-bromobenzilideno)-2,2-dimetilbiciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna de flash (hexano) e, posteriormente, por recristalização fracionada a partir de hexano/etanol (4:1, v/v), resultando no composto 3d na forma de um sólido branco amorfo. Rendimento 90%

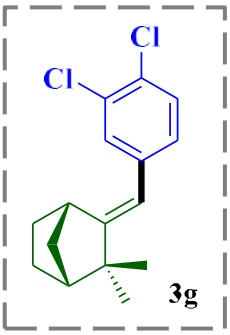
(131.05 mg); mp 89–90 ºC; TLC: Rf = 0.62 (hexano); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3028, 2964, 2857, 1684, 1653, 1620, 1483, 1465, 1357, 1065, 860, 807; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39-7.42 (2H, *m*); 7.09-7.13 (2H, *m*); 5.93 (1H, *s*); 3.17-3.19 (1H, *m*); 1.96-1.97 (1H, *m*); 2.69-1.95 (3H, *m*); 1.36-1.56 (3H, *m*); 1.25-1.29 (1H, *m*); 1.11-1.12 (6H,*s*); ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 161.33; 138.98; 132.21; 130.65; 120.17; 116.29; 48.53; 44.46; 43.51; 39.04; 30.05; 28.81; 27.28; 24.83; HRMS (APCI-TOF) *m/z*, calcd. $C_{16}H_{19}Br$ $[M + H]^+$: 290.0670, encontrado: 291.0729. Análise elementar calculada para $C_{16}H_{19}Br$: C, 65.99; H, 6.58%, encontrado: C, 65.97; H, 9.80%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura [4].



aduto HM 3e, (±)-*3-((E)-4-clorobenzilideno)-2,2-dimetilbiciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna de flash (hexano) e, posteriormente, por recristalização fracionada a partir de hexano/metanol (4:1, v/v), resultando no composto 3e na forma de um sólido branco amorfo. Rendimento 85% (105.30 mg); mp 94–95 ºC; TLC: Rf = 0.50 (hexano); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3039, 2951, 2863, 1683, 1660, 1487, 1464, 1382, 1085, 806; ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.32-7.36 (2H, *m*); 7.24-7.28 (2H, *m*); 6.04 (1H, *s*); 3.27-3.28 (1H, *d*); 2.04-2.06 (1H, *m*); 1.78-1.93 (3H, *m*); 1.55-1.64 (2H, *m*); 1.46-1.53 (1H, *m*); 1.34-1.37 (1H, *m*); 1.19- 1.21 (5H, *s*); ^{13}C RMN (126 MHz, $CDCl_3$) δ 160.25, 137.62, 131.19, 129.36, 128.36, 115.35, 47.63, 43.52, 42.59, 38.13, 29.16, 27.92, 26.40, 23.92; HRMS (APCI-TOF) *m/z*, calcd. para $C_{16}H_{19}Cl$ $[M + H]^+$: 246.1175, encontrado: 247.1235. Análise elementar calculada para $C_{16}H_{19}Cl$: C, 77.87; H, 7.76%, encontrado: C, 77.89; H, 7.75%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura [4].



aduto HM 3f, (±)-*3-((E)-4-fluorobenzilideno)-2,2-dimetilbiciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna de flash (hexano), obtendo-se o 3f na forma de óleo incolor. Rendimento 83% (132.30 mg); TLC: Rf = 0.55 (hexano); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3039, 2956, 2866, 1883, 1603, 1508, 1459, 1361, 1228, 822; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.18-7.24 (2H, *m*), 6.97-7.03 (2H, *m*), 5.98 (1H, *s*), 3.19-3.21 (1H, *m*), 1.97-1.99 (1H, *m*), 1.71-1.86 (3H, *m*), 1.39-1.57 (3H, *m*), 1.27-1.30 (3H, *m*), 1.27-1.30 (1H, *m*), 1.13-1.14 (6H, *s*); ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.30; 159.50 (d, *J* = 74 Hz); 135.19 (d, *J* = 3 Hz); 129.51 (d, *J* = 7 Hz); 115.24 (d, *J* = 18 Hz); 114.94; 47.56; 43.26; 42.3; 38.01; 29.08; 27.85; 26.33; 23.84; Análise elementar calculada para $C_{16}H_{19}F$: C, 83.44; H, 8.32%, encontrado: C, 83.46; H, 8.31%. Os dados de caracterização estão de acordo com os relatados na literatura.



3g

aduto HM 3g, (±)-*3-((E)-3,4-clorobenzilideno)-2,2-dimetilbiciclo[2.2.1]heptano*. Preparado de acordo com o procedimento geral para a arilação HM do canfeno e purificado por cromatografia em coluna rápida (hexano), obtendo-se o 3g na forma de líquido incolor. Rendimento 80% (112.48mg); TLC: Rf = 0.60 (hexano); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3052, 2956, 1892, 1580, 1546, 1461, 1378, 1026, 903, 885; ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30-7.37 (2H, *m*), 7.04-7.09 (1H, *m*), 5.90 (1H, *s*), 3.15-3.20 (1H, *m*), 1.95-1.99 (1H, *m*), 1,67-1.88 (4H, *m*), 1.36-1.60 (3H, *m*), 1.22-1.33 (1H, *m*), 1.12 (6H, s); ^{13}C RMN (126 MHz, $CDCl_3$) δ 161.66, 139.17, 132.04, 129.96, 129.70, 129.07, 127.30, 114.31, 47.43, 43.53, 42.46, 38.00, 28.99, 27.71, 26.19, 23.74; HRMS (APCI-TOF) *m/z*, calc. para $C_{16}H_{18}Cl_2$ $[M + H]^+$: 281.0786, encontrado: 281.0845. Os dados físico-químicos e analíticos do 3g são aqui descritos pela primeira vez.

5. Cópias dos espectros de RMN em 1D e 2D e do HRMS

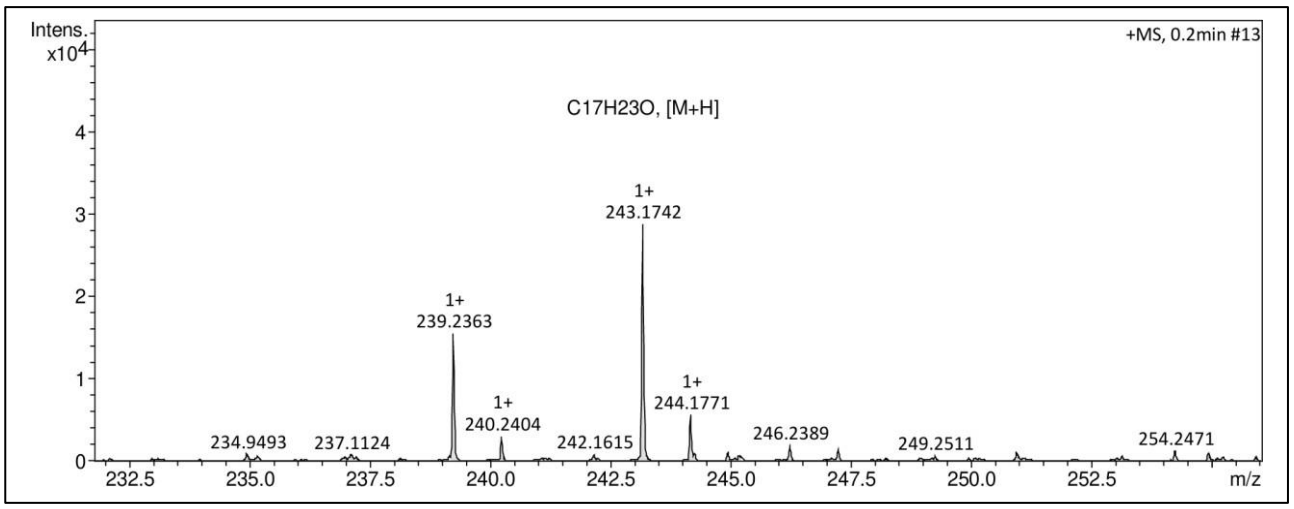


Figure S1. Espectro de massa do composto **3a**.

