Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site http://bdtd.ibict.br/bdtd/, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:	( ) Dissertação	(X) Tese
Autor: Victor Juno Alencar Fonseca		
CPF: 058.871.133-08	RG: 2007206347-0	
Nacionalidade: brasileiro	Estado Civil: solteiro	
Endereço Completo: Rua Coronel Teófilo Siqueira 557		
CEP: 63100-010	Cidade: Crato	Estado: Ceará
Fone/Celular: (88) 9 93162332	E-mail: victorjunobiomedico@gmail.com	
Título: **ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS**		
Orientador: Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga		
Coorientador: Ricardo Andrade Rebelo		
Membros da Banca: **Henrique Douglas Melo Coutinho**		
Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues		
Johnatan Wellisson da Silva Mendes		
Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro		
Data da Defesa: 25/02/2026	Curso: Química Biológica	
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas II		
Palavras-Chave: Fenilpropanoide; *Piperaceae*; Antifúngico*; Pichia kudriavzevii*; *Candida* spp.		
3. Agência de Fomento: CAPES		
Informações de Acesso ao Documento: para publicação	(X) Acesso Total	( ) Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):		

Crato, 20 de Abril de 2026

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data

de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor:



Assinatura do Orientador:



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

VICTOR JUNO ALENCAR FONSECA

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS

Crato - CE
2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

VICTOR JUNO ALENCAR FONSECA

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica

Orientadora: Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga
Coorientador: Ricardo Andrade Rebelo

Crato - CE
2026

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Fonseca, Victor Juno Alencar

F676aa ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Piper rivinoides Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS / Victor Juno Alencar Fonseca. Crato - CE, 2026.

132p. il.

Tese. 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. Dr. Ricardo Andrade Rebelo

1.Fenilpropanoide, 2.Piperaceae, 3.Antifúngico, 4.Pichia kudriavzevii, 5.Candida spp.; I.Título.

CDD: 571.9

VICTOR JUNO ALENCAR FONSECA

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica

Tese defendida em: 25 de fevereiro de 2026

BANCA EXAMINADORA

gov.br Documento assinado digitalmente
MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA
Data: 18/04/2026 18:20:47-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

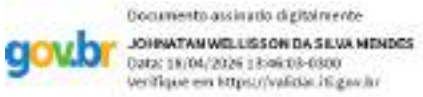
Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga
Orientadora - URCA.

gov.br Documento assinado digitalmente
HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO
Data: 18/04/2026 18:53:47-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Membro Titular Interno - URCA

gov.br Documento assinado digitalmente
FABIOLA FERNANDES GALVAO RODRIGUES
Data: 18/04/2026 19:08:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Membro Titular Interno - URCA



Prof. Dr. Johnatan Wellisson da Silva Mendes
Membro Titular Externo - FMJ

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
Membro Titular Externo - UFCA

Profa. Dra. Cícera Datiane de Morais Oliveira Tintino
Membro Suplente Interno -URCA

Profa. Dra. Maria do Socorro Costa
Membro Titular Externo - UFCA

Dedico este trabalho aos dias incansáveis e noites insones, aos momentos de dúvida e aos triunfos conquistados.

A Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga, minha orientadora e grande amiga, que sempre teve toda paciência comigo e me deu as melhores oportunidades.

Aos meus pais José Otaviano da Fonseca Junior e Antovania Venina Alencar Fonseca, que sempre esperaram grandes coisas de mim, e por isso nunca me permiti oferecer menos do que isso.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo, que forneceu o objeto de estudo da minha tese de doutorado, e sempre foi solícito em atender, da melhor forma possível, as necessidades e dúvidas que surgiram nesses quatro anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, que forneceu minha bolsa de estudos, possibilitando minha dedicação exclusiva ao estudo e a pesquisa, o qual sou imensamente grato.

A família LMAC, que me recebeu e conviveu comigo, formando laços que nunca serão apagados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da URCA, que me deu conhecimento através de professores incríveis.

E a todos os meus amigos, que ouviram as minhas reclamações, riram das minhas piadas mais infames e recuperaram minha sanidade ao longo da jornada.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.

Carl Sagan

Capítulo 1: Introdução Geral

Fluxograma 1. Estrutura da tese; 23

Figura 1: Fórmula estrutural da miristicina (A) e elemicina (B); 41

Capítulo 4: Produção Científica – Artigo 1: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS COMPONENTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS OPORTUNISTAS

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas secas de *Piper rivinoides* Kunth e principais constituintes do óleo essencial obtidos por fracionamento em coluna cromatográfica; 52

Figura 1: Fórmula estrutural da miristicina (A) e elemicina (B); 54

Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos obtidos em RMN de ^{1}H e ^{13}C experimentalmente para elemicina com dados de Mohammad e colaboradores; 54

Tabela 3: Comparação dos deslocamentos químicos obtidos em RMN de ^{1}H e ^{13}C experimentalmente para miristicina com dados de Passreiter e colaboradores;..... 55

Figura 2: Atividade antifúngica de EOPR sozinho e combinado com fluconazol contra *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e P. *kudriavzevii* (C); 57

7

Figura 3. Atividade antifúngica da elemicina sozinha e combinada com fluconazol contra *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e *P. kudriavzevii* (C);..... 58

Figura 4. Atividade antifúngica da miristicina sozinha e combinada com fluconazol contra *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e *P. kudriavzevii* (C);..... 59

Tabela 4 - Concentração capaz de inibir 50% (µg /mL) do crescimento fúngico dos produtos testados; 60

Tabela 5 - Concentração capaz de inibir 50% (µg /mL) do crescimento fúngico dos produtos testados em associação com fluconazol; 60

Capítulo 4: Produção Científica – Manuscrito 2: INIBIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS E ANÁLISE ADMET DA MIRISTICINA E ELEMICINA EXTRAÍDAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth.

Figura 1. Efeito da miristicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*; 82

Figura 2. Efeito da elemicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*; 83
Figura 3. Atividade inibitória da transição morfológica do fluconazol (FCZ), miristicina e elemicina contra *Candida albicans*; 84
Figura 4. Atividade inibitória da transição morfológica do fluconazol (FCZ), miristicina e elemicina contra *Candida tropicalis*; 85
Figura 5. Análise da atividade antifúngica da elemicina (A) e miristicina (B), na presença de ergosterol livre, comparados a anfotericina – B contra *Candida albicans*;..... 86
Figura 6. Análise da atividade antifúngica da elemicina (A) e miristicina (B), na presença de ergosterol livre, comparados a anfotericina – B contra *Candida tropicalis*;..... 87
Figura 7. Efeito da miristicina e elemicina na biomassa de *Candida albicans* (A) e *Candida tropicalis* (B) comparados ao fluconazol; 88
Figura 8. Efeito da miristicina e elemicina na atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* (A) e *Candida tropicalis* (B) comparados ao fluconazol;..... 89
Figura 9. Resultados da análise MLP e similaridade medicamentosa de miristicina e elemicina; 92
Tabela 1. Propriedades físico-químicas calculadas para miristicina e elemicina e aplicadas aos critérios de pontuação do algoritmo MPO da Pfizer, Inc.; 92
Tabela 2. Propriedades farmacocinéticas previstas para miristicina e elemicina expressos em descritores PAMPA, metabolismo e toxicidade;..... 92
Figura 10. Mapa de suscetibilidade 2D da previsão do local do metabolismo e gráfico de similaridade estrutural para (A) Miristicina e (B) Elemicina;..... 93
Figura 11. Estrutura da proteína SapT1 e seu principal sítio de interação;..... 95
Figura 12. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor SapT1;..... 96
Figura 13. Estrutura da proteína SAP5 e seus principais sítios de interação; 98
Figura 14. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor SAP5;..... 99
Figura 15. Estrutura da proteína Cyp51 e seus principais sítios de interação;..... 100
Figura 16. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Cyp51; 101
Figura 17. Estrutura da proteína Als3 e seus sítios de interação;..... 102
Figura 18. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Als3; 103
Figura 19. Estrutura da proteína Gln-NAc e seus principais sítios de interação;..... 104
Figura 20. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Glc-NAc; 105
Tabela 3. Valores de distâncias e tipos de interações formadas pelos complexos avaliados nas simulações de *docking* molecular;..... 106

OEPR/EOPR: Óleo Essencial de *Piper rivinoides*

FCZ: Fluconazol

CA: *Candida albicans*

CT: *Candida tropicalis*

PK: *Pichia kudriavzevii*

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

MPO: Multiparameter Optimization

MLP: Potencial de Lipofilicidade Molecular

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

CM/MC: Concentração Matriz

CFM/MFC: Concentração Fungicida Mínima

CIM/MIC: Concentração Inibitória Mínima

OE/EO: Óleo Essencial

CG-EM/GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectro de Massas

CG-DIC/GC-FID: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector por Ionização em Chama

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

CSD/SDB: Caldo Sabouraud Dextrose

ASD/SDA: Agar Sabouraud Dextrose

ALS: Agglutinin-Like Sequence

SAP: Proteinases Asparticas Secretadas

DMSO: Dimetilsulfóxido

PDA: Agar Batata Dextrose

YPD: Caldo Dextrose Peptona de Levedura

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

CC/GC: Controle de Crescimento

ERO/ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

ATCC: American Type Culture Collection

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma

PAMPA: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

CI/IC_{50}: Concentração Inibitória Média

CV: Cristal Violeta

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo

1 INTRODUÇÃO GERAL 19

1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA 19
1.2 ESTRUTURA DA TESE 23

2 OBJETIVOS 27

2.1 OBJETIVO GERAL 27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 30

3.1 *Gêneros Candida* e *Pichia* 30
3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA 32
3.3 DROGAS ANTIFÚNGICAS 34
3.4 PLANTAS MEDICINAIS 37
3.5 GÊNERO *Piper* 38

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 42

Artigo 1 – CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS COMPONENTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS OPORTUNISTAS 42

1. INTRODUÇÃO 44

2 MÉTODOS 46

2.1 Coleta e preparação de material vegetal 46
2.1.1 Coleta 46
2.1.2 Preparação 46
2.2 Obtenção do óleo essencial 46
2.3 Caracterização química de OE e compostos isolados 47
2.3.1 Análise CG-DIC 47
2.3.2 Análise CG-EM 48
2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear ^{1}H e ^{13}C 48
2.4 Fracionamento do óleo essencial e isolamento dos constituintes 48
2.5 Testes antifúngicos 49
2.5.1 Preparação de soluções e diluições 49
2.5.2 Microorganismos 49
2.5.3 Meio de cultura 50
2.5.4 Preparação dos inóculos 50
2.5.5 Atividade antifúngica do óleo essencial *de P. rivinoides* e seus componentes 50
2.5.6 Concentração Fungicida Mínima (MFC) 50
2.5.7 Atividade combinada com fluconazol 51

3. RESULTADOS 51

3.2 Identificação de compostos isolados 54
3.3 Testes antifúngicos 56
3.3.1 Testes de microdiluição 56
3.3.2 Concentração Fungicida Mínima (MFC) 60

4. DISCUSSÃO 61

5. CONCLUSÃO 65

Manuscrito - INIBIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS E ANÁLISE ADMET DA MIRISTICINA E ELEMICINA EXTRAÍDAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth **72**

1. INTRODUÇÃO **73**

2. MATERIAIS E METODOS **75**

2.1. Obtenção e preparo do material 75
2.2. Meios de cultura 75
2.3. Microrganismos 75
2.4. Preparo dos inóculos 75
2.5. Efeito da miristicina, elemicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida* spp. 76
2.6. Interação com ergosterol 76
2.7. Testes de erradicação de biofilme maduro 77
2.7.1. TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM DROGAS E SUBSTÂNCIAS 77
2.7.2. ANÁLISE DA BIOMASSA POR CRISTAL VIOLETA 77
2.7.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA POR MTT 78
2.8. Análise estatística 78
2.9. Docking Molecular 79
2.9.1. PREPARO DOS LIGANTES 79
2.9.2. PREPARO DOS RECEPTORES BIOLÓGICOS 79
2.9.3. ANÁLISE DE SÍTIOS E ENCAIXE MOLECULAR 80
2.10. Estudo ADMET baseado em MPO 80
3. RESULTADOS **81**

3.1. Inibição da transição morfológica 81
3.2. Interação com ergosterol 85
3.3. Efeito da miristicina e elemicina na biomassa de *C. albicans* e *C. tropicalis.* 87
3.4. Efeito da miristicina e elemicina na atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis.* 88
3.5. Análise do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e similaridade medicamentosa. 90
3.6. Análise de encaixe molecular 94
4. DISCUSSÃO **108**

5. CONCLUSÃO **112**

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **120**

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA 120
5.2 CONCLUSÕES GERAIS 124
5.3 Perspectivas de investigações futuras 124
6 REFERÊNCIAS **126**

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS FITOCONSTITUINTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS

RESUMO

Introdução: Infecções fúngicas causadas por espécies dos gêneros *Candida* e *Pichia*, representam um desafio crescente à saúde pública devido a resistência aos antifúngicos atuais e ao limitado arsenal terapêutico disponível. Diante disso, plantas medicinais da família Piperaceae têm despertado interesse por sua riqueza em óleos essenciais e metabólitos secundários com potencial bioativo, como a miristicina e elemicina. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth e de seus fitoconstituintes, miristicina e elemicina, contra fungos patogênicos, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*. **Metodologia:** As partes aéreas de *P. rivinoides* foram coletadas, secas e submetidas à hidrodestilação para obtenção do óleo essencial, seguida de caracterização química e fracionamento cromatográfico para isolamento dos constituintes majoritários. Técnicas de microdiluição em caldo foram utilizadas para determinar a curva de crescimento fúngico e concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) dos compostos isolados ou combinados ao fluconazol em concentrações variáveis. Em placas de Petri, contendo meio agar sabouraud dextrose, foram determinadas a concentração fungicida mínima (CFM) de cada composto. Além disso, foram avaliados o efeito da miristicina e elemicina frente a importantes fatores de virulência, como o dimorfismo fúngico e formação de biofilme. Para analisar possíveis alvos farmacológicos, foi determinada a capacidade de ligação ao ergosterol, em comparação à anfotericina B. Por meio de abordagens computacionais, foram realizados *docking* molecular com outros alvos de importância para parede celular e membrana fúngica. Predições farmacocinéticas *in sílico* de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), foram aplicadas para investigar a miristicina e elemicina como possíveis fármacos antifúngicos. **Resultados e Discussão:** Os ensaios revelaram atividade antifúngica moderada do óleo essencial de *Piper rivinoides* e de seus constituintes miristicina e elemicina contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Pichia kudriavzevii*, com concentrações inibitórias variando entre 128 e 1024 µg/mL. Em combinação com fluconazol, observou-se potencialização da ação antifúngica, exceto para a elemicina frente a *P. kudriavzevii*, onde ocorreu possivel antagonismo. O efeito geral foi fungistático, com exceção para a elemicina que apresentou ação fungicida contra *P. kudriavzevii* a partir de 128 µg/mL. Em análises *in silico*, a miristicina demonstrou interações próximas às do fluconazol, com os alvos CYP51 e Glc-NAc, além de inibir totalmente a transição morfológica de *C. tropicalis* em 512 µg/mL. A elemicina reduziu significativamente a biomassa de biofilme maduro. Além disso, demonstrou interação com o ergosterol, sugerindo possível comprometimento da integridade da membrana fúngica. Nas predições ADMET, apresentou maior estabilidade e menor propensão à toxicidade. Ambos os compostos atenderam aos critérios da Pfizer para características de fármaco, reforçando seu potencial como candidatos antifúngicos. **Conclusões:** *P. rivinoides* e seus compostos isolados demonstraram relevante potencial antifúngico, possivelmente

associado a diferentes mecanismos de ação, destacando-se como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, incluindo abordagens combinadas. Por fim, a realização desta pesquisa também é movida pelo desejo de contribuir para uma abordagem terapêutica mais sustentável e acessível.

Palavras-Chave: Fenilpropanoide; *Piperaceae*; Antifúngico*; Pichia kudriavzevii*; *Candida* spp.

Agradecimentos: Nossa gratidão à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (BP5-0197-00245.01.00/22).

ANALYSIS OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF *Piper rivinoides* KUNTH ESSENTIAL OIL AND ITS PHYTOCONSTITUENTS MYRISTICIN AND ELEMICIN AGAINST PATHOGENIC FUNGI.

ABSTRACT

Introduction: Candidiasis, primarily caused by species of the genus *Candida*, represents an increasing public health challenge due to resistance to current antifungal agents and the limited therapeutic arsenal available. In this context, medicinal plants of the Piperaceae family have attracted attention for their richness in essential oils and secondary metabolites with bioactive potential, such as myristicin and elemicin. Thus, the present study aimed to assess the antifungal potential of the essential oil of *Piper rivinoides* Kunth and its phytoconstituents, myristicin and elemicin, against pathogenic fungi through *in vitro* and *in silico* approaches. **Methods:** Aerial parts of *P. rivinoides* were collected, dried, and submitted to hydrodistillation to obtain the essential oil, followed by chemical characterization and chromatographic fractionation for isolation of major constituents. Broth microdilution assays were performed to determine fungal growth curves and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the compounds, either alone or in combination with fluconazole at varying concentrations. Minimum fungicidal concentrations (MFC) were determined using Sabouraud Dextrose Agar plates. In addition, the effects of myristicin and elemicin on key virulence factors, such as fungal dimorphism and biofilm formation, were assessed. To explore potential pharmacological targets, binding capacity to ergosterol was evaluated in comparison with amphotericin B. Computational approaches included molecular docking with other relevant cell wall and membrane targets. Finally, pharmacokinetic predictions of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) were performed to investigate myristicin and elemicin as potential antifungal drug candidates. **Results and Discussion:** The assays revealed moderate antifungal activity of *P. rivinoides* essential oil and its constituents against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Pichia kudriavzevii*, with inhibitory concentrations ranging from 128 to 1024 µg/mL. When combined with fluconazole, antifungal activity was enhanced, except for elemicin against *P. kudriavzevii*, where antagonism was observed. Overall, the effect was fungistatic, although elemicin exhibited fungicidal activity against *P. kudriavzevii* at concentrations ≥128 µg/mL. *In silico* analyses showed that myristicin displayed interactions similar to fluconazole, including CYP51 and Glc-NAc, and completely inhibited the morphological transition of *C. tropicalis* at 512 µg/mL. Elemicin significantly reduced the biomass of mature biofilms. In addition, it showed interaction with ergosterol, suggesting a possible disruption of fungal membrane integrity. In ADMET predictions, it exhibited greater stability and a lower propensity for toxicity. Both compounds met Pfizer's criteria for drug-likeness, reinforcing their potential as antifungal candidates. **Conclusion:** *P. rivinoides* and its isolated compounds demonstrated relevant antifungal potential, possibly associated with different mechanisms of action, highlighting them as promising sources for the development of new therapeutic strategies, including combination approaches. Finally, this research is also driven by the desire to contribute to a more sustainable and accessible therapeutic approach.

Keywords: Phenylpropanoid; Piperaceae; Antifungal; *Candida* spp.; *Pichia kudriavzevii*.

Acknowledgements: Our thanks to the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico for their financial support (BP5-0197-00245.01.00/22).

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

A relevância deste trabalho reside na investigação do potencial antifúngico do óleo essencial de *Piper rivinoides* e de seus principais constituintes, miristicina e elemicina, destacando essa espécie vegetal brasileira como uma fonte promissora de compostos bioativos. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a atividade antifúngica de fenilpropanoides frente a espécies de *Candida*, especialmente em um contexto de crescente resistência aos antifúngicos convencionais. Além disso, as análises de biodisponibilidade indicam que esses compostos apresentam propriedades favoráveis à administração oral, reforçando seu potencial para aplicação terapêutica. Dessa forma, o estudo contribui para a valorização farmacológica de *P. rivinoides* e para a expansão de alternativas no tratamento de infecções fúngicas de relevância clínica.

1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

As espécies do gênero *Candida* e *Pichia* são patógenos oportunistas capazes de colonizar mucosas em indivíduos saudáveis sem causar manifestações clínicas. Em situações de imunossupressão ou desequilíbrio do hospedeiro, podem proliferar e desencadear infecções como a candidíase (Siswina *et al.*, 2023). No Brasil, a incidência de candidemia é elevada, estimada em 2,49 casos por 1.000 internações, valor até 15 vezes superior ao observado em países da Europa e Estados Unidos (Brasil, 2023).

Embora *Candida albicans* seja a principal espécie envolvida, estudos recentes apontam o aumento de espécies não-*albicans*, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Pichia kudriavzevii* (antiga *Candida krusei*), esta última notável por sua resistência intrínseca aos azólicos (Chaucanés *et al.*, 2023). A gravidade das infecções relaciona-se à formação de biofilmes, que funcionam como barreiras contra fármacos e mecanismos imunológicos, dificultando o tratamento e favorecendo recorrências (Chaucanés *et al.*, 2023).

Além disso, esses microrganismos apresentam plasticidade morfológica, podendo transitar da forma leveduriforme para a filamentosa (hifal e pseudohifal), processo conhecido como morfogênese celular e associado à virulência (Brown *et al.*, 2024; Farhan *et al.*, 2024). Essa transição favorece colonização, invasão tecidual e evasão imunológica, reforçando o papel desses fungos como agentes persistentes (Fonseca *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de resistência em patógenos fúngicos aos medicamentos disponíveis é um problema clínico emergente na terapia antifúngica (Berman; Krysen, 2020). Diversos fatores, como características do hospedeiro, espécies envolvidas e condições ambientais, contribuem para esse fenômeno. Entre os principais mecanismos estão a plasticidade fenotípica adaptativa, mutações em genes alvo, aneuploidia cromossômica e transferência horizontal de genes (Reddy; Padmavathi; Nancharaiah, 2022).

O tratamento das micoses sistêmicas e oportunistas depende de três classes principais de antifúngicos: polienos, azóis e equinocandinas (Vanzolini; Magnani, 2024). Os polienos, como a anfotericina B, atuam de forma fungicida ao interagir com o ergosterol da membrana, formando poros que levam à perda de íons e morte celular (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022; Nett; Andes, 2016), embora apresentem nefro e hepatotoxicidade (Houšť; Spížek; Havlíček, 2020). Os azóis, como fluconazol e itraconazol, bloqueiam a síntese de ergosterol pela inibição da lanosterol-14α-demetilase dependente de citocromo P450 (Vanzolini; Magnani, 2024; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022), mas podem causar efeitos adversos como prolongamento do intervalo

QT e interações medicamentosas (Cook *et al.*, 2017). Já as equinocandinas, como caspofungina, micafungina e anidulafungina, inibem a β-1,3-D-glucano sintase, essencial para a síntese da parede celular (Loh; Ang, 2020; Suwunnakorn *et al.*, 2018), embora casos de resistência já tenham sido relatados, associados a mutações nos genes Fks1 e Fks2 (Pristov; Ghannoum, 2019).

Além dessas três classes principais, existem ainda antifúngicos menos utilizados, mas que representam alternativas relevantes, como a flucitosina, um análogo da pirimidina empregado em combinação com anfotericina B (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025), e a terbinafina, da classe das alilaminas, que inibe a esqualeno epoxidase (Branda *et al.*, 2025). Novas opções também vêm sendo desenvolvidas, incluindo a rezafungina, o ibrexafungerp, o oteseconazol, o olorofim e o fosmanogepix, que ampliam o espectro de ação e oferecem alternativas frente à resistência fúngica (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025).

Esse panorama evidencia que, apesar dos avanços, o arsenal terapêutico permanece limitado e vulnerável ao desenvolvimento de resistência, reforçando a necessidade de alternativas antifúngicas seguras e eficazes. Diante desse cenário, plantas medicinais despontam como opções promissoras. A família Piperaceae compreende cerca de oito gêneros e 3.000 espécies, sendo o gênero *Piper* amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, com aproximadamente 700 espécies na América (Leal *et al.*, 2019; Braga *et al.*, 2021). Este grupo é reconhecido como fonte de óleos essenciais e metabólitos secundários com diversas bioatividades, incluindo ação antifúngica, caracterizados pela presença de terpenos e fenilpropanoides, como a miristicina e a elemicina, que pertencem a esta última classe (Ruiz-Vásquez et al., 2022).

Embora o uso de plantas medicinais tenha origem empírica, evidências científicas demonstram que seus compostos podem ser eficazes inclusive contra linhagens multirresistentes. A pesquisa de produtos naturais, com foco no isolamento e caracterização de metabólitos secundários, tem impactado significativamente a descoberta de novos antimicrobianos, tornando-se relevante no tratamento de diversas doenças (Braga *et al.*, 2021).

Além disso, estudos recentes evidenciam o potencial da terapia combinada entre óleos essenciais de *Piper* e antifúngicos convencionais. O óleo essencial de *Piper diospyrifolium* modificou a ação do fluconazol contra *C. tropicalis* sensível e resistente (Carneiro *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram obtidos com *P. rivinoides* associado ao fluconazol (Leal *et al.*, 2019), e com *Piper carpunya* frente a *C. albicans* e *C. glabrata* (Ballesteros *et al.*, 2019). O óleo de *Piper regnelli*, em concentrações subinibitórias, também reduziu a quantidade de fluconazol necessária para inibir *C. tropicalis* (Braga *et al.*, 2021).

A investigação de novas combinações e compostos antifúngicos é, portanto, essencial diante do aumento global das infecções resistentes às terapias convencionais. A resistência antimicrobiana, seja intrínseca ou adquirida, representa uma ameaça crescente à saúde pública e à segurança alimentar, reforçando a necessidade de explorar fontes naturais como a Piperaceae para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas (dos Santos *et al.*, 2023).

Dessa forma, este estudo parte das seguintes hipóteses: (I) o óleo essencial de *P. rivinoides* possui constituintes responsáveis por atividade antifúngica, de modo que o efeito observado decorre principalmente desses compostos; (II) tais constituintes podem atuar por mecanismos semelhantes aos antifúngicos convencionais, incluindo interação com o ergosterol, inibição de sua síntese ou interferência nos glucanos da parede celular; e (III) esses compostos apresentam propriedades farmacocinéticas e toxicológicas compatíveis com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Para testar essas hipóteses, foi realizada a caracterização química do óleo essencial de *P. rivinoides*, obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. O óleo foi posteriormente submetido à extração líquido-líquido e concentração em evaporador rotativo, sendo sua composição analisada por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GC-FID) e espectrometria de massas (GC-MS), técnicas amplamente utilizadas em estudos de produtos naturais por sua eficiência e precisão na identificação de constituintes majoritários (Fagbemi; Aina; Olajuyigbe, 2021; Ashraf *et al.*, 2020).

A identificação e caracterização dos constituintes majoritários foram realizadas por técnicas cromatográficas e espectroscópicas. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi empregada para identificação dos compostos, enquanto a ressonância magnética nuclear (^{1}H e ^{13}C RMN) foi utilizada para confirmação estrutural dos constituintes isolados. Essas abordagens são amplamente utilizadas devido à sua elevada precisão na separação, identificação e elucidação estrutural de moléculas voláteis, garantindo confiabilidade na determinação dos compostos responsáveis pela atividade biológica (Gunawan; Nandiyanto, 2021; Teonata *et al.*, 2021). Os compostos foram obtidos em parceria com a Universidade Regional de Blumenau (FURB), sendo o material vegetal coletado, o óleo essencial extraído e caracterizado pelo Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo.

O potencial antifúngico do óleo essencial e de seus constituintes foi avaliado por meio de ensaios padronizados de microdiluição em caldo, como referência para determinação da concentração inibitória mínima (CLSI, 2017). O uso de antifúngicos convencionais, como o fluconazol, serviu como parâmetro comparativo, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos.

A interação entre o óleo essencial, seus constituintes e antifúngicos convencionais foi avaliada por meio de ensaios que simulam terapia combinada, permitindo verificar se os compostos potencializam ou modificam a ação do fluconazol. Essa abordagem é utilizada para interpretar a intensidade da atividade de óleos essenciais e compreender seu papel na reversão ou no aumento da eficácia terapêutica (Coutinho *et al.*, 2008; Sartoratto *et al.*, 2004).

Para verificar se os compostos agem de forma fungicida ou apenas fungistática, foram utilizados ensaios complementares à microdiluição que permitem avaliar a viabilidade celular após o tratamento. Essa técnica é essencial para distinguir entre a simples inibição do crescimento e a morte efetiva das células, fornecendo parâmetros mais precisos sobre o potencial terapêutico dos produtos testados (Ernst *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2022).

A capacidade dos compostos em interferir na transição morfológica de *Candida* foi obtida por meio de ensaio em câmaras úmidas, utilizando meio empobrecido, que permite observar a formação de hifas na presença dos fitoconstituintes analisados, sendo possível verificar seu impacto sobre a morfogênese fúngica. Esse protocolo tem sido bastante utilizado nos últimos anos, sendo aceito na literatura por estar diretamente associado à virulência e à invasividade do fungo, constituindo um parâmetro essencial para compreender o potencial terapêutico dos produtos testados (Carneiro *et al.*, 2019).

O potencial antibiofilme dos compostos foi avaliado por meio de ensaios de microdiluição que permitem analisar tanto a biomassa (Souza, 2013) quanto a viabilidade celular (Yolin *et al.*, 2024) em biofilmes maduros de *Candida* (dos Santos *et al.*, 2025). Esse tipo de abordagem pode fornecer uma visão integrada da ação dos produtos sobre estruturas críticas de virulência, contribuindo para compreender sua eficácia em condições que simulam infecções persistentes.

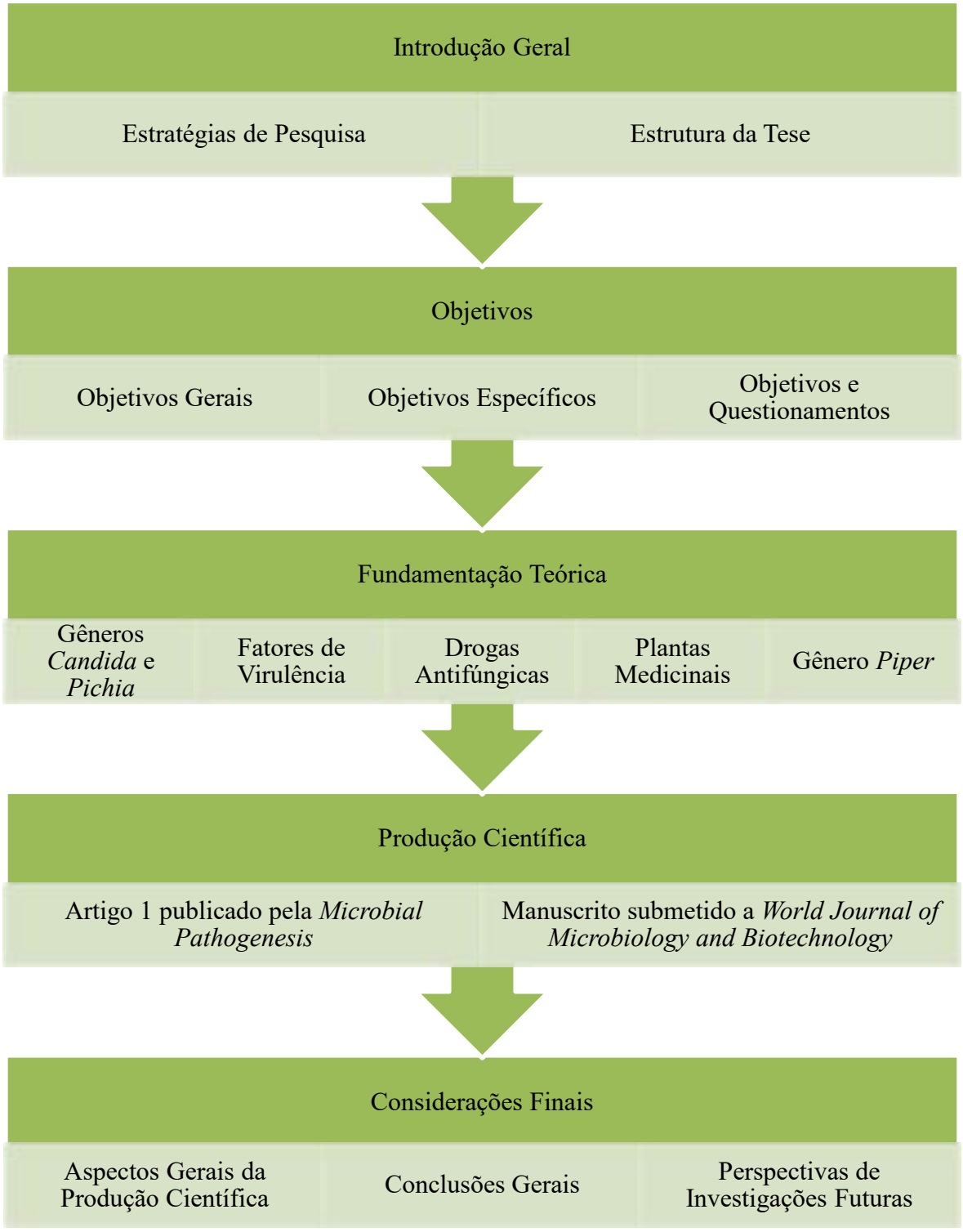
Para investigar se os compostos apresentam mecanismos de ação semelhantes aos antifúngicos convencionais, foram realizados ensaios para avaliar sua interação com o ergosterol (Silva Neto *et al.*, 2020). Técnicas de microdiluição na presença de ergosterol livre permitem comparar o comportamento dos produtos testados com o de fármacos clássicos, como a anfotericina B, cuja atividade depende diretamente da ligação a esse esterol da membrana fúngica (Vanzolini; Magnani, 2024).

Por fim, análises *in silico* foram utilizadas para simular interações moleculares e prever propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos. Essas técnicas, como *docking* molecular e ADMET, são reconhecidas por sua eficiência e baixo custo, além de acelerarem a descoberta de novos fármacos (Gupta *et al.*, 2021). Complementarmente, permitem integrar os resultados obtidos em ensaios *in vitro*, oferecendo uma visão mais abrangente do potencial terapêutico dos produtos estudados.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

A tese está dividida em cinco seções, cada qual representando passos importantes no desenvolvimento desta pesquisa, seguindo uma sequência lógica que vai desde a escolha da planta trabalhada (*Piper rivinoides*), até a escolha dos métodos, a fundamentação teórica necessária para embasar e justificar a pesquisa, os resultados obtidos e as considerações finais. A estrutura mais detalhada está presente no Fluxograma 1, com uma apresentação de cada tópico em sequência.

Fluxograma 1. Estrutura da Tese



A primeira seção, Introdução Geral, apresenta os métodos selecionados, com base na literatura, para a análise do óleo essencial (OE) de *P. rivinoides*. A extração do OE foi realizada por hidrodestilação, enquanto sua caracterização química foi conduzida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), utilizada para identificação dos constituintes, e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID),

empregada para análise quantitativa. A confirmação estrutural dos compostos majoritários foi realizada por ressonância magnética nuclear (^{1}H e ^{13}C). A atividade antifúngica foi avaliada por ensaios de microdiluição em caldo, conforme diretrizes da CLSI. Adicionalmente, foram utilizados ensaios para avaliação de fatores de virulência, incluindo inibição da transição morfológica e análise da biomassa e atividade metabólica de biofilmes maduros. Por fim, análises *in silico* foram conduzidas para predizer interações com alvos fúngicos e propriedades farmacocinéticas dos compostos.

A segunda seção apresenta o Objetivo Geral, que define as metas centrais do trabalho. Em seguida são detalhados os Objetivos Específicos, que desdobram cada aspecto a ser analisado ao longo da pesquisa. Por fim são expostos os Questionamentos, nos quais se discutem as motivações que levaram ao desenvolvimento da tese, além de sugerir qual o impacto que essa pesquisa tem para o meio acadêmico de forma contextualizada com a literatura cientifica.

Na terceira seção consta a Fundamentação Teórica, sendo esta dividida em cinco partes. A primeira trata dos fungos dos gêneros *Candida*, e *Pichia* abordando suas características, suas principais espécies patogênicas e a incidência de suas infecções em seres humanos. A segunda parte fala dos fatores de virulência desses fungos, mostrando como eles infectam os hospedeiros e resistem ao sistema imunológico e ao tratamento medicamentoso. Na terceira parte são citados as principais classes de antifúngicos do mercado atualmente e por quais mecanismos eles atuam. A quarta parte revela a importância de pesquisar novas terapias a partir das plantas medicinais, conduzindo ao quinto tópico, que fala sobre as plantas do gênero *Piper* e seus principais constituintes isolados, extensivamente relatados na literatura por suas atividades antimicrobianas.

A quarta seção traz o artigo publicado a revista Microbial Pathogenesis e é o primeiro trabalho referente à Tese, trazendo os resultados da extração, caracterização e quantificação dos compostos do OE de *P. rivinoides*. Além disso, foram determinadas a atividade antifúngica moderada frente a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Pichia kudriavzevii* contra todos os produtos testados, e uma forte ação da elemicina, composto majoritário do OE frente a *P. kudriavzevii*, linhagem que é intrinsecamente resistente ao fluconazol.

A seção também traz o manuscrito referente a continuação dos testes do primeiro artigo já publicado, onde foram realizadas técnicas *in vitro* e *in sílico* com os compostos isolados do óleo essencial de *Piper rivinoides*, miristicina e elemicina, para determinar o potencial inibitório dos fatores de virulência em *Candida*. Também foram preditos os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos isolados, bem como sua capacidade de ligação ao ergosterol. Cabe destacar que, embora o óleo essencial de *P.*

rivinoides tenha sido caracterizado neste estudo, limitações na obtenção do material exigiram coletas em diferentes períodos do ano, o que levou à condução dos experimentos subsequentes apenas com os compostos isolados. Da mesma forma, optou-se por concentrar as análises no gênero *Candida*, em especial *Candida albicans*, uma vez que suas estruturas moleculares estão mais detalhadamente descritas em bancos de dados, o que viabiliza a realização dos ensaios de *docking* e assegura maior robustez às comparações com antifúngicos convencionais.

Na quinta seção encontram-se as considerações finais, abordando os resultados obtidos nos testes apresentado nos artigos e manuscritos, confrontando os achados com os de outros autores. Além disso, são levantados questionamentos e sugeridos mecanismos que expliquem os dados, e as perspectivas futuras para o trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição química e analisar o potencial antifúngico do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth (OEPR), bem como de seus compostos isolados miristicina e elemicina contra fungos patogênicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e identificar os constituintes do óleo essencial de *Piper rivinoides* por GC-MS e RMN (^{1}H e ^{13}C), e quantificá-los por GC-FID;
- Isolar os compostos majoritários do óleo essencial de *Piper rivinoides* por cromatografia em coluna de sílica gel (fase normal), sob pressão (modo flash), com monitoramento por cromatografia em camada delgada;
- Realizar ensaios para determinação da Concentração Inibitória Média (IC_{50}) do óleo essencial residual de *Piper rivinoides* Kunth, bem como os isolados, frente a *Candida* spp., para estabelecimento da curva de viabilidade celular fúngica;
- Avaliar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos avaliados;
- Verificar as capacidades de modificação do efeito antifúngico de drogas comerciais pelo óleo essencial e seus constituintes miristicina e elemicina, de *Piper rivinoides* Kunth, em concentração subinibitória frente a *Candida* spp.;
- Analisar a ação dos compostos miristicina e elemicina, isolados do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth, sobre importantes fatores de virulência, como dimorfismo e biofilme fúngico;
- Determinar a capacidade de ligação ao ergosterol fúngico dos compostos miristicina e elemicina;
- Realizar simulações por *docking* e ADMET para identificar possíveis interações com alvos fúngicos e identificar o comportamento farmacocinético da miristicina e elemicina de *Piper rivinoides*.

2.3 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A escolha por plantas medicinais como objeto de estudo foi baseada na vasta biodiversidade brasileira, que abriga uma grande diversidade de espécies vegetais amplamente utilizadas pela população com base em conhecimentos empíricos, transmitidos entre gerações.

No entanto, embora o uso tradicional dessas plantas seja amplamente reconhecido, sua validação científica ainda é limitada. Nesse contexto, este trabalho teve como motivação contribuir para o fortalecimento de estudos que integrem o conhecimento popular ao rigor científico.

Dentre essas plantas, as do gênero *Piper* chamaram atenção devido às diversas bioatividades atribuídas a elas, incluindo atividade antifúngica (Carneiro *et al.*, 2020). A literatura relata a presença de diferentes metabólitos secundários, como fenilpropanoides, terpenoides e alcaloides (Chitiva-Chitiva *et al.*, 2021), sendo a piperina um dos principais representantes associados à atividade antimicrobiana (Haq *et al.*, 2021). No entanto, por se tratar de um alcaloide não volátil, sua presença em óleos essenciais é limitada, levantando a hipótese de que outros compostos voláteis possam ser responsáveis pela atividade biológica observada nesses extratos.

Ao analisar a literatura, observou-se que a atividade atribuída à piperina apresenta semelhanças funcionais com a de compostos fenólicos, os quais, segundo Siswina *et al.* (2023), são capazes de interagir com membranas celulares por meio de ligações de hidrogênio, causando danos estruturais que podem levar à lise celular. Embora esses compostos pertençam a classes químicas distintas e sejam oriundos de diferentes vias metabólicas, especialmente no caso dos constituintes voláteis de óleos essenciais, essa similaridade funcional levanta o seguinte questionamento: as atividades biológicas das espécies do gênero *Piper* podem ser atribuídas exclusivamente à presença de piperina, ou outros compostos, particularmente os presentes no óleo essencial, também contribuem de forma sinérgica, atuando em alvos semelhantes?

Para responder a essa pergunta, algumas pesquisas foram realizadas, evidenciando algumas espécies de *Piper* que não apresentavam piperina em sua composição, mas sim compostos fenólicos. Dentre os vários citados, havia dois fenilpropanoides não fenólicos que apareciam em concentrações elevadas, a miristicina e elemicina. Trata-se de uma classe de metabólitos secundários produzidos a partir da fenilalanina (Bauters, Stojilkovic e Gheysen, 2021). Além disso, em trabalho de Leal *et al.* (2019), *Piper rivinoides*, um membro da família Piperaceae pouco citado na literatura, apresentava altas concentrações de isoelemicina, tornando-se o objeto de estudo perfeito para responder ao primeiro questionamento.

