UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELA BOMFIM DE BARROS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO MONOTERPENO α-PINENO FRENTE A LINHAGENS DE *Candida albicans*

Recife
2023

DANIELA BOMFIM DE BARROS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO MONOTERPENO α-PINENO FRENTE A LINHAGENS DE *Candida albicans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor(a) em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientadora: Profª Drª Márcia Vanusa da Silva

Coorientadores:

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra

Prof. Dr. Lucio Roberto Cançado Castellano

Recife

2023

Catalogação na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Barros, Daniela Bomfim de.
Atividade antifúngica e mecanismo de ação do monoterpeno a- pineno frente a linhagens de *Candida albicans*. / Daniela Bomfim de Barros . – 2023.

87 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva.
Coorientadores:Felipe Queiroga Sarmento Guerra; Lucio Roberto Cançado Castellano

.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Produtos naturais. 2. Terpenos. 3. Atividade antifúngica. 4.Biofilme. 5. Candidíase. 6. In silico. 7. In vitro. I. Silva, Márcia Vanusa da (Orient.). II. Guerra, Felipe Queiroga Sarmento (Coorient.). III. Castellano, ucio Roberto Cançado (Coorient.). IV. Título.

570 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2024-052

DANIELA BOMFIM DE BARROS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO MONOTERPENO α-PINENO FRENTE A LINHAGENS DE *Candida albicans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Márcia Vanusa da Silva (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Drª. Maria Betânia de Oliveira Melo (Examinadora Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Drª. Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque (Examinador Externo)

Universidade de Pernambuco

_____

Profª Drª Ana Caroline de Lima Silva (Examinador Externo)

Centro Universitário UNIPÊ

Ao Senhor Deus, Autor e Consumador da minha fé e aos meus pais, irmã e noivo por todo o incentivo, cuidado e amor e por estarem sempre ao meu lado, torcendo e acreditanto em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todo o amor e misericórdia, pois nos momentos difíceis e de grandes provações, nos quais as forças pareciam se esvair, Ele sempre se fez presente e me ajudou a superar os obstáculos para, assim, alcançar mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais, Antônio Pedro Bomfim de Barros e Maria da Conceição Bomfim de Barros, pela educação que a mim dedicaram. Exemplos de sabedoria, garra e honestidade. Obrigada por todo amor e dedicação de todos esses anos.

À minha irmã, Rafaela Bomfim de Barros, pela relação fraterna, conversas nos momentos de dificuldade e apoio irrestrito.

Ao meu noivo, Bruno Leonardo Alves Chalegre, por ser tão importante na minha vida. Graças ao seu companheirismo, apoio, paciência, compreensão, alegria e amor, esse trabalho também pôde ser concretizado.

Às minhas avós, Lúcia Maria do Bomfim Ribeiro (*in memoriam*) e Diva Bomfim de Barros (*in memoriam*) por terem sido, para mim, exemplos de mulheres perseverantes, fortes, batalhadoras e decididas. Se escrevo é para honrar a minha ancestralidade!

Ao meu avô, José Ribeiro de Barros (*in memoriam*), um homem simples, que desde que entrei na faculdade me chamava de “minha doutora” e chorou muito ao me ver formada. Certamente vovô estaria orgulhoso por mais esta conquista.

À minha querida orientadora, Professora Doutora Márcia Vanusa, por ter aceito a orientação, confiado no meu trabalho e me apoiado de maneira irrestrita no momento em que mais precisei. Minha eterna gratidão e admiração pelo ser humano e profissional que és, professora!

Ao meu querido e excepcional coorientador e amigo, Professor Doutor Felipe Queiroga, por ter me acolhido em seu laboratório, ajudando com absolutamente tudo o que eu precisava e nunca medindo esforços para a concretização da pesquisa. Me faltam palavras para expressar o quão grata eu sou. Obrigada, Felipe, pois seu exemplo é meu espelho!

Ao Professor Doutor Lúcio Roberto Cançado pela coorientação e por toda a ajuda inicial com a condução do trabalho.

Aos meus valiosos amigos e companheiros nesta caminhada: Aleson Pereira, Allan Batista, Hermes Diniz, Larissa Alves, Luanna de Oliveira, Mariana

Cavalcante e Rafael Carlos, por todo apoio na execução do trabalho. Vocês são maravilhosos!

Às minhas queridas alunas de iniciação científica, Anna Lisboa a Gheorgia Medeiros, por toda a ajuda prestada na reta final dessa pesquisa. Muito obrigada, meninas. Vocês foram imprescindíveis!

Aos Professores Doutores Juliana Moura, Plínio da Silva Rocha, Luciana Scotti, Edeltrudes de Oliveira e Marianna Sobral por toda a colaboração com o artigo experimental da tese, bem como à colega Doutora Danielle Nóbrega, com toda a ajuda nos experimentos de mecanismo de ação.

Aos queridos Fafá e Júlio, farmacêutica e técnico, respectivamente, do Laboratório de Micologia da UFPB, sempre zelando pelo laboratório e nos ajudando no que fosse necessário.

Aos Professores Doutores Maria Betânia Melo, Bruno Severo, Priscilla Sales e Ana Caroline Lima por prontamente aceitarem o convite para participarem de minha defesa de tese de doutorado, momento ímpar em minha vida. Me sinto honrada em poder contar com a avaliação e valorosa contribuição de profissionais tão admiráveis, que são referência em suas respectivas áreas.

À coordenação, secretaria e docentes do Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas pelo elevado nível de compromisso com as necessidades dos discentes e incansáveis esforços para garantir um programa de excelência.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer os recursos necessários para o desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa.