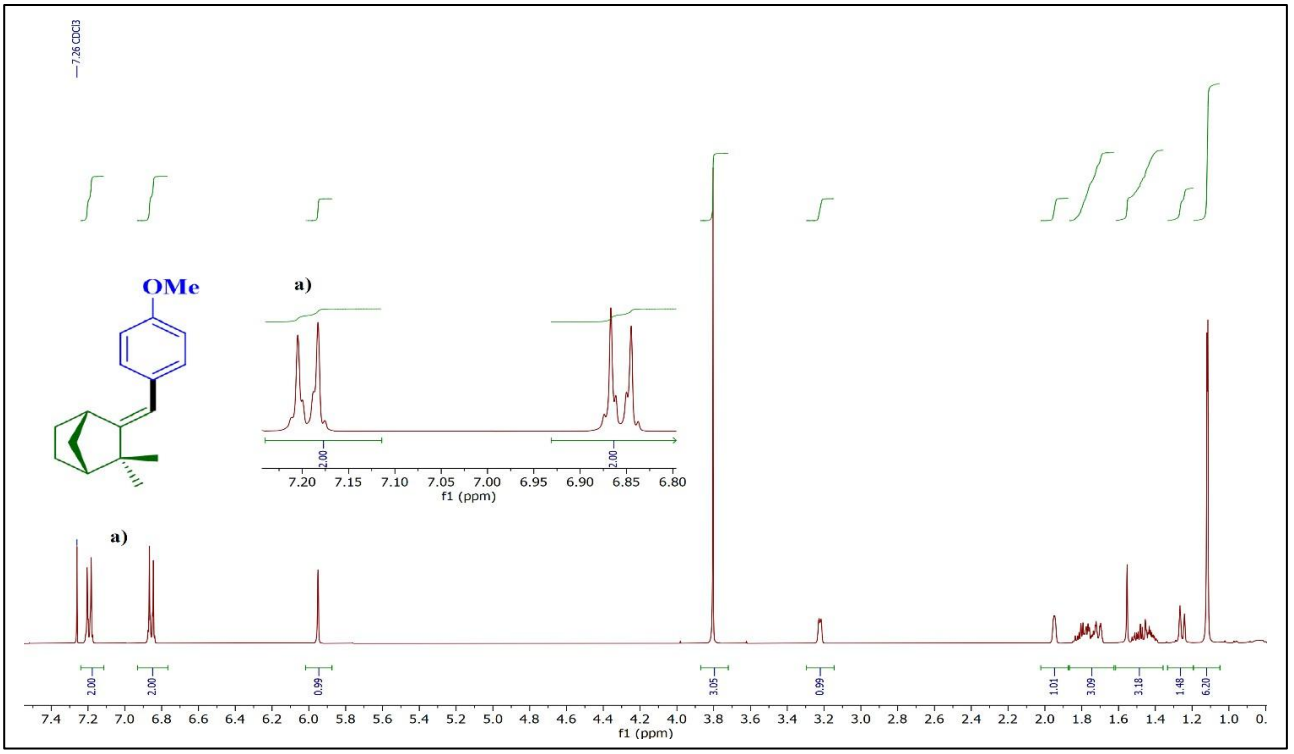


Figura S2. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3a**

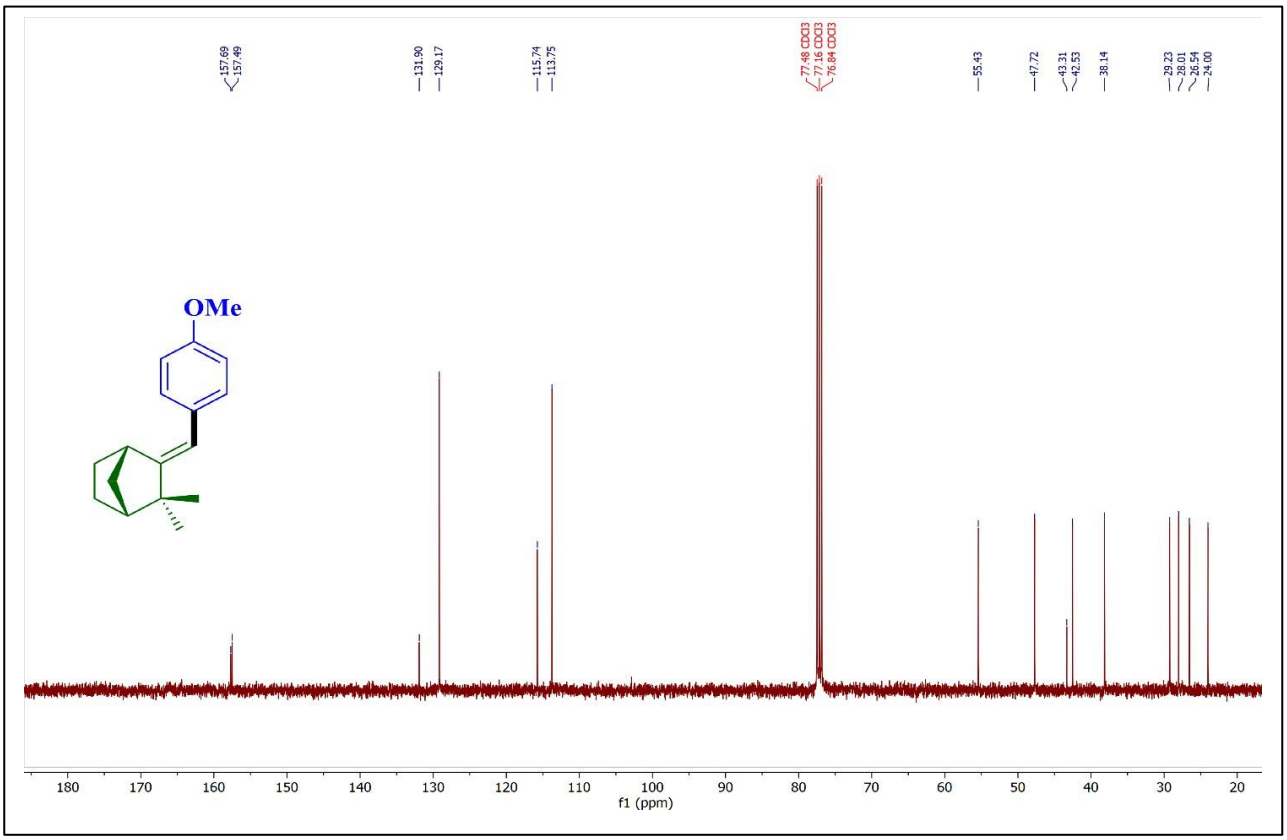


Figura S3. Espectro RMN ^{13}C(101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3a**

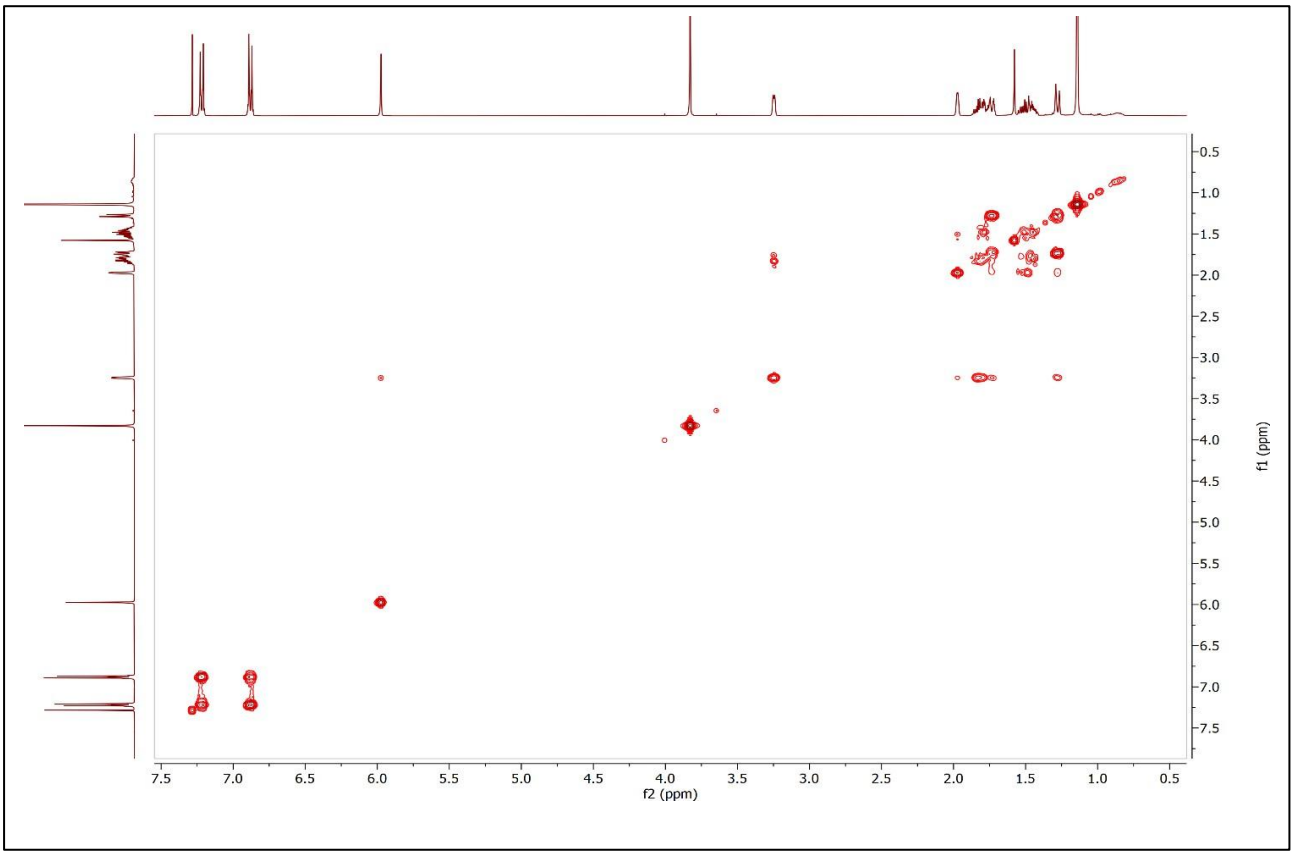


Figura S4. Espectro de RMN H,H-COSY do composto **3a** em $CDCl_3$.

