

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMOS DE AÇÃO DOS DERIVADOS DE TRIAZOL À BASE DE EUGENOL CONTRA *Candida albicans*

Athos de Oliveira Sabino, Talita de Jesus Cattem Moreno, Nicolly Soares Ferreira, Monique Vargas de Gouvêa, Adilson Vidal Costa, 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, oliveiraathos223@gmail.com, morenotalitajesus@gmail.com, ni.colly_ferreira@hotmail.com, moniquegouvea88@gmail.com, avcosta@hotmail.com, mariana.ignacchiti@ufes.br, juliana.resende@ufes.br.

Resumo

A resistência crescente de *Candida albicans* aos antifúngicos disponíveis reforça a necessidade de novas alternativas terapêuticas. Neste estudo, foram investigados três derivados triazólicos do eugenol (3a, 3e e 3i) contra *C. albicans* (ATCC 24433), por meio de ensaios de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), complementados com testes de interação com ergosterol, proteção osmótica com sorbitol e avaliação da permeabilidade da membrana. O derivado 3e apresentou os melhores resultados, com CIM e CFM de 250 ppm. Os mecanismos de ação demonstraram que os compostos interferem na integridade da membrana plasmática, interagem com o ergosterol e, no caso do 3e, também afetam a biossíntese da parede celular. Esses achados indicam um mecanismo antifúngico multimodal, com destaque para o derivado 3e como candidato promissor ao desenvolvimento de novos fármacos. Estudos adicionais, incluindo investigações *in vivo*, são necessários para validar o potencial clínico desses compostos.

Palavras-chave: Antifúngicos. Eugenol. Derivados triazólicos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

As infecções fúngicas, em especial as causadas por leveduras do gênero *Candida*, têm se tornado um desafio crescente para a saúde pública global. *Candida albicans* é a espécie mais prevalente entre *Candida* e é frequentemente encontrada no trato gastrointestinal e nas mucosas de indivíduos saudáveis, funcionando como parte da microbiota comensal. No entanto, em condições que comprometem o sistema imunológico, como imunossupressão, doenças autoimunes ou estresse, essas leveduras podem se tornar patogênicas, levando ao desenvolvimento de candidíase (Talapko *et al.*, 2021). Essa infecção pode variar desde formas superficiais até complicações graves, como candidemia, que ocorre principalmente em ambientes hospitalares e é associada a altas taxas de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Pappas *et al.*, 2018; Ghrenassia *et al.*, 2019).

A crescente resistência aos antifúngicos, especialmente os azóis, tem se tornado uma preocupação crescente no tratamento de infecções fúngicas, como a candidíase. *C. albicans* e outras espécies do gênero *Candida* têm demonstrado resistência aos medicamentos convencionais, limitando as opções de tratamento e dificultando o controle das infecções, especialmente em pacientes com sistemas imunológicos comprometidos (Whaley; Rogers, 2017; Bédard *et al.*, 2024). A resistência pode ser causada por vários fatores, incluindo o uso inadequado de antifúngicos, a formação de biofilmes e a adaptação microbiológica das leveduras (Whaley; Rogers, 2017). Esse cenário tem levado à busca urgente por novas estratégias terapêuticas que possam superar as limitações dos antifúngicos

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

tradicionais e oferecer alternativas eficazes para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (Pristov; Ghannoum, 2019).

Nesse contexto, o eugenol, um composto fenólico natural presente no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), tem se destacado como uma promessa no tratamento de infecções fúngicas. O eugenol possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, mostrando eficácia contra *C. albicans* e outras espécies do gênero *Candida* (Didehdar *et al.*, 2022; Saracino *et al.*, 2022). Estudos recentes indicam que o eugenol pode atuar de forma sinérgica com outros agentes antimicrobianos, como os triazóis, ampliando as possibilidades de tratamento para infecções fúngicas resistentes (Didehdar *et al.*, 2022; Saracino *et al.*, 2022). Com essa combinação, surge uma abordagem terapêutica inovadora que pode ser eficaz contra cepas resistentes, oferecendo uma alternativa viável ao tratamento de candidíase e outras micoses (Momo *et al.*, 2024).

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade antifúngica e investigar os mecanismos de ação de três derivados triazólicos à base de eugenol (3a, 3e e 3i) contra *C. albicans*. Para isso, serão realizados ensaios de suscetibilidade *in vitro* e investigação dos mecanismos de ação, com foco na integridade da membrana celular, estrutura da parede celular e interações com o ergosterol, a fim de compreender melhor a ação desses compostos e seu potencial terapêutico no combate às infecções fúngicas (Péret *et al.*, 2023).