A todos aqueles que acreditam na ciência, perseveram em seu nome e buscam por melhores condições de trabalho neste país, mesmo com tantos ataques e desmontes sofridos em um passado recente. Dias melhores virão!

À todas as mulheres, cientistas ou não, que vieram antes de mim, pois se me levanto é sobre o sacrifício de todas elas.

À todos os aqueles que sofrem com a desigualdade social e educacional, ainda mais evidenciada pela pandemia de COVID-19, para que tenham direito à educação, garantida a todos pela Constituição Federal Brasileira. Que cada vez mais doutoras e doutores surjam de lugares de grande resistência

É preciso ter esperança. Mas tem de ser esperança do verbo esperançar. Por que tem gente que tem esperança do verbo esperar. Esperança do verbo esperar não é esperança, é espera. “Ah, eu espero que melhore, que funcione, que resolva”. Já esperançar é ir atrás, é se juntar, é não desistir. É ser capaz de recusar aquilo que apodrece a nossa capacidade de integridade e a nossa fé ativa nas obras. Esperança é a capacidade de olhar e reagir àquilo que parece não ter saída. Por isso, é muito diferente de esperar; temos mesmo é de esperançar!

(Paulo Freire)

RESUMO

A candidíase, doença causada por fungos do gênero *Candida* spp., tem sido relatada como um grave problema de saúde pública, ocasionando até mesmo infecções sistêmicas em indivíduos. Os fármacos utilizados no tratamento da candidíase são escassos e possuem elevada toxicidade, o que leva a busca por substâncias advindas de produtos naturais, com destaque para os terpenos. O objetivo do presente estudo foi investigar a atividade antifúngica de um monoterpeno, o α- pineno, frente cepas de *Candida albicans*. Os ensaios utilizados para o referido estudo foram: teste de determinação concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), através da técnica de microdiluição em caldo do terpeno isolado; Ensaio de associação *(checkerboard*) entre o o α- pineno e os antifúngicos fluconazol e anfotericina B; Ensaio de cinética de morte (*time kill*); Mecanismo de ação usando testes *in silico* e *in vitro*; Atividade antibiofilme contra *Candida albicans* e toxicidade contra células humanas (HaCat). O α- pineno apresentou uma CIM entre 128 e 512 ug/mL e a CFM teve os mesmos valores de CIM frente às 8 cepas ensaiadas. As demais concentrações não foram possíveis de determinar a CFM, devido ao crescimento ser maior ou igual a CIMx4 (limite do teste). No ensaio de associação, a interação do α- pineno e fluconazol foi indiferente, já combinações entre α- pineno com a anfotericina B e a nistatina obtiveram efeitos sinérgicos. Os resultados da simulação de docking molecular demonstraram que a timidilato sintase (−52 kcal mol−1) e a δ-14-sterol redutase (−44 kcal mol−1) apresentaram as melhores interações. Os resultados in vitro sugerem que a atividade antifúngica do α-pineno envolve a ligação ao ergosterol na membrana celular. No ensaio de *time kill*, a atividade antifúngica não foi dependente do tempo e também inibiu a formação de biofilme ao romper até 88% do biofilme existente. Não foi citotóxico para os queratinócitos humanos. Assim sendo, o presente estudo apóia o α-pineno como um candidato para tratar infecções fúngicas causadas por *C. albicans.*

Palavras-chave: Produtos naturais. Terpenos. Atividade antifúngica. Biofilme. Candidíase. *In silico. In vitro.*

ABSTRACT

Candidiasis, a disease caused by fungi of the genus *Candida* spp., has been reported as a serious public health problem, even causing systemic infections in individuals. The drugs used in the treatment of candidiasis are scarce and have high toxicity, which leads to the search for substances derived from natural products, especially terpenes. The aim of the present study was to investigate the antifungal activity of a monoterpene, α-pinene, against strains of Candida albicans. The assays used for that study were: minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) determination test, through the technique of microdilution in broth of the isolated terpene; Association assay (checkerboard) between α-pinene and the antifungals fluconazole and amphotericin B; Kinetics of death test (time kill); Mechanism of action using in silico and in vitro tests; Antibiofilm activity against Candida albicans and toxicity against human cells (HaCat). α-pinene presented a MIC between 128 and 512 ug/mL and the MIC had the same MIC values against the 8 tested strains. The other concentrations were not possible to determine the CFM, due to the growth being greater than or equal to CIMx4 (test limit). In the association test, the interaction of α-pinene and fluconazole was indifferent, whereas combinations of α-pinene with amphotericin B and nystatin obtained synergistic effects. Molecular docking simulation results showed that thymidylate synthase (−52 kcal mol−1) and δ-14-sterol reductase (−44 kcal mol−1) showed the best interactions. The in vitro results suggest that the antifungal activity of α-pinene involves binding to ergosterol in the cell membrane. In the time kill assay, the antifungal activity was not time dependent and also inhibited biofilm formation by disrupting up to 88% of the existing biofilm. It was not cytotoxic to human keratinocytes. Therefore, the present study supports α-pinene as a candidate to treat fungal infections caused by C. albicans.