Considerando que trabalho com fungos do gênero *Candida*, conhecidos por sua plasticidade e capacidade de desenvolver resistência antifúngica relacionada a componentes estruturais de suas membranas (Farhan *et al.*, 2024), parecia interessante verificar o potencial antifúngico do óleo essencial dessa planta e seus isolados fenilpropanoides, levando como base um novo questionamento: é possível que, se houver também atividade na membrana por parte

desses compostos não fenólicos, possa haver uma possível reversão da resistência ao fluconazol em *Candida*, uma vez que o aumento da permeabilidade facilitaria a entrada do fármaco?

Para responder a essa pergunta, foram selecionadas linhagens de *Candida* com características específicas: as sensíveis ao fluconazol (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) e as intrinsecamente resistentes a ele (*Pichia kudriavzevii*), de acordo com documento da WHO (2022).

Além disso, foram escolhidas técnicas capazes de testar uma ampla variedade de concentrações, como as de microdiluição da CLSI M27 (2017). Também foram adotados métodos que permitissem verificar a interação dos compostos com fatores de virulência dessas espécies ligados a componentes da membrana, como a capacidade de transitar da forma leveduriforme para hifal (Carneiro *et al.*, 2019), a formação de biofilme (dos Santos *et al.*, 2025) e a invasão dos tecidos por meio das proteases aspárticas secretadas (SAPs). Essas interações ainda foram simuladas por técnicas *in silico* de docking molecular e ADMET.

Por fim, incluiu-se uma técnica para verificar se os compostos podem interagir diretamente com o ergosterol fúngico, baseada em Silva Neto *et al.* (2020), em comparação com a anfotericina B, principal representante da classe dos polienos que se liga especificamente a esse esterol (Vanzolini *et al.*, 2024).

Dessa forma, o objetivo principal da minha tese é investigar como os compostos bioativos de *Piper rivinoides* podem atuar no controle de infecções fúngicas causadas por *Candida*, além de compreender, em profundidade, os mecanismos pelos quais esses compostos interferem nos fatores de virulência do fungo, como a transição morfológica e formação de biofilme, e como isso afeta a resistência antimicrobiana. Essa investigação dialoga diretamente com a literatura científica atual, que destaca a necessidade de novas abordagens terapêuticas para lidar com patógenos resistentes.

3.1 *Gêneros Candida* e *Pichia*

Os fungos do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que podem causar infecções em humanos, como candidíase, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, podendo evoluir para candidemia e sepse (Katsipoulaki *et al.*, 2024). Eles são conhecidos por sua capacidade de adotar várias formas morfológicas, como levedura, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidósporos, o que lhes confere virulência e capacidade de infecção (Brown *et al.*, 2024).

O gênero *Candida* possui cerca de 30 espécies previamente designadas por serem patogênicas em humanos. Dessas, *Candida albicans*, *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* representam as causas mais comuns de doenças invasivas causadas por fungos (Katsipoulaki *et al.*, 2024; Farhan *et al.*, 2024). Da mesma forma, a levedura *Candida auris* surgiu há algum tempo em todo mundo e rapidamente se tornou uma ameaça significativa devido a ser multirresistente a terapia vigente (Ivanov; Ćirić; Stojković,, 2022).

Em estudo de Denning (2024), uma estimativa baseada em dados de 98 países revela que a incidência anual é de 626.08 para infecções por *Candida* na corrente sanguínea, cerca de 8,05 por 100.000 habitantes. Somente no Brasil, a taxa de incidência de candidemia chega a 2,49 casos por 1.000 internações hospitalares, correspondendo a uma taxa de 2 a 15 vezes maior que as relatadas em países europeus e EUA (Brasil, 2023).

Algumas dessas espécies vivem de forma comensal no organismo humano, vindo a afetar predominantemente pacientes com fatores predisponentes como imunossupressão, hospitalização prolongada, uso de cateteres venosos centrais, diabetes, gravidez, idade avançada e intervenções cirúrgicas (Denning, 2024). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022), várias espécies de fungos estão classificadas na lista de prioridade. *Candida albicans* e *Candidozyma auris* (*Candida auris*) estão na categoria crítica, enquanto *Candida tropicalis*, *Nakaseomyces glabrata* e *Candida parapsilosis* são consideradas de alta prioridade. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) está listada como de prioridade média. O estabelecimento dessa lista serve para destacar as espécies que representam as maiores ameaças a saúde pública devido a sua resistência a medicamentos e ao impacto clínico significativo. Essa resistência pode ocorrer por mecanismos intrínsecos, como por exemplo a capacidade de alterar sua morfologia, formar biofilmes e produzir enzimas hidrolíticas (Farhan *et al.*, 2024), ou adquiridos, como mutações de alvos antifúngicos, superexpressão de bombas de efluxo e absorção reduzida de fármacos (Katsipoulaki *et al.*, 2024). É importante ressaltar que algumas

espécies de *Candida* passaram por mudança de clado nos últimos anos. O problema com *Candida* é que ela representa um grupo grande e altamente polifilético de leveduras formadoras de colônias brancas em brotamento no subfilo Saccharomycotina, originalmente agrupadas por causa de sua morfologia semelhante e falta de um teleomorfo definido. No entanto, ela não atende aos três critérios geralmente aceitos de um gênero: (1) monofilia, ou seja, todas as espécies dentro dela evoluindo de um ancestral comum; (2) compactação razoável em termos do número de espécies que abrange; e (3) membros do gênero compartilham características derivadas evolutivamente (Kidd *et al.*, 2023).

Dessa forma, com o avanço tecnológico e estudos genéticos, espécies como *C. krusei*, *Candida norvegensis* foram alocadas ao gênero *Pichia*, e *C. glabrata* ao gênero *Nakaseomyces*. Ambos os clados *Nakaseomyces* e *Pichia* incluem espécies caracterizadas por suscetibilidade diminuída ou resistência intrínseca a drogas antifúngicas azólicas, de modo que esses gêneros reclassificados agora representam características evolutivas específicas, o terceiro critério para um gênero (Kidd *et al.*, 2023).

Com apenas três classes principais de medicamentos e alvos limitados, tratar doenças fúngicas resistentes a antimicrobianos (resistentes a pelo menos um medicamento) torna-se extremamente desafiador e, às vezes, impossível. Além disso, existem espécies como *P. kudriavzevii*, que são resistentes a polienos e azóis, e *C. auris*, que apresenta resistência às três classes de antifúngicos (Kim; Cheng; Land, 2022). Esse arsenal terapêutico limitado e a resistência bem documentada contra os agentes disponíveis ressaltam a urgência do desenvolvimento de estratégias alternativas e eficazes para combater infecções fúngicas. Devido à natureza eucariótica dos fungos, os tratamentos disponíveis podem causar toxicidade ao hospedeiro (Reddy; Padmavathi; Nancharaiah, 2022).

Além disso, as mudanças climáticas têm impactado significativamente esse problema. A levedura multirresistente *C. auris* é considerada o primeiro fungo patogênico que pode ter surgido devido à adaptação às mudanças climáticas. Pesquisadores sugerem que o aquecimento global contribuiu para o surgimento simultâneo de clados distintos dessa espécie em três continentes entre 2012 e 2015, baseado na capacidade de *C. auris* crescer em temperaturas mais altas em comparação com espécies relacionadas (Williams *et al.*, 2024).

As leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *P. kudriavzevii* apresentam relevância clínica distinta, mas igualmente significativa. *C. albicans* é a principal espécie patogênica do gênero, capaz de alternar morfologias, formar biofilmes altamente resistentes e causar infecções superficiais ou sistêmicas graves (Farhan *et al.*, 2024; Feng *et al.*, 2024; Jensen *et al.*, 2024; Leal *et al.*, 2021; Pristov *et al.*, 2019). *C. tropicalis*, considerada a segunda mais virulenta, destaca-se pela elevada mortalidade em pacientes imunocomprometidos, forte produção de

biofilme e resistência aos azóis, especialmente ao fluconazol (Pristov *et al.*, 2019; WHO, 2022). Já *P. kudriavzevii*, embora de virulência relativamente menor, representa desafio terapêutico por sua resistência intrínseca ao fluconazol e suscetibilidade variável a outros antifúngicos, além de despertar interesse crescente em aplicações industriais e biotecnológicas (Chu *et al.*, 2023; Gomez-Gaviria *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2023; WHO, 2022). Em conjunto, essas espécies ilustram a diversidade e complexidade das leveduras de importância médica, justificando pesquisas de suscetibilidade antifúngica com todas elas.

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A adesão das células de *Candida* às células hospedeiras é o principal fator que influencia sua capacidade de causar doenças. O primeiro passo para a infecção é a fixação, auxiliada por fatores como proteínas de adesão (encontradas na superfície de *Candida* spp.) e ligantes como caderinas e integrinas. Após essa etapa, é necessário que as células entrem no tecido. Esse processo pode ocorrer por penetração induzida ou endocitose (Farhan *et al.*, 2024).

Todo esse processo é mediado por proteínas, como as da família ALS (Agglutinin-Like Sequence). A família de genes ALS é responsável por oito proteínas da parede celular, como ALS1-7 e ALS-9. Essas proteínas atuam como facilitadoras da adesão às células epiteliais do hospedeiro (Butler *et al.*, 2009). Essas podem carregar genes importantes para proliferação filamentosa, desenvolvimento de biofilmes e estruturas da parede celular. Um exemplo disso é a ALS3, presente nas hifas, facilita a ligação a várias células hospedeiras (epiteliais e endoteliais), interagindo com receptores E-caderina e N-caderina, estimulando a fagocitose (Hoyer e Cota, 2016; Phan *et al.*, 2007).

Para continuar o processo, são secretadas as aspartil proteinases (SAP's), um grupo de 10 enzimas proteolíticas com várias atividades especificas. Elas podem metabolizar a hemoglobina para obter nutrientes para as células de *Candida*, além de hidrolisar albumina, colágeno, cistatina A, queratina, laminina e fibronectina, promovendo adesão e invasão do tecido hospedeiro (Naglik, Challacombe e Hube, 2003; Buu e Chen, 2013).

Para que esses processos ocorram, é necessário que células individuais se fixem a uma superfície adequada, crescendo em pequenos grupos chamados de microcolônias, criando uma camada de base. Isso pode favorecer a produção de biofilmes, que pode variar de 24 a 72 horas. Esse processo é complexo e consiste em vários estágios, onde após a adesão, o biofilme cresce a partir da filamentação com células aderidas próximas e amadurece, chegando ao estágio final de dispersão, disseminando células de levedura por todo o ambiente (Farhan *et al.*, 2024).

Candida albicans é reconhecida como a principal espécie geradora de biofilmes entre as espécies de *Candida* de importância médica. Esta espécie exibe polimorfismo, produzindo hifas verdadeiras e pseudo-hifas, estas últimas mais comuns. As hifas podem se originar de células de levedura ou de extensões de hifas pré-existentes. Pseudo-hifas são formadas por brotamento de células de levedura ou hifas, com progênie conectada à célula-mãe e se alongando para formar filamentos com constrições nas junções célula-célula (Mitchell, Zarnowski e Andes, 2016). Todo esse processo está intimamente relacionado à formação de biofilme em *Candida*, uma vez que a capacidade de aderir e invadir tecidos conferida pelas hifas favorece à sua formação (Medeiros, 2013).

Biofilmes são comunidades de células fúngicas incorporadas em uma matriz extracelular que ajudam os patógenos a evitar serem destruídos por células imunes, como neutrófilos e monócitos, tornando difícil a erradicação. Os fungos empregam vários mecanismos para aumentar a resistência do biofilme, incluindo alta densidade celular, crescimento e limitação de nutrientes, presença de células persistentes, expressão de genes de resistência antifúngica e aumento do conteúdo de esteróis na membrana celular fúngica. A matriz extracelular, composta por proteínas, carboidratos, lipídios e DNA extracelular, também contribui para essa resistência (Ivanov, Ćirić e Stojković, 2022).

A resistência desses fungos não está unicamente ligada a formação de biofilmes. Fatores como a composição da membrana e parede celular são importantes no processo e podem representar fatores de virulência. A resistência ao fluconazol em *P. kudriavzevii* não é totalmente compreendida, mas parece ter duas causas principais: a enzima de síntese de ergosterol Erg11 ou Cyp51 possui uma afinidade anormalmente baixa pelo fluconazol, e as bombas de efluxo de medicamentos Abc1 e Abc11 são expressas constitutivamente (Douglass *et al.*, 2018). Além disso, pesquisas revelam que esse fungo tem menor conteúdo de ergosterol em sua membrana celular, o que pode reduzir os locais de ligação para anfotericina B, tornando o medicamento menos eficaz (Nguyen *et al.*, 2024).

Outro fator importante ligado a parede fúngica é a N-acetilglucosamina (GlcNAc), uma molécula de sinalização de monossacarídeo que pode regular transições morfológicas em *C. albicans* e *C. tropicalis*. Curiosamente, embora a captação e as vias metabólicas de GlcNAc e a troca de células brancas para opacas mediada por GlcNAc sejam semelhantes entre as duas espécies de *Candida*, GlcNAc induz o desenvolvimento de hifas em *C. albicans*, enquanto suprime o desenvolvimento de hifas em *C. tropicalis*. Essas descobertas indicam que as respostas de *C. albicans* e *C. tropicalis* à GlcNAc são notavelmente distintas. Embora a GlcNAc ative a via de sinalização cAMP/PKA em ambas as espécies, o circuito regulatório do desenvolvimento de hifas é bastante diverso entre elas. De fato, o gene REP1, semelhante ao

Ndt80, que é essencial para regular o catabolismo de GlcNAc, desempenha papéis distintos no desenvolvimento de hifas de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Lew; Lin, 2021).

3.3 DROGAS ANTIFÚNGICAS

Dada a relevância clínica dessas infecções, a terapia antifúngica desempenha um papel crucial no manejo e controle das doenças fúngicas, sendo essencial para reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. As principais classes de antifúngicos utilizados na prática clínica são os polienos, tendo a anfotericina B como principal exemplo, os azóis com fluconazol e itraconazol, e as equinocandinas com a caspofungina (Vanzolini; Magnani, 2024).

A anfotericina B é o principal representante da classe dos polienos. Apresenta ação fungicida devido a sua interação hidrofóbica com o ergosterol presente na membrana dos fungos, criando poros que levam a perdas de íons e outras moléculas essenciais (K^+, Ca^{2+}, e Mg^{2+}), resultando em morte celular (Vanzolini; Magnani, 2024; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022). Além disso, Anderson *et al.* (2014) sugere que ela possa atuar na formação de grandes agregados extramembranosos que extraem o ergosterol das bicamadas lipídicas. Também induz um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ambos os mecanismos contribuem para a morte celular (Nett; Andes, 2016).

De forma semelhante, a nistatina, um polieno macrolídeo derivado de *Streptomyces noursei*, também interage com ergosterol, criando cavidades na membrana, levando a perda de função, aumento da permeabilidade e integridade (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022). Natamicina, outro polieno, atua induzindo inibição reversível e específica do ergosterol de proteínas de transporte de membrana e, ao inibir o transporte de membrana, eventualmente inibe o crescimento fúngico (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022).

Embora eficazes, os polienos apresentam limitações importantes. A anfotericina B, utilizada no tratamento de micoses sistêmicas, está associada a efeitos adversos relevantes, incluindo nefro e hepatotoxicidade (Houšť; Spížek; Havlíček, 2020; Vanzolini; Magnani, 2024). A nistatina é usada no tratamento de candidíase local nas comissuras labiais; mucosas da cavidade oral; intestinos; espaços interdigitais, unhas, área anorretal e ouvido externo. Nos casos do uso oral, pode provocar diarreia, náusea, vômito e dores abdominais (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022). Natamicina também é usada majoritariamente para tratar infecções superficiais, e seus efeitos colaterais incluem dores no peito e dispneia (Sharma; Taniguchi, 2017). Os azóis são os antifúngicos de primeira linha. São considerados fungistáticos/fungicidas a depender do organismo e podem ser encontrados em dois grupos: imidazol e triazol. Seu mecanismo de ação incluem a inibição da lanosterol-14α-demetilase

dependente de citocromo P450, uma enzima essencial para converter lanosterol em ergosterol (Vanzolini; Magnani, 2024; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022). Eles são amplamente utilizados como tratamento, profilático e preventivo tanto em campos médicos quanto cirúrgicos (Vanzolini; Magnani, 2024).

O miconazol é um antifúngico da classe dos imidazóis, eficaz contra dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*, sendo amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas da pele, como candidíase cutânea. Devido à sua baixa absorção oral, não é utilizado em comprimidos ou cápsulas, e sua administração por via parenteral é restrita a emergências devido ao risco de efeitos colaterais graves. Quando aplicado topicamente, é geralmente bem tolerado, embora possam ocorrer raros efeitos adversos, como maceração, dermatite alérgica e irritação cutânea (Ivanov, Ćirić e Stojković, 2022).

Dentre os triazóis, o fluconazol é o mais citado, sendo amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas, e importante em casos de meningite criptocócica e em pacientes imunocomprometidos. Além disso, é eficaz no tratamento de infecções cutâneas e mucosas, com destaque para a candidíase vaginal. Comparado ao miconazol, o fluconazol apresenta menor toxicidade, tornando-o uma opção mais segura em diversas condições clínicas (Vanzolini; Magnani, 2024; Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022). Apesar de ser bem tolerado, algumas restrições foram destacadas, como o prolongamento do intervalo QT, a teratogenicidade e a interações medicamentosas dos triazóis (Cook *et al.*, 2017).

As equinocandinas representam uma classe de medicamentos antifúngicos relativamente novos, iniciando seu desenvolvimento no início dos anos 2000. Esses compostos são produzidos por fungos filamentosos e vem sendo usados para criar derivados semissintéticos, como a caspofungina e micafungina e anidulafungina (Houšť; Spížek; Havlíček, 2020; Ivanov, Ćirić; Stojković, 2022). Dependendo da espécie fúngica e cepa, podem atuar como fungistáticos ou fungicidas. Devido a sua forte atividade associada a um amplo espectro, boa farmacocinética e farmacodinâmica, alta segurança e poucas interações medicamentosas, chegaram com grande aceitação no mercado, tornando-se adequados a medicamentos de primeira linha, especialmente na candidemia nosocomial (Kato *et al.*, 2021).

Seu mecanismo de ação está ligado a inibição da β-1,3-D-glucano sintase, uma enzima essencial para síntese de glucanos, um importante polissacarídeo componente da parede celular fúngica. Essa enzima é um complexo formado por duas subunidades, uma reguladora, Rho1 (Ras homólogo 1) e uma catalítica, Fks (sensibilidade FK506). Em particular, as equinocandinas atuam especificamente nos genes Fks e são especialmente usados para tratar infecções graves por *Candida* resistente a azóis (Loh; Ang, 2020). Esses genes estão ligados a

codificação de uma subunidade catalítica do complexo glucano sintase (Suwunnakorn *et al.*, 2018).

Embora sejam medicamentos recentes, casos de *Candida* spp. resistentes a equinocandinas tem sido relatado. A resistência está associada a mutações nos genes Fks1 e Fks2. O mecanismo exato de resistência está ligado à mutação de duas regiões da subunidade Fks1p da β-(1,3) d-glucano sintase, que subsequentemente leva à substituição da serina 645 por prolina, fenilalanina e tirosina e altera o sítio alvo das equinocandinas (Pristov; Ghannoum, 2019).

Existem também outras opções de antifúngicos menos comuns, mas que representam alternativas viáveis a terapia vigente. É o caso da flucitosina, um análogo da pirimidina que, uma vez capturada pela célula fúngica, é convertida em 5-fluorouracilo que inibe a síntese de DNA e RNA. É comumente usada em combinação com anfotericina-B para tratar meningite criptocócica e algumas infecções graves por *Candida* (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025). A terbinafina, da classe das alilaminas, inibe a enzima esqualeno epoxidase, levando ao acúmulo de esqualeno e depleção do ergosterol, alterando o equilíbrio da membrana fúngica (Branda *et al.*, 2025)

Da classe das equinocandinas, a rezafungina é usada para tratamento de candidíase invasiva em adultos, que acaba sendo vantajosa por sua meia-vida muito mais longa, permitindo administração intravenosa semanal, sendo mais facilmente aceitada pelos pacientes (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025). Como representante dos triterpenoides, o ibrexafungerp inibe a β-(1,3)-D-glucano sintase de forma semelhante as equinocandinas, porém atuando em um sítio diferente na enzima, o que lhe confere atividade mesmo contra cepas resistentes ao seu análogo (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025). Da nova geração dos azóis, o oteseconazol atua na CYP51 fúngica, sendo mais seletivo que outros antifúngicos da sua classe, além de apresentar menor risco de interações medicamentosas devido a sua seletividade (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025).

O Olorofim, da nova classe dos orotomidas, é um inibidor da diidroorotato desidrogenase, uma enzima chave na via da biossíntese das pirimidinas, essenciais para síntese de DNA e RNA (de Souza *et al.*, 2025). Embora promissora, encontra-se na fase 3 de ensaios clínicos, sem comercialização (Branda *et al.*, 2025). Outro ainda em testes clínicos é o fosmanogepix, o primeiro inibidor da enzima fúngica Gwt1, essencial para maturação de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol. É de amplo espectro, podendo atuar contra *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e alguns *Mucorales* (Branda *et al.*, 2025; de Souza *et al.*, 2025).

O desenvolvimento de resistência em patógenos fúngicos aos medicamentos disponíveis é um problema clínico emergente na terapia antifúngica (Berman; Krysen, 2020). Diversos fatores, como características do hospedeiro, tipos de fungos envolvidos e condições ambientais, desempenham um papel crucial no desenvolvimento da resistência antifúngica. Entre os principais mecanismos que impulsionam o surgimento da resistência antifúngica estão a plasticidade fenotípica adaptativa, mutações em genes alvo seguidas de seleção, aneuploidia cromossômica, reprodução sexual e transferência horizontal de genes são as forças motrizes para o surgimento da resistência antifúngica (Reddy; Padmavathi; Nancharaiah, 2022).

Diante do avanço da resistência antifúngica, a terapia combinada surge como alternativa promissora por atuar em múltiplos alvos e reduzir falhas terapêuticas. Combinações como caspofungina com voriconazol mostraram eficácia clínica elevada, enquanto associações de terbinafina com itraconazol ampliaram o espectro contra *Candida* e *Aspergillus* (de Souza *et al.*, 2025). Diretrizes internacionais já recomendam a anfotericina B com flucitosina como primeira linha para criptococose, reforçando que a combinação não apenas potencializa o efeito fungicida, mas também diminui doses necessárias e tempo de tratamento, consolidando-se como estratégia essencial no manejo das infecções fúngicas graves (de Souza *et al.*, 2025).

3.4 PLANTAS MEDICINAIS

Desde tempos imemoriais, o valor terapêutico das plantas e sua eficácia no tratamento e gerenciamento da saúde têm sido reconhecidos entre diferentes grupos étnicos. Particularmente, as plantas são conhecidas por desempenhar um papel vital em sistemas medicinais antigos, como as medicinas africana, ayurvédica e chinesa (Aremu; Luo; Mussarat, 2024). Há uma longa história de uso de espécies medicinais na medicina tradicional, com muitas culturas que delas dependem para o tratamento de diversas doenças (Hosee; Farhan; Shaban, 2025; Latif; Nawaz, 2025).

Na medicina moderna, as plantas são fontes reconhecidas de medicamentos importantes, como artemisinina, ginkgolides, quinina, reserpina, escopolamina, paclitaxel, vincristina e vinblastina. É geralmente reconhecido que os recursos naturais, incluindo plantas, continuam a desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de moléculas bioativas utilizadas na formulação de medicamentos para várias doenças (por exemplo, câncer, malária e demência) que afetam os humanos (Newman; Cragg, 2020; Howes *et al.*, 2020).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é amplamente documentado em comunidades rurais e tradicionais, onde são empregadas em banhos e infusões a partir de folhas, cascas de caule, frutos, óleos, raízes, plantas inteiras, seiva e sementes. O país abriga a maior floresta

equatorial e tropical do mundo, conferindo-lhe uma biodiversidade excepcional e uma vasta diversidade genética vegetal. Esse potencial tem sido objeto de grande interesse na ciência brasileira, envolvendo químicos e farmacologistas de renome internacional (Leal *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo na demanda por plantas medicinais. Esse crescimento é impulsionado pela preferência dos consumidores por produtos de origem natural e a crescente necessidade por novas terapias capazes de suplantar a resistência fúngica. Os óleos essenciais extraídos das plantas medicinais e seus constituintes (metabolitos secundários) desempenham, portanto, um papel significativo devido à sua acessibilidade, baixo custo e variedade de atividades biológicas (Silva *et al.*, 2024).

Entre esses metabólitos, compostos fenólicos como taninos, cumarinas, quinonas e estilbenoides são abundantes em plantas e apresentam atividade antifúngica significativa. Seu principal mecanismo de ação envolve a ruptura da membrana celular, já que muitos fitoquímicos interagem com o ergosterol, componente essencial para a integridade da membrana (Hosee; Farhan; Shaban, 2025; Latif; Nawaz, 2025; Wani *et al.*, 2020). Isso ocorre, principalmente, devido a sua natureza hidrofóbica. Essas propriedades lipofílicas desses compostos, ao interagir com células microbianas, permitem atravessar membranas celulares e alcançarem componentes intracelulares, comprometendo suas funções e induzindo a morte celular por aumento da permeabilidade citoplasmática (Menezes; Tasca, 2023). Outros grupos, como saponinas e flavonoides, também comprometem a integridade celular ao provocar lise, disfunção mitocondrial ou interferência na síntese e divisão da parede celular (Hosee; Farhan; Shaban, 2025).

3.5 GÊNERO *Piper*

A família Piperaceae possui espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais nos hemisférios norte e sul, incluindo plantas herbáceas e arbustivas. O gênero *Piper* é o maior e dentro da família destaca-se pela produção de extratos vegetais, incluindo óleos essenciais ricos em metabólitos secundários, como neolignanas, fenilpropanoides, flavonoides, alquilbenzenos, e derivados do ácido benzóico, da via do chiquimato, além de compostos terpenoides (Carneiro *et al.*, 2019; Chitiva-Chitiva *et al.*, 2021).

Essas plantas possuem grande potencial terapêutico, sendo relatadas por seu uso no tratamento de doenças do sistema nervoso central e por atuar como larvicidas (Huong *et al.*, 2019), acaricidas (Silva *et al.*, 2009), antibacterianos (Astuti *et al* 2020) e antifúngicos (Carneiro *et al.*, 2020). esse potencial vem sendo explorado tanto na medicina popular em

diferentes países, quanto no desenvolvimento de novos fármacos, dado o papel multifuncional de seus compostos bioativos (Siswina *et al.*, 2023).

De acordo com Haq *et al.* (2021), a piperina, um alcaloide, é o principal composto isolado em plantas do gênero *Piper*, tendo chamado atenção devido a suas propriedades medicinais, sendo atribuída a ela muitas das atividades benéficas relacionadas ao uso dessas plantas. A piperina é conhecida por aumentar os efeitos biológicos de vários nutrientes e medicamentos terapeuticamente importantes. Ela aumenta a disponibilidade biológica de nutrientes e medicamentos por meio da promoção da absorção por vários mecanismos. Recentemente, Cui *et al.* (2020) demonstraram que a piperina inativa o citocromo P450, que desempenha um papel crítico no metabolismo de medicamentos. A piperina também modula a dinâmica da membrana e aumenta a permeabilidade do local de absorção (Haq *et al.*, 2021).

Com isso, essas plantas representam um grande potencial antifúngico. É o que relata Bravo-Chaucanés *et al.* (2023), que utilizando uma piperina isolada de *Piper nigrum* contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, conseguiu uma MIC_{80} de 1024 µg/mL para a cepa resistente, com uma concentração fungicida mínima de 2048 µg/mL. O autor destaca que a piperina isolada apresentou um desempenho superior ao do extrato de *Piper nigrum*, atribuindo essa diferença à presença de outros compostos no extrato que podem interferir na atuação específica da piperina. Além disso, foi observado que as moléculas interagiram de maneira a alterar a permeabilidade da membrana celular.

No entanto, outros compostos comumente encontrados em *Piper* também apresentam ação antifúngica. É o caso da *Piper barbatum*, com óleo essencial rico em α-felandreno (43,16%), que foi capaz de inibir *C. albicans* e *C. tropicalis* na concentração de 132 e 264 µg/mL respectivamente (Noriega *et al.*, 2020). O extrato das folhas de *Piper betle*, rico em hydroxichavicol, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* na concentração de 125 µg/mL (Sivareddy *et al.*, 2019).

Em trabalho de Zhang *et al.* (2021), o óleo essencial de *P. nigrum* contendo 23,75% de ácido gálico foi capaz de inibir o crescimento e esporulação de *Aspergillus flavus* na concentração de 20 µL/mL. O autor especula que o óleo pôde ter comprometido a membrana celular, causando perda de integridade e extravasamento do conteúdo intracelular. Em outro trabalho, *P. nigrum*, contendo 73% de piperina, foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus parasiticus* com uma MIC_{50} na concentração de 75 µg/mL. O autor chega a sugerir que esses compostos possam atuar afetando a estrutura e função da parede celular, uma vez que suas estruturas são semelhantes ao do eugenol, que é amplamente relatado em literatura por interferir nas permeases de membrana, levando a disrupção da célula (Buitimea-Cantua *et al.*, 2020).

Evidências indicam que as atividades das plantas do gênero *Piper* não podem ser atribuídas a um só composto, mas a vários. Yusuff e colaboradoras (2025) destacam que nos extratos funcionais de *Piper* contêm diversos metabolitos secundários, incluindo terpenos, alcaloides, lipídios e compostos fenólicos que, em conjunto, contribuem para suas diversas atividades biológicas. Os terpenos e alcaloides anteriormente citados parecem apresentar mecanismos semelhantes aos dos fenólicos. Os compostos fenólicos exibem atividades antifúngicas ao interagirem com células fúngicas por meio de ligações de hidrogênio, causando danos às proteínas, membranas celulares e à síntese de ergosterol, o que leva à lise celular e malformações (Siswina *et al.*, 2023). Além de sua ação antifúngica, acredita-se que os compostos fenólicos atuem como mecanismos de sobrevivência das plantas frente a diferentes condições ambientais, o que reforça sua importância adaptativa e funcional (Yusuff *et al.*, 2025).

Essa diversidade de metabólitos secundários em espécies do gênero *Piper* evidencia que diferentes classes químicas contribuem para suas atividades biológicas. Entre essas classes, destacam-se os fenilpropanoides, que também têm sido amplamente investigados por seu potencial antifúngico e imunomodulador. Em trabalho de Leal *et al.* (2019), o óleo essencial de *Piper rivinoides*, contendo 40,81% de isoelemicina, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* na concentração de 217,6 µg/mL. Entretanto, em trabalho de Carneiro *et al.* (2020), o óleo essencial de *Piper mikanianum*, com 82% de safrol, não apresentou inibição em concentrações clinicamente relevantes (2048 µg/mL contra *C. albicans*). Entretanto, quando combinado ao antifúngico fluconazol, houve inibição em concentrações abaixo de 70 µg/mL, enquanto a droga sozinha foi de 91,97 µg/mL contra *C. albicans*.

Os fenilpropanóides, uma classe de metabólitos secundários produzidos a partir da fenilalanina, são um grupo diverso que pode ser dividido em cinco subgrupos de acordo com sua estrutura: flavonóides, monolignóis, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas (Bauters; Stojilković; Gheysen, 2021). O tamanho das suas cadeias ramificadas parece aumentar a potência da atividade antifúngica (Tsukuda *et al.*, 2022), pois quanto mais lipofílica a molécula, maior a capacidade de incorporação em membranas (Ciura *et al.*, 2019). A lipofilicidade é um dos fatores essenciais que determinam a atividade biológica dos candidatos a fármacos. Ela determina não apenas o transporte de moléculas através de membranas biológicas, mas também sua capacidade de se ligar a receptores (Waring, 2010).

Miristicina e elemicina (Figura 1 A e B respectivamente) são metabolitos secundários que fazem parte dos alquenilbenzeno e estão presentes em plantas do gênero *Piper*. Alquenilbenzenos representam um grupo de substâncias naturais que são sintetizadas como metabólitos secundários em várias plantas, incluindo noz-moscada e manjericão. Muitas das

plantas que contêm alquenilbenzeno são plantas de especiarias comuns e suas preparações são usadas para fins de aromatização. Vários derivados dos alquenilbenzenos são tóxicos conhecidos. Por exemplo, o safrol e o metileugenol foram classificados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (AIPC) como "possivelmente cancerígenos para os seres humanos" (Götz *et al.*, 2022).

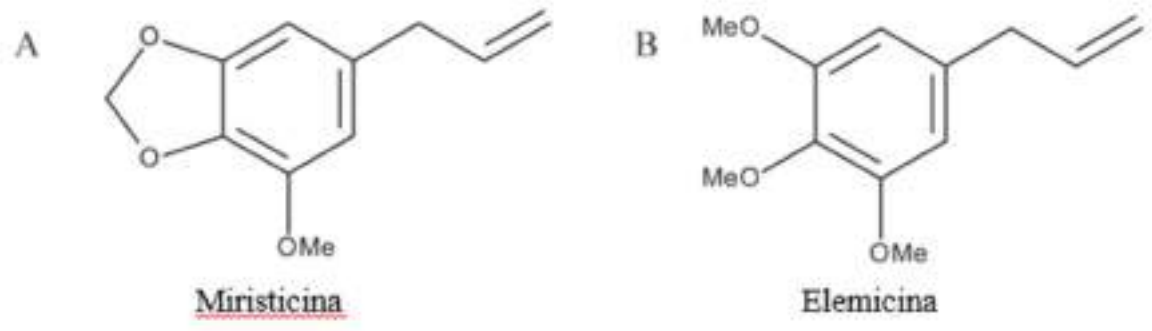


Figura 1: Fórmula estrutural da miristicina (A) e elemicina (B)

A toxicidade do safrol e do metileugenol é causada principalmente pela ativação metabólica na cadeia lateral alílica, formando ésteres de sulfato alílico instáveis que reagem com nucleófilos celulares, como DNA e proteínas. Miristicina e elemicina possuem um substituinte metoxi adicional no núcleo benzênico, comparados ao safrol e ao metileugenol, respectivamente. As reações de desmetilação oxidativa da miristicina e da elemicina no núcleo benzênico diferem das reações no safrol e no metileugenol, resultando em padrões diferentes de metabólitos urinários em humanos após a ingestão. Entretanto, esses metabolitos são consumidos frequentemente em algumas pimentas, e sendo principalmente utilizados em refrigerantes e doces como aromatizantes (Götz *et al.*, 2022).

Artigo 1 – CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper rivinoides* Kunth E SEUS COMPONENTES MIRISTICINA E ELEMICINA, CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS OPORTUNISTAS

Victor Juno Alencar Fonseca[1]; Sara Castro dos Santos[2]; Joara Nályda Pereira Carneiro[1]; Antônia Thassya Lucas dos Santos[1]; Maria Audilene de Freitas[1]; Natália Kelly Gomes de Carvalho[1]; Francildo dos Santos Silva[1]; Andressa Guilhermino dos Santos[1]; Aparecida Vitória Silva Menêses[1]; Naiza Saraiva Farias[1]; Rivânia Pereira dos Santos[1]; Ricardo Andrade Rebelo [2] ; Martinho Rau[2]; Luiz Everson da Silva[3]; Wanderlei do Amaral[4]; José Galberto Martins da Costa[1]; Irwin Rose Alencar de Menezes[1]; Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga[1]

Microbial Pathogenesis – www.sciencedirect.com/journal/microbial-pathogenesis – Fator de Impacto 3.5

RESUMO

A candidíase é uma doença infecciosa causada por alguns fungos do gênero *Candida*. No Brasil, a taxa de incidência é maior que em países europeus e Estados Unidos, e os problemas de saúde ocorrem principalmente devido aos fatores de virulência dos fungos, que têm dificultado o tratamento com medicamentos comerciais. Considerando o contexto, plantas ricas em compostos fenólicos, como as do gênero *Piper*, têm sido estudadas devido às suas propriedades antimicrobianas. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar o óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth, bem como analisar a bioatividade deste óleo essencial e dos isolados de miristicina e elemicina contra patógenos fúngicos oportunistas. O método de microdiluição em caldo foi usado para identificar a atividade intrínseca dos produtos naturais isolados sozinhos e combinados com fluconazol para obter a concentração inibitória de 50% dos fungos (IC_{50}). Ensaios de subcultura de microdiluição foram realizados para determinar a concentração fungicida mínima. Os resultados revelaram atividade antifúngica moderada do óleo *de P. rivinoides contra C. tropicalis* (512 µg /mL), *C. albicans* (1024 µg/mL) e *P. kudriavzevii* (512 µg/mL). A miristicina também apresentou atividade moderada contra *C. albicans, C. tropicalis* e *P. kudriavzevii* a 1024 µg / mL. Quanto à elemicina, a inibição ocorreu na concentração de 512 µg/mL para ambas as cepas, exceto contra *P. kudriavzevii,* que foi de 128 µg/ mL. Combinados com fluconazol, os produtos modificaram a ação do fármaco, aumentando sua eficácia em concentrações que variaram de 0,007 a 20,78 µg /mL, exceto a elemicina, que antagonizou o efeito do fármaco, modificando sua ação de 32,17 a 74,18 µg/mL contra *P. kudriavzevii.* O efeito antifúngico dos compostos, sozinhos ou em combinação com fluconazol,

foi fungistático, exceto para *P. kudriavzevii*, que foi fungicida no teste isolado com elemicina em concentrações a partir de 128 µg/ mL. Portanto, *P. rivinoides* e seus compostos isolados têm potencial para terapia combinada com antifúngicos.

Palavras-chave: Fenilpropanoide; Piperaceae; Antifúngico; *Candida* spp.*; Pichia kudriavzevii*.



Microbial Pathogenesis 199 (2025) 107242

Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Characterization and analysis of the bioactivity of the *Piper rivinoides* Kunth essential oil and its components myristicin and elemicin, against opportunistic fungal pathogens

Victor Juno Alencar Fonseca [a,*], Sarah Castro dos Santos [b], Joara Nályda Pereira Carneiro [a], Antonia Thassya Lucas dos Santos [a], Maria Audilene de Freitas [a], Natália Kelly Gomes de Carvalho [a], Francildo dos Santos Silva [a], Andressa Guilhermino dos Santos [a], Aparecida Vitória Silva Menêses [a], Naiza Saraiva Farias [a], Rivânia Pereira dos Santos [a], Ricardo Andrade Rebelo [b], Martinho Rau [b], Luiz Everson da Silva [c], Wanderlei do Amaral [d], José Galberto Martins da Costa [a], Irwin Rose Alencar de Menezes [a], Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga [a]

[a] Universidade Regional Do Cariri – URCA, Rua Gil. Antônio Luiz, 1161 - Pimenta, Crato, CE, Brazil
[b] Universidade Regional de Blumenau – FURB, Rua Antônio da Veiga, 140 – Itoupava Seca, Blumenau, SC, Brazil
[c] Programa de Pós-Graduação Em Desenvolvimento Territorial Sustentável, Setor Litoral, Universidade Federal Do Paraná, Matinhos, PR, Brazil
[d] Universidade Federal Do Paraná, Jardim Das Américas, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Phenylpropanoid
Piperaceae
Antifungal
Candida spp.
Pichia kudriavzevii

ABSTRACT

Candidiasis is an infectious disease caused by some fungi of the genus *Candida*. In Brazil, the incidence rate is higher than in European countries and the United States, and health problems occur mainly due to the virulence factors of the fungi, which have made treatment with commercial drugs difficult. Considering the context, plants rich in phenolic compounds, such as those of the genus *Piper*, have been studied due to their antimicrobial properties. Thus, the objective of this study was to isolate and characterize the essential oil of *Piper rivinoides* Kunth, as well as to analyze the bioactivity of this essential oil and the myristicin and elemicin isolates against opportunistic fungal pathogens. The broth microdilution method was used to identify the intrinsic activity of the isolated natural products alone and combined with fluconazole to obtain the 50 % inhibitory concentration of the fungi (IC_{50}). Microdilution subculture assays were performed to determine the minimum fungicidal concentration. The results revealed moderate antifungal activity of *P. rivinoides* oil against *C. tropicalis* (512 µg/mL), *C. albicans* (1024 µg/mL), and *P. kudriavzevii* (512 µg/mL). Myristicin also showed moderate activity against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *P. kudriavzevii* at 1024 µg/mL. As for elemicin, inhibition occurred at a concentration of 512 µg/mL for both strains, except against *P. kudriavzevii*, which was from 128 µg/mL. Combined with fluconazole, the products modified the drug's action, increasing its efficacy at concentrations ranging from 0.007 to 20.78 µg/mL, except for elemicin, which antagonized the drug's effect, modifying its action from 32.17 to 74.18 µg/mL against *P. kudriavzevii*. The antifungal effect of compounds, alone or in combination with fluconazole, was fungistatic, except for *P. kudriavzevii*, which was fungicidal in the isolated test with elemicin at concentrations starting from 128 µg/mL. Therefore, *P. rivinoides* and its isolated compounds have the potential for combination therapy with antifungals.

* Corresponding author.
E-mail address: victorjunoalencar@gmail.com (V.J.A. Fonseca).

https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107242
Received 9 September 2024; Received in revised form 16 December 2024; Accepted 18 December 2024
Available online 20 December 2024
0882-4010/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

1. **INTRODUÇÃO**

O gênero *Candida* compreende um grupo de fungos patógenos oportunistas que colonizam mucosas humanas saudáveis. No entanto, quando o organismo apresenta déficit imunológico, ele passa a se multiplicar descontroladamente, causando diversas infecções, como a candidíase [1]. Somente no Brasil, a taxa de incidência de candidemia chega a 2,49 casos a cada 1.000 internações hospitalares, correspondendo a uma taxa de 2 a 15 vezes maior que as relatadas em países europeus e EUA [2]. Segundo Chaucanés *et al.* [3], *Candida albicans* é a espécie mais comumente associada à candidíase, mas não é sua única causa, com registros de espécies não *albicans* como *Candida glabrata, Pichia kudriavzevii,* (formalmente conhecida como *Candida krusei*, esta espécie foi recentemente reclassificada devido a estudos filogenéticos e critérios taxonômicos atualizados. Também exibe resistência intrínseca a antifúngicos azólicos [4]), *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* [5]. Os problemas de saúde ocorrem principalmente devido à capacidade desses microrganismos de formar biofilmes, um importante fator de virulência que confere resistência aos medicamentos e ao sistema imunológico [3].