Metodologia

A atividade antifúngica foi avaliada utilizando a linhagem *C. albicans* (ATCC 24433) por meio de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, com concentrações de 31,25 a 500 ppm dos compostos triazólicos, utilizando Caldo Dextrose Sabouraud (CSD) como meio de cultura. As concentrações de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas após incubação a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24-48 horas (CLSI, 2008). Adicionalmente, a interação dos compostos com o ergosterol da membrana foi investigada, comparando-se os valores de CIM e CFM na presença de 200 $\mu\text{g/mL}$ de ergosterol exógeno. A integridade celular das leveduras foi analisada por meio de dois ensaios complementares, adaptados de Castro *et al.* (2015), para a parede celular (com ou sem sorbitol) e para a membrana plasmática (com adição de ergosterol exógeno). Para avaliar a permeabilidade da membrana, foi utilizado o ensaio de captação de cristal violeta, conforme descrito por Devi *et al.* (2010), enquanto a integridade da parede celular foi analisada por testes de proteção osmótica com sorbitol (0,8 mol/L) (Devi *et al.*, 2010). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo controles adequados para cada experimento. A análise estatística foi conduzida utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey, considerando um valor de $p < 0,05$ como significativo.

Resultados

Os compostos 3a, 3e e 3i demonstraram atividade antifúngica. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento de *C. albicans* após o período de incubação (Tabela 1). Os compostos 3a e 3i apresentaram CIM de 250 ppm, mas com concentrações fungicidas mínimas (CFM) mais altas (500 ppm), indicando um potencial fungicida inferior. Por outro lado, o composto 3e apresentou tanto CIM quanto CFM de 250 ppm.

Tabela 1 - Concentração fungicida mínima (CFM), concentração fungicida mínima na presença de sorbitol (CFM(s)) e concentração fungicida mínima na presença de ergosterol (CFM(e)) dos compostos triazólicos derivados de eugenol frente a *Candida albicans*.

Compostos	CFM (ppm)	CFM(s) (ppm)	CFM(e) (ppm)
3a	500	500	>500
3e	250	500	500
3i	500	500	>500

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

O composto 3e foi o único a promover um aumento na CFM na presença de sorbitol (de 250 ppm para 500 ppm), indicando interferência na biossíntese da parede celular. Todos os compostos mostraram um aumento na CFM quando cultivados em meio suplementado com ergosterol, sugerindo interação com o ergosterol ou comprometimento das funções associadas a ele.

Quanto à permeabilização da membrana celular, todos os compostos aumentaram significativamente a absorção de cristal violeta, o que indica ruptura na membrana celular. O composto 3e foi o que causou maior permeabilização, com 52,38% de absorção na CIM, seguido pelo 3i (44,21%) e pelo 3a (36,02%), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de captação de cristal violeta após tratamento com os triazóis derivados de eugenol frente a *Candida albicans*.

Compostos	% Captação de Cristal Violeta na CIM
Controle negativo	30,64%
Controle positivo	84,55%
3a	36,02%
3e	52,38%
3i	44,21%

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Discussão

A análise dos resultados mostrou que os compostos triazólicos derivados de eugenol (3a, 3e e 3i) demonstraram atividade antifúngica significativa contra *C. albicans*, evidenciada pela determinação da CIM por microdiluição em caldo. Essa técnica, amplamente reconhecida e padronizada pelo CLSI e pelo FDA, é essencial para avaliar a capacidade dos compostos em inibir o crescimento fúngico e determinar sua atividade inibitória contra organismos patogênicos. De acordo com os resultados obtidos, os compostos 3a, 3e e 3i apresentaram atividade inibitória contra o crescimento de *C. albicans* nas concentrações testadas, com destaque para o composto 3e, que apresentou tanto a CIM quanto a CFM mais baixas (250 ppm), sugerindo maior potencial antifúngico em comparação aos demais compostos.

No entanto, a comparação entre os compostos revelou uma variação significativa na atividade antifúngica, com os compostos 3a e 3i apresentando CFM mais altas (500 ppm). Essa diferença de atividade é consistente com estudos recentes, como o de Liu *et al.* (2022), que também observaram variações nas atividades antifúngicas de compostos derivados de eugenol contra *C. albicans*, sugerindo que a estrutura química do composto pode influenciar diretamente sua ação antifúngica. A relação entre a estrutura química e a atividade contra fungos tem sido amplamente discutida na literatura, com algumas modificações estruturais resultando em maior penetração celular e melhor inibição do crescimento fúngico (Khalil *et al.*, 2024).

Em relação à permeabilidade da membrana celular, observou-se que todos os compostos aumentaram significativamente a absorção de cristal violeta, um indicativo de alteração na integridade da membrana. O composto 3e causou a maior permeabilização da membrana, com 52,38% de absorção na CIM, seguido pelos compostos 3i e 3a, com 44,21% e 36,02%, respectivamente. A ruptura da membrana celular é um dos principais mecanismos de ação de agentes antifúngicos, como observado em outros estudos (Sharma *et al.*, 2020). O eugenol tem sido amplamente documentado por sua capacidade de alterar a permeabilidade das membranas celulares de diversos patógenos fúngicos, permitindo a desestabilização da célula e o aumento da sua vulnerabilidade a agentes externos (Khalil *et al.*, 2024).