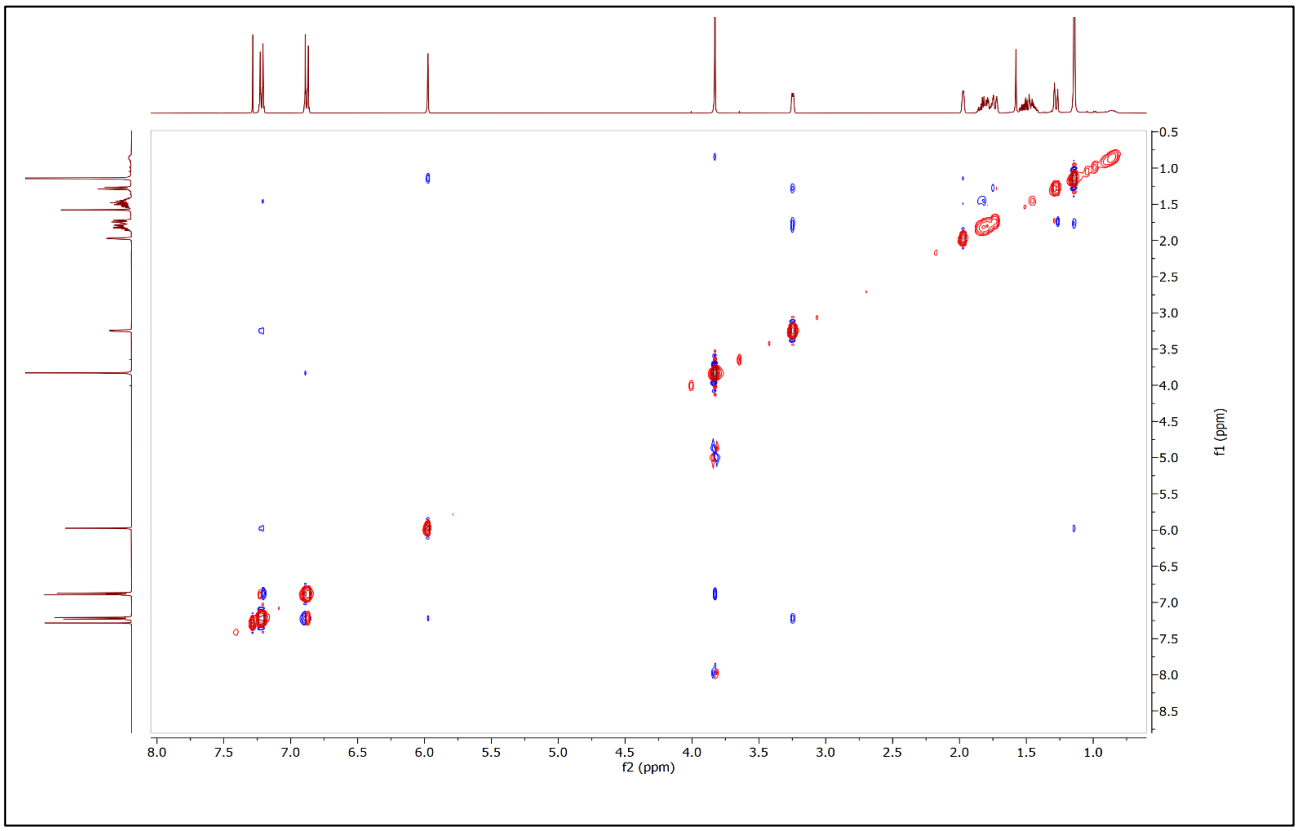


Figura S5. Espectro NOESY RMN do composto **3a** em $CDCl_3$

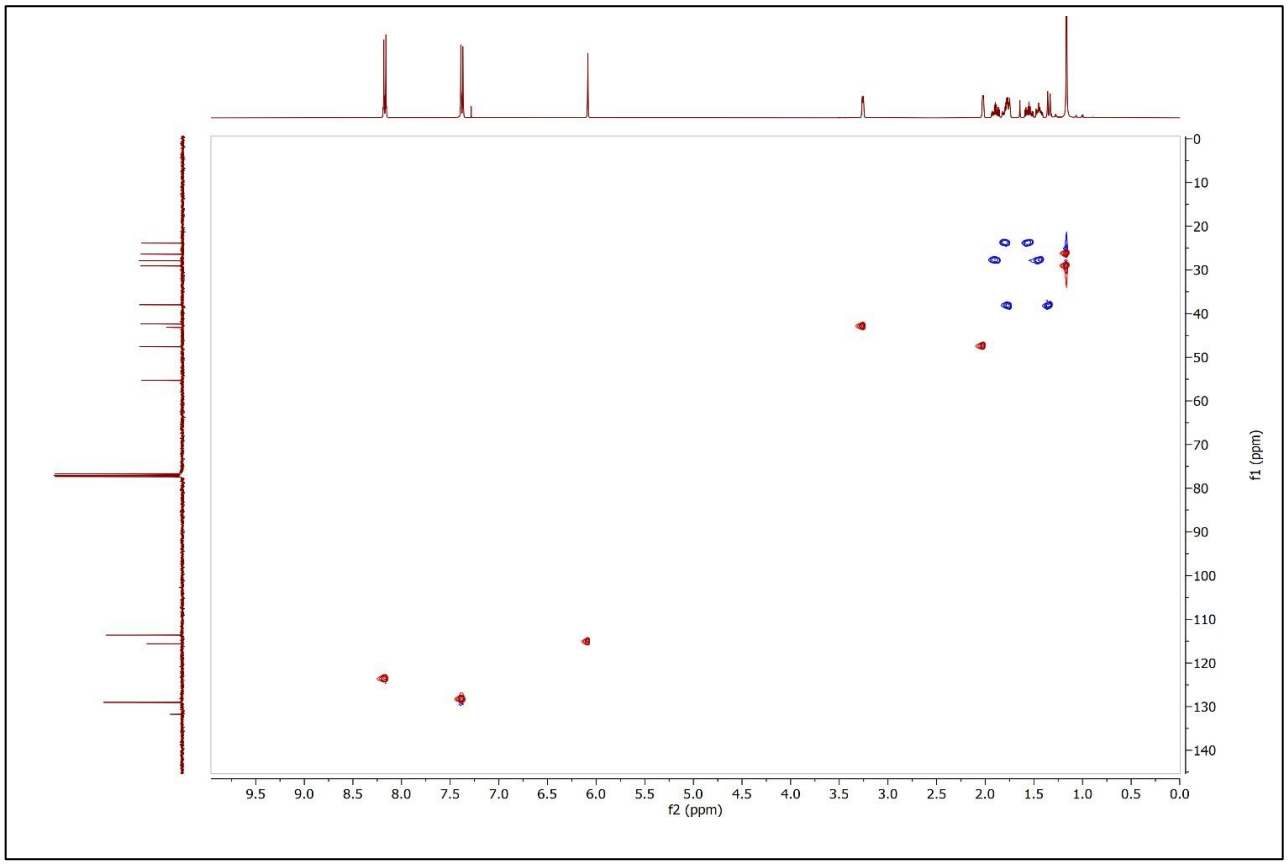


Figura S6. Espectro HMQC RMN do composto **3a** em $CDCl_3$

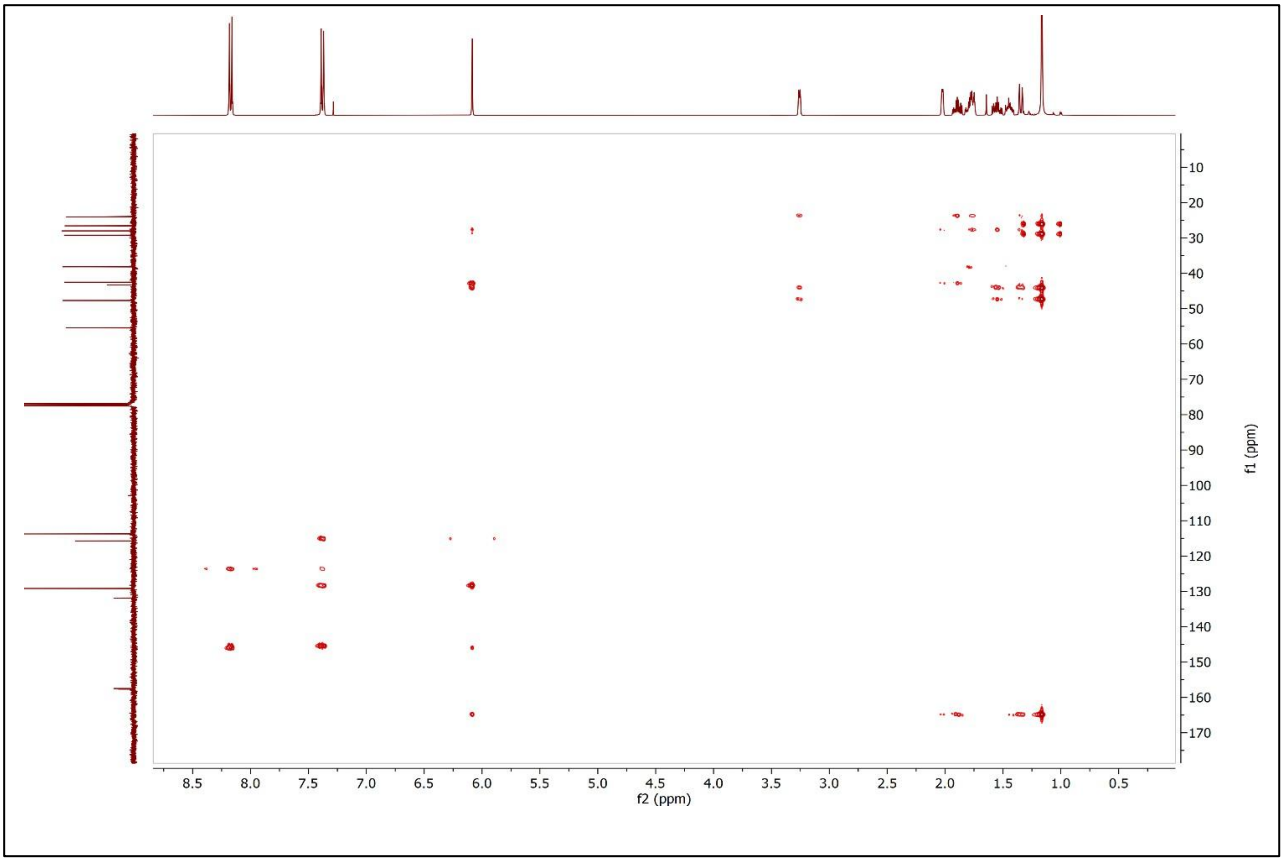


Figura S7. Espectro HMBC RMN do composto **3a** em $CDCl_3$

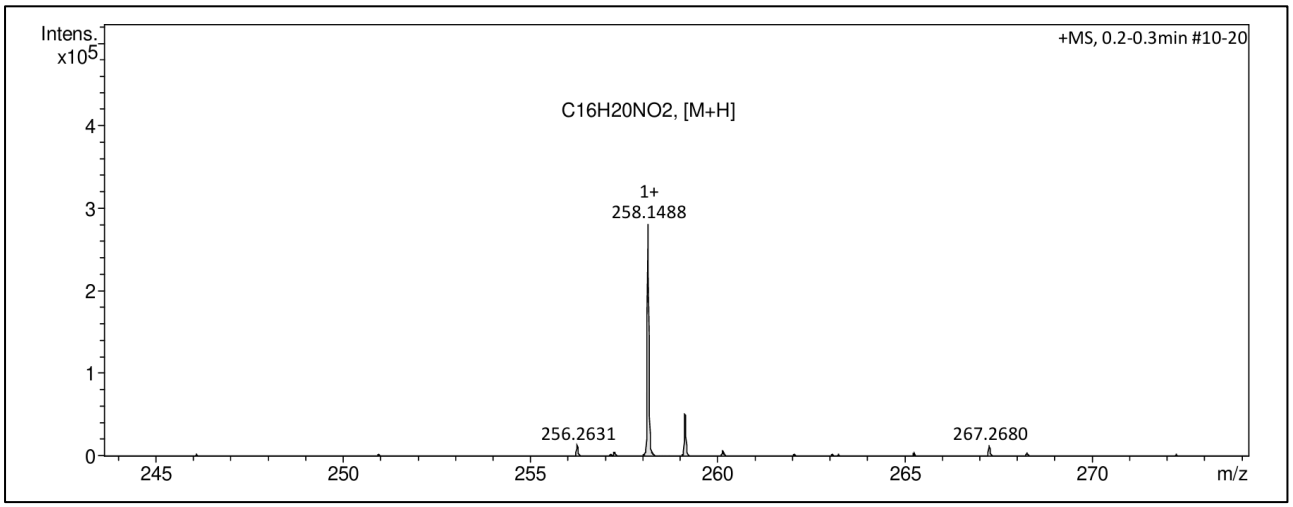


Figura S8. Espectro de massa do composto **3b.**

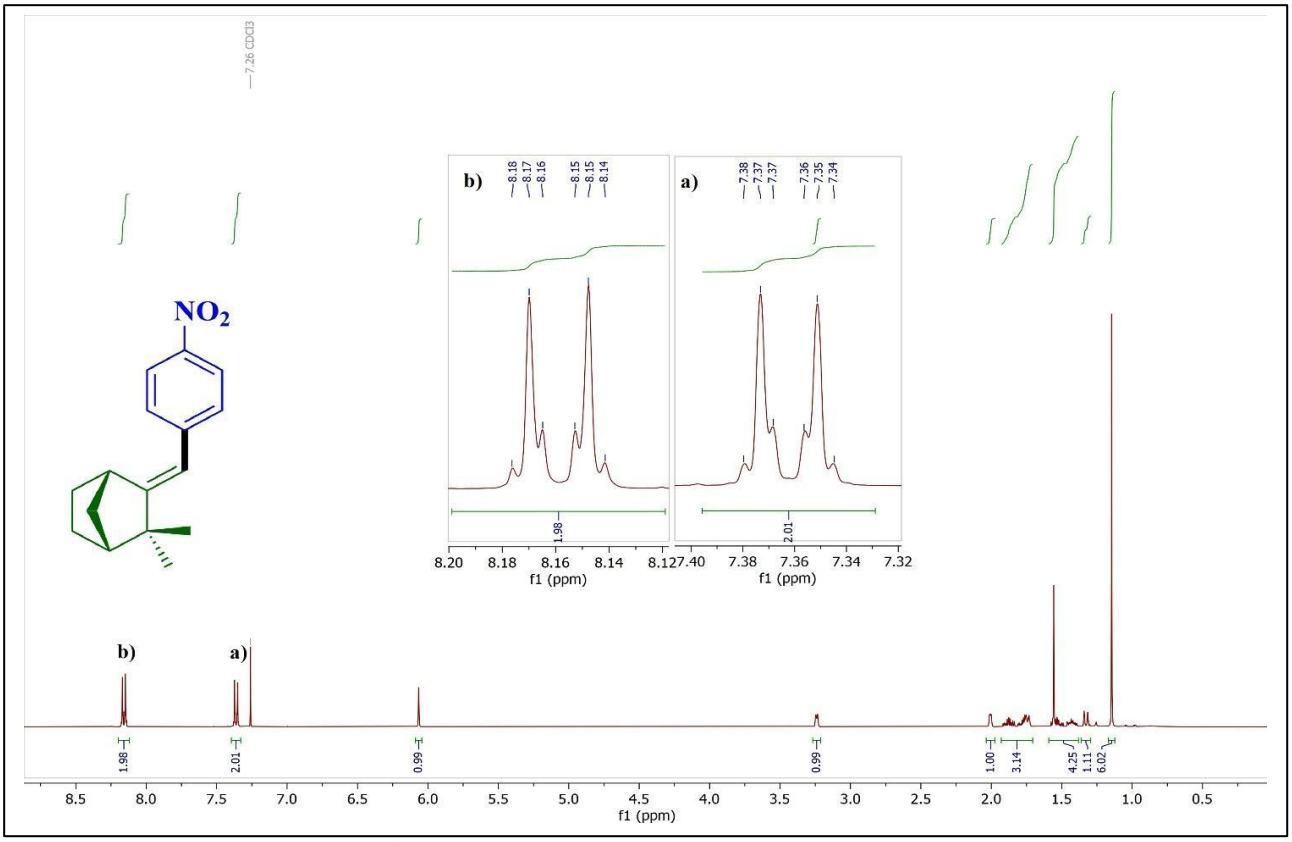


