

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DE TIMOL FRENTE À ESPÉCIES DE *Candida*

Monique Vargas de Gouvêa, Talita de Jesus Catterm Moreno, Yasmin Pena Santos, Mariana Belizario de Oliveira, Adilson Vidal Costa, Mariana Drummond Costa Ignacchiti, Juliana Alves Resende

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Avenida Alto Universitário, s/n, Guararema – 29.500-000 – Alegre-ES, Brasil, moniquegouvea88@gmail.com, morenotalitajesus@gmail.com, yasminpna@gmail.com, belizmary@hotmail.com, avcosta@hotmail.com, mariana.ignacchiti@ufes.br, juliana.resende@ufes.br.

Resumo

As infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida*, têm se tornado um problema crescente de saúde pública nos últimos anos. 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 necessário, justificando a relevância de investigação de novos agentes terapêuticos. Este estudo tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica de dezenove compostos triazólicos derivados do timol contra *Candida albicans* e espécies não-albicans. Foram realizados testes antifúngicos nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 ppm. Os resultados demonstraram que sete compostos apresentaram atividade antifúngica, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 125 a 500 ppm e a ação fungicida variando entre 250 e 500 ppm. Entretanto, o composto TT07 foi o mais eficaz, exibindo uma ampla atividade antifúngica, demonstrando um potencial significativo para se tornar uma nova alternativa terapêutica. No entanto, são necessários estudos complementares para revelar os mecanismos de ação e para avaliar sua eficácia clínica.

Palavras-chave: Antimicrobiano. *Candida albicans*. Candidíase. Triazol.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

Introdução

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente e um dos principais agentes etiológicos causadores dessas infecções são as leveduras do gênero *Candida*. A *Candida* é uma levedura comensal que habita diversas partes do organismo como o trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal. No entanto, em situações de desequilíbrio do sistema imunológico ou desestabilização da microbiota, ela pode causar patologias no hospedeiro (León-García *et al.* 2017, Rocha *et al.*, 2021). Este fungo causa a candidíase, uma doença infecciosa que tem se destacado no contexto mundial (Cordeiro; Matos; Maynard, 2022). Este tipo de infecção pode se apresentar superficial, forma mais comum, além da forma invasiva, que juntamente com a candidemia detêm elevadas taxas de mortalidade variando entre 36% a 63% (Barantsevich; Barantsevich, 2022).

Considerando-se o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o consequente aumento na mortalidade populacional relacionada, percebe-se que se faz necessário encontrar compostos mais eficazes, não tóxicos, que apresentem menos efeitos colaterais e representem uma abordagem inovadora e promissora para o tratamento das infecções fúngicas. 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 (Carvalho *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2024; Mattos *et al.*, 2018).

O timol é um monoterpeneo natural encontrado, majoritariamente, em óleos essenciais de plantas, como o tomilho, o orégano e outras. Este monoterpeneo apresenta atividades antifúngicas e, deste modo, pode ser indicado para a síntese de novas moléculas com efeito antifúngico. A partir do conhecimento do potencial antifúngico do timol e interesse na descoberta por novas moléculas derivadas de compostos naturais que apresentem atividades antifúngicas, torna-se relevante o investimento em pesquisas com compostos derivados do timol (Sun *et al.*, 2021).

Os triazóis, especificamente, são uma classe de compostos azólicos que têm atraído atenção significativa na pesquisa farmacêutica devido às suas propriedades antifúngicas. Os compostos contendo fragmento triazólico, como o fluconazol, itraconazol e voriconazol, são usados amplamente no tratamento de infecções fúngicas, principalmente em casos de micoses sistêmicas e superficiais (Cutrim, 2020).

Pesquisas indicam que os triazóis são efetivos contra diversos fungos patogênicos e têm um perfil de segurança relativamente favorável, consolidando-os como uma opção relevante para o tratamento de infecções fúngicas. A modificação estrutural desses compostos pode resultar no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com maior eficácia e menor toxicidade, ampliando assim as alternativas terapêuticas para o manejo de micoses (Souza *et al.*, 2020).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antifúngica de dezenove compostos triazólicos derivados do timol contra as linhagens de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Metodologia

Neste estudo, foi realizada inicialmente uma triagem da atividade antifúngica de dezenove compostos triazólicos desenvolvidos no Laboratório de Síntese Orgânica (LaSO) da Universidade Federal do Espírito Santo.

A atividade antifúngica foi realizada pelo método de microdiluição de caldo, seguindo as especificações pré-estabelecidas pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI (2008) no laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram utilizadas as linhagens *C. albicans* (ATCC 24433), *C. glabrata* (ATCC2001), *C. krusei* (ATCC20298), *C. parapsilosis* (ATCC22019) e *C. tropicalis* (ATCC750).

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 μ L, o meio de cultura utilizado foi caldo Sabouraud-Dextrose (CSD).

Os 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 e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

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 dezenove compostos. Dentre esses compostos, o derivado triazólico TT07 demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas com CIM variando de 125 a 500 ppm e outros seis compostos (TT01, TT05, TT13, TT16, TT19, TT20) apresentaram atividade antifúngica para ao menos uma das cepas testadas, com CIM de 500 ppm.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de CIM e CFM dos compostos triazólicos testados. Para o composto TT07 a CFM foi de 250 ppm em todas as linhagens avaliadas, exceto para *C. albicans* que revelou uma CFM de 500 ppm. A CFM dos demais compostos foi superior a 500 ppm em todas as linhagens avaliadas (Tabela 1).