Keywords: Natural products. Terpenes. Antifungal activity. Biofilm. Candidiasis. In silico. In vitro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia da Candida albicans. Legenda: Leveduras (A) e Pseudo- hifas (B) de Candida albicans. 19
Figura 2- Mecanismos de ação dos antifúngicos em alvo celular 21
Figura 3- Estrutura químicas dos enantiômeros positivo e negativo de α- pineno. ...26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COVID19	*Coronavirus disease 19*
HIV	*Human Immunodeficiency Virus*
MALDI- TOF MS	Espectroscopia de massa por ionização com dessorção à laser assistido por uma matriz e analisador de tempo de vôo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeira da polimerase
SARS- CoV- 2	*Severe acute respiratory sindrome coronavirus- 2*
TGI	Trato gastrointestinal
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 15

2.1 GERAL 15

2.2 ESPECÍFICOS 15

3 REFERENCIAL TEÓRICO 16

3.2 *CANDIDA SPP*. 17

3.2.1 *Candida albicans* 18

3.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA 21

3.4 COMPOSTOS NATURAIS 23

3.4.1 Terpenos 24

3.4.1.1 *α- pineno* 25

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28

4.1 ARTIGO 1- EFEITO ANTIFÚNGICO DE A- PINENO ISOLADO E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIFÚNGICOS FRENTE ÀS CEPAS DE *Candida albicans* 28

4.2 ARTIGO 2- ANTIFUNGAL ACTIVITY OF TERPENES ISOLATED FROM CAATINGA: A REVIEW 37

4.3 ARTIGO 3- A-PINENE: DOCKING STUDY, CYTOTOXICITY, MECHANISM OF ACTION, AND ANTI-BIOFILM EFFECT AGAINST *Candida albicans*… 47

5 CONCLUSÕES 59

6 SÚMULA CURRICULAR 60

REFERÊNCIAS 65

ANEXO A – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM SIMPÓSIO 75

ANEXO B – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO INTERNACIONAL 78

ANEXO C– CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS 80

ANEXO D– ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO 87

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por fungos têm sido consideradas como um grave problema de saúde pública, apresentando relativa resistência frente aos tratamentos e fármacos disponíveis na atualidade (SCHLEUSENER et al., 2022). Dentre os fungos causadores de graves infecções, destacam-se aqueles pertencentes ao gênero *Candida* spp., tornando-se importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (MULET BAYONA et al., 2020). A candidíase, doença causada por fungos desse gênero, varia desde infecções superficiais, até as mais invasivas (sistêmicas), sendo a espécie mais comum a ocasionar tais infecções a *Candida albicans*, levedura primariamente comensal, que coloniza superfícies do trato gastrointestinal e genital (PAPPAS et al., 2018; RAI et al., 2021).

O recente cenário de pandemia do *Coronavirus disease* 2019 (COVID-19), infecção causada pelo vírus *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2), demostrou o aumento de casos de candidemia tem sido relatados principalmente em pacientes gravemente enfermos, pela exposição a fatores de risco clássicos e específicos da COVID-19 em Unidade de terapia intensiva (UTI) (NUCCI et al., 2021; SHARMA et al., 2021; KAYAASLAN et al., 2022).

Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um relatório onde estão listados fungos patogênicos prioritários, os quais representam ameaça à saúde pública, devido aos riscos de morbidade/ mortalidade. Das 19 espécies fúngicas relatadas, *Candida albicans* encontra-se no grupo dos patógenos com elevado risco de prioridade (crítico), devido a maior incidência e aumento no número de casos (WHO, 2022).

Os antifúngicos convencionais usados no tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. são os azóis (fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol, cetoconazol e voriconazol) e os polienos (anfotericina B e nistatina), podendo recorrer, em casos de maior gravidade, às fluoropirimidinas e equinocandinas (caspofungina) (KATHIRAVAN et al., 2012; PATIL, 2015; SANTOS et al., 2018; LOPES; LIONAKIS, 2022; ZARAGOZA et al., 2021).

Os azóis são agentes fungistáticos sintéticos de amplo espectro, possuem baixa toxicidade e elevada biodisponibilidade. Entretanto, tratamentos prolongados podem levar à resistência ao antifúngico. Já a anfotericina B, indicada para formas graves da doença invasiva, é considerada padrão para o tratamento de infecções

fúngicas, no entanto possui elevada toxicidade (KATHIRAVAN et al., 2012; BHATTACHARYA; VIEIRA; SANTOS, 2017; SANTOS; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Levando em consideração os efeitos citotóxicos dos antifúngicos convencionais, bem como o surgimento de cepas clínicas multirresistentes, é salutar a busca por produtos naturais, como fonte de compostos bioativos, os quais possuam atividade farmacológica frente aos patógenos e que apresentem baixa toxicidade (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 204; DOI et al., 2016; QADRI et al., 2022; MOHAMMADI et al., 2022; SINGLA; DUBEY, 2019).

Conforme supracitado, produtos naturais e seus derivados têm sido amplamente pesquisados na busca por substâncias bioativas que possuam atividade antifúngica, baixa toxicidade e reduzido custo financeiro (SILVA et al., 2012; DOI et al., 2016; RAHMAN et al., 2022). Dentre estes compostos promissores encontram-se os monoterpenos, tais como os pinenos que podem ser encontrados nos óleos essenciais de árvores coníferas (pinheiro), alecrim, lavanda e terebintina (SILVA et al., 2012; SALEHI et al., 2019; WESTON et al; 2021), com destaque para o α- pineno, que possui atividade antifúngica descrita frente a *C. albicans, C. parapsilosis e C. tropicalis* (ALLENSPACH; STEUER, 2021).