Figura S9. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3b**

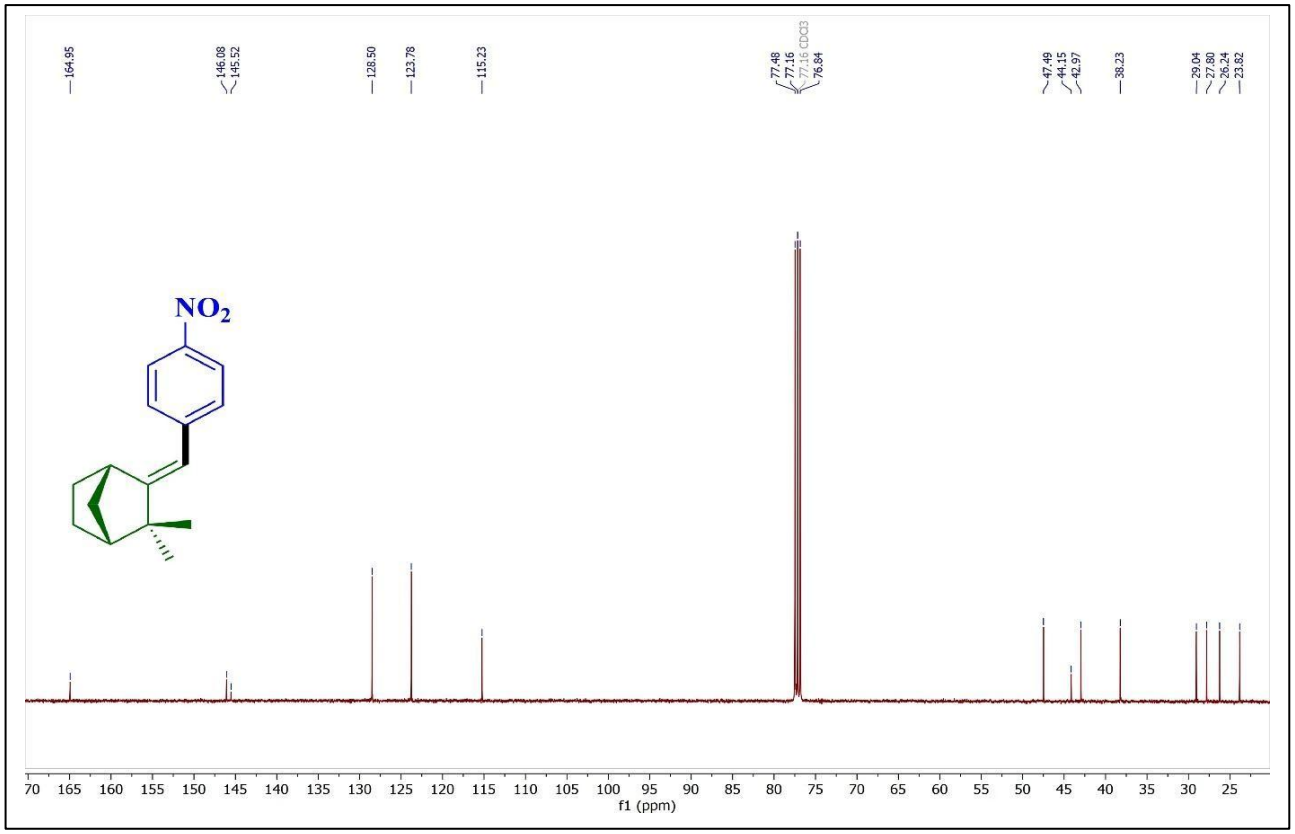


Figura S10. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3b**

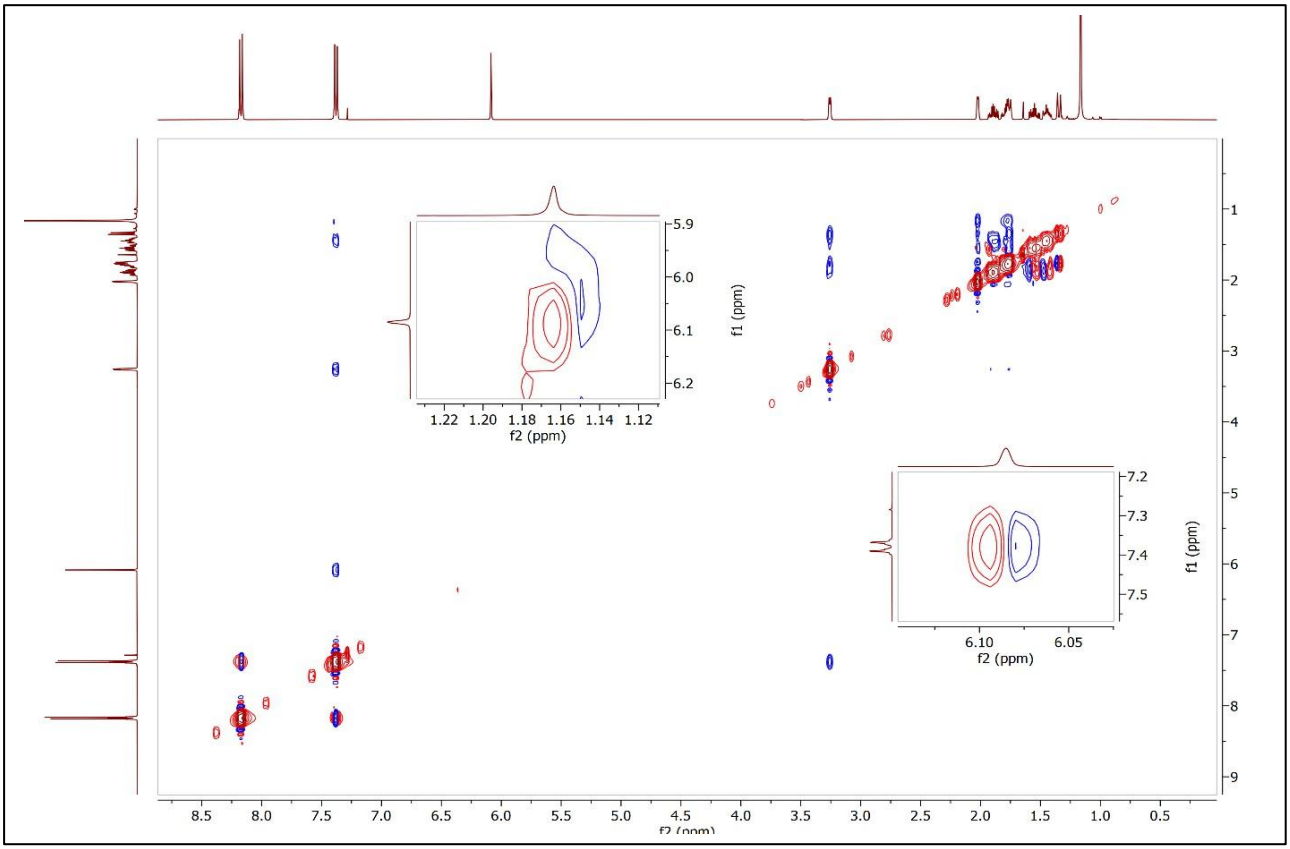


Figura S11. Espectro de RMN H,H-COSY do composto **3b** em $CDCl_3$

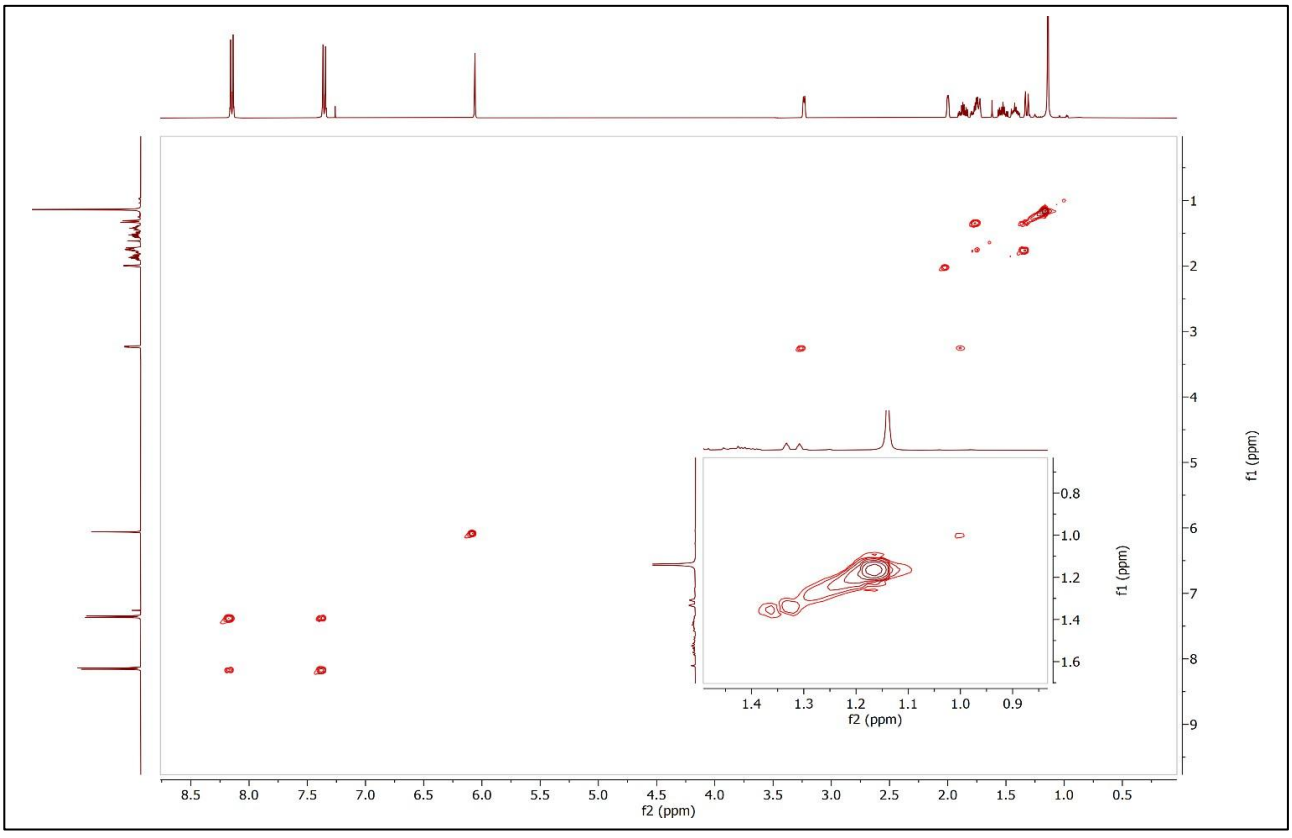


Figura S12. Espectro de RMN NOESY do composto **3b** em $CDCl_3$

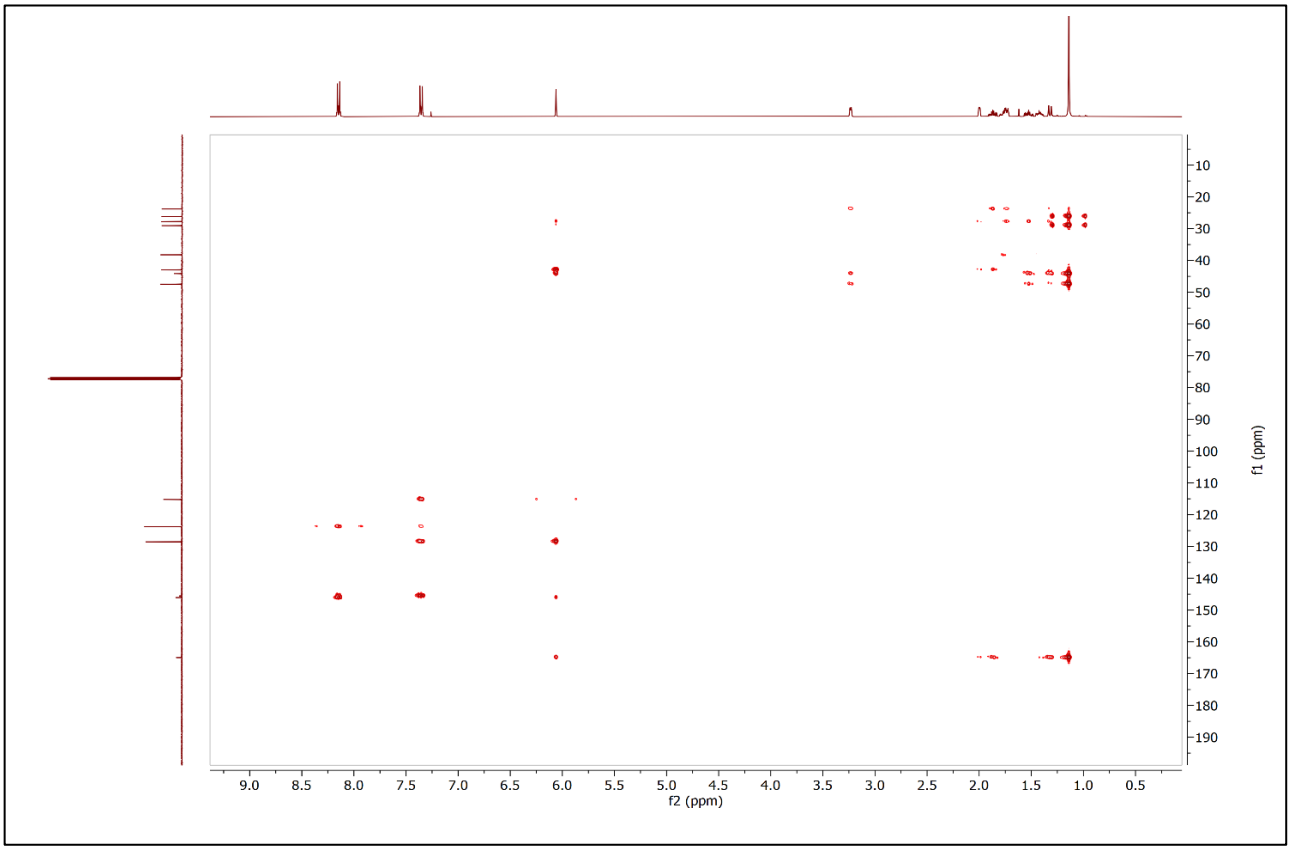