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

| Derivado do timol | <i>C. albicans</i> | | <i>C. glabrata</i> | | <i>C. krusei</i> | | <i>C. parapsilosis</i> | | <i>C. tropicalis</i> | |
|-------------------|--------------------|------|--------------------|------|------------------|------|------------------------|------|----------------------|------|
| | CIM | CFM | CIM | CFM | CIM | CFM | CIM | CFM | CIM | CFM |
| TT01 | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| TT02 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT03 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT04 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT05 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| TT06 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT07 | 500 | 500 | 250 | 250 | 125 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| TT08 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT09 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT10 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT11 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT13 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| TT14 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT15 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT16 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT17 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT18 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT19 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TT20 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |

Fonte: Os autores.

Discussão

O presente estudo realizou a triagem da atividade antifúngica de compostos triazólicos, derivados do timol, sobre *C. albicans* e espécies não-albicans através da técnica de microdiluição em caldo. Por meio desta técnica é possível avaliar a capacidade de compostos em promover a inibição do 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).

Entre os compostos derivados de timol, o triazólico TT07 foi o mais eficaz, exibindo uma ampla atividade antifúngica. Ele se destacou especialmente contra *C. krusei*, para a qual apresentou a menor CIM registrada (125 ppm), sendo o único composto a inibir eficazmente essa cepa em concentrações tão baixas. Além disso, o TT07 demonstrou CIM e CFM de 250 ppm para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, valores de CIM e CFM mais baixas para as cepas em relação aos demais compostos testados. Em relação a *C. albicans*, o TT07 apresentou uma CIM e CFM de 500 ppm, superior ao valor registrado para o composto em relação as outras cepas, mas ainda assim significativo em comparação com outros compostos testados, que se mostraram menos eficazes ou inativos. Sua capacidade de alcançar CIM e CFM em concentrações relativamente mais baixas indica uma potência e consistência na inibição do crescimento fúngico em comparação com os outros compostos.

Por outro lado, a maioria dos outros compostos testados, incluindo TT01, TT02, TT03, TT04, TT05, TT06, TT08, TT09, TT10, TT11, TT13, TT14, TT15, TT16, TT17, TT18, TT19 e TT20, apresentou valores de CIM e CFM superiores a 500 ppm para a maioria das cepas avaliadas, indicando uma atividade antifúngica limitada ou ineficaz. Embora alguns desses compostos, como o TT05 e o TT13, tenham mostrado alguma atividade contra *C. parapsilosis*, com CIM de 500 ppm, o desempenho geral foi insuficiente para justificar um potencial terapêutico, especialmente quando comparado ao TT07.

Estudos confirmam o potencial antifúngico de derivados de timol (Chatrath *et al.*, 2019; Cutrim, 2020; Souza *et al.*, 2020). Brito *et al.* (2015) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta) e de seu componente majoritário timol, sobre cepas de *Candida*. Os autores verificaram que a CIM do óleo frente às cepas variou entre 64 e 256 ppm, enquanto a CIM do timol foi estabelecida entre 32 e 64 ppm. A CFM do óleo essencial foi determinada entre 128 e 512 ppm e para o timol foram encontrados valores entre 64 e 128 ppm. Souza *et al.* (2020) avaliaram o potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. Os testes de CIM e CFM revelaram que o timol exerceu um efeito fungicida em todas as cepas analisadas, com CFM de 128 ppm e CIM de 64 ppm.

Os azóis, classe a qual pertencem os triazóis, constituem um grupo de agentes antifúngicos sintéticos, com um amplo espectro de atividade e que tem demonstrado resultados promissores no tratamento de micoses. Os medicamentos desta classe oferecem atividade contra muitos patógenos fúngicos sem os efeitos nefrotóxicos graves observados com a anfotericina B (Cutrim, 2020). Logo, a exploração de novos triazólicos e seus derivados é essencial para melhorar as abordagens terapêuticas contra infecções fúngicas.

Conclusão

O composto triazólico TT07 demonstrou atividade antifúngica contra todas as linhagens de *Candida*, destacando-se por apresentar menores valores de CIM e CFM em relação aos demais compostos. Estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos de ação do derivado triazólico e para confirmar sua eficácia em contextos clínicos variados. Assim, o presente estudo, revela o potencial antifúngico do composto TT07 para se tornar uma nova alternativa terapêutica e ressalta a necessidade de explorar novos compostos derivados de timol para ampliar as opções de tratamento para as infecções fúngicas.

Referências

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

BRITO, D. I. V. *et al.* Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p. 836-844, 2015.

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.

CHATRATH, A. *et al.* *In Vitro* anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

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.

CORDEIRO, E. S.; MATOS, L. S. C. de; MAYNARD, D. C. Candidiasis: dietotherapy and the use of strains as adjuvants in treatment. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e24211931786, 2022.

CUTRIM, T. A. de S. **Avaliação da atividade antifúngica de novos compostos triazólicos derivados do timol**. 2020. 70f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Vila Velha, 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.

LEÓN-GARCÍA, M. C. *et al.* Evaluation of cell wall damage by dimethyl sulfoxide in *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 8, 2017.

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 (CIM) 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.

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

SUN, C. *et al.* Ultrasound-mediated molecular self-assemble of thymol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for fruit preservation. **Food chemistry**, v. 363, n. 10, p. 52-89, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).