Neste contexto, a busca por novos agentes antifúngicos de origem natural, que apresentem efeitos colaterais leves, boa eficácia e baixo custo, é urgentemente necessária para tratar doenças infecciosas como as causadas por *Candida* spp. [1]. Muitas plantas, popularmente conhecidas por suas propriedades medicinais, são utilizadas por comunidades carentes e frequentemente fazem parte de sua dieta, facilitando a adesão ao tratamento. Decocções das folhas dessas plantas são frequentemente utilizadas, pois costumam ser mais eficazes do que preparações feitas com outras partes da planta [6].

Muitas espécies vegetais utilizadas na medicina são caracterizadas pelo seu sabor e odor aromáticos, que ocorrem devido à presença de compostos voláteis originários do seu metabolismo secundário, tornando o estudo dos óleos essenciais (OEs) uma das melhores estratégias de pesquisa em fitoterapia [7]. Essas plantas, também chamadas de especiarias, são um dos agentes antimicrobianos naturais mais utilizados em alimentos e têm sido tradicionalmente utilizadas há milhares de anos por muitas culturas para controlar complicações comuns de saúde [8], como infecções fúngicas e virais, processos inflamatórios e alérgicos. Muitas dessas propriedades são atribuídas à presença de compostos fenólicos [9].

Esses fenóis podem atuar na membrana celular de microrganismos, levando à ruptura da morfologia e vazamento de conteúdo intracelular [10]. Além disso, foi relatado que compostos fenólicos de plantas causam a morte de células microbianas ao gerar superóxido, produzido pela redução do oxigênio molecular por um único elétron, danificando o DNA

microbiano [11]. Dentro dessa classe de compostos que atuam por essa via estão os fenilpropanoides não fenólicos, que também podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana relatada para óleos essenciais, como miristicina e elemicina.

Em estudo realizado por Zhou *et al.* [12], o EO de *Dalbergia pinnata* apresentou predominância de elemicina (91,06%) em sua composição e apresentou notável atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *C. albicans* na concentração de 12,5 $\mu l\, mL^{-1}$, com zona de inibição de 10,52 ± 0,42 mm. Segundo os autores, a elemicina é matéria-prima para a síntese de mescalina, um importante alcaloide que possui efeitos antimicrobianos, antialérgicos, antiproliferativos e antitumorais. Em estudo realizado por Alizadeh; Abdollahzadeh [13], *Pycnocycla O óleo essencial de bashagardiana* exibiu miristicina (39,12%) como o composto principal e inibiu fortemente o crescimento de *C. albicans*, com sua atividade antifúngica atribuída ao seu constituinte principal.

Espécies da família Piperaceae são amplamente exploradas por suas propriedades antimicrobianas [14]. Em um estudo realizado por Luca *et al.* [15], o extrato metanólico de *Piper nigrum, Piper longum* e *Piper retrofractum* apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. parapsilosis.* Em Noriega *et al.* [16], foi relatado que o óleo essencial de *Piper barbatum* apresentou forte atividade inibitória contra *C. albicans* (132 μg /mL) e *C. tropicalis* (264 μg/mL). Compostos extraídos de *Piper pesarenasum* foram capazes de inibir 50% (IC_{50}) do crescimento fúngico de *Moniliophthora roreri, Fusarium solani* e *Phytophthora* sp. em concentrações variáveis de 3,0 ± 0,8 a 496 ± 2,2 μM [17]. *Piper betle* inibiu o crescimento de patógenos orais *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis* [18] e *C. albicans* [14,19].

Além disso, algumas dessas plantas podem ser utilizadas em terapia combinada com antifúngicos, como o fluconazol, para modificar seus efeitos. Em pesquisa realizada por Carneiro *et al.* [20], o óleo essencial *de Piper diospyrifolium* modificou a ação antifúngica do fluconazol, melhorando suas propriedades contra *C. tropicalis padrão e resistente.* Leal *et al.* [21] também obtiveram bons resultados em terapia combinada contra *C. tropicalis* utilizando óleo essencial *de Piper rivinoides* associado ao fluconazol. Ballesteros *et al.* [7] verificaram a ação sinérgica de *Piper carpunya* com fluconazol contra *C. albicans* e *C. glabrata* . A associação do óleo essencial *de Piper regnellii* em concentrações subinibitórias com fluconazol foi capaz de reduzir a quantidade do fármaco necessária para inibir o crescimento de *C. tropicalis* URM 4262 de 135,45 μg/mL para 36,14 μg/mL [22].

Vários mecanismos adaptativos subjacentes à resistência e tolerância a medicamentos antifúngicos foram identificados, como alterações ou superexpressão de alvos de medicamentos, aumento da expressão de transportadores multidrogas e ativação de vias de resposta ao estresse celular. Essa ação combinada com medicamentos é crucial porque a

resistência fúngica aos antifúngicos se tornou uma das maiores ameaças à humanidade. A resistência, impulsionada pelo uso indiscriminado de produtos comerciais, diminui a eficácia dos medicamentos, aumentando o risco de morbidade e mortalidade e colocando em risco a saúde humana. [23; 24]. A literatura mostra que diferentes espécies não *albicans*, como *C. glabrata* e *Aspergillus fumigatus*, já apresentam esse perfil contra azóis e equinocandinas [19]. Esses mecanismos incluem substituições de aminoácidos no alvo do fármaco, Erg11, o que leva a uma menor afinidade de ligação do fármaco pela enzima lanosterol desmetilase para azóis e mutantes nos genes FKS1, diminuindo o IC_{50} da enzima glucano sintase em várias ordens de magnitude, aumentando os valores de MIC e resultando em resistência cruzada a várias equinocandinas [24]. Assim, o objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar o óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth, bem como analisar a bioatividade deste óleo essencial e dos isolados de miristicina e elemicina contra patógenos fúngicos oportunistas para obter a atividade intrínseca dos produtos naturais e combinados com fluconazol.

2 MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação de material vegetal

2.1.1 Coleta

A coleta de material vegetal, partes aéreas de *Piper rivinoides* Kunth, ocorreu na Reserva Biológica Bom Jesus em Guaraqueçaba, estado do Paraná (S 25° 13.644' W 48° 34.985') em 28 de novembro de 2019. Exsicatas desta espécie estão depositadas no Museu Botânico de Curitiba sob o número 396414.

2.1.2 Preparação

As folhas de *P. rivinoides* foram secas à temperatura ambiente e à sombra. Após adquirirem massa constante, foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura antes da hidrodestilação.

2.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi extraído por hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger modificado [25], segundo procedimento adotado pelo grupo de pesquisa SINETEC – Síntese e Tecnologia da FURB [26,27]. A relação entre massa de material vegetal seco e volume de água destilada foi de 1:10 (m:v) e o tempo de extração foi de 4 horas.

O EO foi isolado por extração líquido-líquido com três porções de 10 mL (3 x 10 mL) do solvente $CH_2 Cl_2$ destilado. Sulfato de magnésio anidro foi adicionado à mistura óleo-solvente para eliminar vestígios de água. A mistura foi submetida à filtração simples e concentrada em evaporador rotativo. A amostra foi então mantida sob vácuo em dessecador por mais 60 minutos para eliminar possíveis vestígios de $CH_2 Cl_2$. O óleo purificado foi transferido para um frasco com tampa de rosca e em atmosfera de nitrogênio e armazenado em freezer a uma temperatura de -15 °C até o uso.

2.3 Caracterização química de OE e compostos isolados

A metodologia utilizada nas análises de Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chama (GC-FID) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS) é descrita em Monteiro [26] e Rudolf [27] por serem um protocolo interno do SINETEC como uma adaptação do descrito em Adams [28].

2.3.1 Análise CG-DIC

O OE foi diluído em $CH_2 Cl_2$ até a concentração de 1% (p/p) e injetado (0,2 uL) no modo split 1:20 em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID) da Perkin Elmer, modelo Clarus 680. O tempo de corrida da amostra foi de 62 min com temperatura do injetor de 250 °C e temperatura do detector de 280 °C. A coluna capilar utilizada foi composta de sílica fundida, tipo Supelco (DB5/5% difenil e 95% dimetilpolissiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e fase estacionária de 0,25 μm (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Temperatura inicial da coluna: 60 ºC, taxa de aquecimento de 3 ºC min-1 a 240 ºC (permanecendo nesta temperatura por 2 minutos). Hélio de grau analítico (He) foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min-1. Da mesma forma, a série homóloga de hidrocarbonetos (carbonos C8 a C19) foi previamente diluída em $CH_2 Cl_2$ na proporção de 10 % (p/p) e injetada em um volume de 0,1 μ L.

O índice aritmético (IA) de cada constituinte presente no óleo foi calculado pela aplicação da equação 1, considerando como padrões os tempos de retenção dos alcanos injetados [28]. Os constituintes cujo tempo de retenção (TR) foi maior que C19 não tiveram seu IA experimental determinado.

$$\mathrm{AI} = 100 \,.\, Z + 100 \,.\left(\frac{RT(X) - RT(Z)}{RT(Z+1) - RT(Z)}\right) \quad \textbf{\textit{Equação 1}}$$

Onde:

Z Alcano com menor tempo de retenção

RT (Z+1) Tempo de retenção do alcano posterior

RT (Z) Tempo de retenção do alcano anterior

RT (X) Tempo de retenção do composto

A análise quantitativa de cada componente do óleo foi expressa em porcentagem através da área relativa dos picos cromatográficos.

2.3.2 Análise CG-EM

Para esta técnica, a amostra de OE foi preparada de maneira semelhante à descrita para GC-FID, com 0,1 μL da amostra sendo injetada automaticamente em um modo de divisão de 1:20.

O CG utilizado nas análises foi um modelo Perkin-Elmer Clarus 680 acoplado a um espectrômetro de massas (MS) quadrupolo Perkin-Elmer Clarus 600T. O detector operou em modo de impacto de elétrons a 70 eV, o tempo de execução selecionado foi de 62 min, e o gás de arraste utilizado foi He de grau analítico com vazão de 1,02 mL min^{-1}. A temperatura do injetor foi de 220 ºC; a temperatura da fonte foi de 250 ºC; a linha de transferência foi de 240 ºC; e a temperatura inicial da coluna foi de 60 ºC, aquecida a 246 ºC a uma vazão de 3 ºC min^{-1}. A coluna capilar utilizada foi uma DB5 Perkin Elmer (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

A caracterização dos constituintes, o IA experimental e os espectros gerados foram comparados com a biblioteca NIST versão 2008 e a biblioteca Adams [28] para determinar a composição do óleo essencial de *P. rivinoides.*

2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear ^{1}H e ^{13}C

A técnica de RMN foi empregada para estimar a pureza da fração obtida por cromatografia em coluna de fase normal e para confirmar a estrutura dos constituintes isolados do óleo essencial. As análises foram conduzidas usando um espectrômetro Bruker Ultrashield ™ 300, operando a 300 MHz para 1 ^ {1}1H e 75 MHz para 13^{13}13C. Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) foi usado como solvente para a fração e os compostos isolados. Os dados espectroscópicos obtidos foram comparados com aqueles relatados na literatura.

2.4 Fracionamento do óleo essencial e isolamento dos constituintes

O isolamento dos compostos majoritários foi realizado por cromatografia em coluna na fase normal (coluna de 3,5 cm de diâmetro) sob pressão (modo flash) utilizando nitrogênio. A

fase estacionária utilizada foi sílica gel 60/270-400 mesh (100 g), e a mistura binária hexanos: acetato de etila (95:5) foi utilizada como fase móvel, utilizando 4,0 g de EO. Este eluente também foi utilizado para preparar a coluna. A fase estacionária tinha uma altura de 32 cm. Alíquotas de 3-4 mL foram coletadas. Após a remoção dos arilpropanoides, a polaridade do eluente foi aumentada para 50:50 (hexanos: acetato de etila).

O material fracionado foi avaliado por cromatografia em camada delgada. Para tanto, pequenas alíquotas foram aplicadas em placas revestidas com sílica gel GF254, examinadas sob luz ultravioleta (265 nm) e reveladas em vanilina sulfúrica. As frações contendo os arilpropanoides foram intensamente absorvidas no UV.

Finalmente, as frações foram eluídas por TLC usando hexano-acetato de etila (95:5). As placas foram desenvolvidas de acordo com a metodologia descrita acima. Algumas frações também foram examinadas por CG-DIC e comparadas ao cromatograma do óleo essencial fracionado.

Frações semelhantes foram combinadas e concentradas. Aquelas contendo arilpropanoides foram submetidas independentemente a uma nova cromatografia em coluna para aumentar o grau de pureza desses constituintes.

A fração e os compostos isolados foram então caracterizados por CG-DIC e CG-EM. Os constituintes isolados foram posteriormente caracterizados por ^{1}H e ^{13}C NMR.

2.5 Testes antifúngicos

2.5.1 Preparação de soluções e diluições

O fluconazol foi adquirido da VIRUPAKSHA ORGANIC LIMITED (Gaddapotharam Village – ÍNDIA); O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Merck, Darmstadt, Alemanha. Amostras de 0,02 g de óleo essencial de *P. rivinoides* (OEPR), produtos isolados e extraídos (miristicina e elemicina), foram pesadas e diluídas em 1 mL (solução estoque de 20.000 µg /mL) de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para formar uma solução estoque. O fluconazol foi diluído em 5% de DMSO. As soluções iniciais dos produtos e do fluconazol foram diluídas em um meio de cultura para preparar uma concentração de matriz (CM) a 2.048 µg / mL.

2.5.2 Microorganismos

As cepas padrões *C. albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231), *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii)* INCQS 40095 (ATCC 34135) foram obtidas

do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Oswaldo Cruz - Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

2.5.3 Meio de cultura

Sabouraud Dextrose (SDA) e o Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) foram obtidos da ISOFAR, Brasil. O Caldo Dextrose Peptona de Levedura (YPD) foi obtido da Difco /BD – Becton Dickinson, França, e o Ágar Dextrose de Batata (PDA) da KASVI, Espanha. Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 ºC por 15 minutos.

2.5.4 Preparação dos inóculos

Todas as cepas foram inicialmente armazenadas em SDA a 8 ºC. As cepas foram cultivadas em placas *de Petri* com SDA a 35 ºC por 24 horas. Em seguida, os microrganismos foram inoculados em tubos contendo 4 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl), com turbidez ajustada para 0,5 na escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^{8}$ UFC/mL (29).

2.5.5 Atividade antifúngica do óleo essencial *de P. rivinoides* e seus componentes

Placas de 96 poços de fundo plano foram utilizadas para realizar o método de microdiluição em meio SDB segundo CLSI (M27) [29]. Foi realizado um processo de diluição seriada, e as concentrações de miristicina, elemicina, EOPR e fluconazol variaram de 1024 a 2 µg / mL. Os dois últimos poços das placas foram reservados para controle do crescimento de microrganismos e controle de esterilidade. Também foram realizados controles de diluição dos produtos (utilizando solução salina ao invés de inóculo). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após esse período, foi observado o crescimento de microrganismos, evidenciado pela presença de meio turvo nas placas. Para os testes quantitativos, as placas foram levadas para leitura em espectrofotômetro ELISA (Termoplate ®) com comprimento de onda de 630 nm [30]. Os resultados forneceram a atividade intrínseca dos produtos testados e a concentração inibitória mínima (CIM), além do IC_{50}. Os testes foram realizados em quadruplicata.

2.5.6 Concentração Fungicida Mínima (MFC)

Para determinar se a combinação foi capaz de afetar a viabilidade das células *de Candida,* foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de 5 µL de cada poço da placa de teste de atividade intrínseca (exceto controle de esterilidade e diluição do produto) foi transferida para placas de Petri contendo meio SDA para subcultivo, distribuídas de acordo com o cartão guia no fundo da placa. Após 24 horas de incubação, as placas foram inspecionadas quanto à formação de colônias *de Candida. O crescimento das colônias indica que* as células são viáveis, e o efeito dos produtos testados foi fungistático e a ausência de crescimento destes indica que houve efeito fungicida [31].

2.5.7 Atividade combinada com fluconazol

Para este teste, os produtos miristicina, elemicina e OEPR foram utilizados em concentração subinibitória (MC/8 que é 256 µg/mL, onde MC é a concentração matricial dos produtos avaliados, sendo esta concentração fixa em todos os poços) de acordo com a metodologia utilizada por Coutinho *et al.* [32], com pequenas modificações, exceto para elemicina contra *P. kudriavzevii*, onde foi utilizada sua concentração subinibitória sendo CFM/8 (16 µg/mL). O fluconazol foi utilizado em concentrações variando de 1024 a 2 µg / mL. Os dois últimos poços das placas foram reservados para controle do crescimento de microrganismos e controle de esterilidade. Também foram realizados controles de diluição do produto em combinação com fluconazol. Todo o teste foi realizado em quadruplicata, e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em aparelho de espectrofotometria ELISA (Termoplate ®) com comprimento de onda de 630 nm [30]. Os resultados foram utilizados para produzir os gráficos da curva de crescimento e $IC_{50.}$

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização do óleo essencial dee *Piper rivinoides* Kunth

O óleo essencial das folhas secas de *P. rivinoides* apresentou aproximadamente 62 constituintes, totalizando 99,46 ± 0,05 da amostra. Dentre estes, quatro apareceram em concentrações superiores a 5%, a saber: o hidrocarboneto monoterpeno δ-3-careno, os arilpropanoides miristicina e elemicina, e o hidrocarboneto sesquiterpeno α- muuroleno. Estes quatro constituintes contribuíram com 76,5 ± 0,05% da amostra, onde a elemicina foi majoritária, com 34,62 ± 0,05%, seguida pela miristicina, com 22,33 ± 0,06% (Tabela 1). A

Tabela 1 também mostra a caracterização das frações purificadas dos arilpropanoides miristicina (M) e elemicina (E).

Tabela 1- Composição química do óleo essencial das folhas secas de *Piper rivinoides* Kunth e principais constituintes do óleo essencial obtidos por fracionamento em coluna cromatográfica.

Numeração	Constituintes	IA_{Exp}	IA_{Lit}	EOPR [%]	M [%]	E [%]
1	2 *E* -hexenal	852	846	*tr*	-	-
2	3 *Z* -hexenol	855	850	*tr*	-	-
3	α- tujeno	925	924	*tr*	-	-
4	α- pineno	933	932	0,47±0,01	-	-
5	canfeno	948	946	0,10±0,01	-	-
6	sabinena	973	969	*tr*		
7	β- pineno	977	974	0,26±0,00	-	-
8	mirceno	989	988	0,42±0,01	-	-
9	α- felandreno	1005	1002	1,94±0,01	-	-
10	**δ-3- careno**	**1011**	**1008**	**11,82±0,07**	**-**	**-**
11	α- terpineno	1016	1014	0,52±0,01	-	-
12	*p* - cimeno	1024	1020	0,49±0,01	-	-
13	limoneno	1028	1024	1,64±0,01	-	-
14	*Z* -β- ocimeno	1035	1032	*tr*	-	-
15	*E* -β- ocimeno	1046	1044	*tr*	-	-
16	γ- terpineno	1058	1054	1,62±0,01	-	-
17	*p* -menta-2,4(8)- dieno	1086	1085	*tr*	-	-
18	terpinoleno	1089	1086	1,65±0,01	-	-
19	terpinen-4- ol	1182	1174	*tr*	-	-
20	*p* -cimen-8-ol	1191	1179	*tr*	-	-
21	tridecano	1297	1300	0,18±0,00	-	-
22	δ- elemeno	1338	1335	*tr*	-	-
23	ciclosativeno	1367	1369	0,62±0,00	-	-
24	α- copaeno	1377	1374	0,35±0,00	-	-
25	β- bourboneno	1387	1387	*tr*	-	-
26	β- elemeno	1392	1389	0,19±0,00	-	-
27	α- gurjuneno	1411	1409	*tr*	-	-
28	β- cariofileno	1422	1417	3,22±0,00	-	-
29	β- copaeno	1431	1430	*tr*	-	-
30	β- gurjuneno	1432	1431	0,10±0,00	-	-
31	aromadendreno	1441	1439	*tr*	-	-
32	6,9- guaiadieno	1445	1442	0,87±0,00	-	-
33	*trans* -muorola-3,5-dieno	1453	1451	0,10±0,00	-	-
34	α- cariofileno	1456	1452	0,40±0,01	-	-
35	alo-aromadendreno	1461	1458	0,69±0,00	-	-

36	γ- gurjuneno	1476	1473	0,14±0,00	-	-
37	γ- muuroleno	1479	1478	0,74±0,00	-	-
38	germacreno D	1484	1484	0,87±0,01	-	-
39	b- selineno	1489	1489	0,74±0,00	-	-
40	biciclogermacreno	1497	1500	0,75±0,01	-	-
41	pentadecano	1500	1500	1,39±0,01		
42	**α- muuroleno**	**1504**	**1500**	**7,73±0,01**	**-**	**-**
43	*E* , *E* -α- farneseno	1509	1505	0,15±0,00	-	-
44	γ- cadineno	1517	1513	*tr*	-	-
45	**miristicina**	**1534**	**1518**	**22,33±0,06**	**99,85±0,07**	**-**
46	δ- cadineno	1523	1522	*tr*	-	-
47	kessanol	1526	1529	1,06±0,04	-	-
48	elemento	1555	1548	*tr*	-	-
49	germacreno B	1561	1559	*tr*	-	-
50	**elemicina**	**1569**	**1555**	**34,62±0,05**	**-**	**94,75±0,06**
51	espatulenol	1585	1577	0,13±0,00	-	0,68 ±0,00
52	óxido de cariofileno	1587	1582	0,14±0,00	-	-
53	globulol	1592	1590	*tr*	-	-
54	tetradecanal	1612	1611	*tr*	-	-
55	dilapiol	1632	1620	0,15±0,01	0,12±0,01	0,15 ±0,00
56	*epi* -α- cadinol	1647	1638	*tr*	-	0,22 ±0,00
57	α- muurolol	1654	1644	0,27±0,00	-	1,72 ±0,02
58	α- cadenol	1658	1652	0,15±0,00	-	0,26 ±0,00
59	4,6-dimetoxi-5-vinil-1,3- benzodioxol	1662	1653	0,21±0,00	-	-
60	apiol	1689	1677	0,24±0,00	-	-
61	heptadecano	1696	1700	*tr*	-	-
62	amorfa-4,9- dien-2 -ol	1707	1700	*tr*	-	-
	Total			**99,46**	**99,97**	**97,78**
	PA-AP			57,55		
	HM			20,93		
	MO			*tr*		
	HS			17,66		
	SO			1,75		
	Outros			1,57		

IA $_{Exp}$: Índice de retenção aritmética experimental; IA $_{Lit}$: Índice de retenção aritmética da literatura; M: miristicina; E: elemicina; tr: traço (concentração menor que 0,10% ou identificado apenas na análise GC-MS); AP: arilpropanoide; MH: hidrocarboneto monoterpênico; OM: monoterpeno oxigenado; SH: hidrocarboneto sesquiterpênico; OS: sesquiterpeno oxigenado.

3.2 Identificação de compostos isolados

Os compostos miristicina e elemicina (Figura 1) foram isolados como óleos incolores, e seus valores espectrais foram determinados usando dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C comparados com a literatura (Tabelas 1 e 2). No espectro de RMN de ^{13}C da elemicina, dois sinais foram observados em δ 56,0 e 60,8, correspondendo aos carbonos dos grupos metoxila, com o sinal em δ 60,8 sendo atribuído ao metoxila estericamente impedido em C-9. O espectro também mostrou quatro sinais de carbonos aromáticos, um sinal correspondendo aos carbonos metino C-5 e C-5' em δ 105,6, e três sinais correspondentes aos carbonos tetrasubstituídos em δ 153,4 (C-6 e C-6'), 136,3 (C-7) e 135,8 (C-4). A presença do grupo alila ligado ao carbono C-4 do anel aromático foi confirmada pelos sinais de carbonos metilenos em δ 40,5 (C-3) e 116,0 (C-1) e de um carbono metino em 137,2 (C-2). No espectro de RMN $^{de\ 1}$H, dois singletos referentes a grupos metoxila foram observados em δ 3,86 (C-6 e C-6') e δ 3,84 (C-7), juntamente com um singleto em δ 6,42, sendo hidrogênios ligados a carbonos nas posições C5 e C5', sugerindo a presença de um anel benzênico tetrasubstituído 4,6,6',7. Também houve sinais em δ 3,35 (C-3, J3 = 6,78 Hz) como um dupleto, um tripleto dupleto-dupleto em δ 5,97 (C-2, J1 = 7 Hz; J2 = 10 Hz; J3 = 16,8 Hz) e um multipleto em δ 5,15 (C-1, geminal), indicando a presença de um radical alílico ligado ao anel aromático em C-4. Assim, a estrutura da elemicina foi definida como a do 5-alil-1,2,3-trimetoxibenzeno.

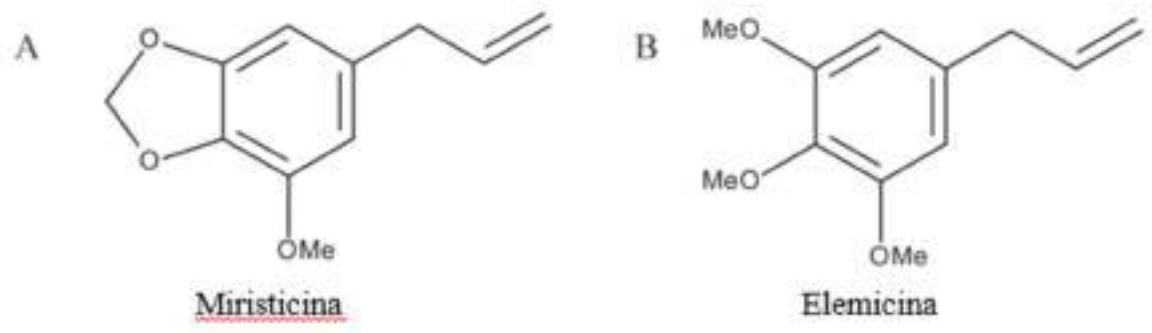


Figura 1: Fórmula estrutural da miristicina (A) e elemicina (B)

Tabela 2 - Comparação dos deslocamentos químicos obtidos em RMN de ^{1}H e ^{13}C experimentalmente para elemicina com dados de Mohammad e colaboradores.

Experimental				[33]			
^{1}H	**[δ]^{1}**	**^{13}C**	**[δ]^{2}**	**^{1}H**	**[δ]^{3}**	**^{13}C**	**[δ]^{4}**
4	6,42 - *s*	1	116,0	4	6,40 – *s*	1	115,9
6	6,42 – *s*	2	137,2	6	6,40 – *s*	2	137,3

7	3,35 – *d, J*^{3}= 6,78 Hz	3	40,5	7	3,28 – *d*, *J*= 6 Hz	3	40,5
8	5,97 – *ddt*, *J*^{1}= 7 Hz; *J*^{2}= 10 Hz; *J*^{3}= 16,8 Hz	4	135,8	8	5,90 – *ddt*, *J* = 15, 7; 6 Hz	4	135,7
9	5,15 - m (geminais)	5/5’	105,6	9	5,06 – *dd*; *J* 15; 2 Hz 5,14 – *dd*; *J* 7; 2 Hz	5/5’	105,7
1 OC**H**$_3$	3,86 – *s*	6/6’	153,4	1 OC**H**$_3$	3,70 – *s*	6/6’	153,3
2 OC**H**$_3$	3,84 – *sZ*	7	136,3	2 OC**H**$_3$	3,80 – *s*	7	136,5
3 OC**H**$_3$	3,86 – *s*	8/8’	56,0	3 OC**H**$_3$	3,70 – *s*	8/8’	56,1
		9	60,8			9	60,7

[δ] = deslocamento químico em ppm; s: singleto; d: dupleto; ddt: dupleto-dupleto tripleto; m: multipleto. 1= 300 MHz; 2= 75 MHz; 3= 90 MHz; 4= 62,5 MHz.

No espectro de RMN de ^{13}C da miristicina, o grupo metilenodioxi foi observado em δ 101,4 e o grupo metoxila em δ 56,7. Além desses sinais, sinais em δ 115,9 (C-9) e 137,5 (C-8) originários da porção terminal da cadeia alílica e δ 40,5 (C-7) que tipicamente corresponde a um metileno de uma cadeia alílica foram observados. Os sinais em δ 133,5 (C-1), 107,8 (C-2), 143,7 (C-3), 134,8 (C-4), 148,9 (C-5) e 102,7 (C-6) foram atribuídos aos carbonos aromáticos de um anel trioxigenado. No espectro de RMN de ^{1}H da miristicina, foram observados sinais em δ 3,90 e δ 5,94 correspondendo a um grupo metoxila e um grupo metilenodioxi, respectivamente. Também foram observados dupletos em δ 6,37 (C-2, J4 1,45 Hz) e δ 6,41 (C-6, J4 1,45 Hz), sendo estes hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 6 na cadeia do anel aromático, e um dupleto em δ 3,31 (C-7, J3 6,74 Hz), correspondendo ao sinal do hidrogênio alílico. Além disso, houve multipletos em δ 5,10 (C-9) e δ 5,94 (C-8) indicando a presença do radical alila ligado ao carbono 1 da cadeia do anel aromático. Assim, a estrutura 2 foi denominada 1-alil-4,5-metilenodioxi-3-metoxibenzeno.

Tabela 3 - Comparação dos deslocamentos químicos obtidos em RMN de ^{1}H e ^{13}C experimentalmente para miristicina com dados de Passreiter e colaboradores.

Experimental				[34]			
^{1}H	**[δ]^{1}**	**^{13}C**	**[δ]^{2}**	**^{1}H**	**[δ]^{3}**	**^{13}C**	**[δ]^{4}**
2	6,37 - *d*, *J*^{4} 1,45 Hz	1	133,5	2	6,35 – s	1	133,4
6	6,41 - 2 *d*, *J*^{4} 1,45 Hz	2	107,8	6	6,38 - *d*, *J* 1,6 Hz	2	107,6
7	3,31 – *d*, *J*^{3} 6,74 Hz	3	143,7	7	3,29 - *d*, *J* 6,9 Hz	3	143,5
8	5,94 – *m*	4	134,8	8	5,92 – *m*	4	134,6
9	5,10 - 3 *m*	5	148,9	9	5,08 – *m*	5	148,8

$O_2C\mathbf{H}_2$	5,94 – *s*	6	102,7	$O_2C\mathbf{H}_2$	5,93 – *s*	6	102,7
$OC\mathbf{H}_3$	3,90 – *s*	7	40,5	$OC\mathbf{H}_3$	3,89 – *s*	7	40,2
		8	137,5			8	137,3
		9	115,9			9	115,8
		$O_2\mathbf{C}H_2$	101,4			$O_2\mathbf{C}H_2$	101,2
		$O\mathbf{C}H_3$	56,7			$O\mathbf{C}H_3$	56,5

[δ] = deslocamento químico em ppm; s: singleto; d: dupleto; m: multipleto . 1= 300 MHz; 2= 75 MHz; 3= 500 MHz; 4=125 MHz.

3.3 Testes antifúngicos

3.3.1 Testes de microdiluição

EOPR foi capaz de inibir 99,73% (1024 µg/mL), 96,88% (512 µg/mL) e 99,12% (512 µg/mL) contra *C. albicans, C. tropicalis* e *P. kudriavzevii* respectivamente. Comparado ao controle com fluconazol, o resultado contra *C. albicans* apresentou maior inibição na concentração de 1024 µg /mL, que para o fármaco foi de 95,84%. Para *C. tropicalis,* a inibição foi de 99,33% na concentração de 512 µg /mL e 98,48% contra *P. kudriavzevii* de 64 µg/mL, atingindo 100% em 256 µg/ mL. Quando combinado com o fármaco, o OEPR inibiu o crescimento de *C. tropicalis* em 100% na concentração de 2 µg / mL. Contra *P. kudriavzevii,* a inibição foi de 98,18% em 32 µg/ mL. Entretanto, contra *C. albicans,* a inibição máxima não foi significativa, atingindo 99,6% na concentração de 1024 µg / mL. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

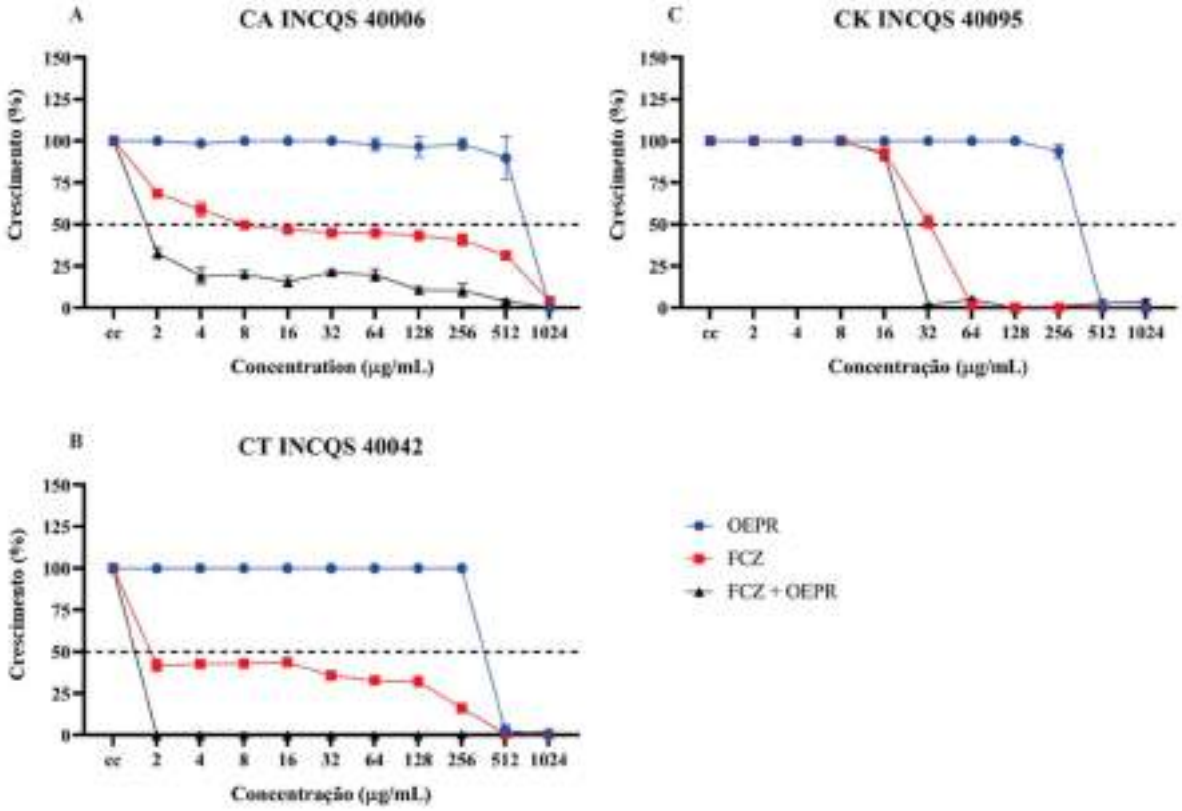


Figura 2. Atividade antifúngica de EOPR sozinho e combinado com fluconazol contra *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e *P. kudriavzevii* (C). CA INCQS 40006: *Candida albicans* ATCC 10231; CT INCQS 40042: *Candida tropicalis* ATCC 13803; PK INCQS 40095: *Pichia kudriavzevii* ATCC 34135; OEPR: óleo essencial *de Piper rivinoides*; FCZ: fluconazol; FCZ + OEPR: fluconazol combinado com OEPR; CC: controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

A elemicina foi capaz de inibir 100% do crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* a partir da concentração de 512 µg / mL. Contra *P. kudriavzevii,* a inibição foi de 100% na concentração de 128 µg / mL. Comparado ao controle com fluconazol, a elemicina foi melhor que o fármaco contra todas as cepas testadas. O fluconazol inibiu 100% do crescimento apenas contra *P. kudriavzevii* na concentração de 256 µg/ mL. Quando combinados, a elemicina foi capaz de modificar a ação do fármaco para melhorar sua atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. tropicalis,* inibindo em 95,29% e 94,58% respectivamente a partir de 4 µg / mL. Entretanto, contra *P. kudriavzevii,* a elemicina aumentou a concentração necessária para inibir o crescimento desta cepa de 64 µg /mL (98,48%) para 512 µg/mL (98,78%) sem atingir 100% de inibição em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados podem ser vistos na Figura 3.

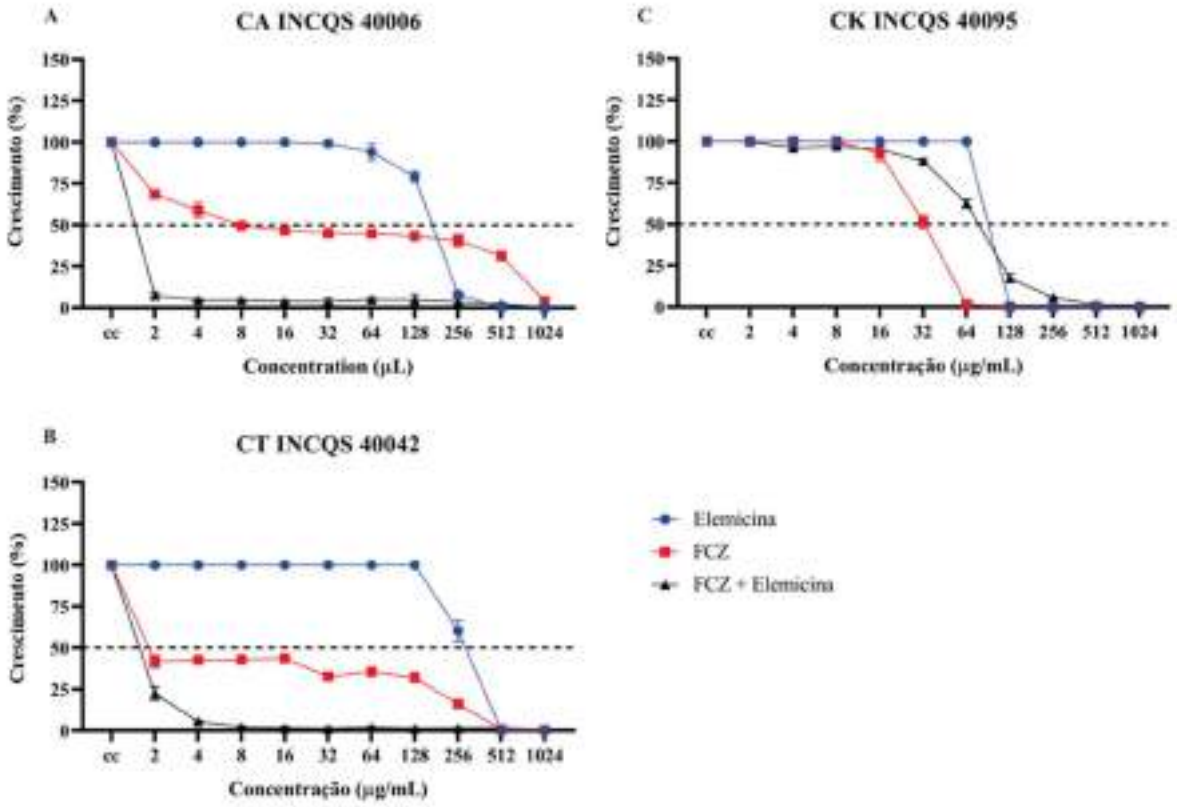


Figura 3. Atividade antifúngica da elemicina sozinha e combinada com fluconazol contra *C. albicans* (A *), C. tropicalis* (B) e *P. kudriavzevii* (C). CA INCQS 40006: *Candida albicans* ATCC 10231; CT INCQS 40042: *Candida tropicalis* ATCC 13803; PK INCQS 40095: *Pichia kudriavzevii* ATCC 34135; FCZ: Fluconazol; FCZ + Elemicina: Fluconazol combinado com elemicina; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

A miristicina inibiu 98,69 % do crescimento fúngico na concentração de 1024 µg/mL contra *C. albicans.* Contra *C. tropicalis,* a inibição foi de 96,1%, enquanto para *P. kudriavzevii* foi de 83,94% na mesma concentração. Quando combinada, a miristicina em concentração subinibitória foi capaz de modificar a ação do fluconazol contra todas as cepas testadas, obtendo atividade inibitória semelhante à do fármaco sozinho em concentrações menores. A combinação de miristicina com fluconazol inibiu 97,82% do crescimento de *C. albicans* na concentração de 2 µg / mL. Na mesma concentração, a inibição foi de 95,12% contra *C. tropicalis.* Para *P. kudriavzevii,* a inibição foi de 98,97% apenas na concentração de 64 µg/mL, semelhante à ação do fluconazol sozinho. Os resultados podem ser vistos na Figura 4.