Assim sendo, o presente estudo objetivou avaliar o potencial antifúngico de α-pineno frente cepas de *C. albicans*, tendo em vista que não houve, até o presente momento, a condução de nenhuma pesquisa aprofundada neste sentido, realçando a importância e originalidade da mesma na contribuição a busca por novas opções terapêuticas para infecções de grande relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a atividade antifúngica de α- pineno contra linhagens de *Candida albicans* oriundas de infecção hospitalar e cepas padrão.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do α- pineno;
- Avaliar o efeito de α- pineno em associação aos antifúngicos contra as linhagens fúngicas testadas;
- Realizar estudo de *docking molecular* do α- pineno para estimar sua afinidade com alvos moleculares;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação de α- pineno com ênfase nos seus efeitos sobre a parede celular e a membrana plasmática fúngica;
- Observar o efeito do terpeno teste sobre a cinética de morte microbiana (*Time kill)*;
- Examinar o efeito do α- pineno sobre o biofilme maduro de *Candida albicans;*
- Avaliar a citotoxicidade de α- pineno frente linhagem de células humanas HaCaT em 24 e 48h.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos possuem papel importante na microbiota humana, alguns podem não afetar o hospedeiro vivendo como comensais, outros podem beneficiar o hospedeiro, o que caracteriza a relação de mutualismo. Outros, ainda, podem afetar de forma negativa atuando como patogênico (KALIA et al., 2020; LOPES, LIONAKIS, 2022).

Em média 15% da população mundial é acometida por infecções fúngicas. A virulência dos fungos é o principal fator associado ao aumento de micoses sistêmicas no mundo (PIASECKI, 2019; KUCHI et al., 2021). Na Alemanha, estima-se que 10% da população é afligida por infecções fúngicas superficiais. Na França, a taxa de mortalidade por infecções fúngicas invasivas chega a 27,6% (LILIENFELD et al., 2019). Um dos pontos de alerta é que alguns fungos são reemergentes enquanto outros são emergentes, demonstrando assim que o aumento das infecções fúngicas no mundo está acontecendo de forma recorrente (LOCKHART; GUARNER, 2019).

No Brasil, as infecções oportunistas aumentaram após o ano de 1980, com o constante crescimento de casos de Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DANTAS et al., 2021). No caso das infecções superficiais, um recente estudo realizado no estado do Rio de Janeiro demonstrou maior incidência de infecções fúngicas em mulheres com ampla faixa etária de 3 meses a 95 anos (BAUER et al., 2021). Em contrapartida, outro estudo realizado no estado do Pará, mostra elevada incidência de infecções fúngicas em pacientes do sexo masculino (OHNISHI et al., 2022). A disparidade entre os resultados aponta para escassez de pesquisas e dados sobre etiopatologia das infecções fúngicas no Brasil.

É sabido que 50% dos óbitos causados por infecções fúngicas ocorreram em pacientes com AIDS, cujas mortes seriam evitadas pelo diagnóstico precoce e tratamento adequados. Populações economicamente vulneráveis são as mais prejudicadas, tanto pela ausência do diagnóstico quanto pelo elevado custo do tratamento (FONSECA; GUIMARÃES; 2022). Apesar do citado, as infecções fúngicas e o financiamento de pesquisas relacionadas continuam negligenciadas por parte das autoridades governamentais (RAYENS; NORRIS, 2018). Diante disto, a conscientização da população quanto às infecções fúngicas e cuidados preventivos,

bem como intervenções e alocação de recursos por parte do governo se fazem necessários (NAVEEN et al., 2022).

3.2 *CANDIDA SPP*.

O gênero *Candida spp* possui aproximadamente 200 espécies, das quais 30 delas são potenciais causadores de doenças (LI et al., 2022). Estão presentes nas mucosas oral, no intestino, na vagina e pele sem causar infecção, colonizando a microbiota humana, de maneira comensal, em indivíduos saudáveis (ROSATI et al., 2020; D'ENFERT et al., 2021). Espécies oportunistas de *Candida*, são causa de infecção mediante quadro clínico específico e na presença de condições que favoreçam o seu crescimento (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022; COTTIER et al., 2020).

Os fatores que podem desencadear uma infecção por fungos do gênero *Candida* podem ser classificados em imunológicos e não imunológicos. A infecção pelo *Human Immunodeficiency virus* (HIV), por exemplo, é um fator imunológico, onde o indivíduo, por possuir a imunodeficiência, está vulnerável à infecção (OLUM et al., 2020; CZECHOWICZ et al., 2022). Já os fatores não imunológicos podem ser: consumo de álcool, mudanças hormonais durante o período de gestação, deficiência nutricional, distúrbios na microbiota quanto à sua composição qualitativa e quantitativa, diminuição na secreção de suco gástrico e de enzimas digestivas por uso medicamentoso, falta de vitaminas e microelementos na dieta (RAFIQ, 2022; LOPES, LIONAKIS, 2022).

As infecções por *Candida spp* podem ser classificadas em dois tipos: superficial e invasiva. A infecção mucocutânea ou superficial ocorre nas unhas, pele, couro cabeludo, e mucosas oral/vaginal (PUEL, 2020), já a candidemia, ou infecção invasiva*,* trata-se de uma infecção de corrente sanguínea por *Candida spp,* e que possui alta taxa de morbidade e mortalidade (POISSY et al., 2020).

A candidemia é a infecção invasiva diagnosticada com mais frequência pela disseminação hematogênica, aproximadamente 50% dos casos de candidemia chegam a resultar em infecção profunda (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022; CLANCY; NGUYEN, 2018). Tal infecção invasiva possui maior incidência em UTIs cirúrgicas, sendo as cirurgias que expressam maior risco desse tipo de infecção as torácicas e gastrointestinais. Internações prolongadas em UTI e o uso de

equipamentos invasivos, bem como a nutrição parenteral também são fatores que expõem o paciente ao risco de contrair a candidemia (RIERA et al., 2022; ALVES et al., 2022).