Figura S13. Espectro de RMN HMQC do composto **3b** em $CDCl_3$

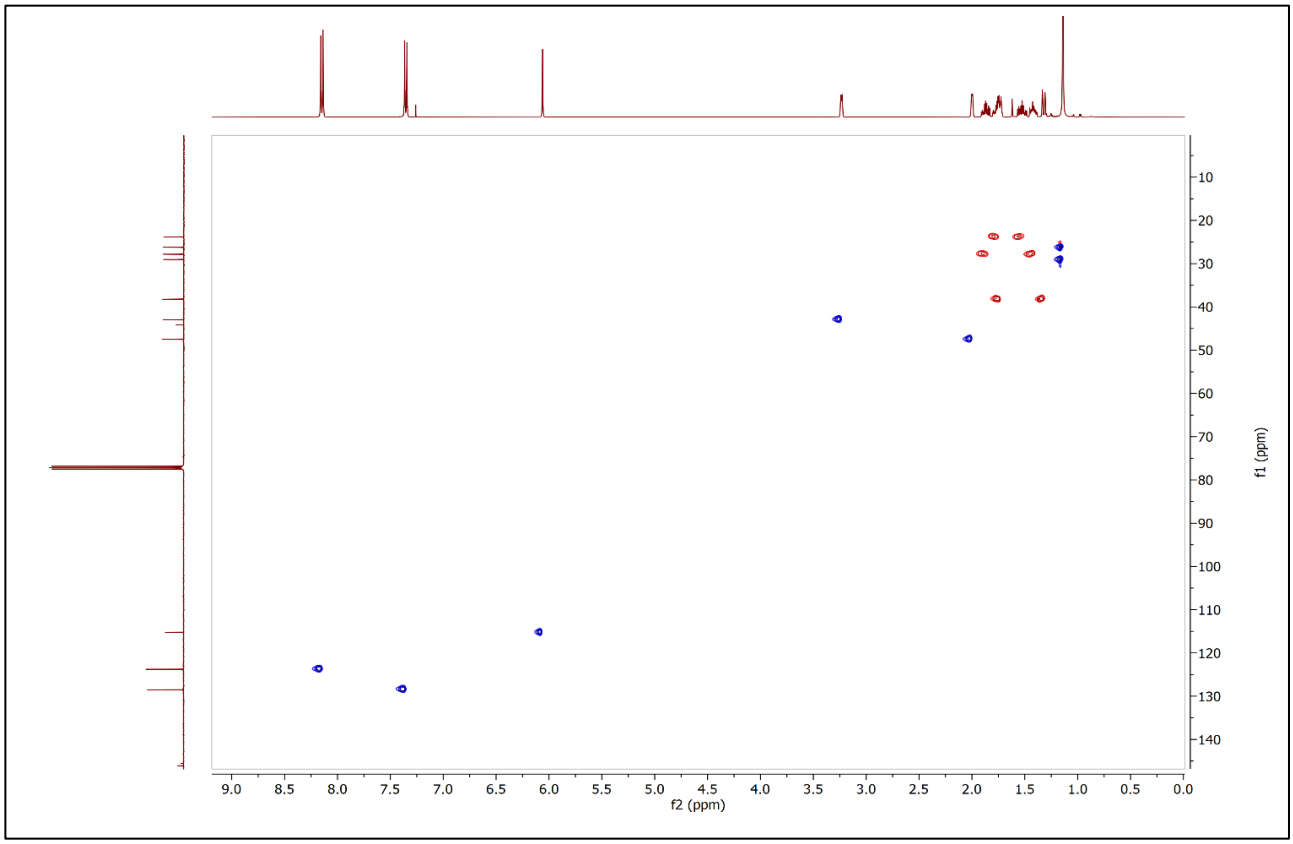


Figura S14. Espectro de RMN HMBC do composto **3b** em $CDCl_3$

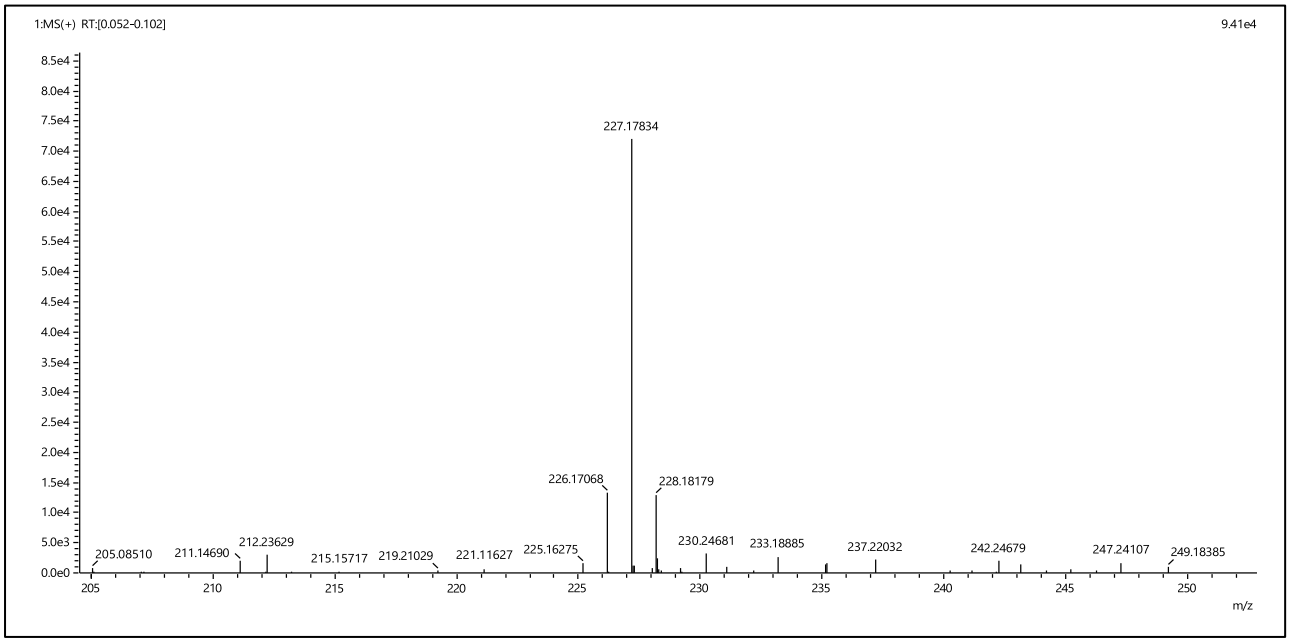


Figura S15. Espectro de massa do composto **3c.**

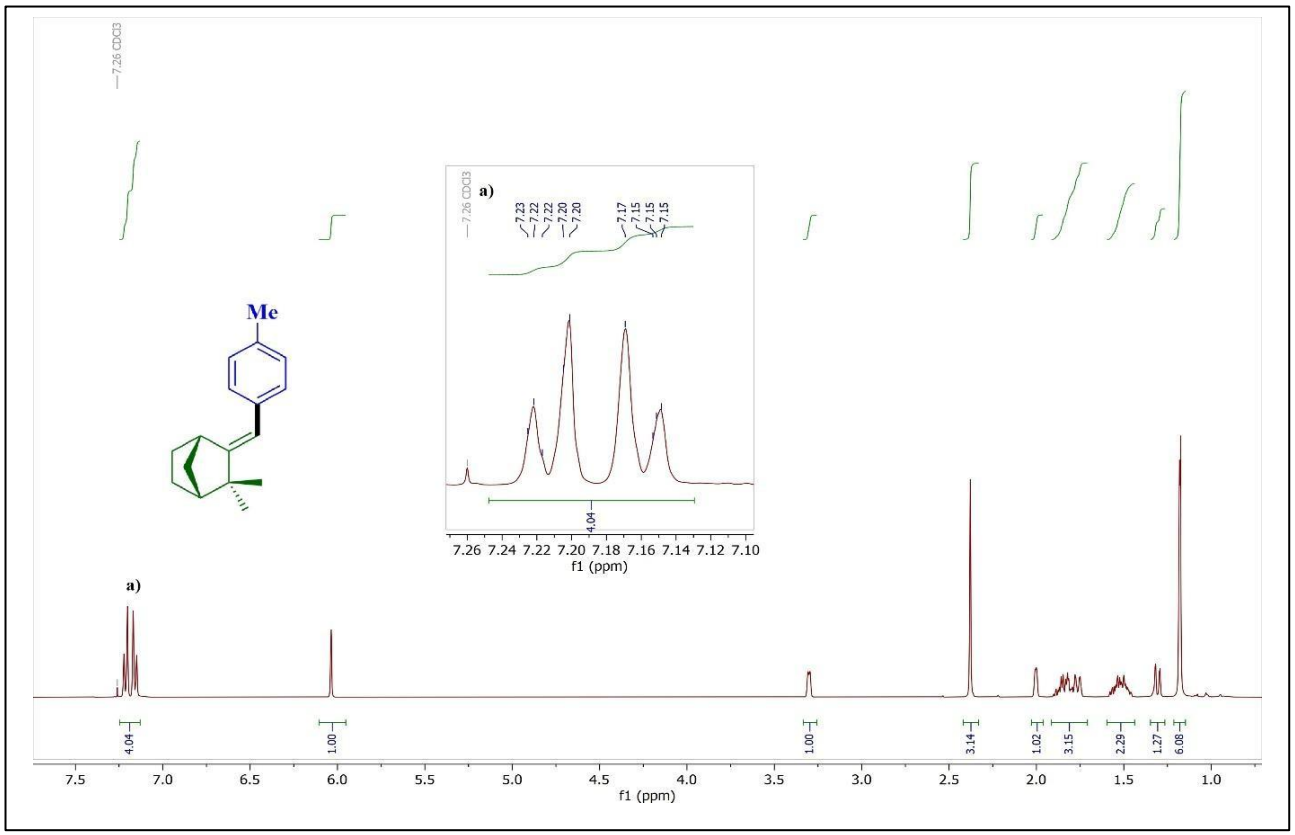


Figura S16. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3c**

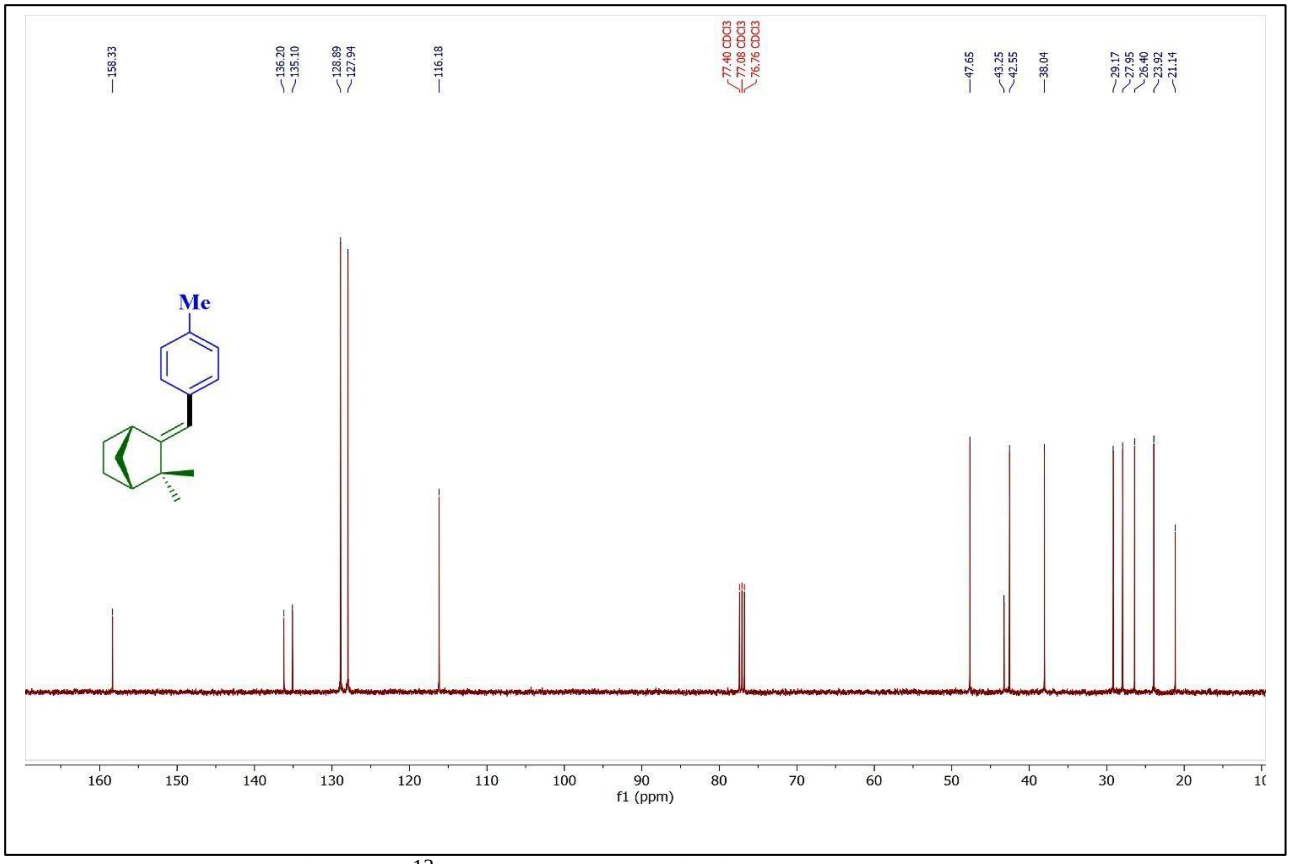


Figura S17. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3c**