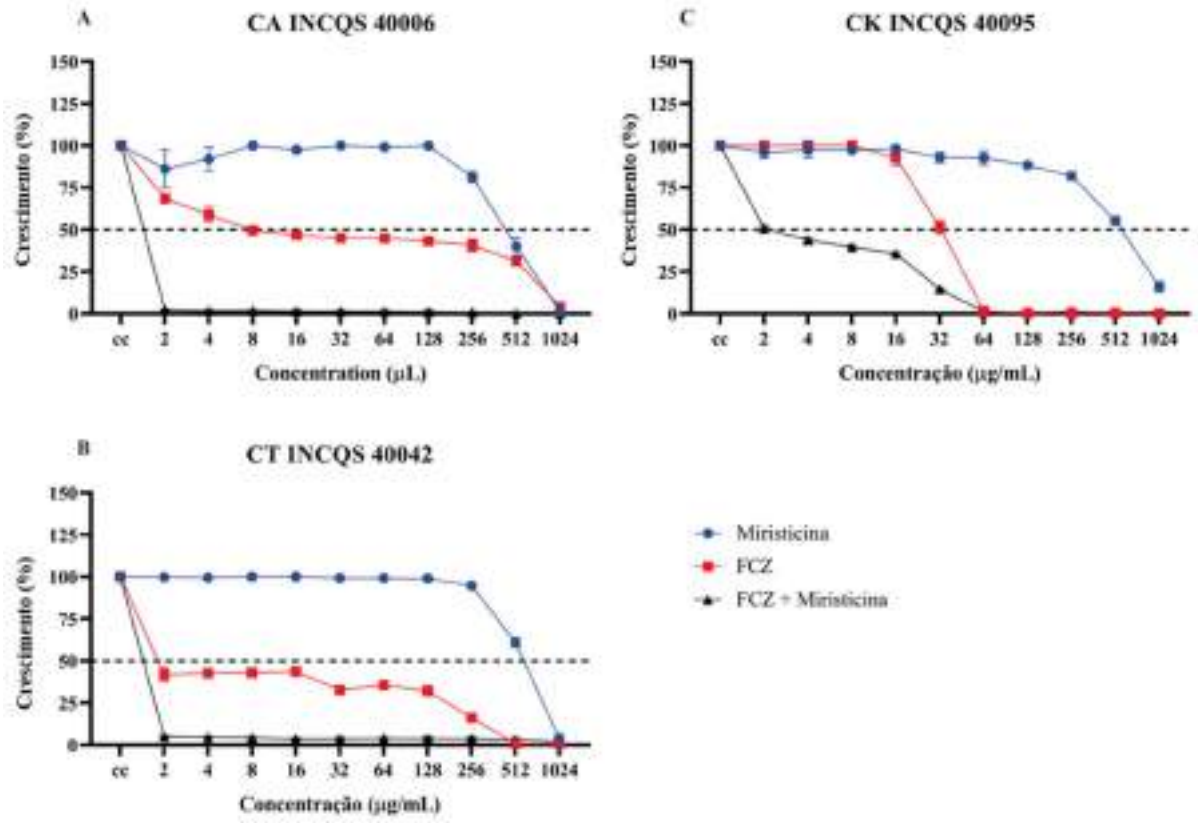


Figura 4. Atividade antifúngica da miristicina sozinha e combinada com fluconazol contra *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e *P. kudriavzevii* (C). CA INCQS 40006: *Candida albicans* ATCC 10231; CT INCQS 40042: *Candida tropicalis* ATCC 13803; PK INCQS 40095: *Pichia kudriavzevii* ATCC 34135; FCZ: Fluconazol; FCZ + Miristicina: Fluconazol combinado com miristicina; GC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

Em relação ao IC_{50} dos produtos, o fluconazol foi melhor que o EOPR e os compostos isolados contra todas as cepas testadas. Entretanto, no teste combinado, EOPR, miristicina e elemicina modificaram a ação do fármaco. Contra *C. albicans,* o EOPR aumentou a eficácia do fluconazol, reduzindo seu IC_{50} de 13,0 µg /mL para 0,17 µg/ mL. Contra *C. tropicalis,* essa redução foi de 2,43 µg /mL para 0,007 µg/mL, e para *P. kudriavzevii* foi de 32,17 µg/mL para 20,78 µg/ mL. Em combinação com miristicina, o produto melhorou a ação do fármaco, reduzindo o IC_{50} de *C. albicans* de 13 µg /mL para 0,013 µg/mL, *C. tropicalis* de 2,43 µg/mL para 0,014 µg/mL e *P. kudriavzevii* de 32,17 µg/mL para 3,024 µg/ mL. Usando elemicina, a redução do $IC_{50\ contra}$ *C. albicans* foi de 13 µg /mL para 0,019 µg/mL e *C. tropicalis* de 2,43 µg/mL para 1,154 µg/ mL. Entretanto, contra *P. kudriavzevii,* a combinação de elemicina com fluconazol antagonizou a ação do antifúngico, aumentando seu IC_{50} de 32,17 µg/mL para 74,18 µg/ mL. Os resultados do IC_{50} podem ser vistos na Tabela 4 para os produtos isolados e na Tabela 5 para os produtos combinados.

Tabela 4 - Concentração capaz de inibir 50% (µg /mL) do crescimento fúngico dos produtos testados.

Microorganismos	*IC_{50} de microrganismos para compostos avaliados isoladamente*			
	EOPR	FCZ	Miristicina	Elemicina
CA INCQS 40006	591,3	13.0	429,5	163,6
CT INCQS 40042	469,3	2.430	543,9	259,2
PK INCQS 40095	329,7	32.17	434,3	90,50

CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis*; PK: *Pichia kudriavzevii*; EOPR: óleo essencial *de Piper rivinoides*; FCZ: Fluconazol; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Tabela 5 - Concentração capaz de inibir 50% (µg /mL) do crescimento fúngico dos produtos testados em associação com fluconazol.

Microorganismos	*IC_{50} de microrganismos para compostos avaliados em combinação com fluconazol*			
	EOPR	FCZ	Miristicina	Elemicina
CA INCQS 40006	0,1704	13.0	0,01371	0,01939
CT INCQS 40042	0,007384	2.430	0,01439	1.154
PK INCQS 40095	20,78	32.17	3.024	74,18

CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis*; PK: *Pichia kudriavzevii*; EOPR: óleo essencial *de Piper rivinoides*; FCZ: Fluconazol; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

3.3.2 Concentração Fungicida Mínima (MFC)

Para identificar o tipo de ação antifúngica exercida pelos compostos, a MFC foi conduzida utilizando uma segunda placa de 96 poços de atividade intrínseca, realizada nas mesmas condições, e esta foi uma das réplicas. Após 24 horas, foi possível observar a presença de colônias fúngicas bem desenvolvidas para EOPR e miristicina em todas as concentrações testadas. Isso mostra que, mesmo nas situações em que houve inibição visível em 512 e 1024 µg /mL, as cepas retomaram o crescimento quando removidas da presença do composto e subcultivadas em meio de cultura SDA em placa de *Petri*. Para elemicina contra *C. albicans* e *C. tropicalis,* foi possível observar o crescimento de colônias fúngicas na placa mesmo havendo 100% de inibição, conforme observado pela leitura de ELISA, indicando que a atividade antifúngica foi fungistática para essas cepas e que, apesar do crescimento fúngico ter sido suspenso pela ação da elemicina, as células contidas nos poços não foram inviabilizadas, permanecendo aptas a crescer na ausência do composto. Entretanto, contra *P. kudriavzevii*, os resultados de MFC foram semelhantes aos observados nas placas ao saírem da estufa, e a leitura de ELISA não demonstrou crescimento em concentrações acima de 128 µg/mL, indicando ação fungicida.

4. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais parecem apresentar boa atividade antifúngica, com os prováveis mecanismos de ação sendo ligados à permeabilidade da membrana celular fúngica [35]. Esses compostos podem induzir instabilidade celular ao causar danos à membrana devido às suas propriedades hidrofóbicas, que permitem que eles se particionem na membrana celular de microrganismos e mitocôndrias, levando à sua ruptura estrutural e vazamento de conteúdo intracelular [3,10,36,37].

Tem sido sugerido que essa ação antimicrobiana depende do tipo de compostos fenólicos, da cepa microbiana testada e dos mecanismos de ação envolvidos no processo [38], bem como de cada constituinte presente no óleo essencial, que pode interferir positiva ou negativamente na ação antifúngica [37], o que pode justificar a baixa a moderada atividade antifúngica em nossos estudos e de outros autores, mesmo utilizando plantas ricas em fenilpropanoides. Adotou-se como parâmetro a classificação de Sartoratto *et al.* [39], onde a atividade é considerada forte para valores de CIM entre 0,05 e 0,50 mg/mL, moderada para valores entre 0,6 e 1,50 mg/mL e fraca para concentrações acima de 1,50 mg/ mL.

No presente estudo, os resultados obtidos mostram uma ação inibitória moderada para todos os produtos quando comparados ao fluconazol, com atividade antifúngica nas concentrações de 512 e 1024 µg/ mL. A elemicina apresentou os melhores resultados contra *P. kudriavzevii,* inibindo seu crescimento a partir de 128 µg/ mL. No trabalho de Leal *et al.* [21] utilizando óleo essencial *de P. rivinoides,* não foi possível determinar a CIM do produto testado frente aos padrões *C. albicans* (40006) e *C. tropicalis* (40042), pois mesmo nas maiores concentrações (2048 µg /mL) não foi observada inibição completa. Embora a composição de seu óleo essencial seja semelhante à do presente trabalho, os compostos apresentaram concentrações diferentes, além da ausência completa de miristicina e da elemicina isomericamente diferente.

Em concordância com os presentes resultados, o óleo essencial de *Croton pluriglandulosus,* rico em elemicina (25,77%), apresentou melhores resultados na inibição de *P. kudriavzevii* ATCC 6258 (89,3%) na concentração de 50 µg/mL $^{-1}$, enquanto *C. albicans* ATCC 10231 não foi inibido. A ação antifúngica do óleo contra *P. kudriavzevvi* também alterou a integridade da membrana na concentração de 50 µg/mL $^{-1}$, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) [36]. Quando a elemicina se apresentou mais concentrada, os óleos essenciais foram capazes de inibir outras cepas *de Candida*, como o óleo *de Dalbergia pinnata*, com 91% de elemicina, que inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 12,5 uL /mL [12]. Em um estudo realizado por Guetat *et al.* [40], o óleo de flores de *Devrra*

triradiata, com 100% de elemicina, apresentaram CIM de 12 µg /mL contra *C. albicans* e 7,15 µg/mL contra *P. kudriavzevii*, enquanto o fármaco controle, itraconazol, obteve CIM > 64 µg/mL e 0,64 µg/mL, respectivamente.

Há literatura limitada disponível sobre a atividade antifúngica de óleos essenciais contendo miristicina. Em um estudo realizado com óleo essencial de *Origanum vulgare,* rico em miristicina (15,6%), foi observada inibição do crescimento contra *Botrytis cinerea* com CIM de 31,25 mg/L e CFM de 62,5 mg/L [9]. O óleo essencial de *Myristica fragrans,* com 13,39% de miristicina, apresentou inibição contra *C. parapsilosis* (ATCC 22019) na concentração de 250 mg/L, mas contra *C. albicans* (ATCC 10231), a CIM ocorreu apenas em concentrações muito altas (2000 mg/L), com CFM > 2000 mg/L [41]. Em Setty *et al.* [42], o óleo essencial de *M. fragrans* inibiu o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028) em todas as concentrações testadas, que variaram de 1 a 500 µg/mL. Neste estudo, o óleo essencial de *M. fragrans* apresentou apenas 2,9% de miristicina e elemicina, sendo seu composto majoritário o sabineno (36,6%). Essa diferença na composição do óleo *de M. fragrans* apresentada por diferentes autores revela uma grande plasticidade das plantas em apresentar diferentes substâncias em diferentes concentrações que mudam de acordo com fatores fisiológicos, ambientais, genéticos, variação geográfica, outras partes da planta e época de coleta [43].

Dessa forma, componentes puros apresentam menor chance de alteração devido à sua natureza estável, além de evitar possíveis efeitos sinérgicos ou aditivos dos diferentes compostos presentes nos óleos essenciais [44]. Em estudo realizado por Qahtani *et al.* [45], o autor avaliou a elemicina extraída de *M. fragrans* contra cepas de *Aspergillus flavus, Aspergillus niger*, *C. tropicalis*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichophyton rubrum* . A elemicina obteve inibição significativa contra cepas fúngicas, com CIM de 125 ug/mL para *A. niger, T. rubrum* e *P. chrysogenum.* Também inibe *C. tropicalis* e *A. flavus* com 62,5 ug/ mL.

Das *et al.* [44] demonstraram que a elemicina apresentou eficácia máxima contra *A. flavus, A. niger, Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata, Cladosporium herbarum*, *Mycelia sterilia* e *Fusarium oxysporum*, onde sua CIM encontrada foi de 4,0, 3,0, 3,5, 2,75, 1,5, 2,0, 1,75 µL/mL respectivamente. Park *et al.* [46] obtiveram uma CE_{50} de 87,36 µg /mL usando elemicina contra *F. oxysporum.* Quanto à miristicina isolada, Valente *et al.* [47] avaliaram este composto extraído de *M. fragrans* contra *A. flavus* e *Aspergillus orchraceus,* obtendo inibição do crescimento radial de 45,0 ± 3,2% e 91 ± 2,9%, 68,1 ± 4,1 e 82,9 ± 2,6% respectivamente nas concentrações de 0,1 e 0,3%.

Segundo Das *et al.* [44], a atividade antimicrobiana desempenhada por essas moléculas pode ocorrer devido aos grupos metoxila em diferentes posições dos anéis benzênicos; no entanto, como e onde essa interação ocorre ainda não está claro. O tamanho da cadeia

ramificada parece aumentar a potência da atividade antifúngica dos fenilpropanoides [48] uma vez que quanto mais lipofílica a molécula, maior a capacidade de partição em membranas [49]. A lipofilicidade é um dos fatores essenciais que determinam a atividade biológica dos candidatos a fármacos. Ela determina não apenas o transporte de moléculas através de membranas biológicas, mas também sua capacidade de se ligar a receptores [50]. Assim, a melhor atividade antifúngica da elemicina pode ocorrer devido ao tamanho de sua cadeia de carbono, que é maior que a da miristicina. Considerando a natureza lipofílica desses compostos, é possível hipotetizar que a miristicina e a elemicina interagem com as membranas celulares fúngicas, alterando a fluidez e a permeabilidade, o que pode levar à liberação de componentes intracelulares essenciais para o crescimento e viabilidade das células fúngicas. Essa interação com a membrana também pode causar estresse oxidativo e formação de poros, resultando em possível desestabilização do envelope celular.

Os fenilpropanoides, uma classe de metabólitos secundários produzidos a partir da fenilalanina, são um grupo diverso que pode ser dividido em cinco subgrupos de acordo com sua estrutura: flavonoides, monolignóis, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas (51), e são comumente encontrados em plantas do gênero *Piper* (52). Essa variedade mostra que não apenas a elemicina e a miristicina podem apresentar atividades antimicrobianas, mas várias outras, conforme encontrado na literatura. Em pesquisa realizada com óleo essencial *de P. nigrum,* foi identificado um total de 23,75% de ácido gálico, pertencente à classe dos ácidos fenólicos, sendo capaz de causar danos à membrana de *A. flavus* de forma dose-dependente, confirmado pela emissão de fluorescência de 18,5% na maior concentração testada (9). Em estudo desenvolvido por Sivareddy *et al.* (23), um extrato de *P. betle* foi utilizado contra cepas de *C. albicans* obtidas de pacientes com problemas bucais, obtendo CIM de 125 μg / mL. O autor sugeriu que o hidroxichavicol, um fenilpropanoide presente nas folhas de *P. betle,* é o responsável pela atividade anti *Candid*a.

Em um estudo de Eid e Hawash (53), o safrol, um fenilpropanoide, foi capaz de inibir o crescimento de *Candida* sp. por difusão em disco, com um halo de 17 ± 0,80 mm, enquanto a nistatina na concentração de 100.000 UI não apresentou inibição. O óleo essencial de *Petroselinum crispum,* contendo 49,05% de apiol, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* por difusão em disco com 14 ± 0,57 mm na concentração de 10 μ L (37). O óleo de *Deverra triradiata,* contendo 72,16% de apiol, obteve inibições com ação fungicida contra *Candida* spp em diversas concentrações testadas, variando de 3,4 a 54,4 mg/mL (40).

Embora os produtos testados isoladamente não tenham apresentado atividade inibitória significativa contra a maioria das espécies fúngicas testadas em comparação ao fluconazol, eles foram capazes de modificar positivamente a ação do fármaco, reduzindo sua IC_{50} quando

combinados com concentrações subinibitórias dos produtos contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. É importante destacar que a miristicina, quando combinada com o fluconazol, reduziu a IC_{50} do fármaco necessária para inibir o crescimento de *P. kudriavzevii* - uma espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol - de 32,17 µg/mL para 3,024 µg/ mL. Curiosamente, embora a elemicina isoladamente tenha inibido o crescimento de *P. kudriavzevii,* ela aumentou a IC_{50} do fármaco em 130% quando combinada. Pequenas variações na composição da parede celular entre diferentes espécies de fungos podem ser responsáveis por essa diferença na atividade sinérgica apresentada pelo fluconazol associado à elemicina contra *P. kudriavzevii,* em comparação a *C. albicans* e *C. tropicalis* [54,55]. Esses resultados são importantes porque a terapia combinada pode reduzir a concentração de compostos sintéticos necessários para combater infecções, minimizando os efeitos adversos sem limitar a eficácia terapêutica [32].

No estudo de Carneiro *et al.* [20], a interação do óleo essencial de *P. diospyrifolium* modulou a ação do fluconazol contra *C. tropicalis* 40042 em concentrações variadas de 4 a 512 ug/ mL. Para *C. albicans* 40006, não houve alteração na atividade do fármaco. Para a cepa resistente ao fluconazol (*C. albicans* URM 4127), a terapia combinada foi antagônica, reduzindo a eficácia do fármaco quando utilizado isoladamente. Da mesma forma, Leal *et al.* [21] obtiveram alta atividade moduladora ao combinar o óleo essencial *de P. rivinoides* contra *C. tropicalis* 40042 e 4262. Com o óleo essencial *de Piper carpunya,* a combinação do produto com fluconazol apresentou resultados 4x melhores que o produto isolado para as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* [7].

Cafeato de etila (EC), derivado de *Elephantopus scaber,* mostrou um forte efeito antifúngico sinérgico com fluconazol (FLU) contra *C. albicans* resistente a azol. Em um modelo murino de candidíase orofaríngea (OPC), o tratamento com EC + FLU reduziu a carga fúngica, a invasão de hifas e melhorou a integridade da mucosa da língua. A análise revelou diminuição da infiltração de células inflamatórias e regulação negativa da fosforilação de proteínas na via de sinalização EGFR/JNK/c-JUN, com redução da expressão de mRNA de EGFR e S100A9. Os resultados em células FaDu e testes ELISA confirmaram uma menor concentração de fatores inflamatórios e alta afinidade de ligação de EC ao EGFR (56).

O anetol, um fenilpropanoide, apresentou uma CIM de 200 µg /mL contra *C. albicans.* Quando combinado subletalmente com dodecanol, foi capaz de atuar sinergicamente, modificando sua atividade fungistática para fungicida (57). Tsukuda *et al.* (48) mostram que esse tipo de atividade com o anetol parece estar principalmente associado ao grupo metoxi e ao comprimento da cadeia p-alquil em p- alquilanisóis, enquanto a ligação dupla do grupo propenil não parece influenciar essa atividade, com inibição do efluxo do fármaco. Isso mostra que, embora haja escassez de estudos relacionando fenilpropanoides a fármacos antifúngicos, a

capacidade sinérgica desses compostos parece ser uma característica deles. Considerando esses achados, ao observar o efeito antagônico entre elemicina e fluconazol, é possível que esses compostos compartilhem vias de metabolização, como a do citocromo P450, o que pode levar à competição ou inibição de uma via bioquímica pela outra, alterando as concentrações intracelulares do fluconazol e reduzindo sua eficácia.

Embora atividades antifúngicas tenham sido relatadas para compostos ricos em miristicina e elemicina contra *Candida* spp., alguns resultados obtidos no presente estudo foram conflitantes com a literatura. Essa discrepância pode ser devido a possíveis pequenas diferenças na sensibilidade e precisão tanto dos métodos utilizados para identificar a atividade antifúngica quanto da extração de compostos isolados [3]. Embora a elemicina tenha obtido resultados antagônicos contra *P. kudriavzevii* quando combinada com fluconazol, o produto sozinho ainda foi capaz de inibir o crescimento desse fungo em baixas concentrações, o que é um marco importante, considerando que *P. kudriavzevii* é intrinsecamente resistente ao fluconazol [58], um fármaco que é o principal agente terapêutico para o tratamento da candidíase, caracterizado por ser menos tóxico que outros agentes antifúngicos comerciais [59].

5. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *P. rivinoides* e seus derivados apresentaram resultados moderados quando testados contra *C. albicans* e *C. tropicalis,* enquanto a elemicina foi capaz de inibir o crescimento de *P. kudriavzevii* em baixas concentrações. Entretanto, a combinação com fluconazol melhorou o desempenho do fármaco, mostrando um efeito potencializador do agente antifúngico em concentrações subinibitórias. A literatura revelou que compostos da classe dos fenóis, extraídos de óleos essenciais, atuam desestabilizando a estrutura das membranas celulares dos fungos. Assim, essa ruptura das membranas pode aumentar a concentração intracelular do fármaco, facilitando sua ação antifúngica. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para validar esse mecanismo de ação, buscando verificar se produtos naturais podem afetar a integridade da membrana interrompendo a síntese de ergosterol ou ligando-se a ele, formando poros, ou ainda atuando desestabilizando a parede celular de leveduras.

AGRADECIMENTOS

Nosso obrigado para a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (BP5-0197-00245.01.00/22).

REFERÊNCIAS

[1] T. Siswina, M. M. Rustama, D. Sumiarsa, E. Apriyanti, H. Dohi, and D. Kurnia, Antifungal Constituents of *Piper crocatum* and Their Activities as Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Discovered via In Silico Study Using ADMET and Drug-Likeness Analysis, *Molecules*, vol. 28, no. 23, Dec. 2023, doi: 10.3390/molecules28237705.

[2] M. da S. Brasil, Situação Epidemiológica. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistemica/situacao-epidemiologica#:~:text=No Brasil%2C a taxa de incidência chega a,relatadas em países dos EUA e da Europa.

[3] C. P. Bravo-Chaucanés *et al.*, Exploring the Potential Mechanism of Action of Piperine against *Candida albicans* and Targeting Its Virulence Factors, *Biomolecules*, vol. 13, no. 12, 2023, doi: 10.3390/biom13121729.

[4] S. E. Kidd, A. Abdolrasouli, and F. Hagen, Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game, *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 10, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1093/ofid/ofac559.

[5] N. Barantsevich and E. Barantsevich, Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis, *Antibiotics*, vol. 11, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11060718.

[6] E. E. Mgbeahuruike, Y. Holm, H. Vuorela, C. Amandikwa, and P. Fyhrquist, An ethnobotanical survey and antifungal activity of *Piper guineense* used for the treatment of fungal infections in West-African traditional medicine, *J. Ethnopharmacol.*, vol. 229, pp. 157–166, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jep.2018.10.005.

[7] J. L. Ballesteros *et al.*, Rediscovering medicinal Amazonian aromatic plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) essential oil as paradigmatic study, *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/6194640.

[8] W. Panphut, T. Budsabun, and P. Sangsuriya, In Vitro Antimicrobial Activity of *Piper retrofractum* Fruit Extracts against Microbial Pathogens Causing Infections in Human and Animals, *Int. J. Microbiol.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/5638961.

[9] Y. Zhao, Y. Yang, M. Ye, K. Wang, L. Fan and F. Su, Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Origanum vulgare against Botrytis cinerea *Food Chem.*, vol. 365, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130506.

[10] G. V. Buitimea-Cantúa, N. E. Buitimea-Cantúa, M. del R. Rocha-Pizaña, A. Hernández-Morales, E. Magaña-Barajas, and J. Molina-Torres, Inhibitory effect of *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits, capsaicin and piperine on aflatoxins

production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of aflD, aflM, aflR, and aflS genes of aflatoxins biosynthetic pathway, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, pp. 835–843, 2020, doi: 10.1080/03601234.2020.1787758.

[11] S. Okonogi, P. Phumat, S. Khongkhunthian, K. Suttiat, and P. Chaijareenont, Denture-Soaking Solution Containing *Piper betle* Extract-Loaded Polymeric Micelles; Inhibition of *Candida albicans*, Clinical Study, and Effects on Denture Base Resin, *Antibiotics*, vol. 10, no. 4, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10040440.

[12] W. Zhou *et al.*, Chemical composition and evaluation of antioxidant activities, antimicrobial, and anti-melanogenesis effect of the essential oils extracted from *Dalbergia pinnata* (Lour.) Prain, *J. Ethnopharmacol.*, vol. 254, May 2020, doi: 10.1016/j.jep.2020.112731.

[13] A. Alizadeh and H. Abdollahzadeh, Essential oil constituents and antimicrobial activity of *Pycnocycla bashagardiana* Mozaff. from Iran, *Nat. Prod. Res.*, vol. 31, no. 17, pp. 2081–2084, 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1274890.

[14] P. Phumat, S. Khongkhunthian, P. Wanachantararak, and S. Okonogi, Potential of *Piper betle* extracts on inhibition of oral pathogens, *Drug Discov. Ther.*, vol. 11, no. 6, pp. 307–315, 2017, doi: 10.5582/ddt.2017.01061.

[15] S. V. Luca *et al.*, Insights into the phytochemical and multifunctional biological profile of spices from the genus piper, *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/antiox10101642.

[16] P. Noriega, J. Ballesteros, A. De la Cruz, and T. Veloz, Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from piper barbatum kunth leaves, *Plants*, vol. 9, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/plants9020211.

[17] L. C. Chitiva-Chitiva, C. Ladino-Vargas, L. E. Cuca-Suárez, J. A. Prieto-Rodríguez, and O. J. Patiño-Ladino, Antifungal activity of chemical constituents from *Piper pesaresanum* C. DC. and derivatives against phytopathogen fungi of cocoa, *Molecules*, vol. 26, no. 11, Jun. 2021, doi: 10.3390/molecules26113256.

[18] F. Prasetya *et al.*, Novel amides derivative with antimicrobial activity of *Piper betle* var. nigra leaves from Indonesia, *Molecules*, vol. 26, no. 2, Jan. 2021, doi: 10.3390/molecules26020335.

[19] N. Zamakshshari *et al.*, Effect of extraction procedure on the yield and biological activities of hydroxychavicol from *Piper betle* L. leaves, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 24, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100320.

[20] J. N. Pereira Carneiro *et al.*, *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities, *Microb. Pathog.*, vol. 136, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.micpath.2019.103700.

[21] A. L. Alves Borges Leal *et al.*, Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE), *Food Chem. Toxicol.*, vol. 131, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.06.006.

[22] A. L. Braga *et al.*, *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance, *South African J. Bot.*, vol. 142, pp. 495–501, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.sajb.2021.07.017.

[23] B. Sivareddy, B. A. Reginald, D. Sireesha, M. Samatha, K. H. Reddy, and G. Subrahamanyam, Antifungal activity of solvent extracts of *Piper betle* and *Ocimum sanctum* Linn on *Candida albicans*: An in vitro comparative study, *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, vol. 23, no. 3, pp. 333–337, Sep. 2019, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_167_19.

[24] Y. Lee, E. Puumala, N. Robbins, and L. E. Cowen, Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond, *Chemical Reviews*, vol. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.

[25] O. R. Gottlieb and M. T. Magalhães, Essential oil of the bark and wood of Aniba canelilla., Perfumery and Essential Oil Record, vol. 51, p. 69, 1959.

[26] J. S. D. M. Monteiro, Valorização de Plantas Aromáticas Catarinenses – Estudo Químico-Biológico dos Óleos Essenciais de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel e *Drimys angustifolia* Miers. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Regional de Blumenau-furb, 2018.

[27] B. J. Rudolf, Extração, Caracterização Química e Avaliação do Óleo Essencial de *Campovassouria cruciata* (VELL.) R. M. King & H. Rob. E. *Grazielia serrata* (SPRENG.) R. M. King & H. Rob. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Regional de Blumenau – FURB, 2018.

[28] R. P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Allured Pub*. Corp, 2007.

[29] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 4ht ed. CLSI Standard M27. Wayne PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute,* 2017.

[30] M. F. B. Morais-Braga *et al.*, *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - Candida effect in association with fluconazole, *Microb. Pathog.*, vol. 95, pp. 200–207, 2016, doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.013.

[31] V. J. A. Fonseca *et al.*, Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis*

(L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, *Arch. Microbiol.*, vol. 204, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.1007/s00203-022-02959-x.

[32] H. D. M. Coutinho, J. G. M. Costa, E. O. Lima, V. S. Falcão-Silva, and J. P. Siqueira, Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine, *Chemotherapy*, vol. 54, no. 4, pp. 328–330, 2008, doi: 10.1159/000151267.

[33] I. Mohammad, P. G. Waterman, and D. W. Thomas, Chemistry in the Annonaceae, XVII. Phenylpropenes from Uvariodendron connivens Seeds, *J. Nat. Prod.*, vol. 48, no. 2, pp. 328–329, Mar. 1985, doi: 10.1021/np50038a025.

[34] C. M. Passreiter, Y. Akhtar, and M. B. Isman, Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Ligusticum mutellina* Roots, *Zeitschrift für Naturforsch. C*, vol. 60, no. 5–6, pp. 411–414, 2005, doi: doi:10.1515/znc-2005-5-608.

[36] S. Hoda, M. Vermani, R. K. Joshi, J. Shankar, and P. Vijayaraghavan, Anti-melanogenic activity of *Myristica fragrans* extract against *Aspergillus fumigatus* using phenotypic based screening, *BMC Complement. Med. Ther.*, vol. 20, no. 1, p. 67, Mar. 2020, doi: 10.1186/s12906-020-2859-z.

[36] R. J. P. Carvalho *et al.*, Antimicrobial Activity the Essential Oil from *Croton pluriglandulosus* Carn. Leaves against Microorganisms of Clinical Interest, *J. Fungi*, vol. 9, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.3390/jof9070756.

[37] G. Nouioura *et al.*, *Petroselinum crispum* L., essential oil as promising source of bioactive compounds, antioxidant, antimicrobial activities: In vitro and in silico predictions, *Heliyon*, vol. 10, no. 8, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29520.

[38] W. Thongphichai, V. Pongkittiphan, A. Laorpaksa, W. Wiwatcharakornkul, and S. Sukrong, Antimicrobial Activity against Foodborne Pathogens and Antioxidant Activity of Plant Leaves Traditionally Used as Food Packaging, *Foods*, vol. 12, no. 12, Jun. 2023, doi: 10.3390/foods12122409.

[39] A. Sartoratto *et al.*, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 35, pp. 275–280, 2004.

[40] A. Guetat *et al.*, *Deverra triradiata* Hochst. ex Boiss. from the Northern Region of Saudi Arabia: Essential Oil Profiling, Plant Extracts and Biological Activities, *Plants*, vol. 11, no. 12, Jun. 2022, doi: 10.3390/plants11121543.

[41] A. Trifan, G. Zengin, I. Korona-Glowniak, K. Skalicka-Woźniak, and S. V. Luca, Essential Oils and Sustainability: In Vitro Bioactivity Screening of *Myristica fragrans* Houtt. Post-Distillation By-Products, *Plants*, vol. 12, no. 9, May 2023, doi:

10.3390/plants12091741.

[42] J. Setty, I. Srinivasan, R. Sathiesh, M. Kale, V. Shetty, and S. Venkatesh, In vitro evaluation of antimicrobial effect of *Myristica fragrans* on common endodontic pathogens, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, vol. 38, no. 2, pp. 145–151, Apr. 2020, doi: 10.4103/JISPPD.JISPPD_214_20.

[43] A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro, and J. J. C. Scheffer, Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils, *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, no. 4, pp. 213–226, Jul. 2008, doi: 10.1002/ffj.1875.

[44] S. Das, V. K. Singh, A. K. Dwivedy, A. K. Chaudhari, and N. K. Dubey, Exploration of some potential bioactive essential oil components as green food preservative, *LWT*, vol. 137, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110498.

[45] W. H. Al-Qahtani *et al.*, Phyto-chemical and biological activity of *Myristica fragrans*, an ayurvedic medicinal plant in Southern India and its ingredient analysis: Phyto-chemical and biological activity of *Myristica fragrans*, *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 29, no. 5, pp. 3815–3821, May 2022, doi: 10.1016/j.sjbs.2022.02.043.

[46] C. joo Park, H. sang Kim, D. W. Lee, J. Kim, and Y. hwa Choi, Identification of antifungal constituents of essential oils extracted from *Boesenbergia pulcherrima* against Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum*), *Appl. Biol. Chem.*, vol. 63, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/s13765-020-00518-w.

[47] V. M. M. Valente, G. N. Jham, C. M. Jardim, O. D. Dhingra, and I. Ghiviriga, Major Antifungals in Nutmeg Essential Oil against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*, *J. Food Res.*, vol. 4, no. 1, p. 51, Oct. 2014, doi: 10.5539/jfr.v4n1p51.

[48] Y. Tsukuda *et al.*, Structure–activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with n-dodecanol and fluconazole, *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 74, no. 3, pp. 377–384, Mar. 2022, doi: 10.1111/lam.13613.

[49] K. Ciura *et al.*, Lipophilicity determination of antifungal isoxazolo[3,4-b]pyridin-3(1h)-ones and their n1-substituted derivatives with chromatographic and computational methods, *Molecules*, vol. 24, no. 23, Nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24234311.

[50] M. J. Waring, Lipophilicity in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 235–248, Mar. 2010, doi: 10.1517/17460441003605098.

[51] L. Bauters, B. Stojilković, and G. Gheysen, Pathogens pulling the strings: Effectors manipulating salicylic acid and phenylpropanoid biosynthesis in plants, *Molecular Plant Pathology*, vol. 22, n. 11, p. 1436-1448, 2021, doi: 10.1111/mpp.13123.

[52] W. M. N. H. W. Salleh, A systematic review of botany, phytochemicals and

pharmacological properties of “Hoja santa” (*Piper auritum* Kunth), *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 76, n. 3-4, 2021, pp. 93-102, doi: 10.1515/znc-2020-0116.

[53] A. M. Eid, and M. Hawash, Biological evaluation of Safrole oil and Safrole oil Nanoemulgel as antioxidant, antidiabetic, antibacterial, antifungal and anticancer, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 21, n. 1, pp. 159, 2021, doi: 10.1186/s12906-021-03324-z.

[54] G. B. Klafke *et al.*, Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology, *Mycopathologia*, vol. 175, no. 1–2, pp. 147–151, Feb. 2013, doi: 10.1007/s11046-012-9596-x.

[55] J. P. Latgé, The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell, Oct. 2007. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x.

[56] T. WANG *et al.*, Ethyl caffeate combined with fluconazole exhibits efficacy against azole-resistant oropharyngeal candidiasis via the EFGR/JNK/c-JUN signaling pathway, *Medical Mycology*, vol. 61, n. 11, pp. myad114, 2023, doi: 10.1093/mmy/myad114.

[57] K. Fujita, T. Fujita, and I. Kubo, Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent, *Phytotherapy Research*, vol. 21, n. 1, pp. 47-51, 2007, doi: 10.1002/ptr.2016.

[58] H. O. Khalifa *et al.*, Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of *Candida krusei* Recovered from an International Collection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 66, no. 2, 2022, doi: 10.1128/AAC.01856-21.

[59] J. N. P. Carneiro *et al.*, GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil, *Food Chem. Toxicol.*, vol. 135, p. 110987, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110987.

Manuscrito - INIBIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS E ANÁLISE ADMET DA MIRISTICINA E ELEMICINA DE *Piper rivinoides* Kunth.

Submetido a World Journal of Microbiology and Biotechnology – https://link.springer.com/journal/11274?utm_source=slink&utm_medium=journal_finder – Fator de Impacto 4.2

Victor Juno Alencar Fonseca[1]; Mário José Lima Orgaz Júnior[2]; Johnatan Wellisson da Silva Mendes[1]; Francisco Bernardo de Barros[1]; Joara Nályda Pereira Carneiro[1]; Antonia Thassya Lucas dos Santos[1]; Maria Audilene de Freitas[1]; Tawanny Kayonara Borges de Aguiar[7]; Maria Alicy Neres de Oliveira[1]; Elita de Sousa Santos[1]; Emmanuel Silva Marinho[5]; Victor Moreira de Oliveira[5]; Matheus Nunes da Rocha[5]; Márcia Machado Marinho[5]; Martinho Rau[2]; Luiz Everson da Silva[3]; Wanderlei do Amaral[4]; Jacqueline Cosmo Andrade-Pinheiro[6]; Ricardo Andrade Rebelo[2]; Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga[1]

1. Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brazil.
2. Universidade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau, SC, Brasil.
3. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Matinhos, PR, Brazil.
4. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brazil.
5. Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza, CE, Brazil.
6. Universidade Federal do Cariri – UFCA, Barbalha, CE, Brazil.
7. Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brazil.

Autor correspondente: Victor Juno Alencar Fonseca – victorjunobiomedico@gmail.com

RESUMO

A família Piperaceae é uma rica fonte de óleos essenciais e metabólitos secundários com diversos efeitos bioativos, incluindo atividade antifúngica. Compostos como miristicina e elemicina, extraídos de espécies de *Piper*, demonstraram potencial na inibição de fatores de virulência de *Candida* spp., importantes agentes etiológicos da candidíase. Este estudo empregou abordagens *in silico*, incluindo *docking* molecular e previsões farmacocinéticas de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET), para investigar a miristicina e a elemicina do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth como potenciais fármacos

antifúngicos. As análises de *docking* avaliaram a interação dos compostos com proteínas associadas à virulência de *Candida spp.*. As predições de ADMET foram utilizadas para estimar propriedades farmacocinéticas e a semelhança com fármacos, com base em parâmetros de otimização multiparamétrica (MPO). Nos ensaios in vitro, a capacidade inibitória dos compostos foi avaliada contra o pleomorfismo fúngico, biomassa de biofilme, metabolismo e interação com o ergosterol. A miristicina apresentou interações semelhantes ao fluconazol, particularmente com CYP51 e GlcNAc, e inibiu a transição morfológica de *Candida tropicalis*. A elemicina reduziu a biomassa de biofilme maduro de forma comparável ao fluconazol e foi o único composto a interagir significativamente com o ergosterol em ambas as cepas testadas. As previsões de ADMET revelaram que a elemicina é mais estável e menos propensa à toxicidade, embora ambos os fenilpropanóides se enquadrem nos parâmetros da Pfizer para viabilidade de fármacos. Esses achados indicam que os compostos podem atuar por vias distintas, mas ambos possuem potencial como candidatos antifúngicos. No entanto, validações experimentais adicionais são necessárias para confirmar as previsões *in silico*, considerando a complexidade biológica envolvida.
Palavras-Chave: Docking molecular; *Candida* spp.; Pleomorfismo; Biofilme.

1. INTRODUÇÃO

A família Piperaceae é composta por aproximadamente oito gêneros e 3000 espécies. O gênero *Piper* é encontrado em áreas tropicais e subtropicais onde, na América, existem aproximadamente 700 espécies. Este gênero é importante fonte de óleos essenciais (OE) e metabólitos secundários que conferem diversas bioatividades, incluindo ação antifúngica (Leal *et al.* 2019; Braga *et al.*, 2021). Esses OEs são caracterizados pela presença de terpenos como hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenoides oxigenados sesquiterpênicos e fenilpropanoides (Ruiz-Vásquez *et al.*, 2022).

Embora as plantas medicinais tenham sido tradicionalmente utilizadas de forma empírica no tratamento de diversas infecções por populações de baixa renda, evidências científicas demonstram que seus compostos também podem ser eficazes contra linhagens multirresistentes. Diante disso, a pesquisa de produtos naturais com ênfase no isolamento, purificação e caracterização de metabólitos secundários de plantas impactou significativamente a descoberta de medicamentos antimicrobianos, tornando-se relevantes no tratamento de inúmeras doenças (Braga *et al.*, 2021).

Algumas dessas plantas podem ser utilizadas na terapia combinada com antifúngicos, como fluconazol, para modificar seus efeitos. Em pesquisa realizada por Carneiro *et al.* (2019),

o OE de *Piper diospyrifolium* modificou a ação do fluconazol, melhorando suas propriedades antifúngicas contra *Candida tropicalis* padrão e resistente. Leal *et al.* (2019) também obtiveram bons resultados em terapia combinada contra C. tropicalis utilizando OE de *P. rivinoides* associado ao fluconazol. Ballesteros e colaboradores (2019) verificaram a ação sinérgica de *Piper carpunya* com fluconazol contra *C. albicans* e *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*). A associação do OE de *Piper regnelli* em concentrações subinibitórias com fluconazol foi capaz de reduzir a quantidade do fármaco necessária para inibir o crescimento de *C. tropicalis* (Braga *et al.*, 2021).

A investigação de novas combinações e compostos antifúngicos é essencial, considerando o aumento global das infecções causadas por microrganismos resistentes às terapias convencionais. Esse cenário tem impulsionado a busca por moléculas com atividade antimicrobiana eficaz contra cepas resistentes aos antifúngicos convencionais (Braga *et al.*, 2021). A resistência antimicrobiana tem o potencial de mudar nosso estilo de vida, desde afetar a segurança alimentar até ameaçar nossos sistemas de saúde pública, e tem sua causa por meio de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida (dos Santos *et al.*, 2023).

Espécies como *C. albicans* e *C. tropicalis*, causadoras da candidíase, onde só no Brasil sua incidência chega a 2,49 a cada 1000 casos de admissão hospitalar (Brasil, 2023), tem características que as tornam patógenos difíceis de erradicar, como a produção de biofilme e sua plasticidade quanto a morfologia. Em condições favoráveis, podem passar por uma transição de sua forma leveduriforme para filamentosa (hifal e pseudohifal) um fenômeno conhecido como morfogênese celular, que é frequentemente associado a virulência, auxiliando na colonização, invasão de tecidos e evasão do sistema imunológico (Fonseca *et al.*, 2022).

Os avanços recentes em abordagens computacionais têm revolucionado a identificação e o designe de moléculas naturais com potencial bioativo, capazes de atingir proteínas de interesse específico. Técnicas *in silico* permitem a triagem e o redirecionamento de metabólitos secundários extraídos de plantas, otimizando o processo de descoberta de novos candidatos a fármacos (Ali *et al.*, 2023). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar estratégias *in sílico*, incluindo *docking* molecular nos alvos fúngicos Als3, Sap5, CYP51, Glc-NAc e SapT1 (proteínas associadas à adesão celular, degradação de tecidos hospedeiros, biossíntese de ergosterol e regulação de fatores de virulência em *Candida* spp.), além de preditores farmacocinéticos de ADMET, para identificar possíveis novos fármacos. Complementarmente, foram empregadas técnicas *in vitro* para avaliar a capacidade dos compostos miristicina e elemicina, extraídos de *P. rivinoides* Kunth, em inibir fatores de virulência de espécies de *Candida* spp.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Obtenção e preparo do material

Os compostos miristicina e elemicina, obtidos a partir do óleo essencial de *Piper rivinoides*, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo, da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Os procedimentos de extração, isolamento e caracterização do óleo essencial e de seus constituintes encontram-se descritos em Fonseca *et al.* (2025). Os ensaios antifúngicos foram conduzidos com base nos valores previamente estabelecidos de concentração inibitória média (IC_{50}) e concentração matriz (CM).