O rápido diagnóstico da candidemia é preponderante para se obter êxito no tratamento, no entanto há dois contrapontos: metodologias tradicionais de diagnóstico, tal como a cultura de sangue, são pouco sensíveis e o resultado necessita de tempo prolongado para ser obtido (CLANCY; NGUYEN, 2013; ROUZÉ; ESTELLA; TIMSIT, 2022) e tais infecções são relegadas a segundo plano por órgãos de saúde, agencias financiadoras, entre outros (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2021).

Métodos diagnósticos como reação em cadeia da polimerase (PCR) e espectroscopia de massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI- TOF MS) para detecção de antígenos fúngicos e componentes da parede celular, com boa sensibilidade e rápida obtenção de resultados, estão sendo aperfeiçoados, porém com baixa aplicação na rotina hospitalar (KOC et al., 2022; MONDAY; PARRAGA ACOSTA; ALANGADEN, 2021).

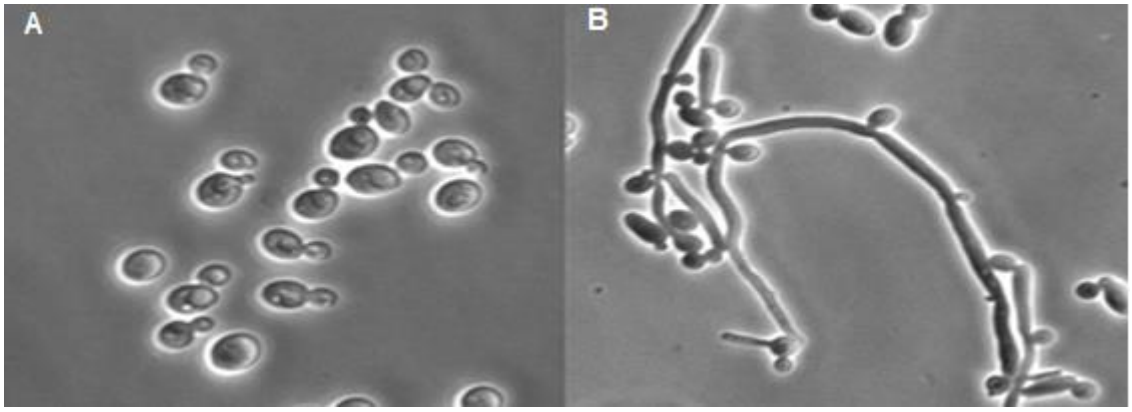
Dentre as espécies de *Candida* que podem levar à infecção invasiva estão: *C. albicans, C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (RIERA et al., 2022), no entanto a *C. albicans* se destaca por estar relacionada com a maioria das infecções deste gênero (LI et al., 2022). *C. albicans* também é a espécie de *Candida* responsável pela maior parte dos casos de candidemia (ALVES et al., 2022).

3.2.1 *Candida albicans*

Pertencente ao Reino fungi, Filo *Ascomycota*, Classe Saccharomycetes, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceaea*, *C. albicans* possui sua parede celular constituída de quitina, garantindo mais rigidez à mesma e membrana citoplasmática fosfolipídica composta por proteínas e o ergosterol (ROCHA et al., 2021; HILLESHEIM, 2022). Por ser um fungo polimórfico, a *C. albicans* pode alternar entre leveduras e hifas, sendo essa alternância de importante papel para a virulência de *C. albicans*. Além disso, a *C. albicans* possui uma morfologia de clamidósporos, ou seja, possuem uma resistência ainda maior (VILLA et al., 2020; RAFIQ, 2022).

As leveduras possuem sua morfologia celular redondas ou ovais e são unicelulares, como pode ser visto na figura 1.

Figura 1- Morfologia da *Candida albicans.* Legenda: Leveduras (A) e Pseudo- hifas (B) de *Candida albicans.*



Fonte: Gomes, 2012.

As leveduras podem tanto ser tóxicas quanto viver em simbiose no sangue, na cavidade oral, pele e vagina (CHEN; ZHOU; REN; CHENG, 2020). A *C. albicans,* na forma de levedura, chega à corrente sanguínea por três possíveis meios: por lesões mecânicas, onde as lesões no epitélio intestinal podem ser um meio de translocação para as leveduras; pelo Mecanismo de “carona”, onde as leveduras acompanham as hifas no processo de invasão do tecido; e a última hipótese seria a transição de hifa para levedura no sangue (CZECHOWICZ et al., 2022; CORTÉS et al., 2020).

Por meio de enzimas hidrolíticas e pressão hidrostática, as hifas podem aderir e penetrar as camadas epiteliais do hospedeiro infectado disseminando a candidíase neste último, e após disseminada, a *C. albicans* pode alcançar órgãos causando no hospedeiro o risco de morte. Esta transição de leveduras em hifas, além de desempenhar papel importante quanto a virulência, ainda concede capacidade da *C. albicans* escapar e destruir os macrófagos, sendo esta uma célula do sistema imune capaz de eliminar resto de células e partículas estranhas (DING et al., 2021; CHEN et al., 2020).

A mucosa oral apresenta mais de 700 espécies de microrganismos e bactérias. A candidíase oral é causada pelo crescimento em excesso da espécie de *C. albicans* (RHODES et al., 2019). Na relação entre a *C. albicans* e os demais microrganismos da cavidade oral do hospedeiro, alguns microrganismos estimulam a formação de biofilmes enquanto outros inibem. Estudos apontam que as bactérias presentes na saliva do hospedeiro apresentam uma significativa baixa diante do aumento da carga de *C. albicans* (PONDE et al., 2021; LI et al., 2022). Os fatores mais comuns para

candidíase oral são o uso de aparelho ortodôntico, a falta de higiene bucal, o uso de prótese, entre outros (CZECHOWICZ et al., 2022).