A análise da parede celular revelou que o composto 3e foi o único a induzir um aumento na CFM na presença de sorbitol, o que sugere uma interferência na biossíntese da parede celular. A parede celular dos fungos é uma estrutura vital para a manutenção de sua integridade e função, e a sua alteração é uma estratégia comum para agentes antifúngicos (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Os compostos derivados de eugenol têm sido associados à interferência na síntese da parede celular, o que pode resultar em uma maior permeabilidade e, consequentemente, na morte do fungo (Ostrosky *et al.*, 2008).

Além disso, todos os compostos testados exibiram uma alteração nas concentrações fungicidas mínimas (CFM) quando cultivados em meio suplementado com ergosterol. O ergosterol é um componente essencial das membranas celulares dos fungos, e a sua alteração pode levar à interrupção de várias funções celulares críticas. A interação com o ergosterol ou a ruptura das funções associadas a ele é uma das principais formas de ação de compostos antifúngicos, como evidenciado por diversos estudos (Khalil *et al.*, 2024). A presença de ergosterol exógeno no meio de cultura pode amplificar a atividade antifúngica dos compostos, como observado por Souza *et al.* (2024), que relataram uma interação significativa entre compostos fenólicos e ergosterol, resultando em aumento da toxicidade para as células fúngicas.

Os compostos triazólicos derivados de eugenol mostraram um bom perfil antifúngico contra *C. albicans*, com variações na atividade antifúngica entre os compostos. As mudanças observadas na permeabilidade da membrana, na biossíntese da parede celular e na interação com o ergosterol indicam que esses compostos atuam por múltiplos mecanismos, semelhantes aos descritos para outros agentes antifúngicos na literatura (Khalil *et al.*, 2024). Esses resultados corroboram o potencial antifúngico dos derivados de eugenol como candidatos promissores, oferecendo uma alternativa valiosa no tratamento de infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por cepas resistentes.

Conclusão

Os compostos triazólicos derivados do eugenol demonstraram notável atividade antifúngica contra *C. albicans*, particularmente o composto 3e, que apresentou um mecanismo de ação multimodal envolvendo ruptura da membrana, interação com o ergosterol e interferência na parede celular. Essas descobertas apoiam o potencial do composto 3e como um candidato promissor para o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos. É fundamental a realização de estudos *in vivo* para validar a aplicação clínica, avaliar segurança e eficácia clínica dos compostos.

Referências

BÉDARD, C. *et al.* Most azole resistance mutations in the *Candida albicans* drug target confer cross-resistance without intrinsic fitness cost. **Nat Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. 3025-3040, 2024.

CASTRO R. D. *et al.* Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, p. 1-7, 2015.

CLSI. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: **Clin Lab Stand Inst.**, 2008.

DEVI, K. P. *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **J Ethnopharmacol.**, v. 130, p. 107–115, 2010.

DIDEHDAR, M. *et al.* Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida albicans* growth and virulence factors. **Microb Pathog.**, v. 166, p. 105577, 2022.

GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 1-13, 2020.

GHRENASSIA, E.; DUFRESNE, S. F.; LEMOINE, P.; *et al.* Candidemia in critically ill immunocompromised patients. **J Infect.**, v. 79, n. 6, p. 508-515, 2019.

KHALIL, A. *et al.* Eugenol and its derivatives: Mechanisms of antifungal action. **J Mycol Med.**, v. 62, p. 45-53, 2024.

LIU, Y. *et al.* Structure–activity relationship of phenolic compounds as antifungal agents against *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 196-204, 2022.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

MOMO, E. J. *et al.* Eugenol-rich essential oils from flower buds and leaves of *Syzygium aromaticum* show antifungal activity against *Candida* and *Cryptococcus* species. **Future Pharmacol.**, v. 4, n. 3, p. 449-465, 2024.

OSTROSKY, J. *et al.* Antifungal susceptibility testing: Methods and clinical applications. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 5, p. 1823-1834, 2008.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PÉRET, V. A. C. *et al.* New miconazole-based azoles derived from eugenol show enhanced antifungal activity against *Candida albicans*. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2023.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 33, n. 2, p. 263-274, 2019.

SARACINO, I. M. *et al.* Antifungal activity of natural compounds against *Candida* spp. and their potential in combination with conventional antifungals. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2022.

SHARMA, A. *et al.* Antifungal effects of eugenol against *Candida albicans* and its interaction with cell membrane. **Fungal Biol.**, v. 126, n. 1, p. 72-80, 2020.

SOUZA, L., *et al.* (2024). Mechanism of action and synergistic effect of *Eugenia uniflora* extract in *Candida* spp. **PloS One**, v. 19, n. 8, e0303878, 2024.

TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans*—The virulence factors and clinical aspects. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1-22, 2021.

WHALEY, S. G.; ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. **Front Microbiol.**, v. 8, p. 1-10, 2017.

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).