O fluconazol foi adquirido da VIRUPAKSHA ORGANIC LIMITED (Gaddapotharam Village – ÍNDIA); o dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Merck, (Darmstadt – Alemanha). A anfotericina-B foi adquirida da Gilead (San Dimas, CA – EUA). O ergosterol foi obtido da Sigma Aldritch Co. (St. Louis, MO – USA). Amostras de 0,02 g dos produtos isolados (miristicina e elemicina) e fluconazol foram pesadas e diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 % para formar uma solução estoque. Para os testes, os compostos e o fluconazol foram diluídos em um meio de cultura para preparar uma CM de 2048 μg/mL.

2.2. Meios de cultura

O Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e o Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) foram obtidos da ISOFAR, Brasil. O Caldo Peptona Dextrose de Levedura (YPD) foi obtido da Difco/BD – Becton Dickinson, França, e o Ágar Batata Dextrose (PDA) da KASVI, Espanha. Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

2.3. Microrganismos

As cepas padrões *C. albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231) e *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Oswaldo Cruz - Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

2.4. Preparo dos inóculos

Todas as cepas foram inicialmente armazenadas em SDA a 8 ◦C. As cepas foram cultivadas em placas de Petri com SDA a 35 ◦C por 24 h. Em seguida, os microrganismos foram

inoculados em tubos contendo 4 mL de solução salina estéril (0,9 % NaCl). Os tubos tiveram sua turbidez ajustada de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, equivalente a 1,5 x 10^8 CFU/mL (CLSI, 2017).

Para os testes de biofilme, os fungos foram repicados em placa de Petri contendo meio SDA e incubados por 24 h a 35 ˚C. Em seguida, foram preparadas soluções em NaCl (0,9%), ajustando sua turbidez de acordo com a escala 1,0 de McFarland, que corresponde a 10 x 10^6 CFU/mL. Alíquotas de 100 µL dessa solução foram transferidos para placas de microdiluição, onde foram incubadas por 90 min a 35 ˚C para adesão das células fúngicas à placa. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi removido delicadamente para preservar a camada de células aderidas. Em seguida foram adicionados 200 µL de meio SDB, e as placas foram incubadas por mais 48 h a 35 ◦C, com objetivo de promover a formação do biofilme maduro (dos Santos *et al.*, 2025).

2.5. Efeito da miristicina, elemicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida* spp.

Câmaras micromorfológicas estéreis foram preparadas para observação das células fúngicas. Três mililitros de meio Potato Dextrose Agar (PDA), esgotados por diluição e acrescidos de ágar bacteriológico foram adicionados às câmaras, contendo as concentrações do produto isolados baseadas na Concentração Matriz (CM: 2048 µg/mL), sendo elas CM/4 e CM/8 para ambas as linhagens. Alíquotas do inóculo foram retiradas das placas de Petri para fazer duas estrias paralelas no meio sólido, sendo posteriormente cobertas com uma lamínula estéril. As câmaras foram incubadas por 24 h a 37 °C e inspecionadas em microscópio de luz com objetiva de 10 x. Uma câmera (DIGILAB DI-3.1; Brazil) acoplada ao microscópio (Bioval L- 20001 TRINO; Biosystems Importer, Brazil) foi utilizada para a captura das imagens. Foram realizados um controle de crescimento de leveduras (hifas estimuladas por depleção), bem como um controle com o antifúngico fluconazol para fins de comparação. Os ensaios seguiram metodologia de Carneiro *et al.* (2019) com algumas modificações.

2.6. Interação com ergosterol

A metodologia utilizada para avaliar a capacidade de interação dos produtos com o ergosterol foi desenvolvida a partir do método descrito por da Silva Neto *et al.* (2020), com modificações introduzidas neste estudo.

Inicialmente, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato. O ergosterol (Sigma–Aldrich, Brasil Ltda.) foi pesado e diluído em solução de Tween (Dinâmica – Química

Contemporânea Ltda.) acrescida de etanol a 3,37% (concentração previamente estabelecida como livre de efeito antifúngico), resultando em concentrações variáveis entre 800 e 50 µg/mL.

O ergosterol foi então transferido para os poços contendo meio de cultura e o produto testado na concentração de IC_{50}, previamente determinada por ensaios de microdiluição (Fonseca *et al.*, 2025). Em seguida, adicionaram-se alíquotas da suspensão fúngica ajustada ao padrão de turbidez de McFarland 0,5, obtendo-se uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ células/mL.

Foram incluídos controles de crescimento, esterilidade e diluição do produto, todos na presença de ergosterol. Adicionalmente, controles positivos foram realizados utilizando a droga anfotericina B, nas concentrações de 1,0 µg/mL para *Candida albicans* e 3,0 µg/mL para *Candida tropicalis*, correspondentes às respectivas IC_{50} previamente determinadas.

As placas foram incubadas a 35 ºC por 24 h. Após esse período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro ELISA (Termoplate®) a 630 nm (Morais-Braga *et al.*, 2016). A análise consistiu em verificar se a atividade antifúngica do produto era alterada na presença de ergosterol. Considerando que a anfotericina B apresenta ligação específica ao ergosterol, sua redução de atividade na presença do esterol livre foi utilizada como parâmetro comparativo para determinar o grau de interação da miristicina e da elemicina.

A principal modificação introduzida neste estudo foi o uso da concentração de IC_{50} previamente determinada para cada produto, associada ao controle comparativo com anfotericina B.

2.7. Testes de erradicação de biofilme maduro

2.7.1. TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM DROGAS E SUBSTÂNCIAS

Após o período de maturação do biofilme, o meio de cultura nas placas foi removido delicadamente. Então, 200 µL (180 µL para as placas da atividade metabólica por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo - INLAB, Brazil) do fluconazol e/ou produtos foram adicionados nas concentrações de IC_{50}, IC_{50} x 10 e IC_{50} x 20 de forma seriada em quadruplicada. Para o controle de crescimento, apenas meio de cultura SDB foi utilizado. O controle de esterilidade foi realizado usando apenas meio SDB em poços sem crescimento fúngico. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h a 35 ºC (dos Santos *et al.*, 2025).

2.7.2. ANÁLISE DA BIOMASSA POR CRISTAL VIOLETA

Após o período de tratamento dos biofilmes, o sobrenadante foi removido de todos os poços e descartados. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 200 µL de tampão fosfato salino (PBS – Exodus Científica). Para visualização dos resultados, 200 µL de cristal violeta (Exodo Scientific, Brazil) foram adicionados aos poços por 20 min. Então, o cristal violeta foi removido, seguido de duas lavagens com água destilada para remoção do excesso do corante. O princípio do teste está ligado a quantidade de células aderidas ao biofilme, onde a quantidade de corante é proporcional a biomassa. Dessa forma, 200 µL de isopropanol (Exodus Científica) são adicionados a cada poço por 15 minutos para solubilização do cristal violeta aderido as células fúngicas, dos quais 100 µL serão transferidos para nova placa para realização da leitura em espectrofotômetro ELISA, no comprimento de onda de 492 nm (dos Santos *et al.*, 2025).

2.7.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA POR MTT

Considerando que a limitação da análise por cristal violeta de não diferenciar células vivas ou mortas, a análise da atividade metabólica complementa os resultados. Após o período de tratamento dos biofilmes, 20 µL de MTT foi adicionado aos poços contendo 180 µL da solução de tratamento, seguido de nova incubação por 18 h a 35 ºC. Este reagente sofre redução por enzimas mitocondriais de células vivas, formando cristais de formazan roxo. A quantidade de formazan é proporcional ao número de células metabolicamente ativas.

Após 18 h, o conteúdo dos poços foi removido delicadamente e adicionado 200 µL de isopropanol por 15 min para solubilização do formazan. Em seguida, alíquotas de 100 µL do conteúdo foi transferido para novas placas de microdiluição realização da leitura em espectrofotômetro ELISA, no comprimento de onda de 630 nm (dos Santos *et al.*, 2025).

2.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9. Os ensaios de microdiluição na presença do ergosterol foram realizados por ANOVA de duas vias para comparar os valores entre as concentrações do produto, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os limiares de significância foram definidos em $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, sendo considerado não significativo o valor de $p > 0,05$.

Os valores de IC_{50} haviam sido determinados por regressão não linear, utilizando interpolação de amostras desconhecidas a partir de curvas padrão geradas com base no crescimento fúngico em função da concentração do produto (µg/mL). Descrição detalhada de metodologia e resultados podem ser conferidos em Fonseca *et al.* (2025).

Para avaliar o efeito na virulência, a área total de cada estria foi medida utilzando ToupView software (ToupTek Photonics®, China), incluindo regiões com crescimento hifal e/ou pseudohifal. Os filamentos encontrados em cinco áreas selecionadas aleatoriamente por estria foram medidos para calcular o comprimento médio do filamento. Esses dados foram analisados usando ANOVA, seguida pela correção de Bonferroni para comparações entre as concentrações do produto.

Para os ensaios de sensibilidade do biofilme, os valores de absorbância dos poços tratados foram comparados aos do controle. Após a tabulação dos dados, foi realizada ANOVA, seguida pela correção de Bonferroni para comparações múltiplas de acordo com as concentrações testadas de fluconazol e dos isolados miristicina e elemicina.

2.9. *Docking* Molecular

2.9.1. PREPARO DOS LIGANTES

A etapa de padronização dos ligantes é iniciada com o processo de renderização em caráter bidimensional. Em seguida, o modelo individual de cada ligante foi submetido ao campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) (Halgren, 1996; Hanif; Lukis; Fadlan, 2020), através da utilização do software Avogadro (Avery *et al.*, 2018; Hanwell *et al.*, 2012). O campo de força consiste em um conjunto de métricas que visam realizar os cálculos de otimização estrutural de todos os ligantes, apresentando as suas conformações mais estáveis e de menor energia, referente ao campo de força utilizado, apresentando a estrutura mais estável segundo o método clássico.

2.9.2. PREPARO DOS RECEPTORES BIOLÓGICOS

Os estudos de *docking* molecular consistem na utilização de receptores biológicos para atuar como molécula alvo durante a simulação. Dentre os receptores utilizados foram selecionadas as espécies *C. albicans* (Als3, Sap5, CYP51 e GlcNAc) e *C. tropicalis* (SapT1). Todas as estruturas foram obtidas através da utilização da plataforma virtual Protein Data Bank (PDB), e devidamente identificado pelos códigos de identificação IdPDB: 4LE8 (Als3) (Ganesh-Kumar *et al.*, 2024), IdPDB: 2QZX (Sap5) (Borelli *et al.*, 2008), IdPDB: 5FSA (CYP51) (Hargrove *et al.*, 2017), IdPDB: 6AKZ (Glc-NAc) (Rani *et al.*, 2020) e IdPDB: 1J71 (SapT1) (Sari; Valand; Girija, 2022; Symersky; Monod; Foundling, 1997). Com as devidas estruturas tridimensionais, todos os receptores passaram por um processo de retiras de resíduos em suas coordenadas visando expor todas as possíveis cavidades durante as simulações de

docking molecular. Em seguida, foram adicionados todos os hidrogênios polares em suas respectivas estruturas, e adicionada as cargas de Kollman (Maurya; Mishra, 2022), e Gasteiger (Verma *et al.*, 2020).

Para a realização das simulações de *docking* molecular é necessário estipular os eixos de Gridbox, que visa demonstrar a região de atuação que o ligante irá atuar durante a simulação. Em todos os receptores alvo os valores foram ajustados com o intuito de envolve-los completamente (de Oliveira *et al.*, 2021), apresentando os valores de size (126 x, 64 y e 122 z) e eixos (13.811 x, 1.559 y e 179.097 z) relacionado ao Als3, size (96 x, 94 y e 126 z) com os eixos (13.367 x 24.439 y e 25.099 z) referente ao Sap5, size (126 x, 114 y e 126 z) com os eixos (207.466 x, -2.009 y e 38.552 z) para a CYP51, size (126 x, 120 y e 126 z), com os eixos (17.632 x, 17.732 y e 55.349 z) para a Glc-NAc e para a SapT1 (122 x, 126 y e 126 z) com os valores de eixo (26.434 x, 16.426 y e 14.565 z).

2.9.3. ANÁLISE DE SÍTIOS E ENCAIXE MOLECULAR

Para a realização das simulações de *docking* molecular foram executadas 50 simulações independentes com 20 poses distintas para cada simulação realizada, com o intuito de formar complexo entre o ligante e o receptor alvo, apontando todos os valores de energia de afinidade e RMSD (Root Mean Square Deviation), que devem apresentar valores que sejam iguais ou inferiores a 2.0 Å (Yusuf *et al.*, 2008), com o suporte do software AutoDockVina (Trott; Olson, 2010). Para fins de validação das simulações de docking molecular, foram realizadas simulações de re*docking* molecular com os inibidores co-cristalizados presentes nas estruturas tridimensionais referentes a SAP5. Com a PepA, o receptor alvo da CYP51 apresenta a presença do posaconazol, e para SapT1, o tetrapeptideo, com o intuito central de validar o complexo formado e estimar a viabilidade das simulações de docking molecular. As análises de interações serão estimadas pela comparação com fármaco de referência fluconazol (Ghabbour *et al.*, 2014).

Dentre todas as análises de sítio, foi utilizado DoGsite3, amplamente aplicado no Protein Plus com o intuito de avaliar possíveis cavidades que os receptores alvos possuem e estimar possíveis regiões para atuarem como sítio de ligação, atuando na correlação direta entre o volume (Å3) da cavidade, a superfície (Å2) e a profundidade (Å) (Graef; Ehrt; Rarey, 2023; Volkamer *et al.*, 2010).

2.10. Estudo ADMET baseado em MPO

Para predição das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), da miristicina e elemicina, foi utilizada uma abordagem baseada em Multiparameter Optimization (MPO) da Pfizer, Inc., onde é conduzida uma estimativa quantitativa de druglikness, como mostra a Eq. 1 (da Rocha *et al.*, 2024; Wager *et al.*, 2010):

$$d = \sum_{i=1}^{n} w_k \, T_k(x^0{}_k)$$

(1) onde w é o fator de ponderação (0 a 1) atribuído a cada propriedade físico-química (k) com valor calculado dentro dos limites estatísticos (T(x)) definidos por: coeficiente de partição (logP) ≤ 3, coeficiente de distribuição (logD) ≤ 2, Molecular Weight (MW) ≤ 360 g/mol, Topological Polar Surface Area (TPSA) 40-90 $Å^2$, Ligação de Hidrogênio donor (HBD) ≤ 1 e pKa mais básico ≤ 8.0 (n = 6); e o somatório resulta em uma pontuação de desirability (d) que varia de 0 a 6, conforme a viabilidade farmacocinética e avaliada pelas regras da Pfizer and Golden Triangle (Hughes *et al.*, 2008; Johnson; Dress; Edwards, 2009).

Para corroboração dos resultados, as propriedades de Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) foram previstas utilizando a base de dados ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/). As propriedades incluem permeabilidade celular passiva (Papp,A→B), em modelos celulares adenocarcinoma colorectal (Caco-2) e Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), P-glycoprotein (P-gp) substrate, depuração hepática da fração molecular intrínseca (CLint,u) e Volume of Distribution of steady state (VDss).

A predição do sítio de metabolismo e toxicidade foi feita utilizando as plataformas StopTox (https://stoptox.mml.unc.edu/) e XenoSite (https://xenosite.org/), onde o teste de especificidade e sensitividade estrutural resultaram em um mapa de suscetibilidade 2D que foi relacionado aos descritores de metabolismo e toxicidade dos preditores PreADMET (https://preadmet.qsarhub.com/) e ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/), que incluem substratos de isoformas do cytochrome P450 (CYP450), Drug-Induced Liver Injury (DILI) e mutagenicidade de Ames (Lima *et al.*, 2023; Vian *et al.*, 2019).

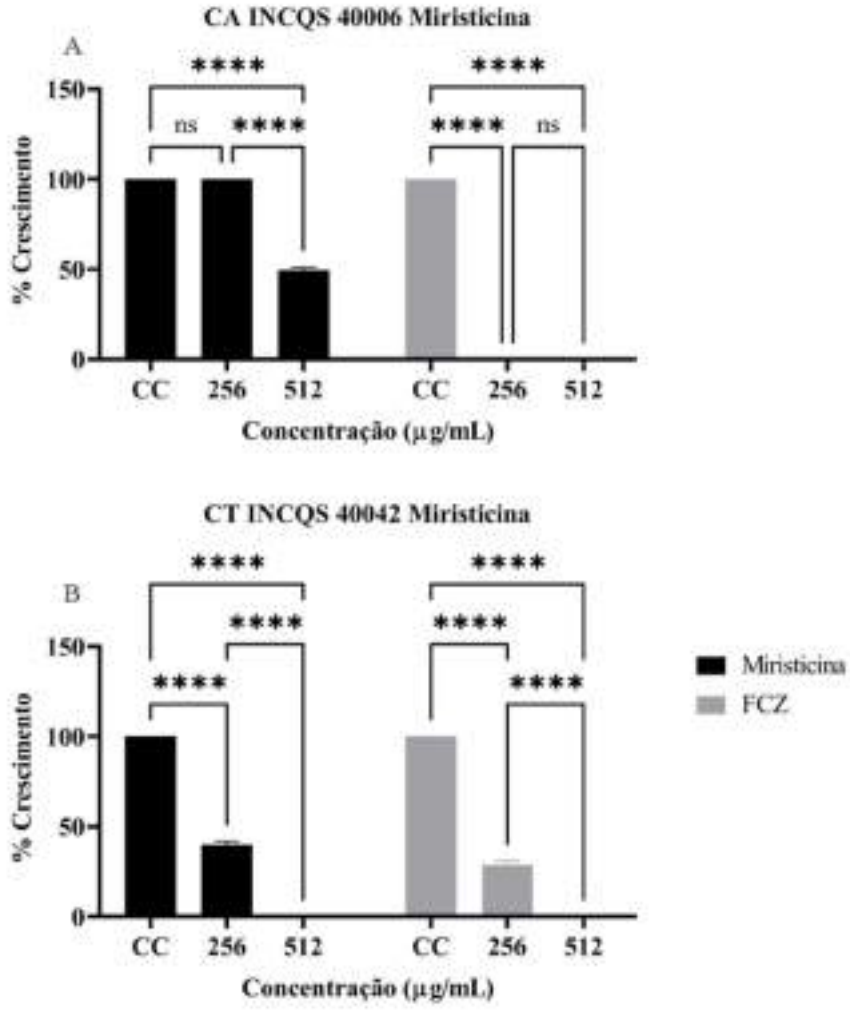
3. RESULTADOS

3.1. Inibição da transição morfológica

No Teste da inibição da transição morfológica de *Candida*, a miristicina inibiu completamente a transição em *C. tropicalis* na concentração de 512 µg/mL, e provocou redução no comprimento hifal de 60 % a partir de 256 µg/mL. Contra a *C. albicans*, houve apenas redução de 50 % das hifas na concentração de 512 µg/mL. A elemicina apenas reduziu o

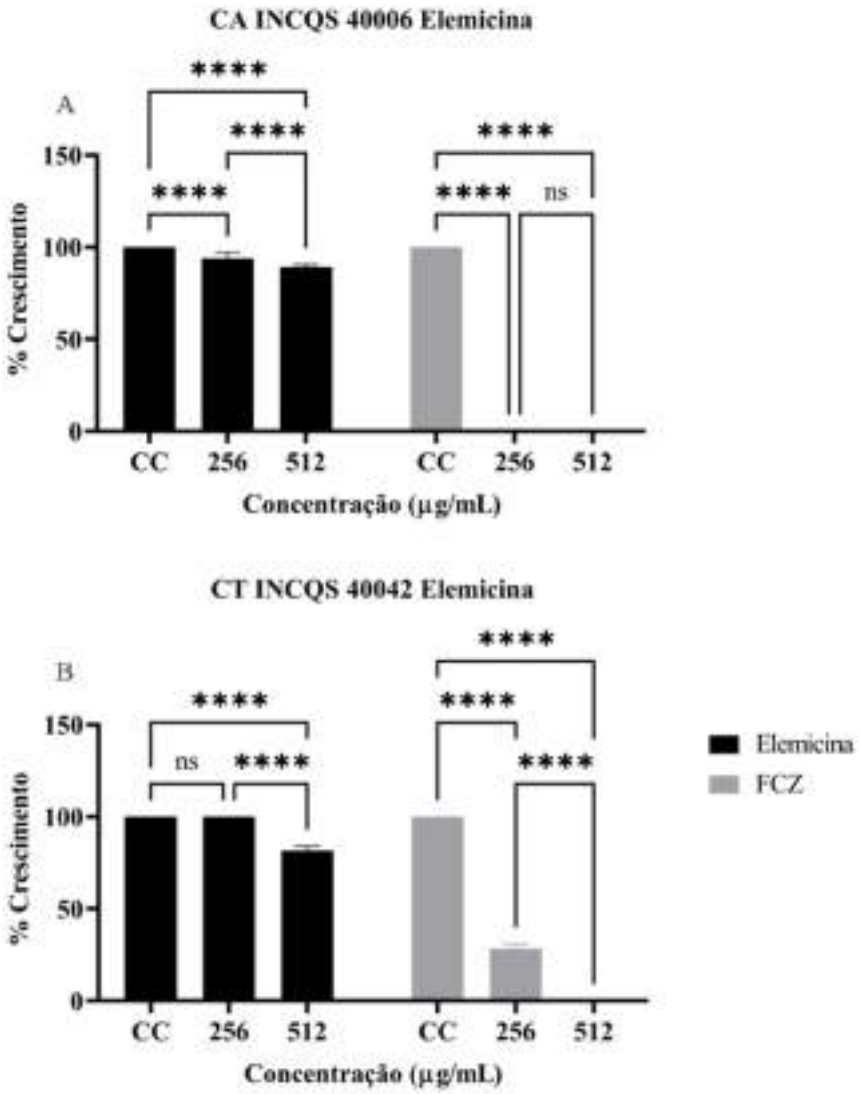
comprimento das hifas em todas as linhagens testadas, sendo obtidos percentuais de inibição de 6,2 % em 256 µg/mL, 11 % em 512 µg/mL frente a *C. albicans* e de 18,31 % em 512 µg/mL frente a *C. tropicalis*. Em comparação, o FCZ foi capaz de inibir completamente a transição de levedura para hifas de *C. albicans*. Contra *C. tropicalis*, houve redução no comprimento das hifas de 71,5 % na concentração de 256 µg/mL. Os resultados quantitativos podem ser observados nas Figuras 1 a 2, e os qualitativos nas Figuras 3 a 4).

Figura 1. Efeito da miristicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*



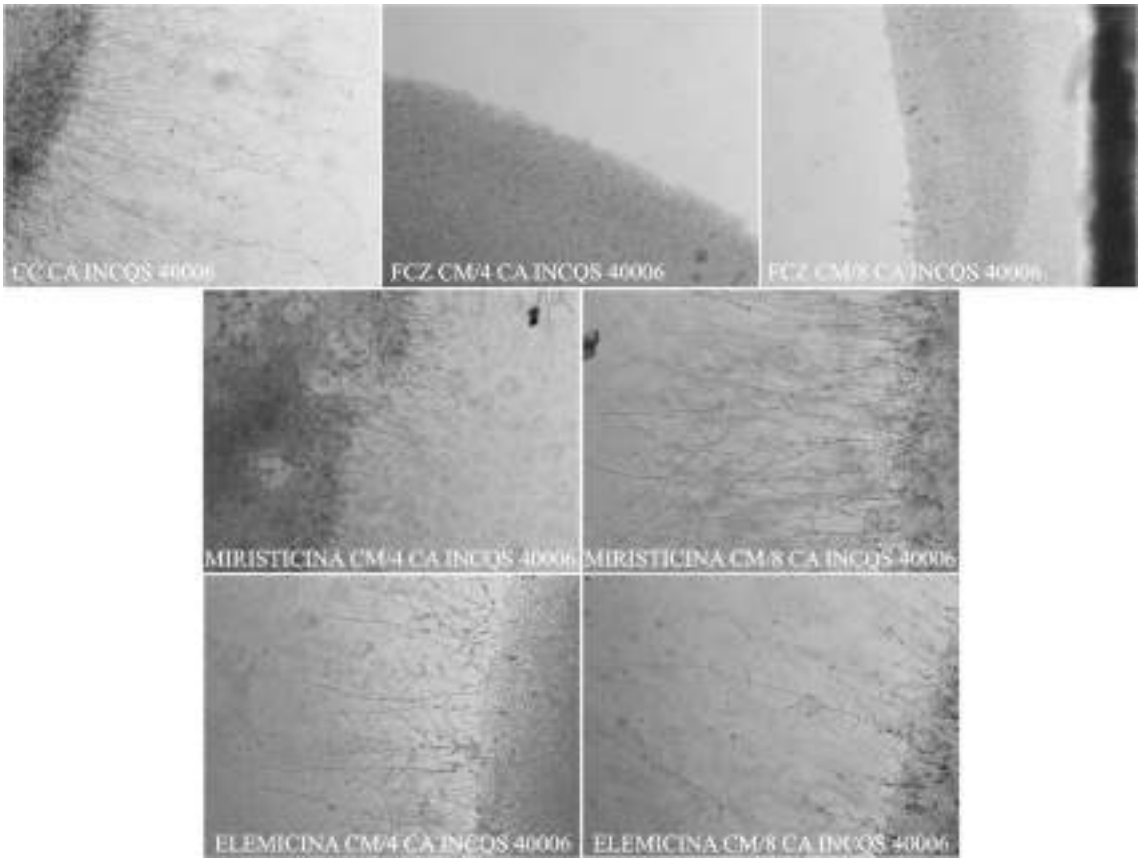
C. albicans (A), *C. tropicalis* (B). CA INCQS 40006: *Candida albicans* ATCC 10231; CT INCQS 40042: *Candida tropicalis* ATCC 13803; FCZ: Fluconazol; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; NS: não significante; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

Figura 2. Efeito da elemicina e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*



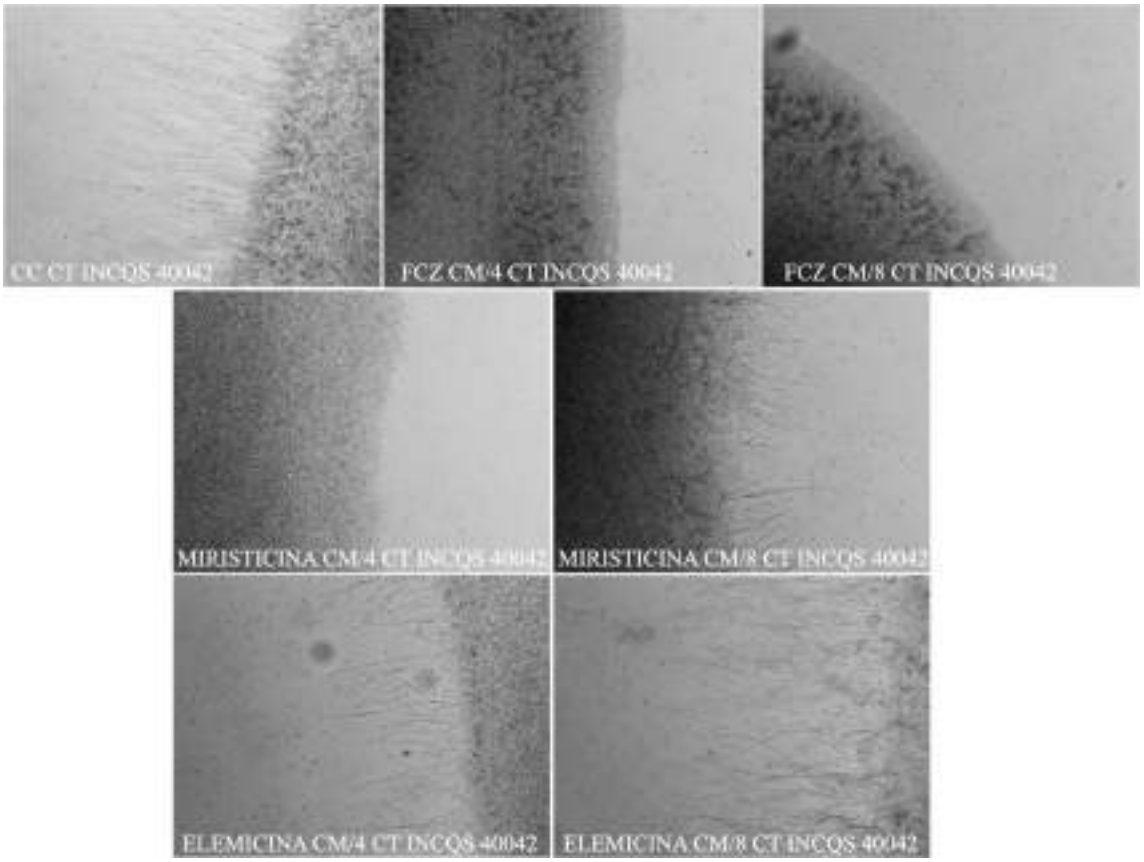
C. albicans (A), *C. tropicalis* (B). CA INCQS 40006: *Candida albicans* ATCC 10231; CT INCQS 40042: *Candida tropicalis* ATCC 13803; FCZ: Fluconazol; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; NS: não significante; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

Figura 3. Atividade inibitória da transição morfológica do fluconazol (FCZ), miristicina e elemicina contra *Candida albicans*.



CA: *Candida albicans* ATCC 10231; FCZ: Fluconazol; CM: Concentração matriz; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Figura 4. Atividade inibitória da transição morfológica do fluconazol (FCZ), miristicina e elemicina contra *Candida tropicalis*.



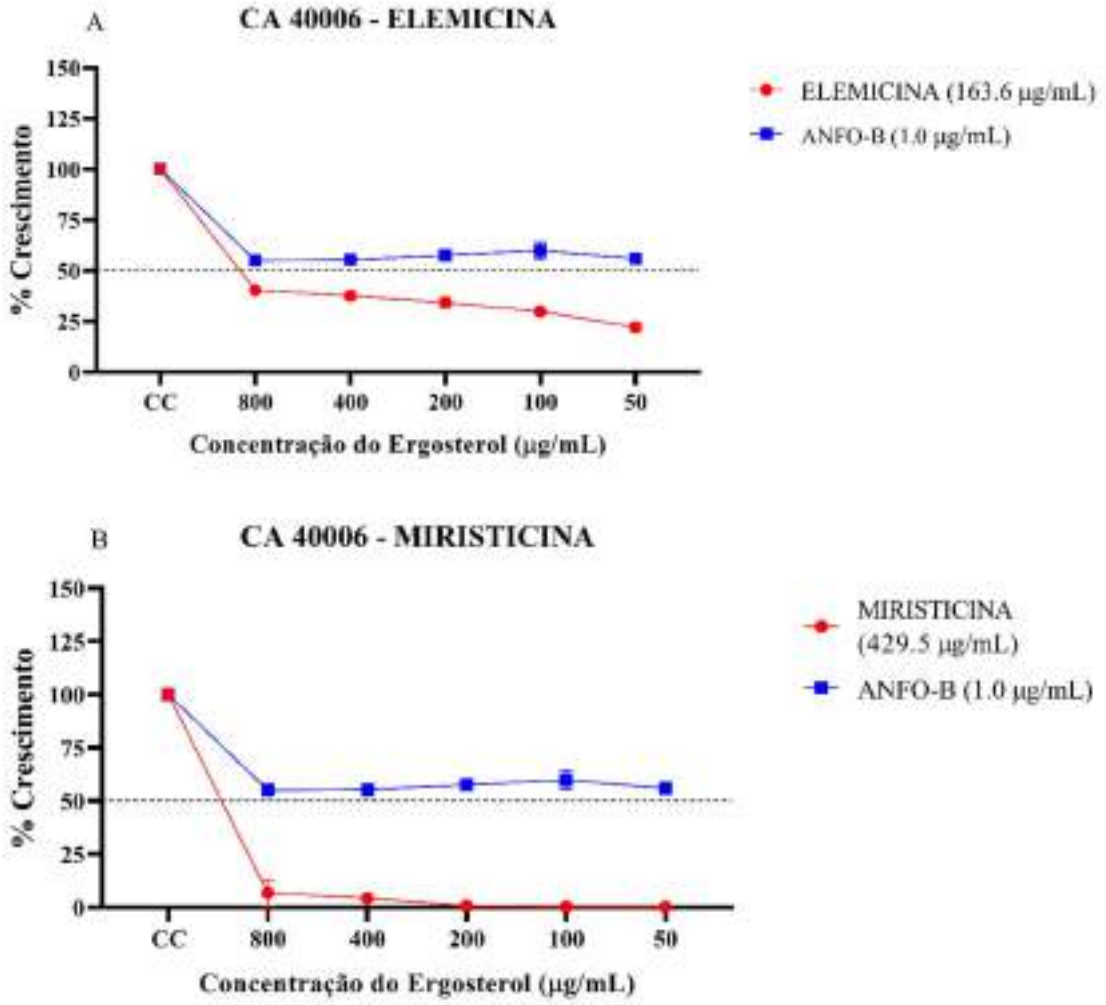
CT: *Candida tropicalis* ATCC 13803; FCZ: Fluconazol; CM: Concentração matriz; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

3.2. Interação com ergosterol

Como esperado, a anfotericina – B, usada como controle positivo, apresentou aumento da IC_{50} na presença do ergosterol livre, que se manteve constante em todas as concentrações testadas, apresentando um crescimento fúngico de aproximadamente 55,1 % para CA, e com uma pequena variação em CT, indo de 65,5 % em todas as concentrações, e chegando a 71.4 % em 800 µg/mL de ergosterol, confirmando sua afinidade por esse componente.

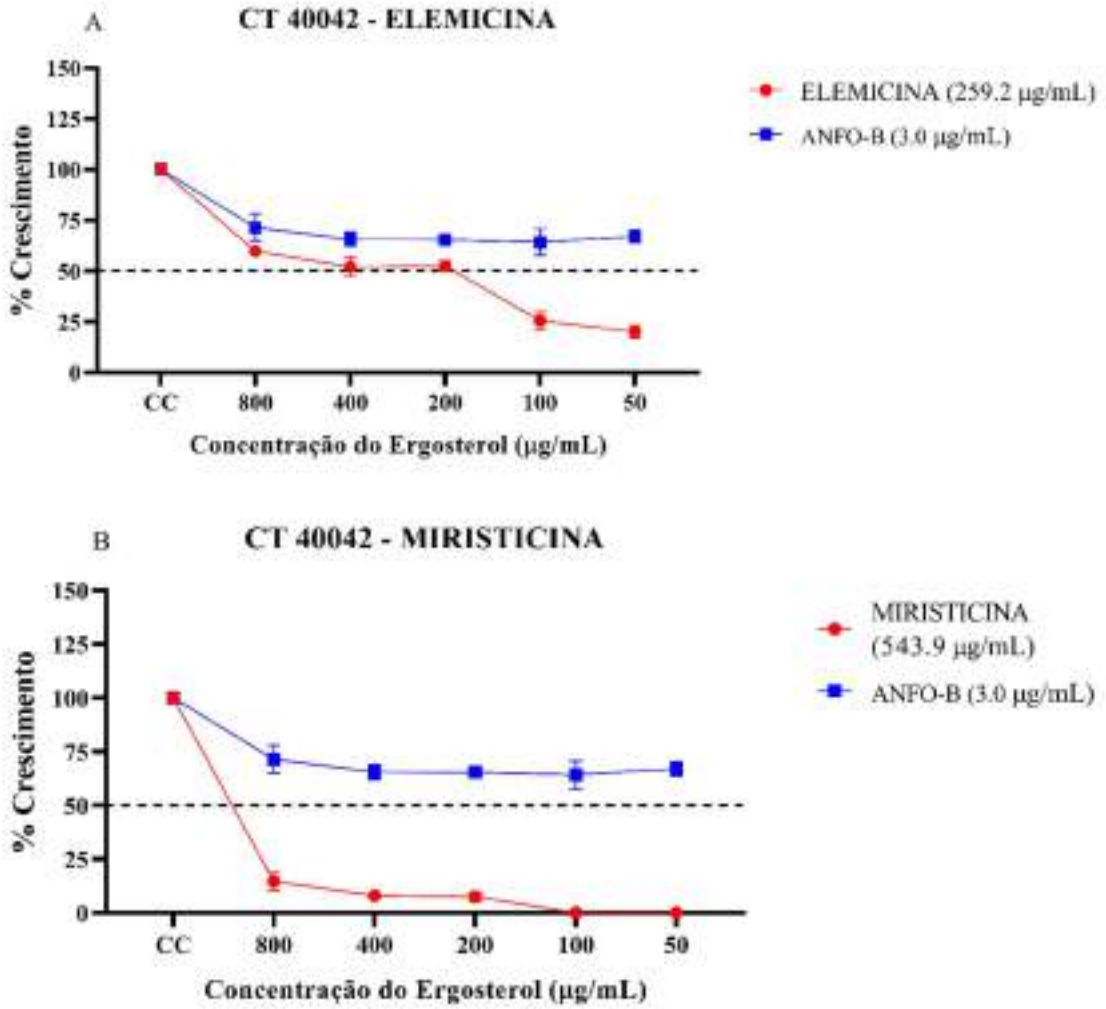
Entre os compostos testados, apenas a elemicina mostrou comportamento semelhante: sua IC_{50} aumentou proporcionalmente à concentração do ergosterol livre, indo de 22 a 40,4 % de crescimento fúngico para CA, e 20 a 59,7 % para CT, indicando provável interação com o esterol e consequente redução da atividade antifúngica. Em contraste, a miristicina manteve sua eficácia antifúngica mesmo na presença de altas concentrações de ergosterol livre, chegando a 6,8 % para CA e 14,7 % para CT de crescimento fúngico na presença de 800 µg/mL do esterol, sugerindo que sua ação não depende da ligação a este componente de membrana. Os resultados podem ser observados nas figuras 5 e 6.

Figura 5. Análise da atividade antifúngica da elemicina (A) e miristicina (B), na presença de ergosterol livre, comparados a anfotericina – B contra *Candida albicans*.



CA: *Candida albicans* ATCC 10231; ANFO-B: Anfotericina - B; CC: Controle de crescimento; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

Figura 6. Análise da atividade antifúngica da elemicina (A) e miristicina (B), na presença de ergosterol livre, comparados a anfotericina – B contra *Candida tropicalis*.



CT: *Candida tropicalis* ATCC 13803; ANFO-B: Anfotericina - B; CC: Controle de crescimento; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

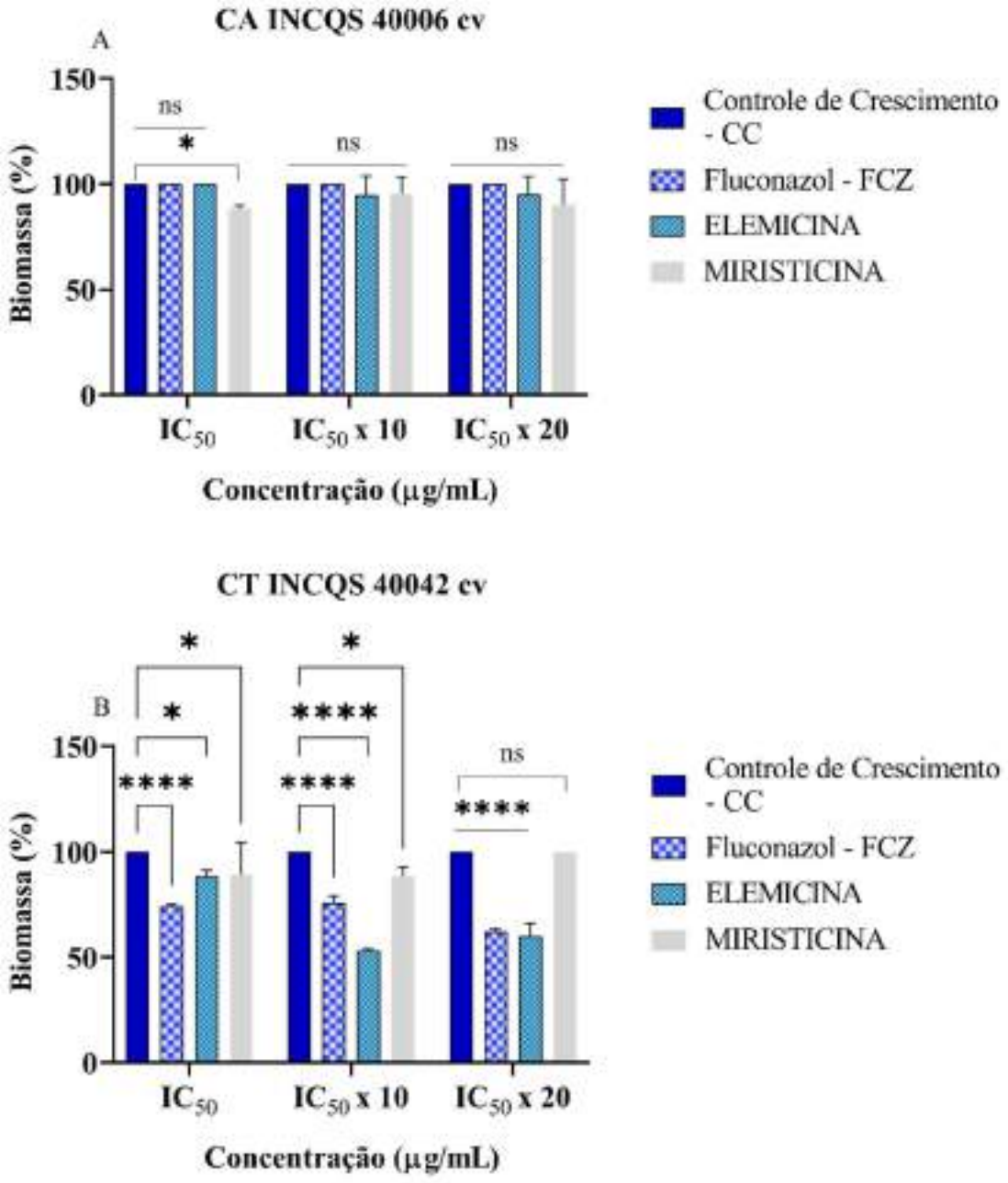
3.3. Efeito da miristicina e elemicina na biomassa de *C. albicans* e *C. tropicalis.*

Para *C. albicans*, nenhum dos compostos testados – incluindo fluconazol – foi capaz de promover redução significativa da biomassa do biofilme, mesmo em concentrações elevadas, indicando uma alta resistência da estrutura madura do biofilme dessa espécie ao fluconazol, comumente usado para tratar infecções por esse patógeno. Em contraste, os resultados obtidos para *C. tropicalis* foram mais promissores. O fluconazol apresentou redução gradual da biomassa conforme aumentava a concentração do fármaco, indo de 25 a 37,7 % entre IC_{50} até IC_{50} x 20.