No trato gastrointestinal (TGI), diante de alterações na microbiota ou no sistema imunológico, como já citado anteriormente, a *C. albicans* se dissemina pelo TGI podendo causar infecções sistêmicas com alta mortalidade. Na relação entre *C. albicans* e a microbiota do intestino, algumas bactérias regulam o crescimento de *C. albicans* ocorrendo também o contrário. Estudos *in vitro* mostram que o *Lactobacillus rhamnosus* reduz o tamanho das hifas e protege contra danos epiteliais causados pela mesma (JEZIOREK et al, 2019; RAFIQ, 2022; LOPES; LIONAKIS, 2022; LI et al., 2022).

A Candidíase vulvovaginal é uma infecção que atinge mulheres de todas as idades, porém, as mulheres em idade reprodutiva são as mais susceptíveis. A *C. albicans* é a responsável por grande parte das infecções vulvovaginais. Por meio de transmissão endógena, as leveduras vulvovaginais têm sua fonte oriunda do trato gastrointestinal e na transmissão sexual (WILLEMS et al., 2020; CZECHOWICZ et al., 2022).

Segundo Li et al (2022), os antibióticos de amplo espectro, quando usados de maneira irracional, podem causar esgotamento das bactérias do trato gastrointestinal, levando também o hospedeiro a um quadro de disbiose, podendo desta forma ocasionar uma disseminação da Candidíase, isso porque os antibióticos de amplo espectro, de forma direta ou não, ocasionam o super crescimento de *C. albicans* (MORA, 2022; LI et al., 2022).

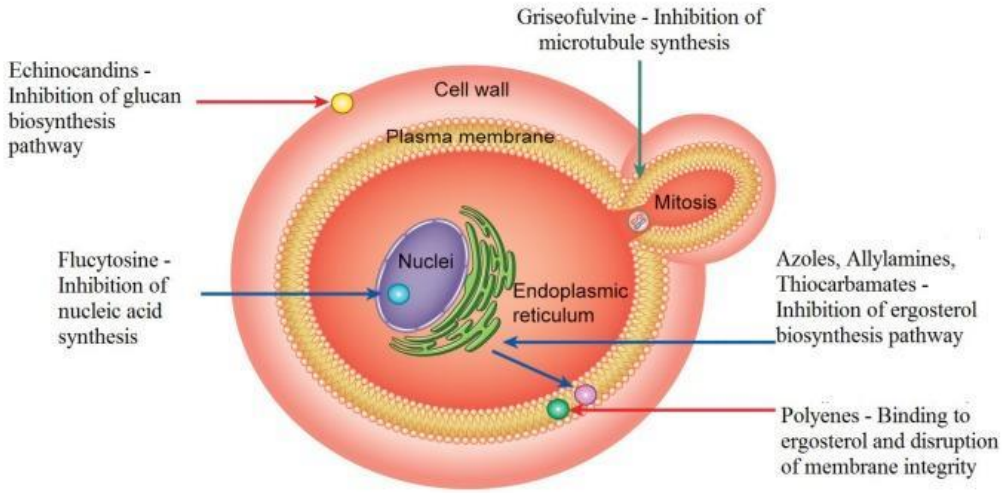
A *C. albicans* também pode agir formando um biofilme que confere resistência antifúngica e às respostas imunes do hospedeiro. Este biofilme pode variar morfologicamente e quanto à sua densidade, possuindo uma matriz extracelular que envolve e garante proteção às células fúngicas, escondendo componentes da parede celular reconhecidos pelas células da imunidade inata. A formação de biofilmes apresenta resistência aos antifúngicos tornando a infecção por *C. albicans* difícil de erradicar (VILLA et al., 2020; EEIX; NETT, 2020; PONDE et al., 2021; JUNQUEIRA, MYLONAKIS, 2022).

Sendo causa de maior virulência e resistência contra a resposta imune bem como aos antifúngicos, a formação de biofilmes por *Candida spp,* é então um grave problema que leva o hospedeiro a quadros de reinfecção e falhas no tratamento antifúngico (KALIA et al., 2020).

3.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Os antifúngicos mais usados para o tratamento de candidíase podem ser divididos em cinco classes: azóis, equinocandinas, polienos, pirimidinas e alilaminas, como pode ser visto na figura 2. No tratamento da candidemia quatro classes são utilizadas: equinocandinas, polienos, azóis e os análogos da piridina, contudo, os azóis e as equinocandinas apresentam maior eficácia (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022).

Figura 2- Mecanismos de ação dos antifúngicos em alvo celular



Fonte: Santos et al., 2018

Os azóis são os antifúngicos de primeira escolha no combate à *Candida spp.* (SARI et al., 2019). Em geral isso ocorre por serem antifúngicos de ampla atividade, possuírem segurança e baixo preço. Os azóis agem inibindo a enzima lanosterol 14-α-desmetilase (ERG11), resultando em depleção do ergosterol que é componente da membrana celular dos fungos. Os azóis são divididos em dois grupos: imidazóis e triazóis. O cetoconazol, miconazol e clotrimazol pertencem ao grupo dos imidazóis. Já o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol ao grupo dos triazóis (BOHNER et al., 2022). O fluconazol é o antifúngico mais usado em grande parte das infecções por *Candida*, bem como para infecções invasivas por *Candida* em pacientes em tratamento com azóis. (SANTOS et al., 2018; NASHIMOTO et al., 2020).