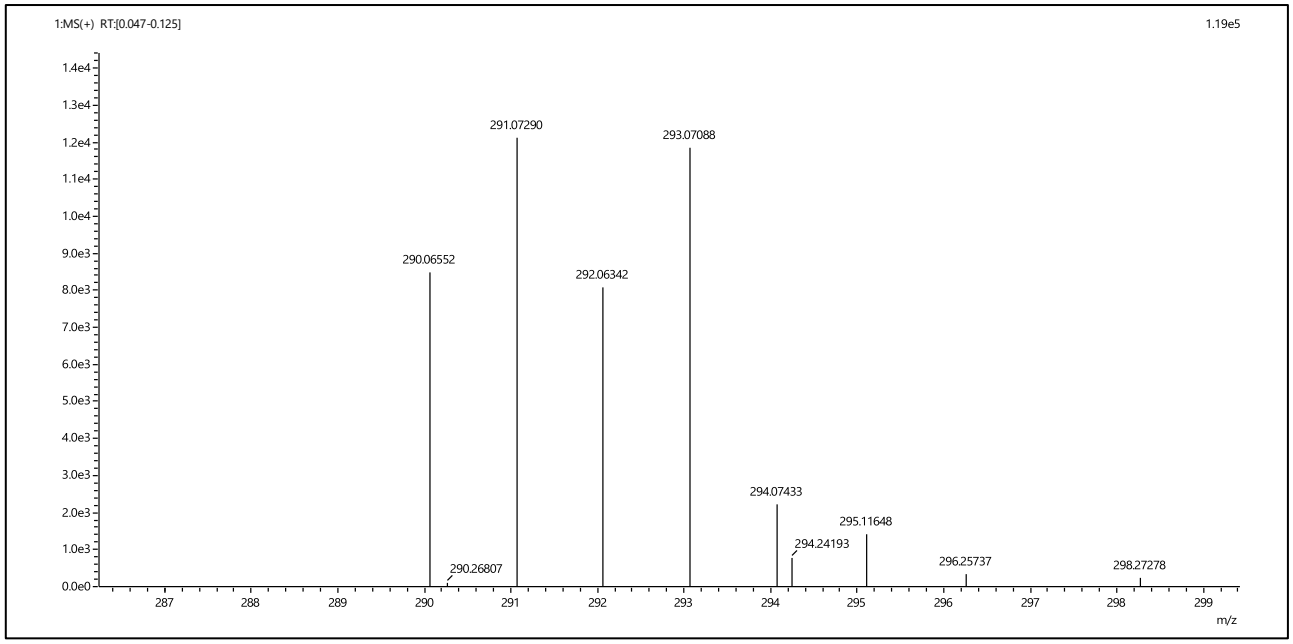


Figura S18. Espectro de massa do composto **3d**

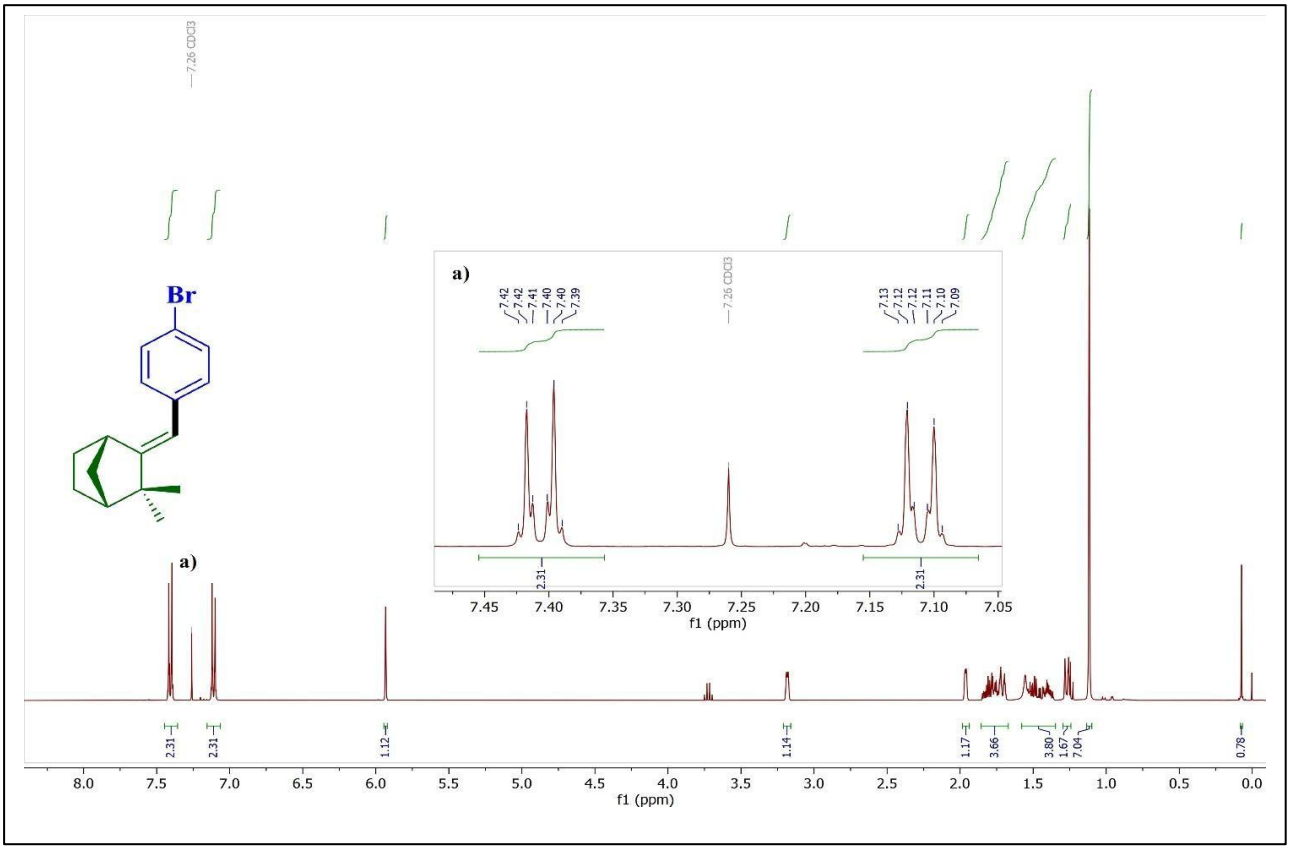


Figura S19. Espectro RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3d**

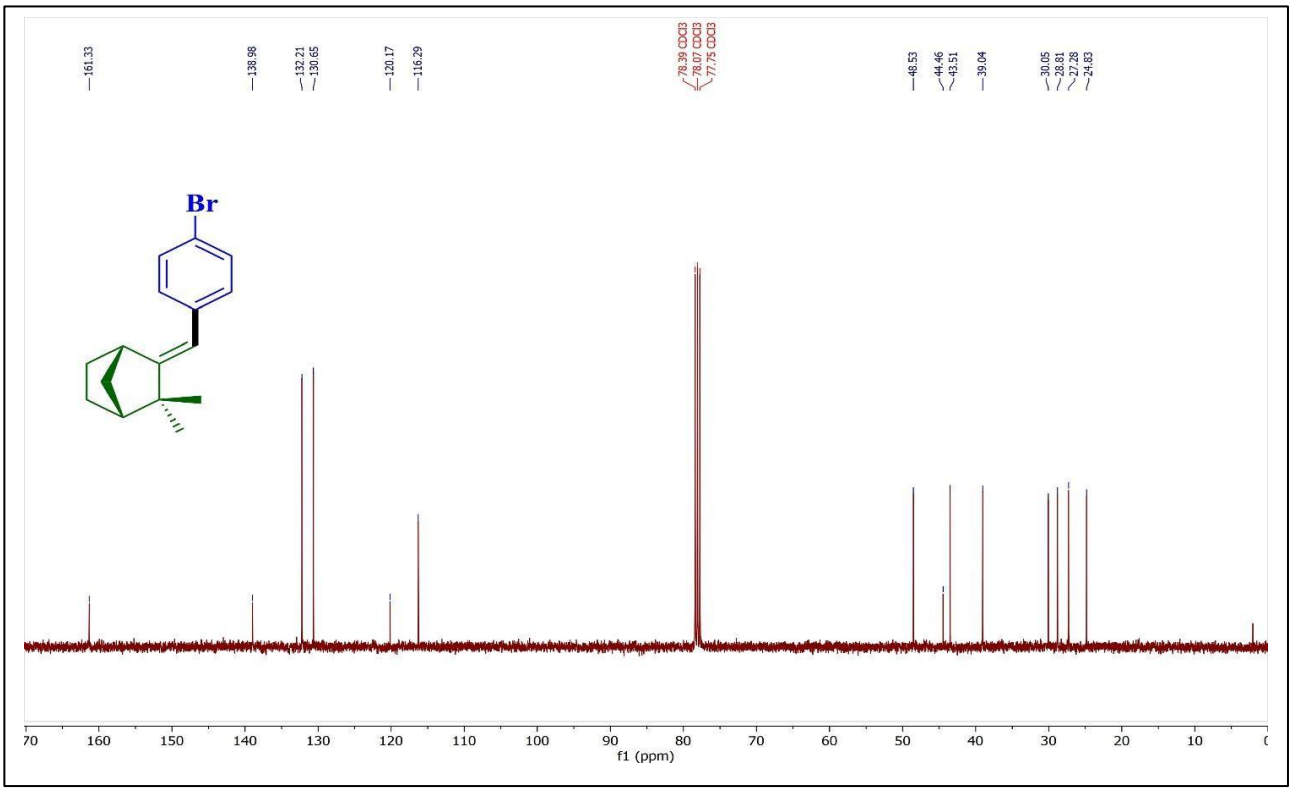


Figura S20. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3d**

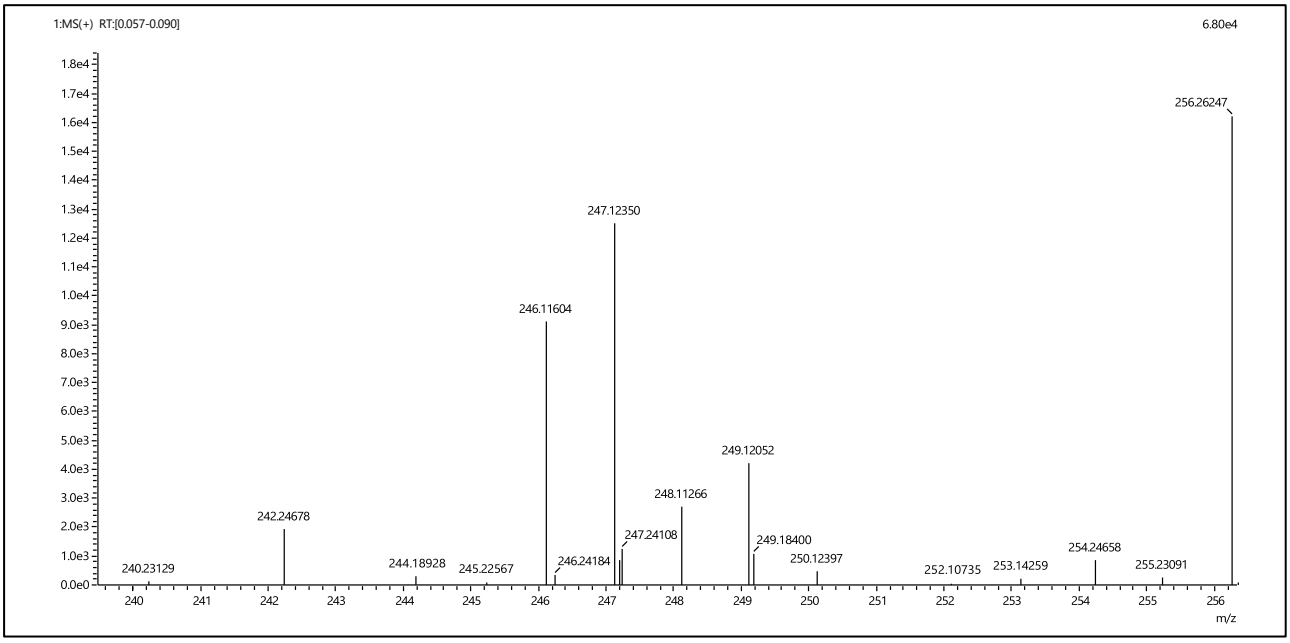


Figura S21. Espectro de massa do composto **3e**.