A elemicina demonstrou desempenho semelhante, com destaque para a concentração de IC_{50} x 10, na qual superou o fluconazol na erradicação do biofilme, com uma redução de 47 %. Por outro lado, a miristicina não apresentou atividade relevante contra o biofilme de *C.*

tropicalis mesmo em concentrações elevadas, mantendo os níveis de biomassa comparáveis ao controle negativo. Os resultados podem ser observados na Figura 7.

Figura 7. Efeito da miristicina e elemicina na biomassa de *Candida albicans* (A) e *Candida tropicalis* (B) comparados ao fluconazol.



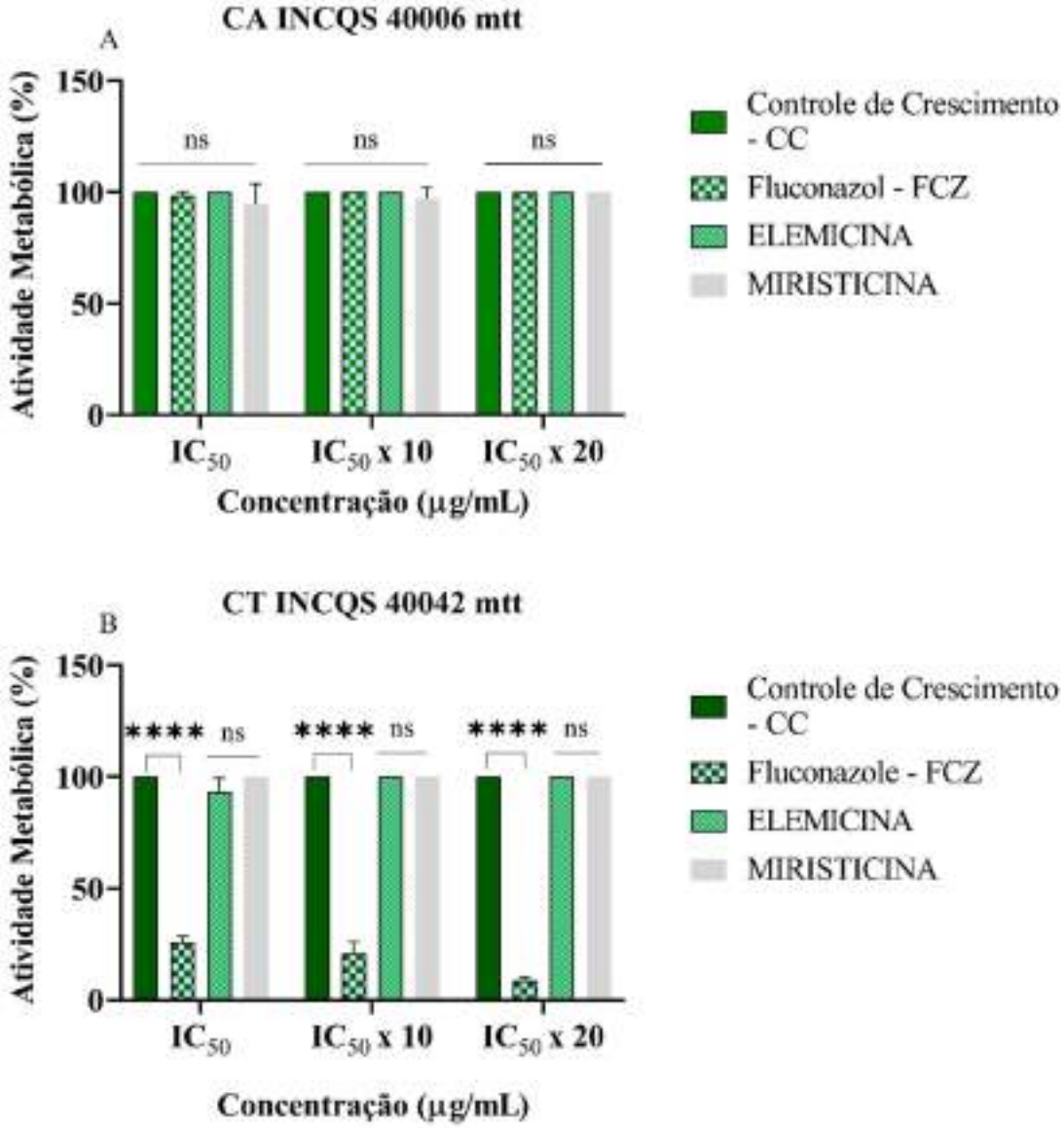
CA: *Candida albicans* ATCC 10231; CT: *Candida tropicalis* ATCC 13803; FCZ: fluconazol; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; cv: cristal violeta; ns: não significante; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

3.4. Efeito da miristicina e elemicina na atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis.*

Assim como observado na quantificação da biomassa, não houve redução significativa da atividade metabólica nos biofilmes maduros de *C. albicans* para nenhum dos compostos avaliados, incluindo o fluconazol, reforçando sua resistência à erradicação em estágio maduro. Entretanto, os biofilmes de *C. tropicalis* responderam de forma mais sensível ao tratamento com fluconazol, o qual apresentou eficácia crescente na redução da atividade metabólica conforme se aumentava sua concentração, chegando a uma inibição máxima de 91,3 % na IC_{50} x 20, indicando que ele não só controla o crescimento e desenvolvimento da biomassa do biofilme, como também é fungicida sobre suas células.

Curiosamente, embora a elemicina tenha reduzido a biomassa de *C. tropicalis*, não houve diminuição da atividade metabólica em nenhuma das concentrações testadas. Este resultado sugere que a elemicina pode atuar limitando o crescimento ou a estrutura do biofilme, sem necessariamente inviabilizar as células fúngicas presentes. Os dados podem ser observados na figura 8.

Figura 8. Efeito da miristicina e elemicina na atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* (A) e *Candida tropicalis* (B) comparados ao fluconazol.



CA: *Candida albicans* ATCC 10231; CT: *Candida tropicalis* ATCC 13803; FCZ: fluconazol; CC: Controle de crescimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; mtt: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo; ns: não significante; Significância estatística: $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

3.5. Análise do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e similaridade medicamentosa.

Em uma análise topológica do potencial de lipofilicidade molecular (MLP), é possível observar de que forma as contribuições polares e apolares afetam a lipofilicidade dos derivados miristicina e elemicina (Figura 9a). Com os resultados, é possível notar que a superfície dos compostos é essencialmente hidrofóbica, com forte contribuição da cadeia lateral alifática contendo um alceno isolado (*blue color spectra*). Como contribuição polar, os compostos apresentam grupos oxigenados do tipo R-O-R, onde a superfície polar de 9.23 Å² resulta na

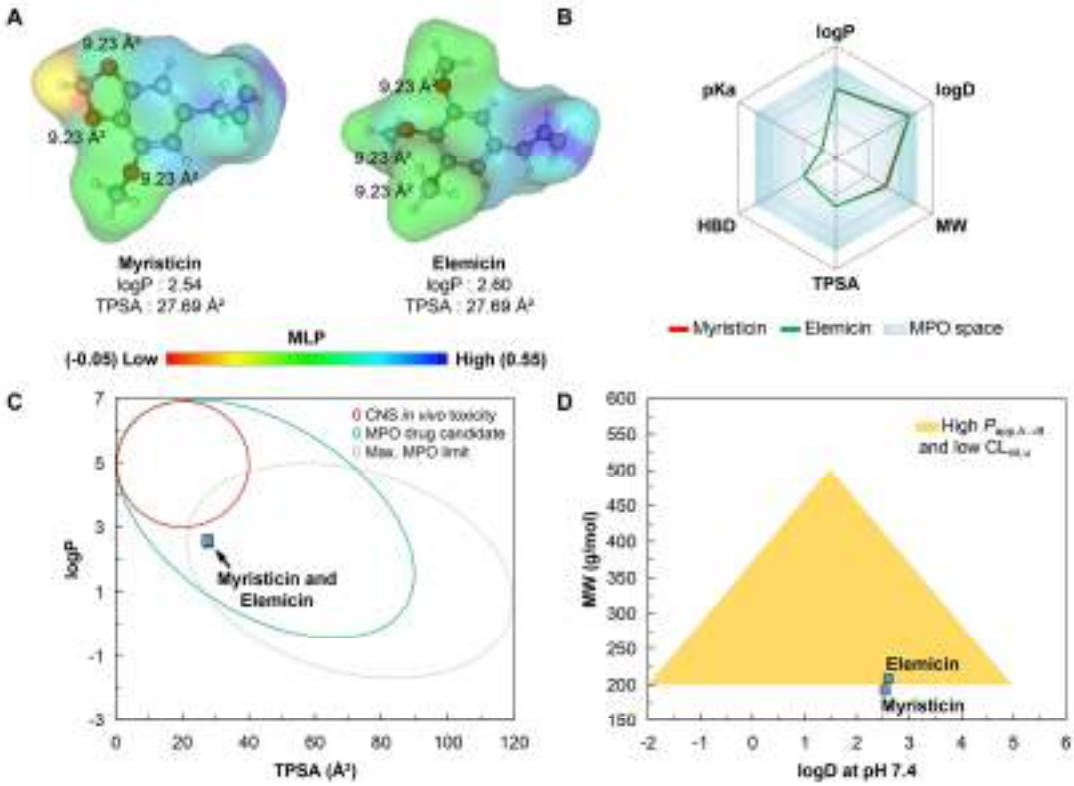
formação de regiões ligeiramente hidrossolúveis (green color spectra) (Ertl, 2007). Por outro lado, o anel heterocíclico oxigenado do derivado miristicina se destaca pela formação de uma superfície hidrofílica (yellow color spectra), resultando em um logP na ordem de 2.54 que indica a formação de uma espécie química menos lipofílica em relação a elemicina, com valor de logP calculado em 2.60 (Figura 8A).

No radar de MPO (Figure 9b), é possível observar que os compostos não apresentam doadores de Ligação de Hidrogênio (HBD), indicando que são compostos de baixa polaridade topológica (TPSA < 40 Å²) e com tendência a serem mais lipofílicas em pH fisiológico (logD > 2). A semelhança nas pontuações de MPO, calculadas em 5.12 e 5.09 (respectivamente miristicina e elemicina), em uma escala que varia de 0.0 a 6.0, revela características físico-químicas semelhantes, seguindo basicamente as tendências da química medicinal estimadas pela Pfizer, Inc., (Tabela 1).

A Figura 9c mostra o alinhamento entre o coeficiente de partição (LogP) e a área de superfície polar topológica (TPSA), onde a miristicina e elemicina apresentaram valores de 2,54 e 2,60 respectivamente para LogP e 27,69 Å² para TPSA em ambas as substâncias, estando dentro dos parâmetros desejáveis. Na figura 8d, o peso molecular (MW) da miristicina ficou em 192.21 g/mol, enquanto a elemicina foi de 208,26 g/mol (≤ 360 g/mol), sendo alinhado com o coeficiente de partição (LogD) de 2,54 e 2,60 (≤ 2) para os compostos respectivamente, para gerar um gráfico onde podem ser observados a permeabilidade passiva (região em amarelo $P_{app, A-B}$), onde a elemicina está mais inserida, e uma região branca de baixa depuração hepática ($CL_{int,u}$), onde a miristicina está presente.

Esses valores foram estimados por predição ADMET de acordo com as propriedades de Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), onde foi possível observar que os valores $P_{app,A\rightarrow B}$ Caco-2 ficaram em $2,65 \times 10^{-5}$ cm/s para miristicina e $2,02 \times 10^{-5}$ cm/s para elemicina, e $P_{app,A\rightarrow B}$ MDCK em $1,96 \times 10^{-5}$ e $1,62 \times 10^{-5}$ cm/s para ambas as substâncias respectivamente. Os valores estimados de $CL_{int,u}$ estão entre 5.5 e 7.2 mL/min/kg (respectivamente miristicina e elemicina) e podem ser observados na tabela 2. Ainda, podem ser observados dados importantes como a VDss, que mede o volume de distribuição no estado estável, ficando na ordem de 2.31 e 1.47 L/kg para miristicina e elemicina respectivamente.

Figura 9. Resultados da análise MLP e similaridade medicamentosa de miristicina e elemicina.



(A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP), (B) radar MPO para estimativa de similaridade a fármacos, (C) alinhamento entre logP e TPSA para estimativa do espaço físico-químico ocupado por miristicina e elemicina em relação ao espaço físico-químico de fármacos e candidatos a fármacos da Pfizer, Inc., e (D) alinhamento entre MW e logD em pH 7,4 para estimativa do perfil de permeabilidade celular passiva (Papp,A→B) e depuração hepática (CLint,u).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas calculadas para miristicina e elemicina e aplicadas aos critérios de pontuação do algoritmo MPO da Pfizer, Inc.

Propriedade	**Miristicina**	**Elemicina**
logP	2.54	2.60
logD at pH 7.4	2.54	2.60
MW	192.21 g/mol	208.26 g/mol
TPSA	27.69 Å²	27.69 Å²
HBD	0	0
pKa	-4.54	-4.45
MPO score	5.12	5.09

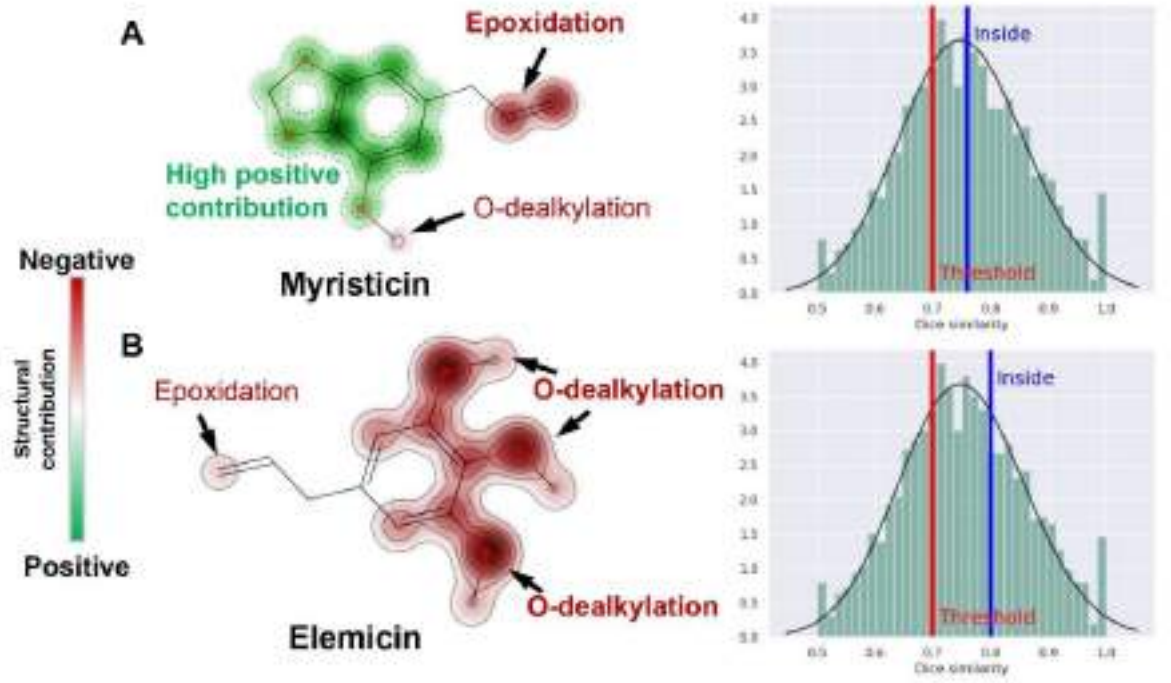
Tabela 2. Propriedades farmacocinéticas previstas para miristicina e elemicina expressos em descritores PAMPA, metabolismo e toxicidade.

Propriedade	Miristicina	Elemicina
$P_{app,A\rightarrow B}$ Caco-2	2.65×10^{-5} cm/s	2.02×10^{-5} cm/s
$P_{app,A\rightarrow B}$ MDCK	1.96×10^{-5} cm/s	1.62×10^{-5} cm/s
P-gp	Não-substrato	Não-substrato
$CL_{int,u}$	5.56 mL/min/kg	7.21 mL/min/kg
VDss	2.31 L/kg	1.47 L/kg
CYP2D6	Não-substrato	Não-substrato
CYP3A4	Substrato	Substrato
DILI	0.51	0.40
Ames	0.46	0.37

Quanto a predição de toxicidade, o Drug-Induced Liver Injury (DILI) apresentou valores de 0,51 para miristicina e 0,40 para elemicina, sendo desejável valores de até 0,5. Da mesma forma, o preditivo de amex para mutagenicidade apresentou 0,46 para miristicina e 0,37 para elemicina, sendo ideal valores inferiores a 0,5 (Tabela 2).

Com os resultados da predição do sítio de metabolismo, foi possível observar que a estrutura química da miristicina apresenta um alceno isolado com alta especificidade estrutural, suscetível a epoxidação dependente de hidroxilação alifática, sendo metabolizado majoritariamente pela isoforma CYP3A4 (Figura 10a). Por outro lado, a elemicina apresenta três grupos metoxila (R-OCH3) que reduzem a sensitividade de epoxidação do alceno isolado, uma vez que este fragmento é altamente sensitivo ao metabolismo de fase I em uma baixa especificidade estrutural (ZHENG *et al.*, 2009). É válido ressaltar que as predições performaram dentro de um limiar estatístico de similaridade estrutural superior a 0.7 com substâncias tóxicas e reativas, garantindo a confiabilidade do modelo preditivo (Figura 10).

Figura 10. Mapa de suscetibilidade 2D da previsão do local do metabolismo e gráfico de similaridade estrutural para (A) Miristicina e (B) Elemicina.



As regiões verdes indicam alta contribuição positiva para o metabolismo, enquanto as áreas vermelhas indicam suscetibilidade à epoxidação e O-desalquilação.

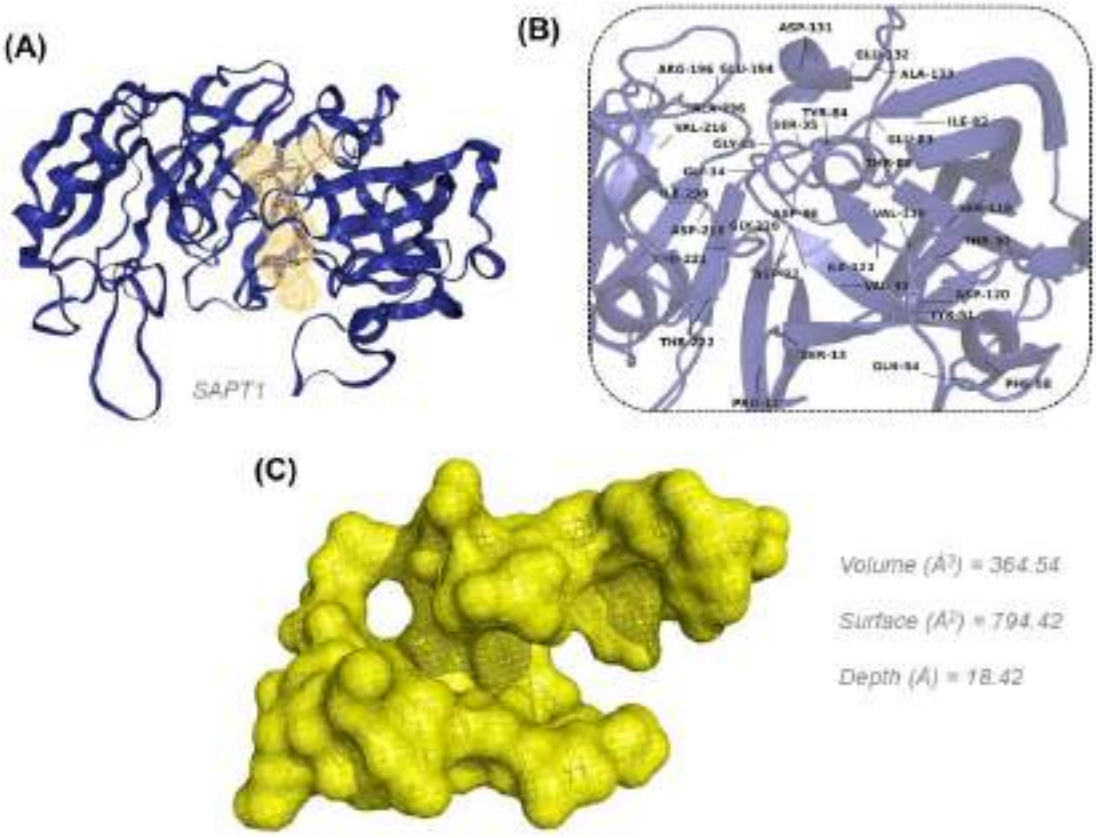
3.6. Análise de encaixe molecular

Com a realização das simulações de *docking* molecular foram destacadas todas as melhores poses resultantes das simulações. Dentre os resultados é ressaltado os valores de RMSD e energia de afinidade de todos os ligantes tetrapeptídeo (co-cristalizado), fluconazol, elemicina e miristicina associados ao receptor biológico SapT1, apresentando valores iguais a (1,945 Å e -5,1 kcal/mol), (1,227 Å e -7,3 kcal/mol), (1,785 Å e -5,0 kcal/mol) e (1,693 Å e -5,8 kcal/mol), respectivamente. Já relacionado ao receptor Sap5 foram formados complexos com os ligantes pepstatina A (co-cristalizado), um inibidor clássico de aspartil proteases, fluconazol, elemicina e miristicina, com resultados de RMSD e energia de afinidade iguais a (1.435 Å e -5,9 kcal/mol), (1,072 Å e -6,9 kcal/mol), (1,854 Å e -4,8 kcal/mol) e (1,159 Å e -5,9 kcal/mol), sequencialmente. Ao tratar dos complexos formados com o receptor alvo Cyp51, os sistemas foram formados com os ligantes posaconazol (co-cristalizado), fluconazol, elemicin e miristicina com os valores iguais a (1,843 Å e -11,3 kcal/mol), (1,681 Å e -8,1 kcal/mol), (0,155 Å e -6,4 kcal/mol) e (1,777 Å e -6,8kcal/mol), respectivamente. Para o alvo Als3 foram formados complexos com os ligantes fluconazol, elemicina e miristicina, apresentando os valores de RMSD e energia de afinidade iguais a (0,909 Å e -7,1 kcal/mol), (1,795 Å e -5,1 kcal/mol) e (1,069 Å -5,6 kcal/mol), respectivamente. Por fim o receptor Gln-NAc, onde os complexos foram formados com os ligantes fluconazol, elemicina e miristicina apresentado os

respectivos valores de RMSD e energia de afinidade (1,730 Å e -7,2 kcal/mol), (1,686 Å e -4,8) e (1,680 Å e -5,6 kcal/mol).

Ao tratar das principais cavidades do receptor biológico da *C. tropicalis*, é apresentada na Figura 11 (A) o receptor SapT1 com sua cavidade de interações destacadas em amarelo, apresentado a sua visualização global e estimando uma possível rota para interações com o receptor. Segundo os dados, o volume da cavidade do sítio apresenta um valor igual a 364,42 ($Å^3$), enquanto a superfície referente a esta cavidade apresenta um valor igual a 794.42 ($Å^2$) e profundidade de 18.42 (Å). Já relacionado a todos os resíduos de aminoácidos presentes em torno da cavidade são apresentados na Figura 11 (B). A visualização tridimensional da superfície que envolve todos os resíduos de aminoácidos da cavidade prevista pelas simulações do *Proteinplus* está presente na Figura 11 (C), onde é apresentada a cavidade em que os ligantes podem exercer possíveis interestações e apontar como poderá ser a ordenação dos ligantes no sítio previsto.

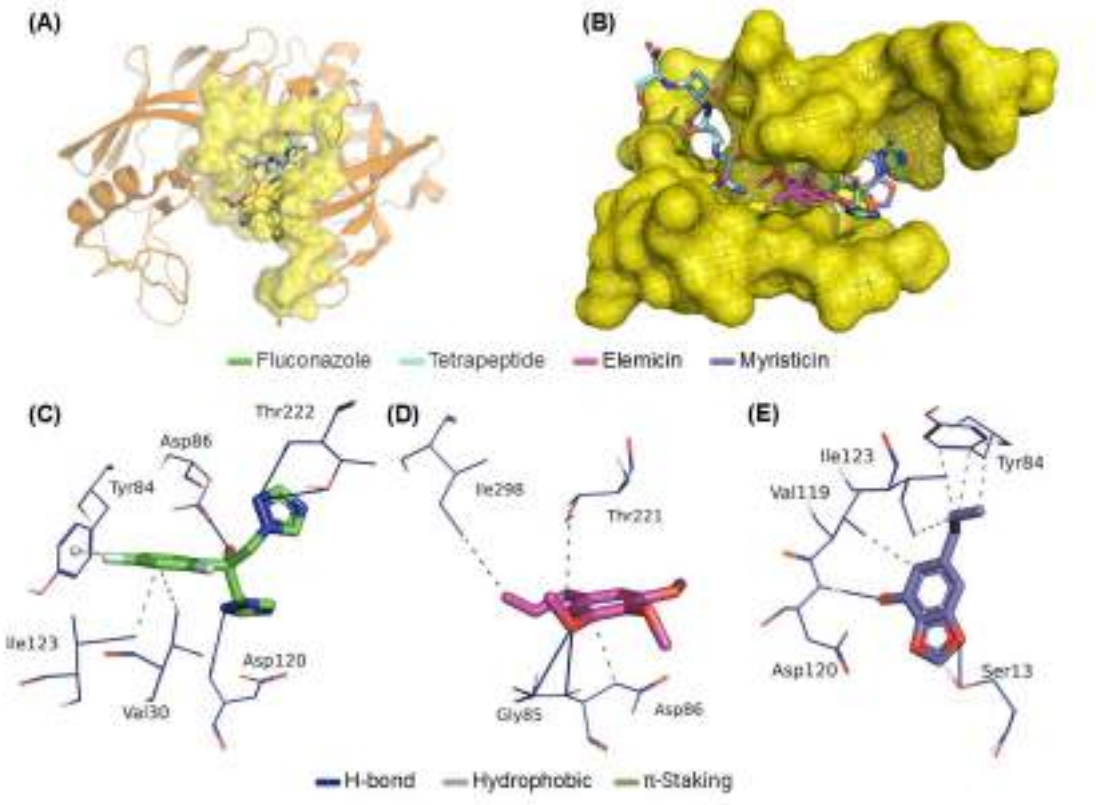
Figura 11. Estrutura da proteína SapT1 e seu principal sítio de interação.



(A) Cavidade prevista pelo protein plus do receptor SapT1, (B) resíduos de aminoácidos presentes em torno da cavidade, (C) superfície em torno de todos dos aminoácidos presentes no sítio; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ALA: Alanina; GLU: Glutamato; VAL: Valina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; ILE: Isoleucina; THR: Treonina: SER: Serina; GLN: Glutamina; PHE: Fenilalanina.

Com as devidas simulações de *docking* molecular é possível observar a projeção de afinidade de todos os ligantes apresentados na Figura 12 (A), que aponta todas as regiões de interação exercida entre os ligantes e o receptor alvo SapT1, apresentando a região global de interação com todos os ligantes simulados. Pelas simulações de *docking* molecular, é observado na Figura 12 (B) a presença dos ligantes tetrapeptideo (ciano), fluconazol (verde), elemicina (rosa) e miristicina (lilás). Já relacionado a todas as interações formadas entre o ligante fluconazol inseridos na cavidade prevista por simulações composta pelos resíduos de aminoácidos, na Figura 12 (C), são observadas todas as interações formadas entre o fármaco de referência com seis resíduos de aminoácidos Thr222, Asp86, Tyr84, Ile123, Val30, Asp120. Ainda relacionada as interações, foram observados na Figura 12 (D) a contribuição do ligante elemicina, onde exerceu interações com quatro resíduos do sítio divididos em Ile298, Thr221, Gly85 e Asp86. Com a análise da formação de complexos, é destacado a participação de cinco resíduos e aminoácidos frente ao ligante miristicina na Figura 12 (E), composto pelos resíduos Val119, Ile123, Tyr84, Asp120 e Ser13, com os principais valores de distancias e o tipo de interação presente na Tabela 3.

Figura 12. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor SapT1.



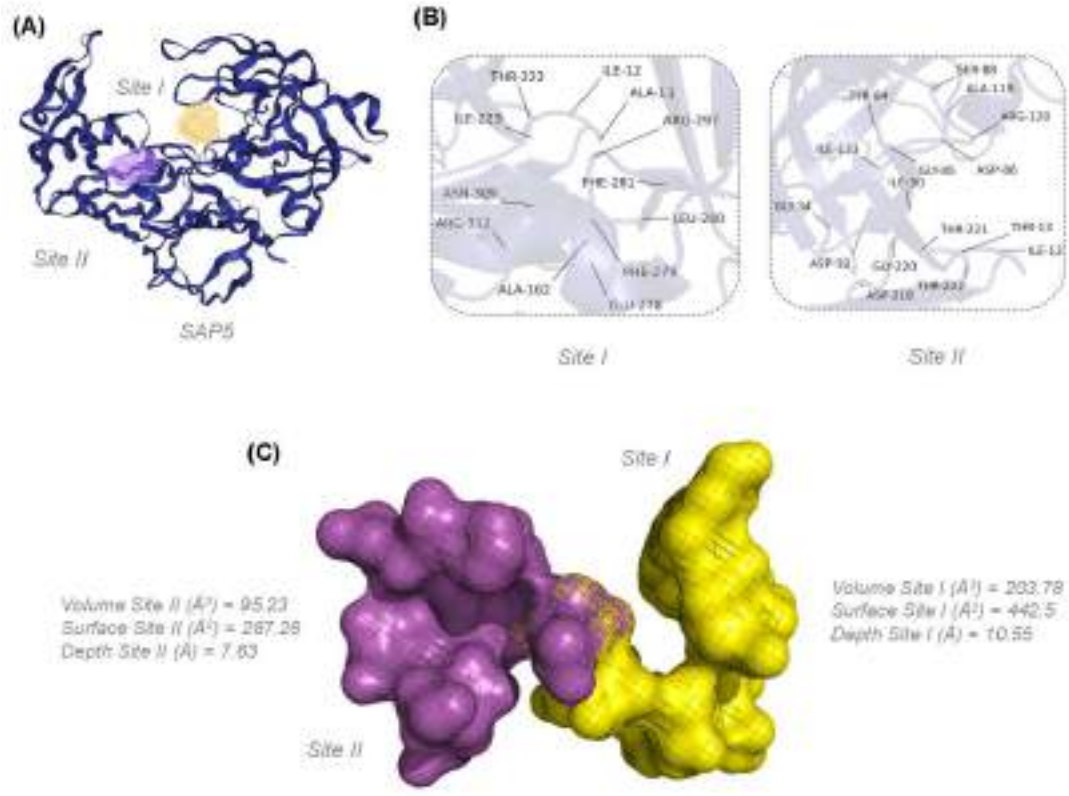
Docking molecular dos ligantes com o receptor SapT1 (A) posição global dos ligantes, (B) ligantes inseridos no sítio na cavidade predita no servidor (C) interações do fluconazol, (D)

formação de interações com a elemicina, (E) o ligante miristicina; ASP: Aspartato; VAL: Valina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; ILE: Isoleucina; THR: Treonina: SER: Serina.

Segundo os dados apresentados na Figura 12, é possível destacar que a região de afinidade foi similar entre o fármaco de referência fluconazol, amplamente utilizado contra *C. tropicalis*, para análise comparativa (Silva *et al.*, 2022), e os ligantes elemicina e miristicina. Dentre todas as interações, é possível observar que a elemicina apresentou apenas uma interação com o resíduo Asp86, enquanto na miristicina foram destacadas interações com três resíduos similares ao fluconazol, destacados pelos resíduos Ile123, Tyr84 e Asp120. Esses dados apontam que ambos os ligantes avaliados apresentam potencial afinidade quando comparado com o fármaco de referência, sendo que a miristicina demonstra potencial ainda mais favorável pelo fato de apresentar um maior número de interações com os resíduos de aminoácidos do sítio de referência.

Ao tratar dos possíveis sítios de interações do receptor alvo Sap5 da *C. albicans*, o servidor online *Proteinplus* apresentou na Figura 13 (A) dois sítios divididos em site I (amarelo) e site II (roxo). A composição de todos os resíduos de aminoácidos dos respectivos sítios estimados é destacada na Figura 13 (B), demonstrando duas possíveis cavidades para a formação de complexos de interação. Já referente a superfície que envolve todos os resíduos de aminoácidos é apontado na Figura 13 (C), onde a cavidade referente ao sítio I apresentou volume igual a 203,78 ($Å^3$), sua superfície de 442,5 ($Å^2$) e profundidade de 10,55 (Å). Já referente ao sítio II o volume é de 95,23 ($Å^3$), superfície 287,26 ($Å^2$) e profundidade de 7,63 (Å), demonstrando que a primeira cavidade proposta apresenta um tamanho maior quando comparado com a segunda.

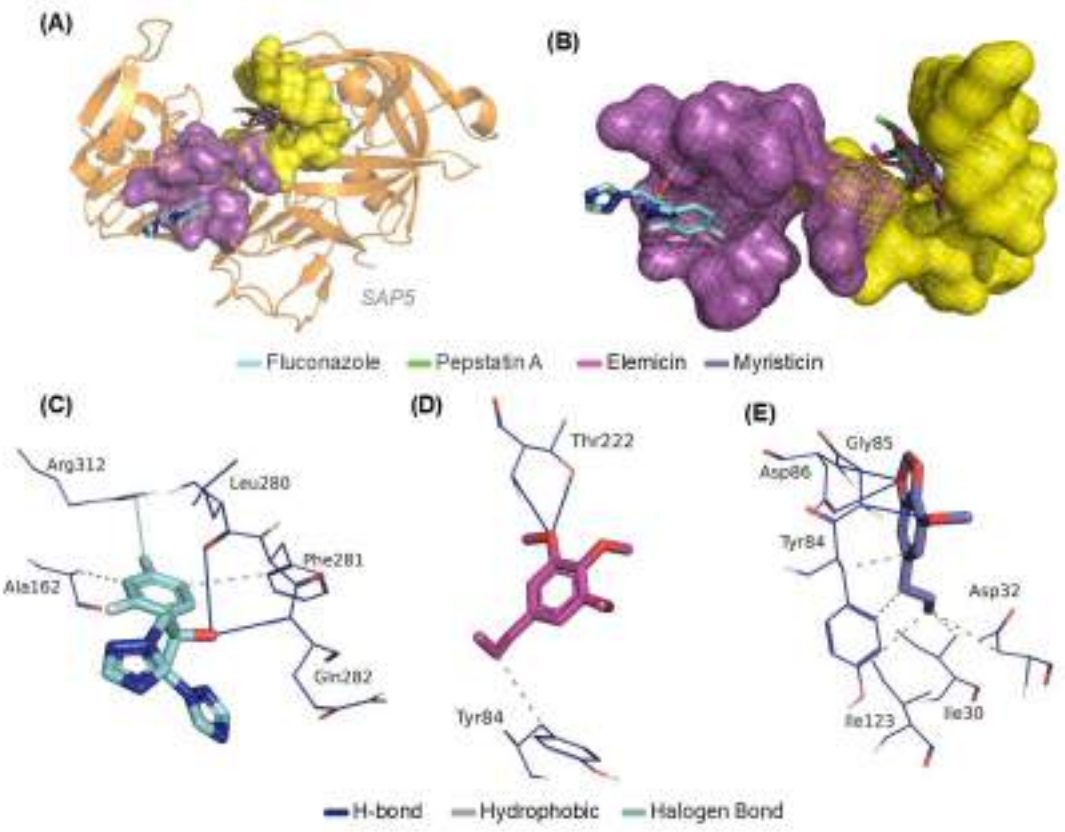
Figura 13. Estrutura da proteína SAP5 e seus principais sítios de interação.



Cavidade de interações do receptor SAP5 (A) visão tridimensional das cavidades dos sítios I e II, (B) resíduos de aminoácidos dos sitos I e II, (C) superfície em torno de todos os resíduos de aminoácidos referente ao sítio I e II; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ALA: Alanina; ASN: Asparagina; GLU: Glutamato; VAL: Valina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; ILE: Isoleucina; THR: Treonina: SER: Serina; PHE: Fenilalanina; LEU: Leucina.

Já referente as simulações de *docking* molecular com o receptor alvo SAP5, os resultados presentes na Figura 14 (A) apontaram que ocorreram interações em locais distintos do receptor alvo, onde os ligantes pepstatina A, elemicina e miristicina estão presentes no sítio I (amarelo), enquanto o fármaco de referência apresentou afinidade no segundo sítio de interação (roxo). Na Figura 14 (B) é apresentada a ampliação da cavidade de predição com a presença dos ligantes, formando complexos e expressando a região de maior afinidade. Referente a todas as interações exercidas entre os ligantes e os resíduos do sítio de interação na Figura 14 (C), foram observadas interações entre o fluconazol e cinco resíduos de aminoácidos separados em Arg312, Ala162, Leu280, Phe281 e Gln282, enquanto o ligante elemicina exerceu interações com apenas dois resíduos Thr222 e Tyr84 como observado na Figura 14 (D). Já tratando da Figura 14 (E), foi destacado a presença de interações entre a miristicina frente a seis resíduos divididos em Gly85, Asp86, Tyr84, Asp32, Ile30 e Ile123, com todos os valores de distâncias e os tipos de interação inseridos na Tabela 3.

Figura 14. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor SAP5.



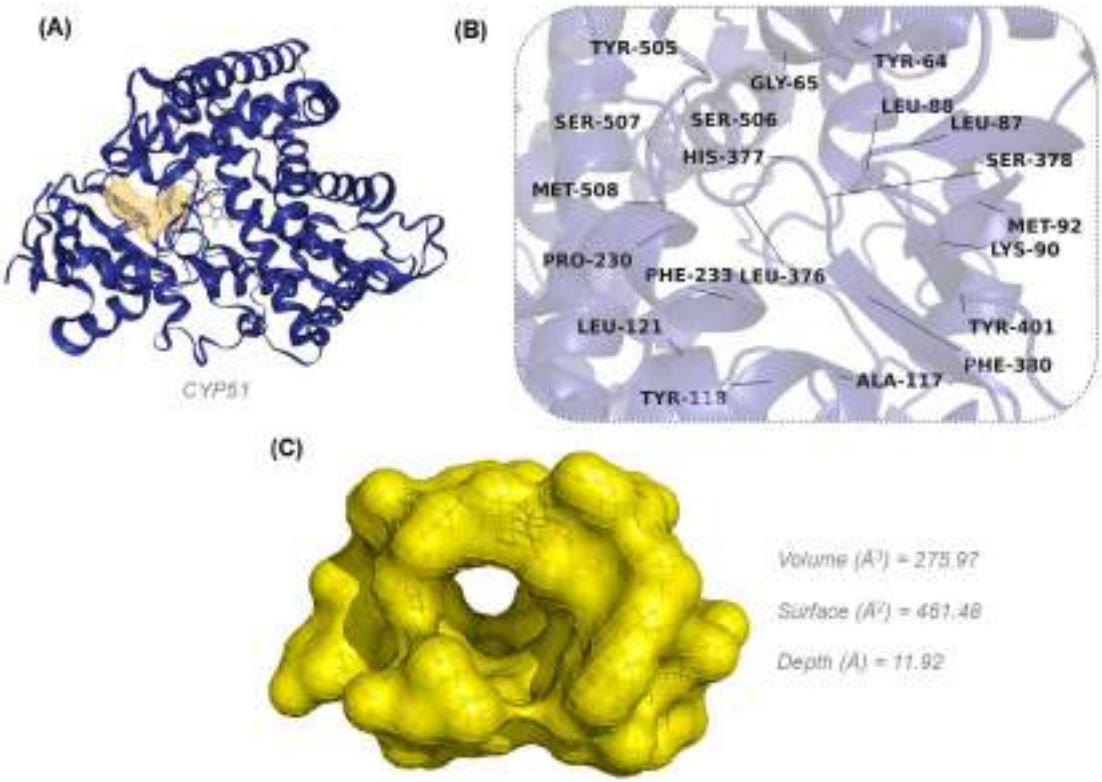
Complexos formados com a SAP5 (A) posição global de todas os complexos junto a superfície do sítio, (B) Análise ampliada da superfície do sítio e os ligantes em sua cavidade, (C) interações com fármaco fluconazol, (D) interações formadas com a elemicina e (E) interações com a contribuição do ligante miristicina; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ALA: Alanina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; ILE: Isoleucina; GLN: Glutamina; PHE: Fenilalanina.

Em decorrências das interações formadas entre os ligantes e os resíduo do sítio de interação é possível observar que o fármaco fluconazol demonstrou maior afinidade com o segundo sitio predito pela plataforma, enquanto os ligantes elemicina e miristicina demonstraram uma maior afinidade com os resíduos do primeiro sítio de interação, atuando diretamente com os resíduos de aminoácidos presente na cavidade de predição, demonstrando um elevado potencial de afinidade e consequentemente expondo o potencial de inibição favorável dos ligantes elemicina e miristicina, caracterizada pela triagem comparativa com o fármaco fluconazol frente a *C. albicans* (Martin, 1999; Rana; Sharma; Kumar, 2019).

Referente as simulações de *docking* molecular com a CYP51 é possível destacar na Figura 15, o principal sítio de interações prevista pela plataforma (amarelo). Na posição (A) da figura é destacada a visão geral do receptor alvo onde é ressaltada a cavidade da CYP51, apontando a principal região de interação que pode ser formada entre os ligantes e o receptor alvo. Na Figura 15 (B) é apresentado todos os resíduos de aminoácidos que compõe o principal sítio de interação, sendo estimado como possível rota para estimar a inibição da atividade

catalítica. Já referente a Figura 15 (C) é possível observar a superfície que sobrepõe todos os resíduos de aminoácidos presentes na principal região de interações, onde a cavidade prevista apresentou um volume total de 275,97 ($Å^3$), enquanto a superfície apresentou um valor igual a 461,48 ($Å^2$) e sua profundidade igual a 11,92 (Å).