O mecanismo de ação dos polienos, como a anfotericina B, se dá por meio da ligação com o ergosterol da membrana celular fúngica, formando canais e consequentemente comprometendo a homeostase celular. Essa ligação entre o polieno e o ergosterol faz com que, rompendo a estrutura celular, haja o extravasamento dos constituintes da célula causando a morte da mesma. A semelhança estrutural entre o ergosterol e o colesterol faz com que esta classe não seja muito utilizada na prática clínica (OLIVEIRA DOS SANTOS et al., 2018; BOHNER et al., 2022).

Desenvolvidas no final dos anos 90, as equinocandinas agem inibindo a subunidade catalítica da enzima β-glucana sintase (FKS). Segundo Bohner et al. (2022), as equinocandinas além de possuírem baixa toxicidade que resulta em mais segura ao paciente, este grupo ainda possui atividade antifúngica frente a maioria das espécies de *Candida,* incluindo as espécies resistentes aos azóis e polienos (PRISTOV; GHANNOUM., 2019). Em sua atuação, ao impedir a (1,3) β- d-glucana sintase, as equinocandinas impedem a síntese de glucana existente na membrana celular do fungo. Desta forma, as equinocandinas agem como inibidores não competitivos ligando-se a subunidade FsK1, levando a parede celular fúngica à ruptura, o que resulta em instabilidade osmótica e consequente morte celular (MOREIRA, 2021).

As alilaminas agem inibindo a enzima escaleno epoxidase (ERGI), esta enzima é responsável por fazer a conversão do escaleno em lanosterol. Desta forma, a terbinafina (alilamina), impede a biossíntese do ergosterol presente na membrana celular do fungo. As piridinas, por sua vez, agem inibindo a síntese proteica e inibindo a biossíntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) na célula fúngica (FIORITI et al., 2022).

De acordo com Quindós et al (2019), três pontos devem ser levados em consideração para a escolha do tratamento, são eles: identificação da espécie de *Candida*, tratamento de fatores que levaram à infecção e, então, o uso do antifúngico mais indicado (QUINDÓS et al., 2019).

O tratamento da candidíase oral pode ser realizado tanto de forma oral quanto sistêmica, no entanto, esta última é recomendada quando o tratamento tópico não tiver sido suficiente. Um dos antifúngicos utilizados na candidíase oral é o fluconazol, este possui elevada biodisponibilidade e baixa toxicidade, além de baixo índice de efeitos adversos. Diante da resistência ao fluconazol, uma opção é utilizar o triazólico

itraconazol contra as espécies resistentes ao fluconazol *C. glabrata* e *C. krusei*. No entanto, o uso de itraconazol pode gerar desconforto gástrico (QUINDÓS et al., 2019; HELLSTEIN et al., 2019; TAYLOR et al., 2022).

Acompanhada de vermelhidão, prurido, corrimento branco e espesso, a candidíase vaginal gera bastante desconforto entre mulheres. O tratamento da candidíase vulvovaginal é realizado com os azóis: clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e cetoconazol; e a nistatina que é um polieno (COOKE et al., 2022). O uso de probióticos pode ser usado como meio preventivo contra *Candida spp,* pois os probióticos apresentam atividade fungicida impedindo a proliferação de *Candida spp* na vaginal e sua adesão às células epiteliais (FARR et al., 202; MUNDULA et al., 2019).

A candidemia é a infecção invasiva por *Candida spp,* tendo a *Candida albicans* a maior incidência de infecção comparado com *C. glabrata, C. parapsilosis e C. tropicalis.* A primeira opção terapêutica para pacientes críticos sem neutropenia, é a troca da equinocandina pelo fluconazol. Já em pacientes que apresentam neutropenia, o tratamento mais indicado é com as equinocandinas (TORTORANO et al., 2021; CORTÉS et al., 2020).

Em todo o mundo, a preocupação em torno da resistência aos medicamentos é crescente. Sobre o que pode desencadear a resistência antifúngica é possível afirmar que a mesma pode surgir direta ou indiretamente a interação droga- alvo por meio de alterações genéticas no sítio de ligação ao alvo, superexpressão da quantidade de alvo disponível ou alteração da concentração efetiva do fármaco (FISHER et al, 2022).

Diante da resistência aos antifúngicos, os produtos naturais têm se tornado alvos de pesquisas quanto à sua potencial atividade antifúngica. Assim, os monoterpenos oriundos do metabolismo secundário das plantas, demonstram ser compostos promissores (RAHMAN et al., 2022; SALEHI et al., 2019; WESTON et al; 2021).

3.4 COMPOSTOS NATURAIS

Em muitas comunidades e grupos étnicos o conhecimento sobre plantas medicinais representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico básico para manutenção da saúde. Desde os primórdios das civilizações as plantas são utilizadas

no tratamento e cura de diversas enfermidades. As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas contribuem para a divulgação das suas potencialidades terapêuticas e embasam o desenvolvimento de pesquisas científicas em áreas multidisciplinares (MOURA, 2020; KACHMAR et al., 2021).

Cerca de 30% dos medicamentos utilizados são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal (THOMFORD et al., 2018). Os produtos naturais continuam sendo uma das maiores fontes para a descoberta de novos medicamentos com atividade antimicrobiana, cicatrizante, anti-inflamatória, antineoplásica, entre outras (PINHO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). Em relação às suas propriedades antifúngicas, alguns vegetais já foram descritos, apresentando potenciais relacionados a compostos fenólicos, flavonóides, cumarinas, quinonas, saponinas e xantonas, além de alcalóides, lectinas, polipeptídeos e terpenóides (MENEZES et al., 2015; YANQUN et al., 2020; OWUSU et al., 2021).

