

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DE EUGENOL FRENTE À ESPÉCIES DE *Candida*

Talita de Jesus Catterm Moreno, Monique Vargas de Gouvêa, Athos de Oliveira Sabino, Nicolly Soares Ferreira, Mariana Belizario de Oliveira, Mariana Drummond Costa Ignacchiti, Juliana Alves Resende.

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Avenida Alto Universitário, s/n, Guararema – 29.500-000 – Alegre-ES, Brasil, [morenotalitajesus@gmail.com](mailto:morenotalitajesus@gmail.com), [monique.gouvea@edu.ufes](mailto:monique.gouvea@edu.ufes), [oliveiraathos223@gmail.com](mailto:oliveiraathos223@gmail.com), [ni.colly\\_fereira@hotmail.com](mailto:ni.colly_fereira@hotmail.com), [belizmary@hotmail.com](mailto:belizmary@hotmail.com), [mariana.ignacchiti@ufes.br](mailto:mariana.ignacchiti@ufes.br), [juliana.resende@ufes.br](mailto:juliana.resende@ufes.br).

### Resumo

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente e um dos principais agentes etiológicos causadores são as leveduras do gênero *Candida* spp. Com o aumento de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. e a escassez de tratamento para as formas mais graves da doença, a busca por novos antifúngicos se torna essencial, justificando a necessidade de prospecção de novos agentes terapêuticos. Este estudo tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica de nove compostos triazólicos derivados do eugenol contra *Candida albicans* e espécies não-albicans. Foram realizados testes antifúngicos com compostos triazólicos nas concentrações de 31,25; 62,50; 125; 250 e 500 ppm. Três compostos apresentaram atividade antifúngica, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 62,50 – 500 ppm. A ação fungicida variou entre 125 e 500 ppm. Os compostos demonstraram potencial como novas opções terapêuticas, mas são necessários mais estudos para elucidar seus mecanismos de ação e avaliar sua eficácia clínica.

**Palavras-chave:** Candidíase. Eugenol. Fungicida. Triazol.

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde.

### Introdução

A candidíase tem ganhado destaque global devido ao aumento de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Estes fungos são integrantes da microbiota de várias mucosas do corpo humano, incluindo a boca, trato gastrointestinal, sistema geniturinário e até mesmo a pele. Em condições favoráveis, como desequilíbrios na microbiota, comprometimento imunológico ou uso prolongado de antibióticos, esses microrganismos podem adquirir características patogênicas, levando ao desenvolvimento de infecções fúngicas localizadas, conhecidas como candidíase, ou infecções sistêmicas (Ferrão, 2020; Serra *et al.*, 2018).

O tratamento das infecções fúngicas causadas por *Candida* frequentemente requer terapias prolongadas e dispendiosas, particularmente no caso de candidíase invasiva. Além disso, a disponibilidade de antifúngicos é significativamente menor em comparação com antimicrobianos utilizados para infecções bacterianas, somado a isto, tem-se a diminuição na eficácia dos tratamentos devido ao aumento da resistência dos patógenos a antifúngicos atuais, como os azóis e polienos (Fakhim *et al.*, 2018; Giolo; Svidzinski, 2010; Silva *et al.*, 2021).

Com o aumento contínuo das infecções fúngicas e o surgimento de linhagens de *Candida* resistentes aos antifúngicos disponíveis, além das opções terapêuticas restritas, é fundamental implementar novas abordagens para o tratamento antifúngico (Toledo, 2020; Rocha *et al.*, 2021). Nesse contexto, o uso histórico e crescente das plantas medicinais, conhecidas por suas propriedades curativas e preventivas, oferece uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos (Ferreira *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2020).

O Brasil possui uma vasta diversidade de plantas medicinais, e a utilização de produtos naturais extraídos dessas plantas surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de

medicamentos (Hasenclever *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2018). Compostos derivados de substâncias bioativas de planta medicinal representam uma importante fonte para a busca de novos agentes terapêuticos. Os compostos azólicos constituem a base da maioria dos medicamentos utilizados no tratamento de micoses. Dentro desta classe, os triazóis têm sido amplamente estudados e demonstrado resultados promissores (Silva, 2021).

O eugenol, um fenol natural, componente majoritário de óleos essenciais como o cravo-da-índia, tem-se destacado por suas propriedades terapêuticas, incluindo ações analgésicas, antibacterianas e antifúngicas (Fontenelle *et al.*, 2011, Ferreira *et al.*, 2024). Estudos demonstram que o eugenol é eficaz contra linhagens de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, tornando-o uma alternativa promissora para o tratamento da candidíase (Ferreira *et al.*, 2024; Silva, 2021).