Figura 15. Estrutura da proteína Cyp51 e seus principais sítios de interação.

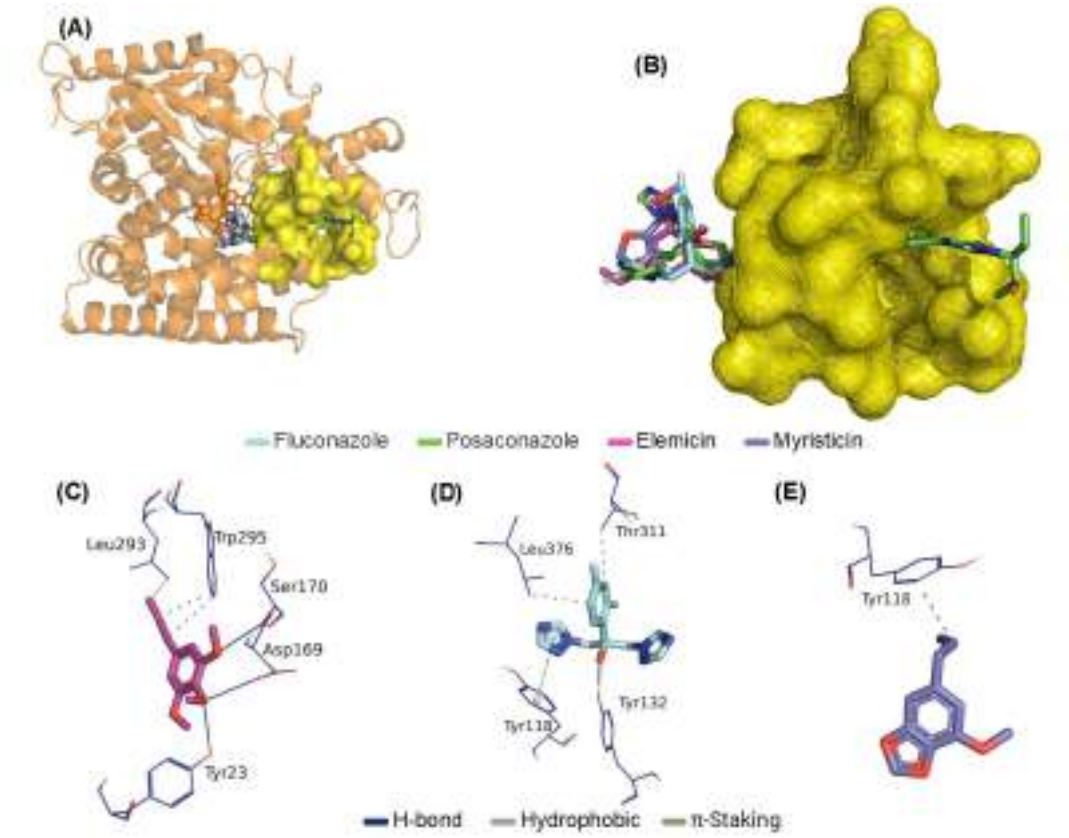


Predição do principal sítio da Cyp51 (A) visão global da cavidade do sítio em projeção ao receptor (B) Resíduos de aminoácidos do sítio de interações (C) superfície principal que envolve todos os resíduos de aminoácidos; ALA: Alanina; HIS: Histidina; LEU: Leucina; LYS: Lisina; MET: Metionina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; SER: Serina; PRO: Prolina; PHE: Fenilalanina.

Para as simulações de *docking* molecular entre os ligantes e o receptor da Cyp51, é ressaltado na Figura 16 (A) todas as regiões de afinidade entre os ligantes e toda a superfície dos resíduos de aminoácidos, com uma visualização mais ampliada representada na Figura 16 (B), onde são apresentadas todas as preferências de cada ligante ao formar complexo com a região de maior afinidade, apontando as contribuições do fluconazol (ciano), elemicina (rosa) e miristicina (lilás). Ao tratar de todas as interações, é destacado na Figura 16 (C) a participação de cinco resíduos de aminoácidos divididos em Leu293, Trp295, Ser170, Asp169 e Tyr23 formando complexo com a elemicina, enquanto o fluconazol presente na Figura 16 (D), exerceu interações com quatro resíduos de aminoácidos separados em Leu376, Thr311, Tyr118 e

Tyr132. Ao tratar das possíveis interações formadas entre a miristicina na Figura 16 (E), foi destacado apenas uma interação com o resíduo Tyr118. Nesta perspectiva, todos os tipos de interação e distâncias estão presentes na Tabela 3.

Figura 16. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Cyp51.



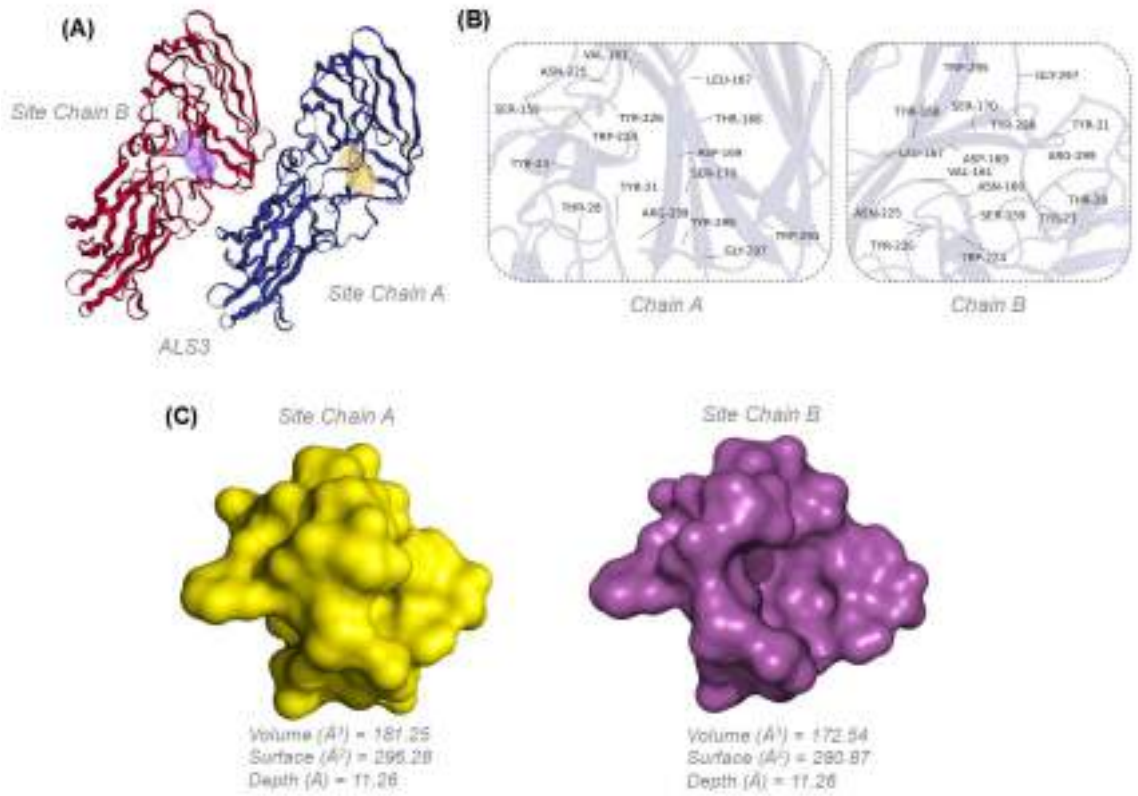
Docking molecular com o receptor alvo Cyp51 (A) visualização global com todos os ligantes avaliados (B) superfície de resíduos de aminoácidos com os ligantes avaliados (C) interações com a elemicina (D) interações formadas com o fluconazol (E) formação de interações com a miristicina; ASP: Aspartato; TYR: Tirosina; ILE: Isoleucina; THR: Treonina: TRP: Triptofano; SER: Serina; LEU: Leucina.

Ao avaliar as interações formadas entre os ligantes em complexo com o receptor alvo Cyp51, é observado que nem um dos três ligantes apresentaram interações direta com os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade de interação predita, mas em comparação com o fármaco analisado é possível ressaltar que apenas o ligante miristicina apresentou interação similar caracterizado pela contribuição do resíduo de aminoácido Tyr118, demonstrando o potencial de inibição da miristicina devidamente associado por interações similares, quando comparado com o fármaco de referência.

Ao tratar do receptor Als3, alvo relacionado a *C. albicans*, foi observado na Figura 17 (A) a predominância na participação das duas cadeias (A e B), com a contribuição de duas cavidades especificas em cada domínio do receptor, sendo que na cadeia A a cavidade foi

representada pela cor amarela e para a cadeia B a cavidade apresenta a cor roxa. Na Figura 17 (B) é apresentado todos os resíduos de aminoácidos presentes em ambas as cadeias que estão alocadas na mesma região de cada cadeia. Já na Figura 17 (C) são observadas todas as superfícies principais do alvo biológico sendo divididas para a cadeia A (amarelo) que possui os valores de 181,25 ($Å^3$) para o volume da cavidade, com 296,28 ($Å^2$) relacionado a superfície e a profundidade igual a 11,26 (Å). Já relacionado a segunda cavidade alocada na cadeia B (roxo) os seus valores são iguais a 172,54 ($Å^3$) para o volume, 280,87 ($Å^2$) referente a superfície e profundidade igual a 11,26 (Å).

Figura 17. Estrutura da proteína Als3 e seus principais sítios de interação.

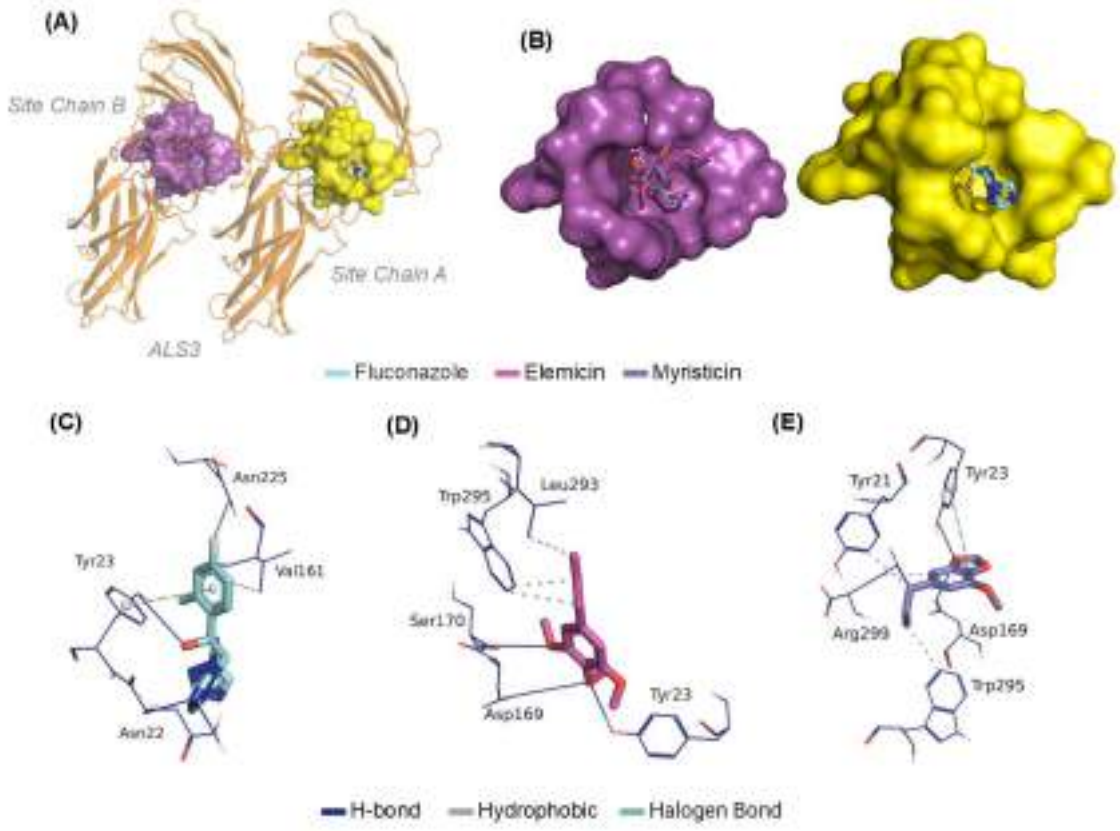


Cavidade de interações prevista no receptor Als3. (A) visão global de ambas as cadeias com a presença de suas respectivas cavidades (B) resíduos de aminoácidos referentes as cavidades das cadeias A e B (C) superfície de ambos os resíduos de aminoácidos; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ALA: Alanina; ASN: Asparagina; LEU: Leucina; VAL: Valina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; THR: Treonina; TRP: Triptofano; SER: Serina.

Ao tratar das simulações de *docking* molecular com o receptor Als3, é observado na Figura 18 (A) a visão global das duas cadeias com suas respectivas superfícies em complexos com os ligantes fluconazol (ciano), elemicina (rosa) e miristicina (lilás), onde foram observaras as contribuições em ambas as cadeias. Na Figura 18 (B) é destacada a ampliação do sito de interação dos ligantes fluconazol (chain A), enquanto a elemicina e miristicina formaram

complexos na cavidade da cadeia B. Na Figura 18 (C) é apresentada todas as interações formadas entre o fluconazol com quatro resíduos de aminoácidos (Asn225, Val161, Tyr23 e Asn22), enquanto para a elemicina presente na Figura 18 (D) foram constatadas interações com cinco resíduos de aminoácidos (Trp295, Leu293, Ser170, Asp169 e Tyr23), sendo que apenas o resíduo Tyr23 apresenta similaridade com o fármaco de referência. Já relacionado a miristicina na Figura 18 (E), foram observadas interações com cinco resíduos de aminoácidos (Tyr21, Tyr23, Arg299, Asp169, Trp295), possuindo apenas a Tyr23 como resíduo similar com o fármaco de referência. Todos os valores de distâncias e tipos de interações são observados na Tabela 3.

Figura 18. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Als3.



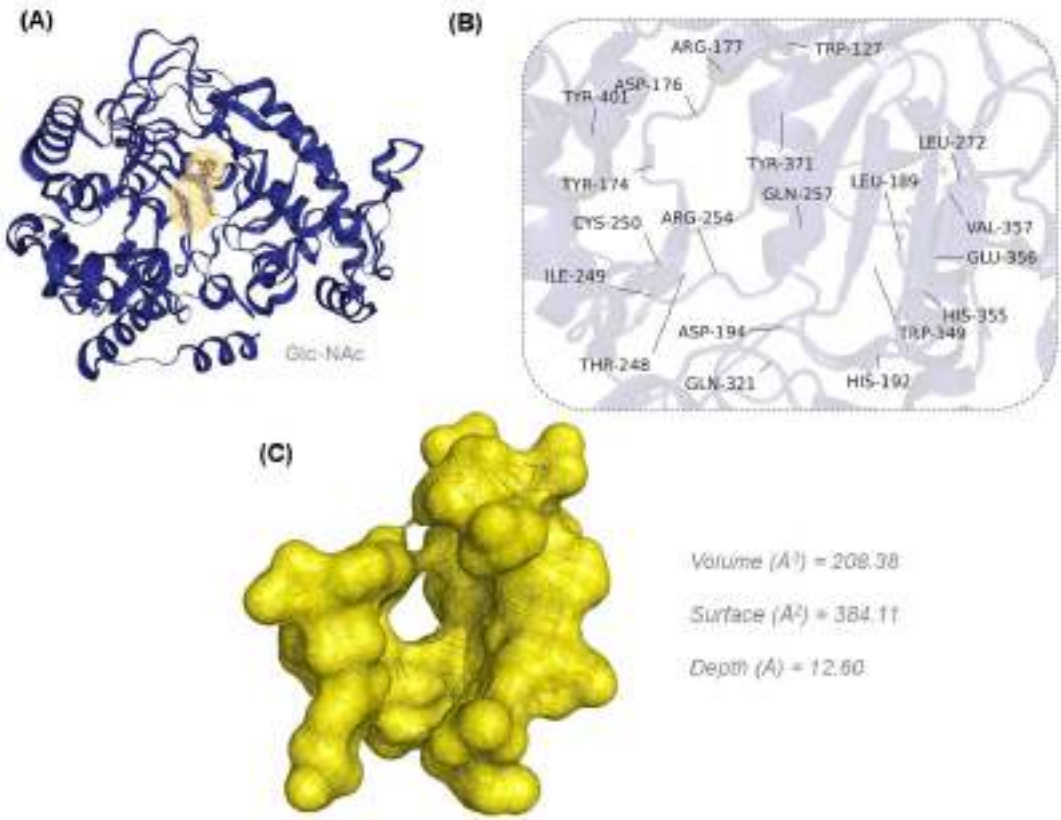
Docking molecular com o alvo Als3 (A) visão global dos complexos formados (B) complexos ampliados com seus respectivos ligantes com as superfícies (C) interações com o fármaco fluconazol (D) interações do ligante elemicina (E) interações formadas com a miristicina; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ASN: Asparagina; TYR: Tirosina; SER: Serina; VAL: Valina.

Pelos dados das simulações de *docking* molecular é possível destacar que mesmo os ligantes estarem em cadeias diferentes, os sítios de interações foram relativamente similares, pois o fármaco de referência apresentou contribuições com seis resíduos de aminoácidos referentes a cadeia A, os ligantes elemicina e miristicina formaram complexo na cavidade da

cadeia B, sendo detectado a similaridade de apenas um resíduo de aminoácido (Tyr23), para ambos os ligantes, demonstrando potencial de inibição da Als3 da *C. albicans*.

Ainda referente a *C. albicans*, é possível destacar a cavidade principal do receptor biológico Glc-NAc, onde os resultados apontaram a predominância de uma região ampla (amarelo) desatacado na Figura 19 (A). Na cavidade prevista na Figura 19 (B) é apontado todos os resíduos de aminoácidos que estão presentes na formação do sítio de interação. Já na Figura 19 (C), é apresentado o modelo de superfície que encobre todos os resíduos de aminoácidos listados, sendo que a cavidade expressa o valor do volume central igual a 208,38 ($Å^3$), sua superfície é igual a 384,11 ($Å^2$) e a profundidade de 12,60 (Å), demonstrado a possível região de interações referente ao receptor avaliado e estimando as possíveis contribuições que os ligantes podem desempenhar durante as simulações.

Figura 19. Estrutura da proteína Gln-NAc e seus principais sítios de interação.

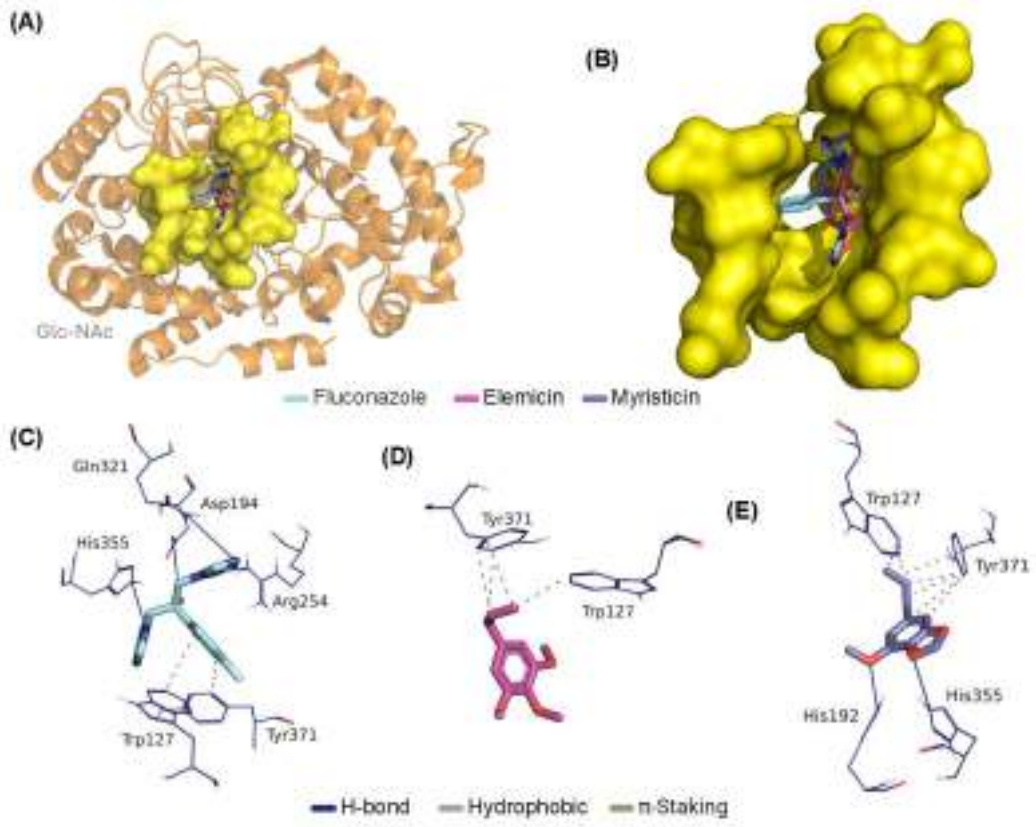


Predição do sítio de interação do receptor Gln-NAc. (A) visualização global da cavidade do receptor biológico (B) resíduos de aminoácidos que compõe a cavidade de interesse (C) superfície tridimensional dos resíduos de aminoácidos; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; CYS: Cisteína; GLU: Glutamato; VAL: Valina; TYR: Tirosina; ILE: Isoleucina; THR: Treonina: TRP: Triptofano; GLN: Glutamina; HIS: Histidina.

Ao tratar das simulações de *docking* molecular com o receptor Gln-NAc é possível observar na Figura 20 (A) a formação do complexo entre os ligantes fluconazol (ciano),

elemicina (rosa) e miristicina (lilás), todos inseridos dentro da cavidade previstas pela simulação do sítio no receptor alvo. A ampliação da cavidade de interação junto com os complexos dos ligantes são destacados na Figura 20 (B). É possível ressaltar que todos os ligantes apresentaram afinidade com a mesma região do receptor biológico, demonstrando uma elevada especificidade com a região de interação. Ao avaliar todas as interações formadas pelas simulações, é destacado na Figura 20 (C) que o fármaco de referência fluconazol exerceu interações com seis resíduos de aminoácidos presentes no sítio de interação, sendo destacado por Gln321, Asp194, Arg254, His355, Trp127 e Tyr371. Já referente a todas as contribuições do ligante elemicina inserido na Figura 20 (D), foi ressaltado que o ligante exerceu interações apenas com dois aminoácidos (Tyr371 e Trp127), sendo dois resíduos similares quando comparados com o fluconazol (referência). O ligante miristicina presente na Figura 20 (E) formou interações com quatro resíduos de aminoácidos, representados por Trp127, Tyr371, His192 e His355, onde apenas a His192 não integra os resíduos referente ao sítio do fluconazol. Todos os valores de distâncias e o tipo de interação formada são devidamente destacadas na Tabela 3.

Figura 20. *Docking* molecular dos ligantes com o receptor Glc-NAc.



Docking molecular dos compostos frente ao receptor Glc-NAc (A) visão global dos complexos com a superfície de interação (B) ampliação do complexo com ênfase na superfície de aminoácidos (C) interações formadas entre o ligante fluconazol e os resíduos de aminoácidos

(D) contribuição da elemicina (E) interações realizadas pela miristicina; ARG: Arginina; ASP: Aspartato; HIS: Histidina; TYR: Tirosina; TRP: Triptofano.

Segundo os resultados das simulações com o receptor Glc-NAc, é possível destacar que o fármaco de referência e os demais ligantes apresentaram uma maior afinidade com a região da cavidade prevista, apresentado potencial de inibição favorável.

Tabela 3. Valores de distâncias e tipos de interações formadas pelos complexos avaliados nas simulações de *docking* molecular.

SAPT1/LIGANTE	RESIDUO	INTERAÇÃO	DISTÂNCIA (Å)
FLUCONAZOL	Val30	Hidrofóbico	3.77
	Ile123	Hidrofóbico	3.38
	Asp86	Ligação de Hidrogênio	2.48
	Asp120	Ligação de Hidrogênio	2.68
	Thr222	Ligação de Hidrogênio	2.87
	Thr222	Ligação de Hidrogênio	3.20
	Tyr84	Interação π-π	4.98
ELEMICINA	Asp86	Hidrofóbico	3.73
	Thr221	Hidrofóbico	3.84
	Ile298	Hidrofóbico	3.78
	Gly85	Ligação de Hidrogênio	2.25
	Asp86	Ligação de Hidrogênio	3.13
MIRISTICINA	Tyr84	Hidrofóbico	3.64
	Tyr84	Hidrofóbico	3.72
	Tyr84	Hidrofóbico	3.85
	Val119	Hidrofóbico	3.18
	Ile123	Hidrofóbico	3.63
	Ser13	Ligação de Hidrogênio	3.08
	Asp120	Ligação de Hidrogênio	2.19
SAP5/LIGANTE	**RESIDUO**	**INTERAÇÃO**	**DISTÂNCIA (Å)**
FLUCONAZOL	Ala162	Hidrofóbico	3.95
	Phe281	Hidrofóbico	3.91
	Leu280	Ligação de Hidrogênio	2.62
	Gln282	Ligação de Hidrogênio	2.56
	Arg312	Halogen Bond	3.77
ELEMICINA	Tyr84	Hidrofóbico	3.73
	Thr222	Ligação de Hidrogênio	2.33
	Thr222	Ligação de Hidrogênio	2.15
MIRISTICINA	Ile30	Hidrofóbico	3.55
	Asp32	Hidrofóbico	3.93

	Tyr84	Hidrofóbico	3.53
	Tyr84	Hidrofóbico	3.62
	Ile123	Hidrofóbico	3.65
	Gly85	Ligação de Hidrogênio	2.19
	Asp86	Ligação de Hidrogênio	3.33
	Asp86	Ligação de Hidrogênio	3.23
CYP51/LIGANTE	**RESIDUO**	**INTERAÇÃO**	**DISTÂNCIA (Å)**
FLUCONAZOL	THR311	HIDROFÓBICO	3.68
	Leu376	Hidrofóbico	3.91
	Tyr132	Ligação de Hidrogênio	2.88
	Tyr118	Interação π-π	4.67
ELEMICINA	Leu293	Hidrofóbico	3.76
	Trp295	Hidrofóbico	3.86
	Trp295	Hidrofóbico	3.53
	Tyr23	Ligação de Hidrogênio	2.16
	Asp169	Ligação de Hidrogênio	3.35
	Ser170	Ligação de Hidrogênio	2.73
MIRISTICINA	Tyr118	Hidrofóbico	3.57
ALS3/LIGANTE	**RESIDUO**	**INTERAÇÃO**	**DISTÂNCIA (Å)**
FLUCONAZOL	Val161	Hidrofóbico	3.62
	Asn22	Ligação de Hidrogênio	2.10
	Asn22	Ligação de Hidrogênio	2.67
	Tyr23	Ligação de Hidrogênio	3.14
	Tyr23	Interação π-π	5.22
	Asn225	Halogen Bond	3.22
ELEMICINA	Leu293	Hidrofóbico	3.76
	Trp295	Hidrofóbico	3.86
	Trp295	Hidrofóbico	3.53
	Tyr23	Ligação de Hidrogênio	2.16
	Asp169	Ligação de Hidrogênio	3.35
	Ser170	Ligação de Hidrogênio	2.73
MIRISTICINA	Tyr21	Hidrofóbico	3.62
	Trp295	Hidrofóbico	3.64
	Arg299	Hidrofóbico	3.82
	Tyr23	Ligação de Hidrogênio	2.19
	Asp169	Ligação de Hidrogênio	2.82
	Tyr23	Interação π-π	5.26
GLC-NAC/LIGANTE	**RESIDUO**	**INTERAÇÃO**	**DISTÂNCIA (Å)**
FLUCONAZOL	Trp127	Hidrofóbico	3.95
	Tyr371	Hidrofóbico	3.51
	Asp194	Ligação de Hidrogênio	2.90
	Arg254	Ligação de Hidrogênio	2.81

	Gln351	Ligação de Hidrogênio	3.33
	His355	Ligação de Hidrogênio	2.90
ELEMICINA	Trp127	Hidrofóbico	3.59
	Tyr371	Hidrofóbico	3.86
	Tyr371	Hidrofóbico	3.61
	Tyr371	Hidrofóbico	3.83
MIRISTICINA	Trp127	Hidrofóbico	3.64
	Tyr371	Hidrofóbico	3.27
	Tyr371	Hidrofóbico	3.67
	His192	Ligação de Hidrogênio	2.16
	His355	Ligação de Hidrogênio	3.18

ARG: Arginina; ASP: Aspartato; ALA: Alanina; ASN: Asparagina; GLU: Glutamato; VAL: Valina; TYR: Tirosina; GLY: Glicina; ILE: Isoleucina; LEU: Leucina; THR: Treonina; SER: Serina; GLN: Glutamina; PHE: Fenilalanina; HIS: Histidina; TRP: Triptofano.

4. DISCUSSÃO

Candida spp. destaca-se por sua notável capacidade de adaptação ao ambiente, característica intimamente relacionada ao seu dimorfismo. Essa flexibilidade morfológica permite ao fungo alternar entre as formas leveduriforme e filamentosa, em um processo reversível que está associado ao seu potencial invasivo. Nessa transição, os filamentos fúngicos podem aderir aos tecidos hospedeiros, secretar enzimas hidrolíticas e, consequentemente, provocar danos teciduais (Farhan *et al.*, 2024).

Considerando a importância da morfologia para o comportamento patogênico de *Candida spp.*, Carneiro e colaboradores (2019) revelaram que a análise dessas alterações morfológicas se torna uma ferramenta relevante para compreender os efeitos de diferentes agentes sobre fatores de virulência. Em seus estudos, o óleo essencial de *Piper diospyrifolium*, foi capaz de inibir o crescimento micelial de *C. albicans* e *C. tropicalis* de forma significante nas concentrações de 512 e 1024 µg/mL. De forma semelhante, Leal *et al.* (2019) conseguiu inibir a formação micelial de *C. albicans* e *C. tropicalis* utilizando óleo essencial de *P. rivinoides*, porém em concentrações mais altas de 4096 µg/mL.

Esses resultados corroboram os achados no presente trabalho, onde as substâncias isoladas do óleo essencial de *P. rivinoides* apresentaram inibição ou redução da formação de hifas apenas em concentrações mais elevadas (512 µg/mL), com a miristicina sendo a única capaz de inibir completamente a formação de hifas em *C. tropicalis*. É importante notar que, no teste da interação com o ergosterol, esterol presente na membrana nesses fungos, a elemicina apresentou um perfil mais próximo da droga padrão – anfotericina-B – que a miristicina. Este dado torna-se relevante pela ligação indireta que este componente tem com o dimorfismo

fúngico, uma vez que atua crescimento, fluidez e forma como o fungo regula a atividade enzimática que ocorre na membrana (Tanwar; Kalra; Bari, 2024).

Embora essa relação não esteja completamente definida, um estudo recente conduzido por Wang *et al.* (2024) mostrou que, ao inibir a biossíntese do ergosterol, o desenvolvimento de hifas em *C. albicans* foi suprimido, ação provocada pela imunoglobulina A secretora (sIgA), destacando esse esterol como um regulador crucial da interação fungo-hospedeiro. Isso pode explicar o porquê do fluconazol inibir completamente a transição morfológica já em baixas concentrações, uma vez que sua atividade antifúngica está relacionada a conversão da lanosterol em ergosterol, reduzindo sua biodisponibilidade na membrana plasmática e comprometendo a integridade e fluidez necessárias para o crescimento hifal (Tanwar; Kalra; Bari, 2024; Ivanov *et al.*, 2022; Katsipoulaki *et al.*, 2024).

De acordo com Katsipoulaki *et al.* (2024), a transição morfológica de levedura para hifa em *C. albicans* é controlada por uma complexa rede de fatores regulatórios, incluindo as vias Cek1-MAPK, Ras-cAMP, Hog1-MAPK e Tor1, que também influenciam a formação de biofilmes. Segundo o autor, os biofilmes de *C. albicans* são compostos por uma camada basal de células leveduriformes das quais emanam hifas. Katsipoulaki destaca, ainda, que a coordenação entre reguladores transcricionais — como BCR1, EFG1, NDT80, ROB1, TEC1, BRG1, FLO8, GAL4 e RFX2 — e complexos de remodelação de cromatina, como SWI/SNF, RSC e a histona desacetilase Sir2, é essencial para a regulação da filamentação e, por consequência, para o desenvolvimento de biofilmes.

Esses aspectos ajudam a compreender os resultados obtidos neste estudo. Embora as vias regulatórias da morfogênese e da formação de biofilme compartilhem componentes comuns (Katsipoulaki *et al.*, 2024), cada composto pode interferir em pontos distintos dessas redes. Isso pode explicar o fato de a miristicina ter promovido inibição completa da formação de hifas em *C. tropicalis* na concentração de 512 μg/mL, sem, contudo, exercer efeito significativo sobre a biomassa ou a atividade metabólica dos biofilmes maduros de ambas as espécies testadas. Em contraste, a elemicina apresentou efeito oposto, não interferindo na transição morfológica, mas exibindo atividade antibiofilme superior à do fluconazol ($IC_{50} \times 10$) no controle da biomassa do biofilme de *C. tropicalis*.

Em pesquisa de Chaucanés *et al.* (2023), utilizando compostos fenólicos extraídos de *Piper nigrum*, os autores sugerem que a diferença da atividade antibiofilme entre espécies de *Candida* podem estar relacionados a processos metabólicos distintos presentes no biofilme de cada espécie. Essa interpretação é consistente com Katsipoulaki *et al.* (2024), que demonstraram que os biofilmes de *C. albicans* apresentam uma estrutura altamente filamentosa, regulada por uma complexa rede de fatores transcricionais, enquanto *C. glabrata* forma

biofilmes menos estruturados e dependentes de vias distintas, o que reforça a existência de variações metabólicas e fisiológicas entre as espécies.

Considerando o papel e a relevância de determinados fatores relacionados à membrana desses microrganismos, as análises por docking molecular envolvendo proteínas essenciais para formação das membranas, parede e, consequentemente, alongamento das hifas, como é o caso da CYP51, ALS3 e Gln-NAc (Farhan *et al.*, 2024; Kim; Cheng; Land, 2022; Naseem *et al.*, 2011) contribuem para elucidar os dados obtidos nesse trabalho e na literatura. A CYP51, responsável por catalisar a transformação do lanosterol em ergosterol (Kim; Cheng; Land, 2022), apresentou interação com a miristicina no resíduo de aminoácido Tyr118, de forma semelhante ao observado para o fluconazol, droga de referência cujo mecanismo de ação está diretamente associado a essa proteína (Vanzolini *et al.*, 2024).

No caso da proteína ALS3, tanto a miristicina quanto a elemicina interagiram exclusivamente com o aminoácido Tyr23, assim como o fluconazol. No entanto, a miristicina estabeleceu ligação tanto por interações de hidrogênio quanto por Interação π-π ao Tyr23, o que é sugestivo de uma ligação mais estável (Carter-Fenk; Herbert, 2020). Essa proteína de superfície é encontrada nas hifas de *C. albicans* e facilita a adesão de células de levedura com diferentes tipos celulares, como epiteliais, endoteliais e proteínas da matriz extracelular (Farhan *et al.*, 2024).

Na análise entre os compostos isolados, observa-se que a miristicina apresentou um maior número de interações formadas, envolvendo três resíduos do sítio catalítico (Trp127, Tyr371 e His355 à referência), demonstrando potencial relevante de inibição especialmente pela formação do complexo entre a miristicina e o receptor Glc-NAc. A N-acetilglucosamina (GlcNAc) é uma molécula fundamental em *Candida*, pois atua na sinalização e regulação das transições morfológicas em *C. albicans* e *C. tropicalis* (Lew; Lin, 2021), corroborando a eficácia superior da miristicina no controle do dimorfismo fúngico nessas espécies em comparação à elemicina.

Em testes anteriores, utilizando as mesmas substâncias e linhagens fúngicas (Fonseca *et al.*, 2025), foi observado que a miristicina apresentou resultados superiores quando combinado ao fluconazol no combate a *C. albicans* e *C. tropicalis,* em comparação com a elemicina. Por outro lado, a elemicina sozinha demonstrou maior eficácia que a miristicina e o óleo essencial, indicando que estes atuam por mecanismos distintos. Além disso, os dados indicam que a miristicina possui um mecanismo de ação mais próximo ao do fármaco de referência, o fluconazol.

Miristicina também interagiu de forma semelhante ao fluconazol quando comparado a elemicina no receptor SapT1 e SAP5. Essas proteínas fazem parte das aspartil-proteases

secretadas, que são responsáveis pela degradação de proteínas e metabolização de nutrientes em células hospedeiras, além de romper membranas por hidrolise, conferindo capacidade de invasão dos tecidos a *Candida* (Farhan *et al.*, 2024). Esses resultados mostram que a miristicina pode interagir de forma combinada com o fluconazol para combater infecções fúngicas de forma semelhante. É importante ressaltar que no estudo de Fonseca *et al.* (2025), apenas a elemicina apresentou ação fungicida, enquanto a miristicina foi exclusivamente fungistatica, a semelhança do fluconazol (Lu *et al.*, 2021). De acordo com Sharma *et al.* (2019), inibir processos de virulência sem matar microrganismos comensais é crucial para reduzir pressões evolutivas que contribuem para a resistência microbiana.

Esses resultados sugerem que, o óleo essencial de *P. rivinoides* contém dois compostos com atividade antifúngica, cada um atuando por mecanismos distintos. Dessa forma, um dos compostos pode ser utilizado em associação ao fluconazol, potencializando seus efeitos, enquanto o outro apresenta eficácia significativa quando empregado isoladamente.

Visando um direcionamento para o desenvolvimento de novos medicamentos, foram realizadas predições de ADMET baseada em MPO. Os dados revelam um MPO score de 5,12 para miristicina e 5,09 para elemicina, onde o coeficiente de partição foi menor que três, a permeabilidade das substâncias através de uma membrana celular expressa em $P_{app,A\rightarrow B}$ foi maior que 10 x 10^{-6} cm/s, além de não serem transportadas pela glicoproteína-P (P-gp) e depuração hepática menor que oito, colocando a miristicina e elemicina dentro dos parâmetros de viabilidade farmacocinética da Pfizer and Gold Triangle (Hughes, Jason *et al.*, 2008; Johnson; Dress; Edwards, 2009).

Segundo Wager *et al.* (2016), compostos não-ionizáveis em pH fisiológico, que são pouco lipofílicos (logP ≤ 3) e mais polares do que compostos ativos no sistema nervoso central (TPSA > 20-40 Å²), apresentam um alinhamento entre alta permeabilidade em membranas celulares ($P_{app,A\rightarrow B} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s), baixo risco de efluxo por P-gp e baixa taxa de depuração hepática ($C_{Lint,u} < 8.0$ mL/min/kg) (Pettersson *et al.*, 2016; Wager *et al.*, 2016). Estes atributos farmacocinéticos estão diretamente relacionados com a absorção oral e estabilidade metabólica de diversas drogas, e são empregados em modelos preditivos para seleção de substâncias com maior biodisponibilidade oral (Johnson; Dress; Edwards, 2009; Van De Waterbeemd; Gifford, 2003).

Também foram realizadas predições dos sítios de metabolismo para ambos os compostos isolados. Esse teste é essencial para correlacionar o metabolismo hepático com respostas tóxica-orgânica, tais como drug-induced liver injury (DILI) (Guengerich, 2021). O metabolismo de fase I, mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450), envolve reações de oxidação e redução que afetam grupos oxigenados e centros insaturados, resultando em

metabólitos secundários que podem ser tanto ativos quanto altamente reativos. Essas modificações influenciam tanto a biodisponibilidade dos fármacos quanto a dose oral administrada (KLON, 2010; YU *et al.*, 2014). Um desses metabólitos é formado pela epoxidação, um intermediário instável gerado pela hidroxilação de centros insaturados, com potencial de reatividade frente a macromoléculas como proteínas e DNA (Hughes, Tyler; Miller; Swamidass, 2015).

Em nossos testes, a predição dos sítios de metabolismo indicou que, embora a elemicina apresente um número maior de "soft-points" para metabolismo de fase I, é menos propensa a epoxidação, o que resulta em menor risco tóxico quando comparado à miristicina. Corroborando esse achado, observou-se que a miristicina é mais propensa a induzir danos hepáticos por ativação metabólica (DILI > 0.5) enquanto seu análogo elemicina, apresentou menos tendência a causar lesões hepáticas e mutagenicidade. Esses resultados sugerem que a elemicina é mais segura para administração oral do que a miristicina.

Embora miristicina e elemicina pertençam ao grupo dos alquenilbenzenos, cujos alguns derivados são conhecidos por sua toxicidade, como o safrol e o metileugenol (Götz *et al.*, 2022), esses compostos apresentam diferenças estruturais. Tanto a miristicina quanto elemicina possuem um substituinte metoxi adicional no núcleo benzênico, em comparação ao safrol e ao metileugenol, respectivamente. As reações de desmetilação oxidativa desses compostos no núcleo benzênico diferem das observadas no safrol e no metileugenol, resultando em padrões diferentes de metabólitos urinários em humanos após a ingestão (Götz *et al.*, 2022). Essas características tornam os compostos estudados no presente trabalho mais adequados ao consumo, e consequentemente corroboram com os dados encontrados nos testes *in sílico*.

5. CONCLUSÃO

Modelos computacionais avançados podem fornecer dados relevantes para corroborar resultados obtidos *in vitro* e orientar o desenvolvimento racional de novos agentes antifúngicos. Apesar de suas contribuições, é importante reconhecer que tais modelos ainda simplificam a complexidade biológica, o que pode limitar a fidelidade em relação ao comportamento das moléculas em sistemas *in vivo*.