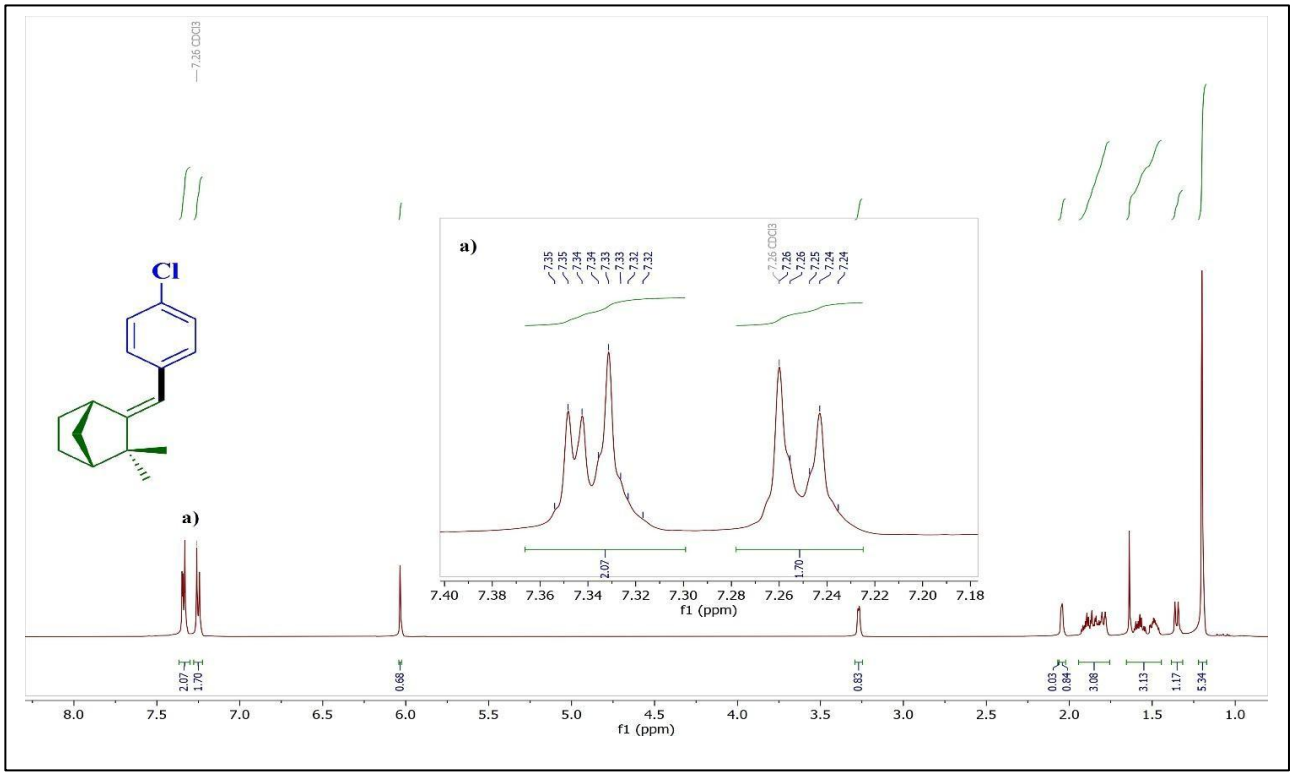


Figura S22. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3e.**

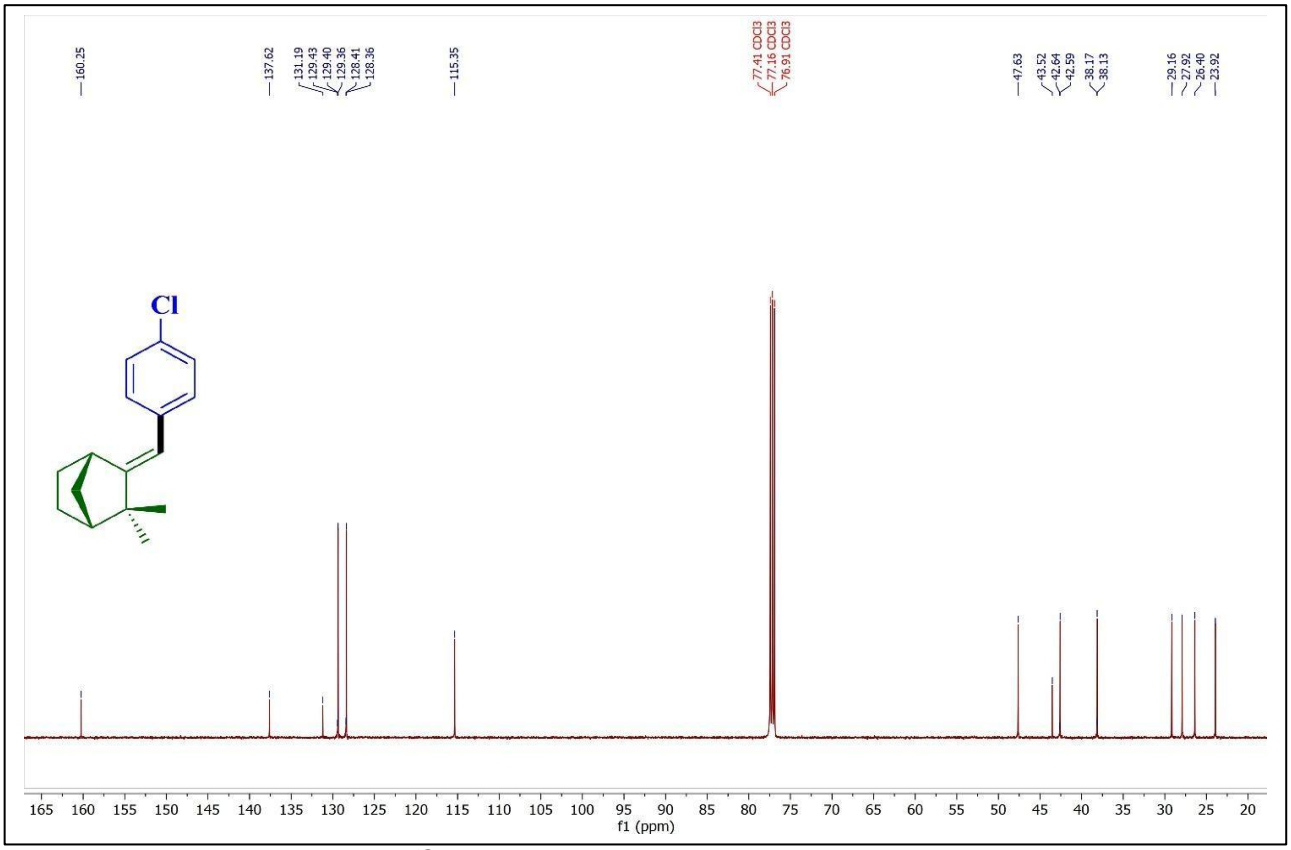


Figura S23. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3e**

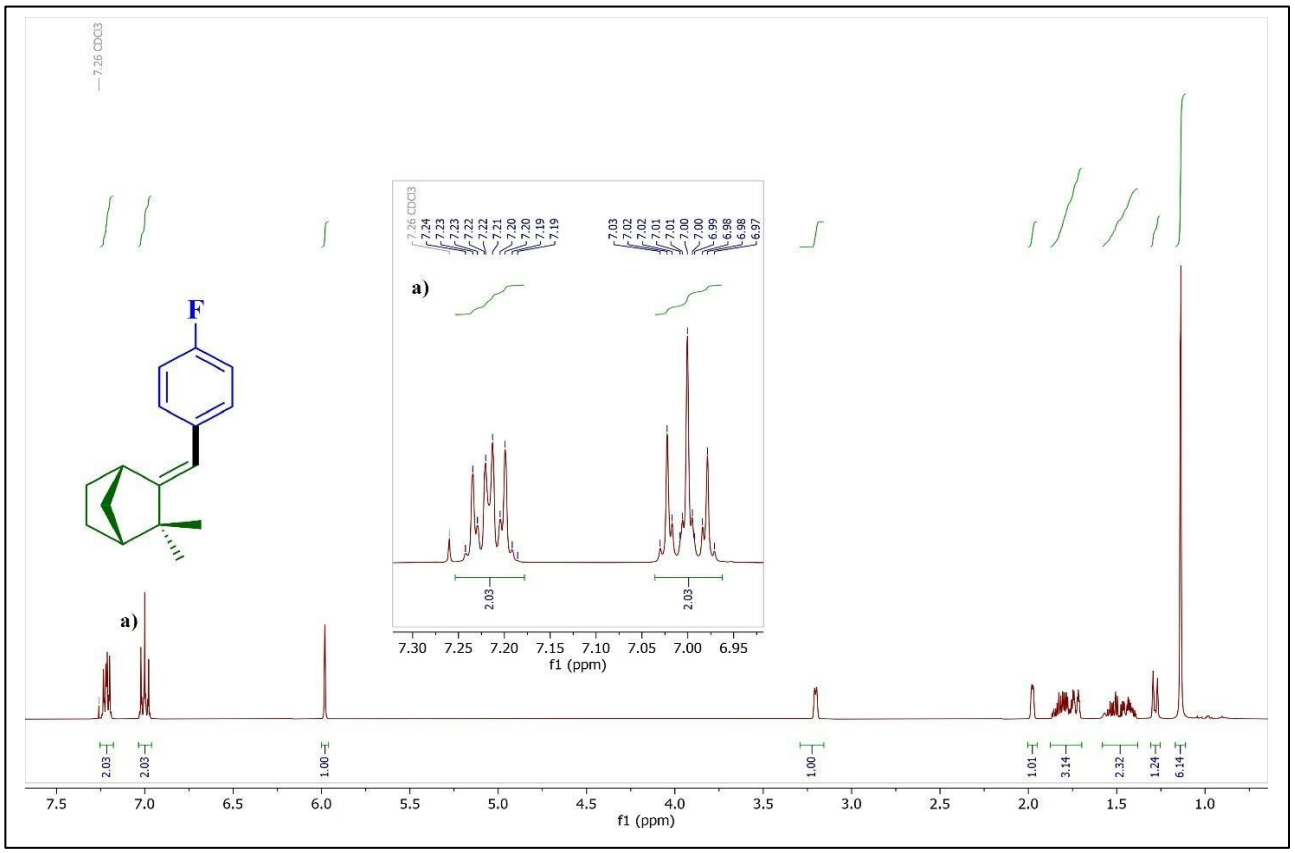


Figura S24. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3f**

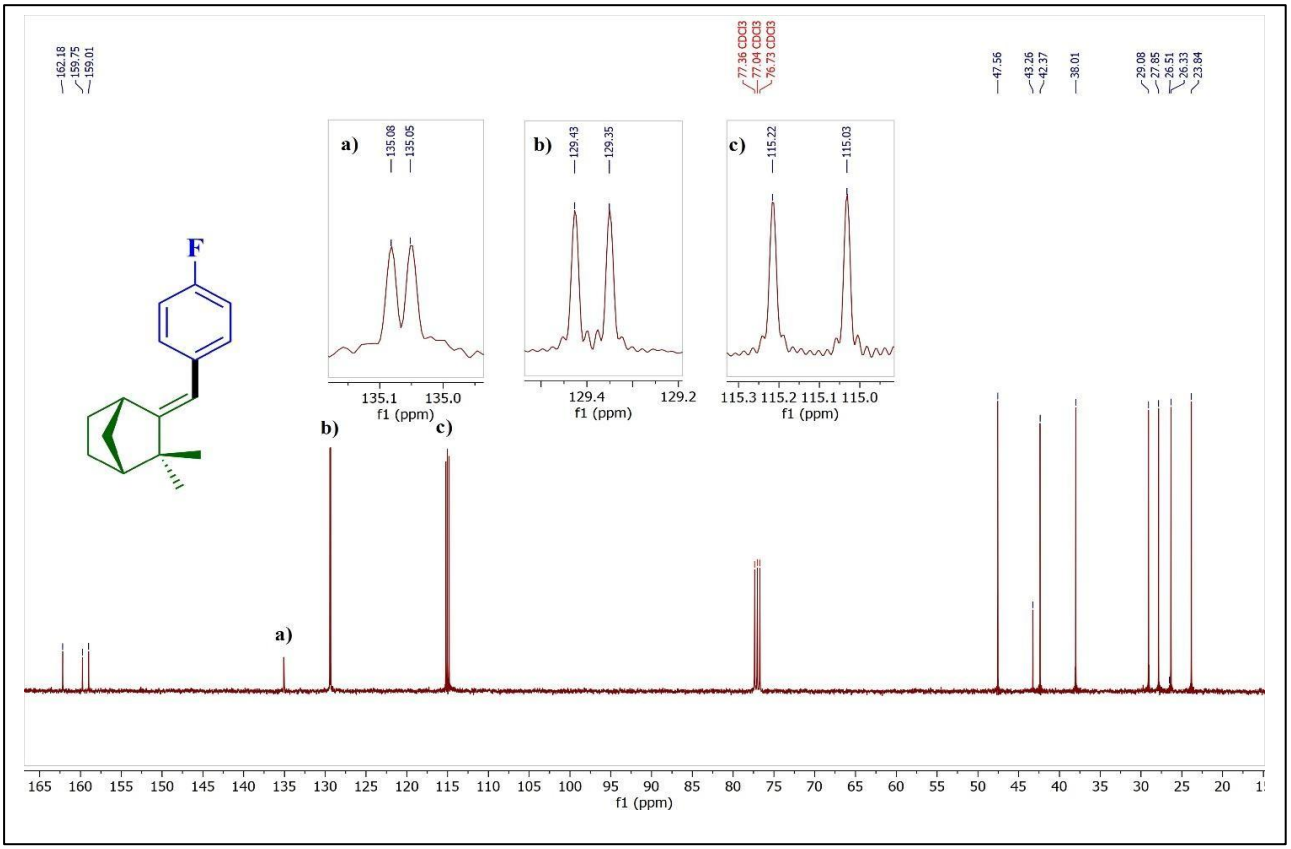


Figura S25. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3f**

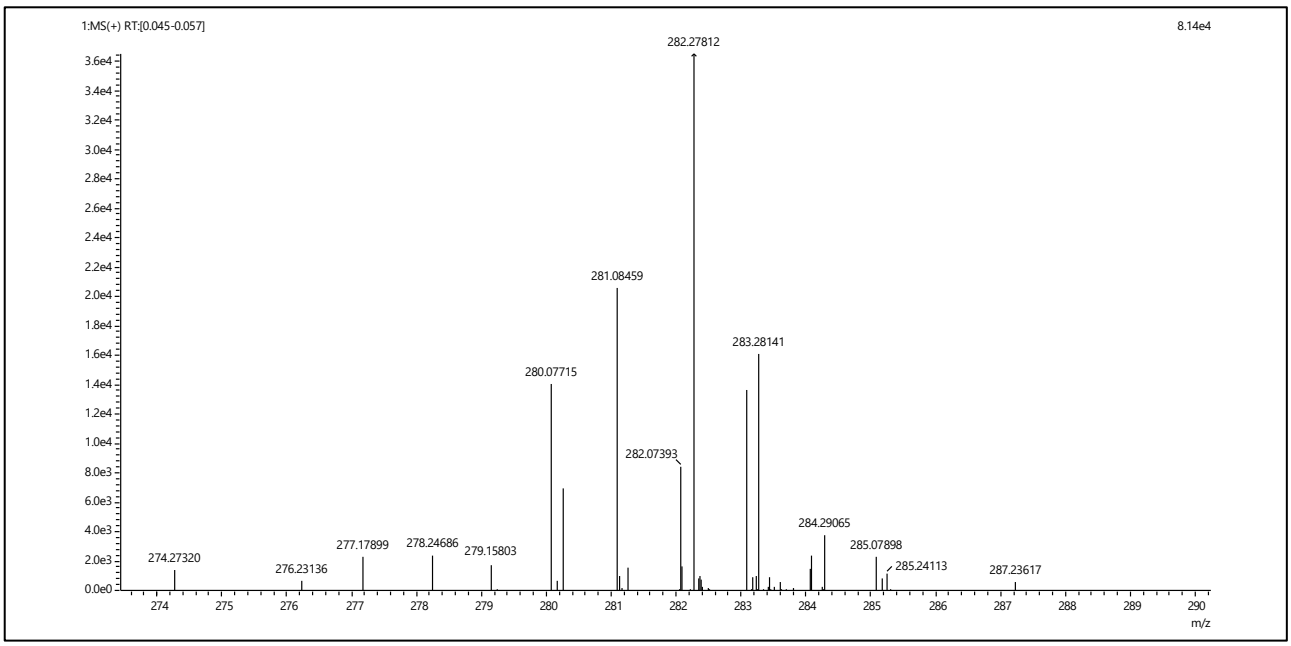


Figura S26. Espectro de massa do composto **3e.**

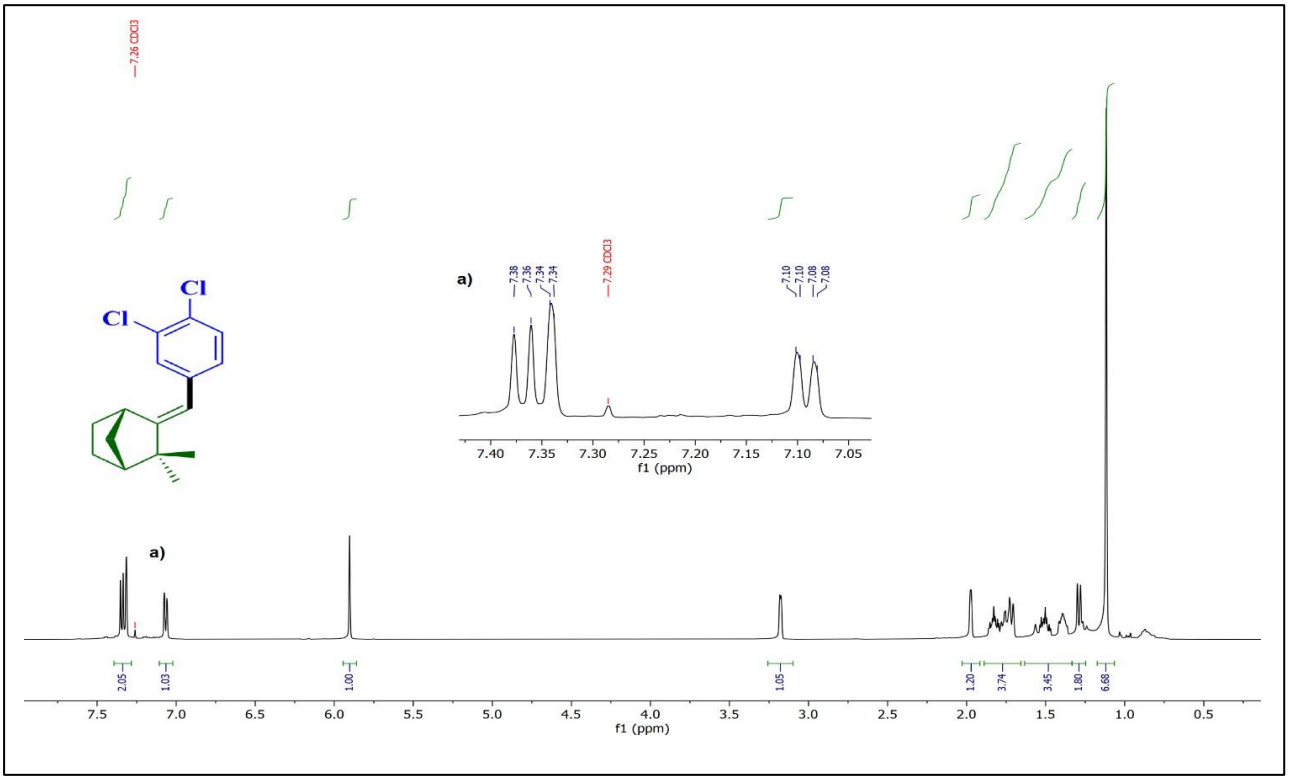


Figura S27. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto **3g**

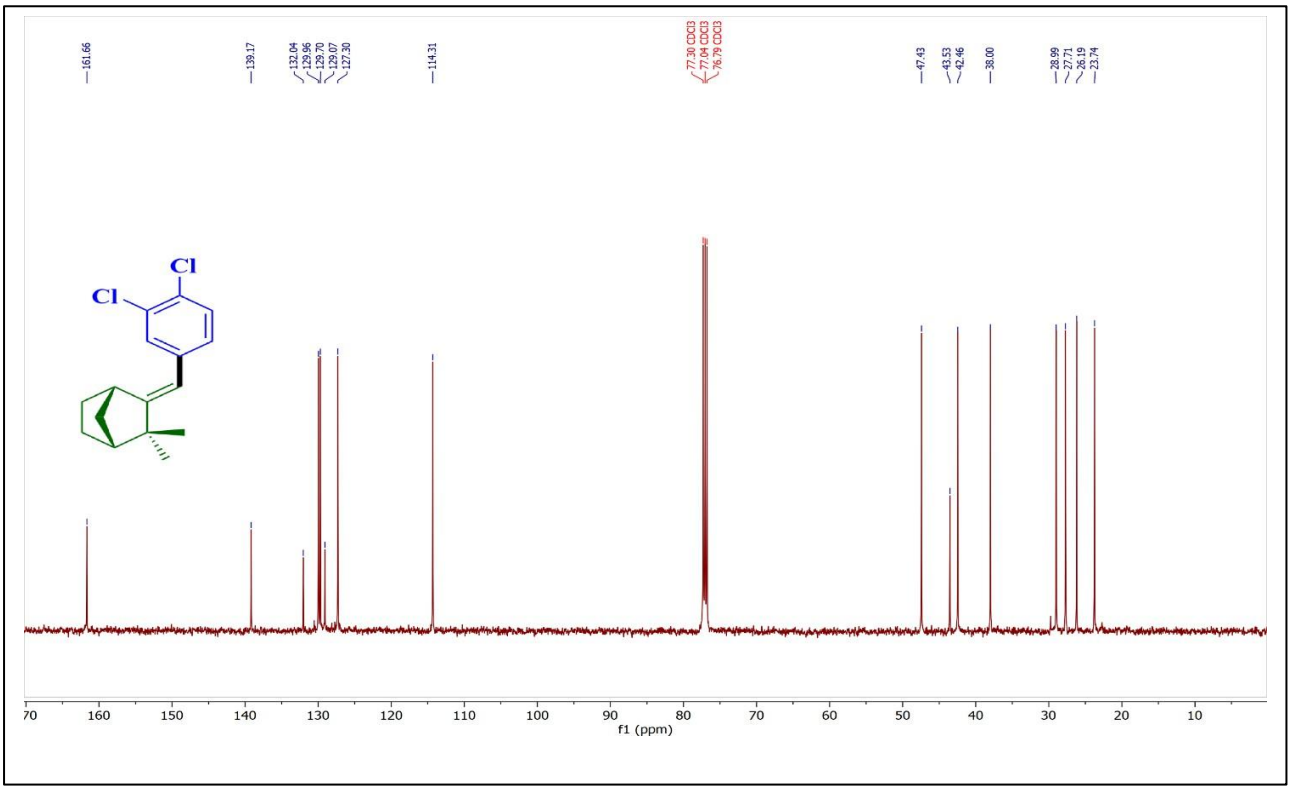


Figura S28. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) do composto **3g**

6. Referências Suplementares

[1] Still, W.C., Kahn, M. e Mitra, A. (1978) “Técnica cromatográfica rápida para separações preparativas com resolução moderada”, Revista de Química Orgânica, 43(14), pp. 2923–2925. Disponível em: https://doi.org/10.1021/jo00408a041.

[2] Angnes, R.A. *et al.* (2018) “Desimetrização enantioseletiva de Heck não covalente do cis-ciclohex-4-eno-1,2-diol dirigida pelo substrato: síntese de todos os 5-aril-ciclohex-3-eno-1,2-dióis quirais cis e investigação mecânica,” Síntese Avançada e Catálise, 360(19), pp. 3760–3767. Disponível em: https://doi.org/10.1002/adsc.201800785.

[3] Souza, E.L.S. de, Chorro, T.H.D. e Correia, C.R.D. (2023) “Análise térmica de sais de tetrafluoroborato de arenediazonio: estabilidade e avaliação de riscos”, Segurança de processos e proteção ambiental, 177, pp. 69–81. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.06.082.

[4] Yong, W. *et al.* (1991) “Arilação do canfeno com sais de arenediazônio catalisada por acetato de paládio”, Sínteses, 1991(11), pp. 967-969. Disponível em: http://doi.org/10.1055/S-1991-26619.