Ao combinar as propriedades terapêuticas dos triazóis com o potencial antimicrobiano do eugenol, os compostos triazólicos derivados do eugenol representam uma estratégia promissora na busca por novos tratamentos para infecções fúngicas. Dessa forma, esta pesquisa tem como objetivo investigar o potencial antifúngico de nove compostos triazólicos derivados do eugenol frente às linhagens controle de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

## Metodologia

Foram utilizadas as linhagens *C. albicans* (ATCC 24433), *C. glabrata* (ATCC2001), *C. krusei* (ATCC20298), *C. parapsilosis* (ATCC22019) e *C. tropicalis* (ATCC750).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição de caldo, seguindo as especificações pré-estabelecidas pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI (2008). O inóculo foi preparado a partir de uma colônia isolada obtida a partir do crescimento leveduriforme no meio Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD). A turbidez dos inóculos foi ajustada para uma turbidez de 0,5 na escala de Mac Farland, o que equivale a  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços de fundo redondo, em triplicata. A mistura de reação final teve um volume de 200  $\mu$ L, o meio de cultura utilizado foi caldo Sabouraud-Dextrose (CSD).

Os nove compostos triazólicos foram testados nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 ppm. Após a montagem, as microplacas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ$  C por 24 - 48h. Em seguida foi realizada a inspeção visual do crescimento fúngico. Cada microplaca teve um controle de esterilidade (sem inóculo), controle de crescimento (inóculo + meio de cultura) e um controle positivo (inóculo + meio de cultura + anfotericina B), todos submetidos às mesmas condições de cultivo. Após o teste de microdiluição em meio líquido foi feito o plaqueamento dos poços da CIM dos compostos e do controle positivo, em placas de Petri contendo 25 mL de ASD. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ$  C por 24 horas.

O resultado foi definido pela presença ou ausência da formação de colônias, sendo a ação classificada como fungistática ou fungicida, respectivamente. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração dos compostos que foram capazes de impedir o crescimento visível do subcultivo.

## Resultados

Neste estudo, foi realizada inicialmente uma triagem com nove compostos triazólicos. Dentre esses compostos, três triazóis (EPT1, EPT5 e EPT9) demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de todas as leveduras avaliadas. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir completamente o crescimento fúngico após o período de incubação (Tabela 1).

A CIM dos compostos triazólicos testados variou de 500 a 62,5 ppm. No entanto, é importante notar que, dentro dessas faixas de concentração, alguns compostos demonstraram apenas ação fungistática. Por outro lado, a CFM, que representa a menor concentração capaz de erradicar completamente o crescimento das leveduras, variou entre 500 e 125 ppm (Tabela 1). Esses dados destacam a variação na eficácia dos compostos e fornecem informações cruciais sobre suas propriedades antifúngicas.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima (ppm) dos compostos triazólicos derivados de eugenol frente a linhagens de *Candida albicans* e não-*albicans*.

<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
--------------------	--------------------	------------------	------------------------	----------------------

Derivado do eugenol	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
EPT1	250	500	250	250	250	250	250	250	62,5	125
EPT5	250	250	250	250	250	250	125	125	125	250
EPT9	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Fonte: o autor.

## Discussão

O presente estudo demonstrou a atividade antifúngica dos três compostos triazólicos sobre *C. albicans* e espécies não-*albicans* através da determinação da CIM por microdiluição em caldo. Por meio desta técnica é possível avaliar se os compostos inibem o crescimento fúngico e determinar a CIM da droga. Este procedimento é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo CLSI para a determinação de susceptibilidade a antimicrobiano (Ostrosky *et al.*, 2008). Os compostos EPT1, EPT5 e EPT9 demonstraram potencial antifúngico ao inibir o crescimento de todas as espécies de *Candida* nas diferentes concentrações testadas. No entanto, a eficácia geral dos compostos varia significativamente.

O composto EPT1 apresentou os menores valores de CIM e CFM, 62,5 ppm e 125 ppm, respectivamente, frente à *C. tropicalis*. Para as demais linhagens, como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, o EPT1 exibiu CIM e CFM maiores, semelhante ao EPT5.

O composto EPT5 apresentou a menor CIM e CFM para *C. parapsilosis*. Contudo, a eficácia do EPT5 foi intermediária para *C. tropicalis*, quando comparado ao EPT1 e EPT9. Por outro lado, o composto EPT9 apresentou CIM e CFM uniformemente elevadas (500 ppm) para todas as linhagens testadas, indicando a menor eficácia entre os compostos avaliados.

Quando se compara a sensibilidade das linhagens de *Candida*, observa-se que *C. tropicalis* é mais suscetível ao EPT1, exibindo CIM e CFM baixas, enquanto *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram CIM e CFM mais altas para todos os compostos testados. Os maiores valores de CIM e CFM, dos 3 compostos avaliados, foi observado frente à *C. albicans*.

A partir dos dados apresentados na tabela 1, verifica-se que os compostos EPT1 e EPT5 na concentração de 250 ppm são eficientes na inibição do crescimento de todas as linhagens avaliadas, em contraste, ao EPT9 que necessita de uma concentração de 500 ppm para promover a inibição do crescimento fúngico.