Os dados obtidos neste estudo indicam uma possível atividade antibiofilme, em estágios iniciais do desenvolvimento, dos compostos analisados, considerando que diversos fatores preditos *in silico* estão diretamente e indiretamente associados à formação do biofilme, como as interações com CYP51, ALS3 e GlcNAc. Os testes *in vitro* reforçaram essa hipótese: a

elemicina demonstrou eficácia na redução da biomassa de *C. tropicalis*, enquanto a miristicina inibiu a transição morfológica, sugerindo atuação em diferentes etapas da formação do biofilme.

Diante disso, novos ensaios são necessários para validar os achados das simulações e aprofundar a investigação da atividade antibiofilme. Embora a elemicina apresente um perfil de segurança mais favorável, a miristicina também se enquadra nos parâmetros estabelecidos pela Pfizer, indicando que ambos os compostos possuem viabilidade como candidatos a fármacos antifúngicos. Os dados sugerem que miristicina e elemicina atuam por mecanismos distintos, o que amplia as possibilidades de aplicação terapêutica e destaca o óleo essencial de *Piper rivinoides* como uma fonte promissora para o desenvolvimento de fitoterápicos antifúngicos.

No entanto, é importante ressaltar que novos ensaios experimentais são necessários para validar e aprofundar os achados das simulações, considerando a complexidade dos sistemas biológicos *in vivo*. Assim, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre o potencial terapêutico de metabólitos naturais e reforça a importância da pesquisa multidisciplinar na busca por alternativas eficazes e seguras para o tratamento de infecções fúngicas.

FINANCIAMENTO

Nossos agradecimentos à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (BP5-0197-00245.01.00/22).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Victor Juno Alencar Fonseca: Redação – revisão e edição, Redação – rascunho original, Visualização, Validação, Software, Metodologia, Investigação, Análise formal, Curadoria de dados, Conceituação. **Mário José Lima Orgaz Júnior:** Metodologia, Investigação. **Johnatan Wellisson da Silva Mendes:** Metodologia, Investigação. **Francisco Bernardo de Barros:** Metodologia, Investigação. **Joara Nályda Pereira Carneiro:** Metodologia, Investigação. **Antonia Thassya Lucas dos Santos:** Metodologia, Investigação. **Maria Audilene de Freitas:** Metodologia, Investigação. **Tawanny Kayonara Borges de Aguiar:** Metodologia, Investigação. **Maria Alicy Neres de Oliveira:** Investigação. **Elita de Sousa Santos:** Investigação. **Emmanuel Silva Marinho:** Software, Metodologia, Investigação. **Victor Moreira de Oliveira:** Software, Metodologia, Investigação. **Matheus Nunes da Rocha:** Software, Metodologia, Investigação. **Márcia Machado Marinho:** Software, Metodologia,

Investigação. **Martinho Rau:** Metodologia, Investigação. **Luiz Everson da Silva:** Metodologia, Investigação. **Wanderlei do Amaral:** Metodologia, Investigação, Software, Metodologia, Investigação. **Jacqueline Cosmo Andrade-Pinheiro:** Metodologia, Investigação. **Ricardo Andrade Rebelo:** Software, Recursos, Metodologia, Investigação, Análise formal. **Maria Flaviana Bezerra Morais Braga:** Redação – revisão e edição, Visualização, Supervisão, Recursos, Administração do projeto, Análise formal, Curadoria de dados, Conceitualização.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não possuir quaisquer interesses financeiros ou relações pessoais que possam ter influenciado o trabalho apresentado neste artigo.

REFERÊNCIAS

Ali A, Khan M, Hussain R, *et al.* (2023) *In silico* analysis and molecular docking studies of natural compounds of *Withania somnifera* against bovine NLRP9. J Mol Model 29(6). https://doi.org/10.1007/s00894-023-05570-z

Alves Borges Leal AL, Silva R, Andrade R, *et al.* (2019) Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* Kunth (BETIS-WHITE). *Food Chem Toxicol* 131:110559. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.06.006

Avery P, Richards J, Thompson L, *et al.* (2018) Extended Hückel calculations on solids using the Avogadro molecular editor and visualizer. J Chem Educ 95(2):331–337. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00698

Ballesteros JL, Ramirez C, Ortega F, *et al.* (2019) Rediscovering medicinal Amazonian aromatic plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) essential oil as paradigmatic study. Evid Based Complement Alternat Med 2019(1):6194640. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2019/6194640

Borelli C, Meyer T, Schmidt H, *et al.* (2008) X-ray structures of Sap1 and Sap5: structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. Proteins 72(4):1308–1319. https://doi.org/10.1002/prot.22021

Braga AL, Santos M, Oliveira J, *et al.* (2021) *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance. S Afr J Bot 142:495–501. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.017

Brasil. Ministério da Saúde (2024) Situação epidemiológica da candidíase sistêmica. Ministério da Saúde, Brasília. Acesso em: 20 maio 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistemica/situacao-epidemiologica

Bravo-Chaucanés CP, Ramirez J, Lopez F, *et al.* (2023) Exploring the potential mechanism of action of piperine against *Candida albicans* and targeting its virulence factors. Biomolecules 13(12):1729. https://doi.org/10.3390/biom13121729

Carter-Fenk K, Herbert JM (2020) Reinterpreting π-stacking. Phys Chem Chem Phys 22(43):24870–24886. http://dx.doi.org/10.1039/D0CP05039C

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 4th edn. CLSI Standard M27. Wayne, PA: CLSI.

Da Rocha MN, Silva P, Andrade L, *et al.* (2024) In silico study in MPO and molecular docking of the synthetic drynaran analogues against chronic tinnitus: modulation of the m1 muscarinic acetylcholine receptor. Mol Biotechnol 66(2):254–269. https://doi.org/10.1007/s12033-023-00748-5

Da Silva Neto JX, Oliveira R, Santos T, *et al.* (2020) Role of membrane sterol and redox system in the anti-*Candida* activity reported for Mo-CBP2, a protein from *Moringa oleifera* seeds. Int J Biol Macromol 143:814–824. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.142

De Oliveira VM, Costa R, Almeida P, *et al.* (2021) Molecular docking identification for the efficacy of natural limonoids against COVID-19 virus main protease. J Indian Chem Soc 98(10):100157. https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100157

Dos Santos ATL, Oliveira R, Costa M, *et al.* (2023) Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. Microb Pathog 180:106129. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106129

Dos Santos ATL, Oliveira R, Costa M, *et al.* (2025) In silico activity and effect of synthetic chalcones on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. Biochimie 234:29–39. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2025.03.004

Ertl P (2007) Polar surface area. In: Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction. Springer, pp 111–126.

Farhan MS, Ali R, Khan T, *et al.* (2024) Review of virulence factors in *Candida*. J Res Appl Sci Biotechnol 3(2):75–82. https://doi.org/10.55544/jrasb.3.2.15

Fonseca VJA, Braga AL, de Almeida RS, *et al.* (2022) Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Arch Microbiol 204(6):346. https://doi.org/10.1007/s00203-022-02959-x

Fonseca VJA, Rebelo RA, Andrade R, *et al.* (2025) Characterization and analysis of the bioactivity of the *Piper rivinoides* Kunth essential oil and its components myristicin and elemicin, against opportunistic fungal pathogens. Microb Pathog 199:107242. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107242

Ganesh-Kumar A, Ramesh S, Kumar P, *et al.* (2024) *Cleome rutidosperma* leaf extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and anti-candidal, anti-biofilm, anti-cancer, and molecular docking analysis. Biomass Convers Bioref 14(22):28971–28983. https://doi.org/10.1007/s13399-023-03806-9

Ghabbour HA, Ali M, Hassan R, *et al.* (2014) Design, synthesis, and molecular docking of 1-(1-(4-chlorophenyl)-2-(phenylsulfonyl) ethylidene)-2-phenylhydrazine as potent nonazole anticandidal agent. J Chem 2014:154357. https://doi.org/10.1155/2014/154357

Götz ME, Schmidt H, Weber T, *et al.* (2022) Myristicin and elemicin: potentially toxic alkenylbenzenes in food. Foods 11(13):1988. https://doi.org/10.3390/foods11131988

Graef J, Ehrt C, Rarey M (2023) Binding site detection remastered: enabling fast, robust, and reliable binding site detection and descriptor calculation with DoGSite3. J Chem Inf Model 63(10):3128–3137. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00336

Guengerich FP (2021) A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. Toxicol Res 37(1):1–23. https://doi.org/10.1007/s43188-020-00056-z

Halgren TA (1996) Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. J Comput Chem 17(5–6):490–519. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P

Hanif AU, Lukis PA, Fadlan A (2020) Pengaruh minimisasi energi MMFF94 dengan MarvinSketch dan open Babel PyRx pada penambatan molekular turunan oksindola tersubstitusi. Alchemy J Chem 8(2):33–40. https://doi.org/10.18860/al.v8i2.10481

Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J Cheminform 4:17. https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

Hargrove TY, Friggeri R, Wawrzak Z, *et al.* (2017) Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14α-demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. J Biol Chem 292(16):6728–6743. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778308

Hughes JD, Blagg J, Price DA, *et al.* (2008) Physiochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. Bioorg Med Chem Lett 18(17):4872–4875. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071

Hughes TB, Miller GP, Swamidass SJ (2015) Modeling epoxidation of drug-like molecules with a deep machine learning network. ACS Cent Sci 1(4):168–180. https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00131

Ivanov M, Ćirić A, Stojković D (2022) Emerging antifungal targets and strategies. Int J Mol Sci 23(5):2756. https://doi.org/10.3390/ijms23052756

Johnson TW, Dress KR, Edwards M (2009) Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. Bioorg Med Chem Lett 19(19):5560–5564. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.045

Katsipoulaki M, Papadopoulou A, Georgiou D, *et al.* (2024) *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. Microbiol Mol Biol Rev 88(2). https://doi.org/10.1128/mmbr.00021-23

Kim JH, Cheng LW, Land KM (2022) Advances in antifungal development: discovery of new drugs and drug repurposing. Pharmaceuticals 15(7):787. https://doi.org/10.3390/ph15070787

Klon AE (2010) Machine learning algorithms for the prediction of hERG and CYP450 binding in drug development. Expert Opin Drug Metab Toxicol 6(7):821–833. https://doi.org/10.1517/17425255.2010.489550

Lew SQ, Lin CH (2021) N-acetylglucosamine-mediated morphological transition in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Curr Genet 67(2):249–254. https://doi.org/10.1007/s00294-020-01138-z

LIMA, Joan Petrus Oliveira *et al.* De novo design of bioactive phenol and chromone derivatives for inhibitors of Spike glycoprotein of SARS-CoV-2 *in silico*. *3 Biotech*, v. 13, n. 9, p. 301, 2023. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03695-9

Lu H, Zhang Y, Chen X, *et al.* (2021) *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. Crit Rev Microbiol 47(3):323–337. https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1884641

Martin MV (1999) The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. J Antimicrob Chemother 44(4):429–437. https://doi.org/10.1093/jac/44.4.429

Maurya AK, Mishra N (2022) Coumarin-based combined computational study to design novel drugs against *Candida albicans*. J Microbiol 60(12):1201–1207. https://doi.org/10.1007/s12275-022-2279-5

Morais-Braga MFB, Oliveira R, Silva TG, *et al.* (2016) *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. Microb Pathog 95:200–207. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.013

Naseem S, Gunasekera A, Konopka JB, *et al.* (2011) N-acetylglucosamine (GlcNAc) induction of hyphal morphogenesis and transcriptional responses in *Candida albicans* are not dependent on its metabolism. J Biol Chem 286(33):28671–28680. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.249854

Pereira Carneiro JN, Silva R, Braga AL, *et al.* (2019) *Piper diospyrifolium* Kunth.: chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. Microb Pathog 136:103700. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103700

Pettersson M, Norinder U, Bergström CAS, *et al.* (2016) Quantitative assessment of the impact of fluorine substitution on P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux, permeability, lipophilicity, and metabolic stability. J Med Chem 59(11):5284–5296. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00027

Rana R, Sharma R, Kumar A (2019) Repurposing of existing statin drugs for treatment of microbial infections: how much promising? Infect Disord Drug Targets 19(3):224–237. https://doi.org/10.2174/1871526518666180806123230

Rani P, Singh R, Patel S, *et al.* (2020) Crystal structure of Gig2 protein from *Candida albicans* provides a structural insight into DUF1479 family oxygenases. Int J Biol Macromol 150:1272–1280. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.138

Ruiz-Vásquez L, Paredes K, Rojas R, *et al.* (2022) Antifungal and herbicidal potential of *Piper* essential oils from the Peruvian Amazonia. Plants 11(14):1793. https://doi.org/10.3390/plants11141793

Sari S, Valand N, Girija U (2022) A hybrid ligand and structure-based virtual screening of NCI compound library identifies potential SAPT1 inhibitors. J Res Pharm 26(3). http://dx.doi.org/10.29228/jrp.159

Sharma J, Kumar A, Singh R, *et al.* (2019) Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. J Fungi 5(1). https://doi.org/10.3390/jof5010017

Silva SL, Oliveira R, Santos T, *et al.* (2022) Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide, docking and molecular dynamics studies against clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*. J Appl Microbiol 132(5):3601–3617. https://doi.org/10.1111/jam.15498

Symersky J, Monod M, Foundling SI (1997) High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. Biochemistry 36(42):12700–12710. https://doi.org/10.1021/bi970613x

Tanwar S, Kalra S, Bari VK (2024) Insights into the role of sterol metabolism in antifungal drug resistance: a mini-review. Front Microbiol 15:1409085. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1409085

Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem 31(2):455–461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Van de Waterbeemd H, Gifford E (2003) ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? Nat Rev Drug Discov 2(3):192–204. https://doi.org/10.1038/nrd1032

Vanzolini T, Magnani M (2024) Old and new strategies in therapy and diagnosis against fungal infections. Appl Microbiol Biotechnol 108(1):147. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12884-8

Verma AK, Singh R, Patel S, *et al.* (2020) Inhibition of multidrug resistance property of *Candida albicans* by natural compounds of *Parthenium hysterophorus* L.: an *in-silico* approach. J Pharmacogn Phytochem 9(3):55–64. https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i3a.11480

Vian M, Rossi F, Bianchi L, *et al.* (2019) *In silico* model for mutagenicity (Ames test), taking into account metabolism. Mutagenesis 34(1):41–48. https://doi.org/10.1093/mutage/gey045

Volkamer A, Grombacher T, Rarey M, *et al.* (2010) Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. J Chem Inf Model 50(11):2041–2052. https://doi.org/10.1021/ci100241y

Wager TT, Hou X, Verhoest PR, *et al.* (2016) Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery. ACS Chem Neurosci 7(6):767–775. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00029

Wager TT, Chandrasekaran RY, Hou X, *et al.* (2010) Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, in vitro ADME, and safety attributes. ACS Chem Neurosci 1(6):420–434. https://doi.org/10.1021/cn100007x

Yu K, Li J, Zhang H, *et al.* (2014) High daily dose and being a substrate of cytochrome P450 enzymes are two important predictors of drug-induced liver injury. Drug Metab Dispos 42(4):744–750. https://doi.org/10.1124/dmd.113.056267

Yusuf D, Davis AM, Kleywegt GJ, *et al.* (2008) An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. J Chem Inf Model 48(7):1411–1422. https://doi.org/10.1021/ci800084x

Zheng M, Luo X, Shen Q, *et al.* (2009) Site of metabolism prediction for six biotransformations mediated by cytochromes P450. Bioinformatics 25(10):1251–1258. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp140

CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

No presente estudo, o óleo essencial de *Piper rivinoides* (OEPR) demonstrou potencial como fonte de metabólitos bioativos com atividade antifúngica, apresentando efeito frente a microrganismos de relevância clínica, incluindo espécies do gênero *Candida*, tanto de forma isolada quanto em associação com antifúngicos.

Considerando que a resistência a antifúngicos tem crescido nos últimos anos, comprometendo os tratamentos vigentes e representando uma ameaça à saúde pública, as plantas medicinais têm se destacado como fontes promissoras na descoberta de novos agentes terapêuticos. Patógenos como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Pichia kudriavzevii* apresentam características como formação de biofilmes e morfogênese celular, que dificultam sua erradicação e aumentam sua virulência. Nesse contexto, o presente estudo caracterizou e analisou o perfil fitoquímico e o potencial antifúngico do OEPR, bem como de seus constituintes isolados, miristicina e elemicina.

Os resultados mostraram atividade antifúngica de OEPR, miristicina e elemicina. O OEPR inibiu mais de 95% do crescimento de *Candida albicans* e *Pichia kudriavzevii* em concentrações de 512 e 1024 µg/mL. Quando combinado com fluconazol (FCZ), o OEPR inibiu *Candida tropicalis* a 2 µg/mL e *P. kudriavzevii* a 32 µg/mL. A elemicina inibiu 100% do crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* a 512 µg/mL, e foi eficaz contra *P. kudriavzevii* a partir de 128 µg/mL. A miristicina inibiu mais de 95% do crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* a 1024 µg/mL, e 83,94% de *P. kudriavzevii* na mesma concentração. A elemicina demonstrou atividade fungicida contra *P. kudriavzevii*, enquanto os outros compostos foram principalmente fungistáticos.

No teste de inibição da transição morfológica de *Candida*, o OEPR reduziu o comprimento das hifas de *C. albicans* e *P. kudriavzevii*. A miristicina inibiu a transição em *C. tropicalis* e reduziu o comprimento das hifas em *C. albicans* e *P. kudriavzevii*. A elemicina reduziu o comprimento das hifas em *C. albicans* e *C. tropicalis*, mas não teve efeito significativo contra *P. kudriavzevii*. O FCZ inibiu totalmente a transição em *C. albicans* e reduziu o comprimento das hifas em *C. tropicalis* e *P. kudriavzevii*. Entretanto, a miristicina não apresentou efeito significativo sobre a biomassa ou atividade metabólica dos biofilmes maduros de *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto a elemicina chegou a ser superior ao fluconazol, reduzindo de forma mais eficaz a biomassa de biofilmes de *C. tropicalis*.

A transição morfológica e a formação de biofilmes em *C. albicans* envolvem uma complexa rede de vias regulatórias, o que pode explicar os efeitos diferenciados observados para miristicina e elemicina. Enquanto a miristicina apresentou uma atuação mais evidente sobre o dimorfismo, a elemicina demonstrou maior impacto sobre a biomassa de biofilmes.

Além disso, as diferenças na atividade antibiofilme entre espécies de *Candida* podem estar relacionadas a variações metabólicas e estruturais próprias de cada biofilme. Essa interpretação está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, que evidenciam a importância de considerar tanto o dimorfismo quanto a arquitetura dos biofilmes na avaliação da atividade antifúngica de metabólitos secundários de *Piper*.

Nos testes da interação com ergosterol, a elemicina apresentou um perfil mais próximo da droga padrão anfotericina-B, perdendo sua capacidade antifúngica na mesma medida em que aumentava a concentração do esterol. Este dado torna-se relevante pela ligação indireta que este componente tem com o dimorfismo fúngico, uma vez que atua no crescimento, fluidez e forma como o fungo regula a atividade enzimática que ocorre na membrana. Embora essa relação não esteja completamente definida, estudos tem demonstrado que a inibição da biossíntese de ergosterol pode suprimir o desenvolvimento de hifas em *C. albicans*, ação mediada pela imunoglobulina A secretora (sIgA). Esses achados reforçam o papel central do ergosterol como regulador da interação fungo-hospedeiro e da transição morfológica.

As simulações de *docking* mostraram que a miristicina interagiu de forma semelhante ao fluconazol com o receptor SapT1 de *C. tropicalis* e foi mais favorável que a elemicina na interação com a SAP5 de *C. albicans*, interagindo com três aminoácidos, enquanto a elemicina interagiu com apenas dois. A miristicina também foi capaz de interagir com a CYP51, embora com apenas um resíduo (Tyr118). No receptor Als3, ambos os ligantes interagiram com Tyr23, similar ao fármaco de referência.

Além disso, a miristicina apresentou um maior número de interações no sítio do fluconazol em Glc-NAc. No teste preditivo de ADMET baseado em MPO, foi demonstrado que ambos os compostos possuem equilíbrio entre permeabilidade celular e depuração hepática, resultando em boa biodisponibilidade oral. A elemicina foi metabolicamente mais estável devido à presença dos grupos metoxila, que protegem a epoxidação do alceno.

Considerando que foram encontrados poucos dados sobre miristicina e elemicina em *Piper*, foram utilizados como referência outros estudos envolvendo o uso de óleos essenciais contendo grandes concentrações desses compostos. De modo geral, observa-se que a atividade antifúngica varia significativamente conforme a concentração desses constituintes e a espécie fúngica avaliada. Para elemicina, óleos essenciais, como os de *Dalbergia pinnata* e *Devrra triradiat*a apresentaram atividade antifúngica relevante contra *C. albicans* e *P. kudriavzevii*,

apresentando melhores valores de inibição a medida em que o fenilpropanoide se apresentava mais concentrado. Já para miristicina, óleos como o de Origanum vulgare e Myristica fragrans inibiram o crescimento de patógenos fúngicos em concentrações variadas, sugerindo que sua eficácia pode estar relacionada a concentração do composto e a presença de outros componentes presentes no óleo.

Estudos envolvendo espécies do gênero *Piper*, com óleos essenciais, tem mostrado sua capacidade de modular a atividade de antifúngicos, bem como inibir fatores de virulência essenciais. De maneira geral, fluconazol tem apresentado melhora em sua atividade antifúngica quando combinado a esses óleos de forma relevante contra *C. tropicalis*, além de promover a inibição do crescimento micelial em *C. albicans* em concentrações mais elevadas. Esses dados evidenciam que a interferência em processos como a morfogênese representa um mecanismo importante de ação antifúngica, uma vez que está diretamente relacionada à virulência desses patógenos. Dessa forma, estratégias que visam inibir fatores de virulência, sem necessariamente promover a morte celular, têm sido consideradas promissoras, pois podem reduzir a pressão seletiva associada ao desenvolvimento de resistência.

Com relação com *docking*, a interação com a SapT1 e Sap 5, ambas proteinases aspárticas secretadas, revelou que ambos os ligantes (miristicina e elemicina) apresentam RMSD dentro dos valores ideais para interação (< 2 Å) e energia de interação semelhantes, porém menos efetivos que o FCZ. Entretanto, a miristicina foi a que mais se assemelhou com o antifúngico, onde ambos apresentaram uma maior afinidade no sítio em relação ao ligante controle co-cristalizado (tetrapeptideo e pepstatina respectivamente). Os dados indicam que a elemicina apresentou baixa interação com as proteínas avaliadas, enquanto, para a CYP51, ambos os ligantes interagiram em regiões distintas em relação ao controle co-cristalizado (posaconazol). No entanto, a miristicina foi a única a apresentar um padrão de interação semelhante ao fluconazol, destacando-se a participação do resíduo Tyr118, além de apresentar energia de interação mais próxima a esse fármaco.

Esse comportamento sugere uma maior afinidade da miristicina pelo sítio ativo da CYP51, sendo consistente com sua capacidade de interagir de forma relevante com esse alvo. Para proteínas associadas à adesão e morfogênese, a miristicina também apresentou resultados mais próximos aos do fluconazol, com interação envolvendo o resíduo Tyr23, reforçando seu potencial como modulador desses processos.

De acordo com a literatura, a atividade antimicrobiana desempenhada por essas moléculas pode ocorrer devido aos grupos metoxila em diferentes posições dos anéis benzênicos; no entanto, como e onde essa interação ocorre ainda não está claro. O tamanho da cadeia ramificada parece aumentar a potência da atividade antifúngica dos fenilpropanoides,

pois quanto mais lipofílica a molécula, maior a capacidade de partição em membranas. A lipofilicidade é um dos fatores essenciais que determinam a atividade biológica dos candidatos a fármacos. Ela determina não apenas o transporte de moléculas através de membranas biológicas, mas também sua capacidade de se ligar a receptores. Assim, a melhor atividade antifúngica da elemicina pode ocorrer devido ao tamanho de sua cadeia de carbono, que é maior do que a da miristicina. Considerando a natureza lipofílica desses compostos, é possível hipotetizar que a miristicina e a elemicina interagem com as membranas celulares fúngicas, alterando a fluidez e a permeabilidade, o que pode levar à liberação de componentes intracelulares essenciais para o crescimento e viabilidade das células fúngicas. Além disso, essa interação com a membrana também pode causar estresse oxidativo e formação de poros, resultando em possível desestabilização do envelope celular.

Essa atividade na membrana pode ter relação com os dados obtidos no *docking* molecular, onde a proteína que obteve os melhores resultados de interação foi a CPY51. Essa enzima é responsável por catalisar a transformação do lanosterol em ergosterol, um importante componente das membranas nos fungos do gênero *Candida*. Além disso, os resultados da inibição da transição morfológica podem ser afetados não só pela interação com a CYP51, mas também com a ALS3 e Gln-Nac, que são fatores ligados a adesão desses fungos a superfícies e a formação das hifas. O resultado antagônico observado pela elemicina contra *P. kudriavzevii* não está claro, mas a similaridade que a substância e o FCZ interagem com a CYP51 pode fornecer indícios, uma vez que este microrganismo é intrinsecamente resistente a este antifungo. Estudos mostram que essa resistência pode estar associada a mutações ligadas ao gene codificador dessa enzima, o que poderia provocar alterações estruturais capazes de afetar a eficácia do FCZ. Além disso, levando em conta interações alostéricas, é possível que na ausência da droga, a elemicina se ligue ao receptor, promovendo suas ações biológicas. Entretanto, na presença do agonista (FCZ) que se liga mais fortemente ao sítio, como apresentado pelo *docking*, a elemicina pode adotar um modo de ligação alternativo, podendo interagir de formas diferentes. Essa variação na afinidade do ligante pode exibir diferentes propriedades conforme sua concentração, e do contexto molecular, é um fenômeno chamado de modulação alostérica.

Embora atividades antifúngicas tenham sido relatadas para compostos ricos em miristicina e elemicina contra *Candida* spp., alguns resultados obtidos no presente estudo foram conflitantes com a literatura. Essa discrepância pode ser devido a possíveis pequenas diferenças na sensibilidade e precisão tanto dos métodos utilizados para identificar a atividade antifúngica quanto da extração dos compostos isolados. Embora a elemicina tenha obtido resultados antagônicos contra *P. kudriavzevii* quando combinada com fluconazol, o produto sozinho ainda

foi capaz de inibir o crescimento desse fungo em baixas concentrações. Além disso, os dados obtidos no ADMET baseado em MPO revelaram que a elemicina além de apresentar boa biodisponibilidade oral, ela também é mais estável, tornando-a mais segura ao consumo do que a miristicina.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

O óleo essencial de *P. rivinoides* e seus derivados, miristicina e elemicina, apresentaram resultados moderados quando testados contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto a elemicina foi capaz de inibir o crescimento de *P. kudriavzevii* em baixas concentrações. Entretanto, a combinação com fluconazol melhorou o desempenho do fármaco, mostrando efeito potencializador do agente antifúngico em concentrações subinibitórias, exceto a elemicina que apresentou efeito antagônico contra *P. kudriavzevii*. A literatura revela que compostos da classe dos fenilpropanoides, frequentemente presentes em óleos essenciais, atuam desestabilizando a estrutura das membranas celulares de fungos. Dessa forma, essa ruptura pode aumentar a permeabilidade celular e, consequentemente, a concentração intracelular de fármacos, facilitando sua ação antifúngica. Além disso os resultados do *docking* molecular reforçam esse potencial, evidenciando interações com proteínas associadas à virulência. Somado a estabilidade da molécula e boa absorção oral evidenciado pelo ADMET, isso torna esses compostos agentes antifúngicos promissores, principalmente a elemicina para tratar *P. kudriavzevii*. Esses achados reforçam o potencial dos compostos avaliados como agentes antifúngicos, destacando sua aplicabilidade em estratégias terapêuticas, especialmente em abordagens combinadas.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Considerando que vários dos alvos utilizados no *docking* estão relacionados a formação de biofilme, e a inibição da transição morfológica de levedura para hifas está inteiramente ligado a esse fator de virulência, faz-se necessário a realização de um teste para determinar as capacidades antibiofilme da miristicina e elemicina. Também é importante um estudo mais detalhado sobre como esses compostos poderiam interagir com o ergosterol, ou mesmo inibir sua formação. Outra abordagem que poderia complementar os resultados envolve a avaliação da atividade antioxidante por meio de ensaios como FRAP e DPPH, que, em conjunto, fornecem dados abrangentes sobre a capacidade antioxidante total. Adicionalmente, estudos

envolvendo síntese ou modificação estrutural dos compostos isolados poderiam ser explorados, com o objetivo de otimizar suas propriedades biológicas e ampliar seu potencial terapêutico.

ANDERSON, Thomas *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, v. 10, n. 5, p. 400–406, 2014.

AREMU, Adeyemi; LUO, Binsheng; MUSSARAT, Sakina. *Medical ethnobotany*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. [S.l.]: BioMed Central, 2024

ASHRAF, Rizwan *et al.* Cold pressed coriander (*Coriandrum sativum* L.) seed oil. In: COLD PRESSED OILS. *Academic Press*, 2020. p. 345-356.

ASTUTI, Suryani Dyah *et al.* Ultraviolet (UV) activation effect on antibacterial agents of red betel (*Piper crocatum*) extract to *Streptococcus mutans*. In: *JOURNAL OF PHYSICS: CONFERENCE SERIES*. IOP Publishing, 2020. p. 012004.

BAUTERS, Lander; STOJILKOVIĆ, Boris; GHEYSEN, Godelieve. Pathogens pulling the strings: effectors manipulating salicylic acid and phenylpropanoid biosynthesis in plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 22, n. 11, p. 1436–1448, 2021.

BALLESTEROS, José L. *et al.* Rediscovering medicinal Amazonian aromatic plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) essential oil as paradigmatic study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2019, n. 1, p. 6194640, 2019.

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

BRANDA, Francesco *et al.* Antifungal agents in the 21st century: advances, challenges, and future perspectives. *Infectious Disease Reports*, v. 17, n. 4, p. 91, 2025.

BRAGA, Ana Lays *et al. Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance. *South African Journal of Botany*, v. 142, p. 495–501, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629921002763>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-aaz/c/candidiase-sistemica/situacao-epidemiologica#:~:text=No Brasil%2C a taxa de incidência chega a,relatadas em países dos EUA e da Europa. Acesso em: 20 maio 2024.

BRAVO-CHAUCANÉS, Claudia Patricia *et al.* Exploring the Potential Mechanism of Action of Piperine against *Candida albicans* and Targeting Its Virulence Factors. *Biomolecules*, v. 13, n. 12, p. 1729, 2023.

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

BUITIMEA-CANTÚA, Génesis *et al.* Inhibitory effect of *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits, capsaicin and piperine on aflatoxins production in *Aspergillus parasiticus* by

downregulating the expression of afl D, afl M, afl R, and afl S genes of aflatoxins biosynthetic pathway. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 55, n. 9, p. 835–843, 2020.
BUTLER, Geraldine *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, v. 459, n. 7247, p. 657–662, 2009.
BUU, Leh-Miauh; CHEN, Yee-Chun. Sap6, a secreted aspartyl proteinase, participates in maintenance the cell surface integrity of *Candida albicans*. *Journal of biomedical science*, v. 20, p. 1–9, 2013.
CARNEIRO, Joara Nályda Pereira *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.
CARNEIRO, Joara Nályda Pereira *et al. Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. *Microbial Pathogenesis*, v. 136, p. 103700, 2019.
CHITIVA-CHITIVA, Luis C *et al.* Antifungal activity of chemical constituents from *Piper pesaresanum* C. DC. and derivatives against phytopathogen fungi of cocoa. *Molecules*, v. 26, n. 11, p. 3256, 2021.
CHU, Yunfei *et al.* Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 2, p. 170, 2023. DOI: 10.3390/jof9020170.
CIURA, Krzesimir *et al.* Lipophilicity determination of antifungal isoxazolo [3, 4-b] pyridin-3 (1 H)-ones and their N1-substituted derivatives with chromatographic and computational methods. *Molecules*, v. 24, n. 23, p. 4311, 2019.
CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. (CLSI document M27).
COOK, Katherine *et al.* QTc prolongation in patients receiving triazoles and amiodarone. 2017, [S.l.]: Oxford University Press US, 2017. p. S84–S84.
COUTINHO, Henrique 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.
CUI, Tiantian *et al.* Piperine is a mechanism-based inactivator of CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 48, n. 2, p. 123–134, 2020.
DA SILVA NETO, João Xavier *et al.* Role of membrane sterol and redox system in the anti-candida activity reported for Mo-CBP2, a protein from Moringa oleifera seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 143, p. 814-824, 2020.

DE SOUZA, Cássia Milena *et al.* The evolution of antifungal therapy: Traditional agents, current challenges and future perspectives. *Current Research in Microbial Sciences*, p. 100341, 2025.

DENNING, David W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 2024.

DOS SANTOS, Antonia Thassya Lucas *et al. In silico* activity and effect of synthetic chalcones on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Biochimie*, v. 234, p. 29-39, 2025.

DOS SANTOS, Antonia Thassya Lucas *et al.* Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. *Microbial Pathogenesis*, v. 180, p. 106129, 2023.

DOUGLASS, Alexander *et al.* Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 7, 1 jul. 2018.

ERNST, Erika J. *et al. In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.

FAGBEMI, Kehinde Oluwakemi; AINA, Daniel Ayandiran; OLAJUYIGBE, Olufunmiso Olusola. Soxhlet extraction versus hydrodistillation using the clevenger apparatus: A comparative study on the extraction of a volatile compound from *Tamarindus indica* seeds. *The Scientific World Journal*, v. 2021, n. 1, p. 5961586, 2021.

FARHAN, Mohammed Sami *et al.* Review of Virulence Factors in *Candida*. *Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 75–82, 2024.

FENG, Zhe; LU, Hui; JIANG, Yuanying. Promising immunotherapeutic targets for treating candidiasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, 2024. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1339501.

FONSECA, Victor Juno Alencar *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.

GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela; RAMÍREZ-SOTELO, Uriel; MORA-MONTES, Héctor M. Non-albicans *Candida* species: immune response, evasion mechanisms, and new plant-derived alternative therapies. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 1, p. 11, 2023. DOI: 10.3390/jof9010011.

GÖTZ, Mario *et al. Myristicin and Elemicin: Potentially Toxic Alkenylbenzenes in Food*. *Foods*. [S.l.]: MDPI, 1 jul. 2022

GUNAWAN, Ramdhan; NANDIYANTO, Asep Bayu Dani. How to read and interpret 1H-NMR and 13C-NMR spectrums. *Indonesian Journal of Science and Technology*, v. 6, n. 2, p. 267-298, 2021.

GUPTA, Rohan *et al.* Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. *Molecular Diversity*, v. 25, n. 3, p. 1315-1360, 2021.

HAQ, Iahtisham-Ul *et al.* Piperine: A review of its biological effects. *Phytotherapy research*, v. 35, n. 2, p. 680–700, 2021.

HOSEE, Yousif Nazzal; FARHAN, Mohammed Sami; SHABAN, Semaa A. The Potential of Medicinal Plants in Antifungal Drug Development: Mechanisms, Synergies, and Future Directions. *Journal of mycology and infection*, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2025.

HOUŠŤ, Jiří; SPÍŽEK, Jaroslav; HAVLÍČEK, Vladimír. Antifungal drugs. *Metabolites*, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.

HOWES, Melanie-Jayne R. *et al.* Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. *Plants, People, Planet*, v. 2, n. 5, p. 463-481, 2020.

HOYER, Lois; COTA, Ernesto. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: a review of Als protein structure and function. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 280, 2016.

HUONG, Le Thi *et al.* Chemical compositions and mosquito larvicidal activities of essential oils from *Piper* species growing wild in Central Vietnam. *Molecules*, v. 24, n. 21, p. 3871, 2019.

IVANOV, Marija; ĆIRIĆ, Ana; STOJKOVIĆ, Dejan. Emerging antifungal targets and strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 5, p. 2756, 2022.

JENSEN, Owen; TRUJILLO, Emma; HANSON, Luke; OST, Kyla S. Controlling *Candida*: immune regulation of commensal fungi in the gut. *Infection and Immunity*, v. 92, n. 9, 2024. DOI: 10.1128/iai.00516-23.

KATO, Hideo *et al.* Comparison of mortality between echinocandins and polyenes for an initial treatment of candidemia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 27, n. 11, p. 1562–1570, 2021.

KATSIPOULAKI, Myrto *et al. Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. e00021-23, 2024.

KIDD, Sarah E; ABDOLRASOULI, Alireza; HAGEN, Ferry. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. ofac559, 1 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac559>.

KIM, Jong H; CHENG, Luisa W; LAND, Kirkwood M. *Advances in antifungal development: Discovery of new drugs and drug repurposing*. *Pharmaceuticals*. [S.l.]: MDPI, 2022

LATIF, Riffat; NAWAZ, Taufiq. Medicinal plants and human health: A comprehensive review of bioactive compounds, therapeutic effects, and applications. *Phytochemistry Reviews,* p. 1-44, 2025.

LEAL, Antonio Linkoln Alves Borges *et al.* Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). *Food and Chemical Toxicology*, v. 131, p. 110559, 2019.

LEW, Shi Qian; LIN, Ching-Hsuan. N-acetylglucosamine-mediated morphological transition in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Current Genetics*, v. 67, n. 2, p. 249–254, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01138-z>.

LOH, Boon Shing; ANG, Wee Han. *"Illuminating" echinocandins' mechanism of action*. [S.l.]: ACS Publications, 2020.

MARTINEZ-IRUJO, Juan *et al.* A checkerboard method to evaluate interactions between drugs. Biochemical pharmacology, v. 51, n. 5, p. 635-644, 1996.

MEDEIROS, Mariana Araújo Paulo de. Aspectos de patogenicidade e relacionamento genético de isolados clínicos vaginas e anais de *Candida albicans* oriundos de pacientes com candidíase vulvovaginal. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MENEZES, Saulo Almeida; TASCA, Tiana. Essential oils and terpenic compounds as potential hits for drugs against amitochondriate protists. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 1, p. 37, 2023.

MITCHELL, Kaitlin; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David. The extracellular matrix of fungal biofilms. *Fungal Biofilms and related infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 3*, p. 21–35, 2016.

NAGLIK, Julian; CHALLACOMBE, Stephen; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 67, n. 3, p. 400–428, 2003.

NETT, Jeniel; ANDES, David. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 1, p. 51–83, 2016.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NGUYEN, Thi Anh *et al. Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): A systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. *Medical Mycology*, v. 62, n. 6, p. myad132, 2024.

NORIEGA, Paco *et al.* Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from *Piper barbatum* Kunth leaves. *Plants*, v. 9, n. 2, p. 211, 2020.

PHAN, Quynh *et al.* Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology*, v. 5, n. 3, p. e64, 2007.

PRISTOV, K E; GHANNOUM, M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

REDDY, G Kiran Kumar; PADMAVATHI, Alwar Ramanujam; NANCHARAIAH, Y V. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 3, p. 100137, 2022.

RUIZ-VÁSQUEZ, Liliana *et al.* Antifungal and herbicidal potential of *Piper* essential oils from the Peruvian Amazonia. *Plants*, v. 11, n. 14, p. 1793, 2022.

SARTORATTO, Adilson *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 275-280, 2004.

SHARMA, Ajay; TANIGUCHI, Jonathan. Emerging strategies for antimicrobial drug delivery to the ocular surface: Implications for infectious keratitis. *The ocular surface*, v. 15, n. 4, p. 670–679, 2017.

SHARMA, Jehoshua *et al.* Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. Journal of Fungi, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.

SILVA, José Thyálisson da Costa *et al.* In Vitro and In Silico Biological Evaluation of the Essential Oil from *Syzigium cumini* Leaves as a Source of Novel Antifungal and Trichomonacidal Agents. *Future Pharmacology*, v. 4, n. 2, p. 380–394, 2024.

SILVA, Wilson Castro *et al.* Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 2-4, p. 267-274, 2009.

SISWINA, Tessa *et al.* Antifungal Constituents of *Piper crocatum* and Their Activities as Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Discovered via In Silico Study Using ADMET and Drug-Likeness Analysis. *Molecules*, v. 28, n. 23, p. 7705, 2023.

SIVAREDDY, Basireddy *et al.* Antifungal activity of solvent extracts of *Piper betle* and *Ocimum sanctum* Linn on *Candida albicans*: An: in vitro: comparative study. *Journal of oral and Maxillofacial Pathology*, v. 23, n. 3, p. 333–337, 2019.

SOUZA, Igor Oliveira Palagi de. *Técnicas de determinação da formação de biofilme microbiano*. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SUWUNNAKORN, Sumanun *et al. FKS2 and FKS3 Genes of Opportunistic Human Pathogen Candida albicans Influence Echinocandin Susceptibility*. [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <http://www.candidagenome>.

TEONATA, Natasya *et al.* An introduction to different types of gas chromatography. *Journal Sains dan Terapan Kimia*, v. 15, n. 8, 2021.

TSUKUDA, Y *et al.* Structure–activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with n-dodecanol and fluconazole. *Letters in Applied Microbiology*, v. 74, n. 3, p. 377–384, 2022.

VANZOLINI, Tania; MAGNANI, Mauro. Old and new strategies in therapy and diagnosis against fungal infections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, n. 1, p. 147, 2024.

WANG, Jiannan *et al.* Secretory IgA reduced the ergosterol contents of *Candida albicans* to repress its hyphal growth and virulence. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 108, n. 1, p. 244, 2024.

WANI, Snober S *et al.* Therapeutic potential of medicinal plant proteins: present status and future perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, v. 21, n. 5, p. 443–487, 2020.

WARING, Michael J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 5, n. 3, p. 235–248, 2010.

WILLIAMS, Samantha L *et al.* Effects of climate change on fungal infections. *Plos Pathogens*, v. 20, n. 5, p. e1012219, 2024.

World Health Organization. WHO. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. World Health Organization, 2022.

YOLIN ANGEL, Poomany Arul Soundara Rajan *et al*. Topical antifungal keratitis therapeutic potential of Clitoria ternatea Linn. flower extract: phytochemical profiling, in silico modelling, and in vitro biological activity assessment. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 2024.

YUSOFF, Ida Madiha *et al.* Phenolic compounds from piper plants: A review on ai integration for extraction, quantification, antioxidant, antimicrobial properties, and food applications. *Journal of Food Technology Research*, v. 12, n. 2, p. 47-67, 2025.

ZHANG, Chi *et al.* Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Food Chemistry*, v. 346, p. 128845, 2021.