Os compostos triazólicos derivados de eugenol, incluindo EPT1, EPT5 e EPT9, demonstraram potencial antifúngico ao inibir o crescimento de diversas espécies de *Candida* nas diferentes concentrações testadas. A eficácia variada entre esses compostos destaca a necessidade de uma análise mais detalhada para identificar quais triazólicos oferecem as melhores perspectivas terapêuticas para o tratamento de candidíase.

Estudos recentes corroboram a eficácia antimicrobiana dos derivados de eugenol (Didehdar, Chegini, Shariati, 2022; Jardim, 2018; Lima *et al.*, 2021). Ferreira *et al.* (2024) avaliaram a eficácia do eugenol contra linhagens clínicas de *C. tropicalis*, encontrando CIM e CFM de 64 ppm e 512 ppm, respectivamente. Para linhagens ATCC, as CIM e CFM foram 128 ppm e 512 ppm. Esses resultados confirmam a atividade antifúngica do eugenol em concentrações relativamente baixas, o que é consistente com os resultados observados no presente estudo. Fregnan *et al.* (2016) também mostraram potencial antifúngico e ação fungicida de compostos benzisoxazolidinônicos derivados do eugenol contra *C. glabrata* e *C. krusei*, reforçando a importância de explorar diferentes derivados do eugenol para ampliar as opções de tratamento.

Os triazóis, que pertencem à classe dos azólicos, constituem a base da maioria dos medicamentos antifúngicos atualmente utilizados. Esta classe de compostos tem sido amplamente estudada e demonstrado resultados promissores para o tratamento de micoses (Silva, 2021). Portanto, a investigação de novos triazólicos e seus derivados é essencial para otimizar as estratégias de tratamento contra infecções fúngicas, alinhando-se aos achados de eficácia dos compostos derivados de eugenol discutidos anteriormente.

## Conclusão

Dos nove compostos triazólicos derivados do eugenol avaliados, os derivados EPT1, EPT5 e EPT9 exibiram um significativo potencial antifúngico, inibindo o crescimento de todas as leveduras testadas. A CIM dos compostos variou de 62,5 a 500 ppm e a CFM, por sua vez, variou de 125 a 500 ppm, indicando a capacidade desses compostos de erradicar completamente o crescimento fúngico em determinadas concentrações. O EPT1 apresentou menores valores de CIM e CFM contra *C. tropicalis*, o EPT5 mostrou menores valores de CIM e CFM frente a *C. parapsilosis*, e o EPT9 apresentou maiores valores de CIM e CFM contra a todas as linhagens avaliadas. Esses achados destacam o potencial dos compostos EPT1, EPT5 e EPT9 como promissores agentes antifúngicos, fornecendo uma base sólida para futuros estudos e desenvolvimento de novos tratamentos para infecções fúngicas. Estudos adicionais são necessários para identificar o mecanismo de ação dos triazólicos derivados de eugenol e para confirmar sua eficácia em contextos clínicos variados.

## Referências

- CARVALHO, N. S. *et al.* Perception of pregnant women on the use of medicinal plants and herbal medicines: an integrative literature review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 9282-9298, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/13849>. Acesso em: 01 ago. 2024.
- CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2. ed. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.
- DIDEHDAR, M.; CHEGINI, Z.; SHARIATI, A. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida* species infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1-12, 2022.
- FAKHIM, H. *et al.* Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 377-382, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29460345/>. Acesso em: 02 ago. 2024.
- FERRÃO, S. K. **Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS**. 2020. 215f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.
- FERREIRA, E. T. *et al.* The use of medicinal and phytotherapy plants: an integrational review on the nurses performance. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 1511-1523, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/1383>. Acesso em: 01 ago. 2024.
- FERREIRA, V. B. S. *et al.* Atividade antifúngica do eugenol sobre a *Candida tropicalis*. **Peer Review**, v. 6, n. 5, p. 17-28, 2024.
- FONTENELLE, R. O. S. *et al.* Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and *O*-methyl derivatives. **Molecules**. v.16, n. 8, p. 6422-6431, 2011.
- FREGNAN, A. M. **Síntese e avaliação de derivados benzisoxazolinônicos do eugenol como potenciais agentes antifúngicos**. 2016. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, 2016.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

HASENCLEVER, L. *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

JARDIM, J. U. G. **Derivados do eugenol e isoeugenol e suas potencialidades antifúngica e antibiofilme**. 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacoquímica), Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

LIMA, J. A. C. *et al.* Síntese, atividade antifúngica e docking molecular de derivados do eugenol. **Scientia Plena**, v. 16, n. 5, p. 1-22, 2020.

MATTOS, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, 2018.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

ROCHA, W. R. V. *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de Virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de Resistência. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 4, p. 1-14, 2021.

SERRA, E. *et al.* Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2018.

SILVA, G. C. F. da *et al.* Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de *Morinda citrifolia* - Noni e do óleo de Melaleuca em *Candida albicans*. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, v. 16, n. 45, p. 147-155, 2021.

TOLEDO, L. G. de. ***Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela): prospecção química-biológica do óleo essencial com destaque no estudo de biofilme e controle da candidíase vulvovaginal**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2020.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).