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem sido causa de resistência diminuindo a eficácia dos medicamentos e deixando cada vez mais difícil o tratamento de doenças. Neste contexto, pesquisadores de todo o mundo buscam alternativas de tratamento em potenciais substâncias naturais, como por exemplo nos terpenos encontrados nos óleos essenciais (CÉSAR, 2021; BORGES, et al., 2022).

3.4.1 Terpenos

A descoberta de produtos naturais bioativos é importante não apenas pela necessidade de caracterização das propriedades farmacológicas das moléculas em questão, mas também pelo conhecimento de novas substâncias que possam ser utilizadas como alternativa farmacológica promissoras (SOARES, 2018).

Os terpenos são constituintes que fazem parte da composição dos óleos essenciais, que por sua vez, são empregados na indústria para a produção de diversos produtos que apresentam efeitos farmacológicos (BONI, 2016; BERGMAN, et al., 2019).

Estes possuem estrutura típica e podem ser classificados de acordo com o número de carbonos da seguinte forma: hemiterpenos (C5); monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); sesterpenos (C25); triterpenos (C30); tetraterpenos (C40) e acima disso são considerados polímeros. Possuem atividades biológicas bem definidas, tais como antiparasitária, hipotensora, anti-inflamatória,

relaxante da musculatura lisa vascular, anticariogênica e antifúngica (VIRIATO, 2014; YAO, P; LIU Y, 2022).

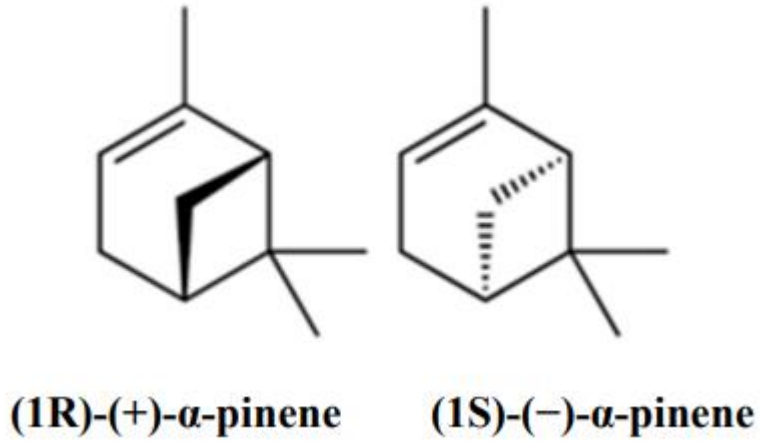
Esses compostos apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos podem atuar na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto que muitos diterpenos dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenoides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (TOSCAN, 2010; FEIRIA,2015; NINKUU et al., 2021; SYCZ et al., 2022).

Acerca das atividades biológicas, dentre os monoterpenos de destaque encontra-se o *α*-pineno, um terpeno facilmente encontrado nos óleos essenciais extraídos de árvores coníferas, eucalipto, alecrim, *Psidium* e cânfora, cuja fórmula química é 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-eno, sendo um alceno em anel de quatro membros. Estudos com o *α*-pineno demonstram várias atividades antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana (HOU et al., 2019; ALLENSPACH; STEUER, 2021).

3.4.1.1 *α- pineno*

Como já foi dito, o *α- pineno*, classificado como monoterpeno é um hidrocarboneto bicíclico que possui duas unidades de isopreno ($C_5 H_8$), onde sua soma resulta na fórmula $C_{10} H_{16}$. Nos óleos essenciais oriundos das coníferas, o *α-pineno* é o principal metabólito secundário (figura 3). A atividade biológica do *α- pineno* é vasta e de grande interesse médico, sendo conhecida por suas propriedades antibacteriana, antifúngica, anti leishmania, anti-inflamatório, antioxidante e neuroprotetor (UTEGENOVA, et al., 2018; KARTHIKEYAN, et al., 2018; ALLENSPACH, et al., 2020; KHOSHNAZAR, et al., 2020; ALLENSPACH; STEUER, 2021; NÓBREGA, et al.,2021).

Figura 3- Estrutura químicas dos enantiômeros positivo e negativo de α- pineno.



Fonte: Adaptado de Salehi et al., 2019.

Encontrado em aproximadamente 40 óleos essenciais diferentes, *α-pineno* possui as seguintes características: líquido incolor que possui solubilidade em óleo, não sendo solúvel em água e etanol. O mesmo possui ponto de ebulição em 155 °C e odor amadeirado (SCHREINER et al., 2018; SALEHI et al., 2019).

Estudos realizados com o *α- pineno* mostraram atividade de inibição de crescimento frente cepas de *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani.* Apresentando, no entanto, diferenças de atividades entre os seus enantiômeros, de forma que apenas o enantiômero positivo possui atividade antimicrobiana e antifúngica (MELKINA et al., 2021).

Em alguns estudos foram realizadas observações quanto ao sinergismo do *α-pineno* com alguns antibióticos, de forma que a pesquisa estava voltada para análise dessa associação. Foi possível observar que na presença do monoterpeno *α- pineno,* os diferentes antibióticos tiveram sua ação potencializada (BORGES, et al., 2022).

Quanto à atividade de sinergismo, estudos mostraram que o (+)-*α-pineno* associado à ciprofloxacina, potencializou o efeito deste antibiótico frente às cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Observou-se também que, frente cepas de *Escherichia coli*, os antibióticos ceftazidima, amoxicilina, cefepima, cefoxitina e amicacina tiveram suas atividades potencializadas quando associadas ao *α- pineno* (LEITE et al., 2022).

Contra *C. albicans*, estudos mostram a atividade do *α- pineno*, também como inibidor de crescimento de cepas de *C. albicans.* Em um determinado estudo, a curva de tempo-kill mostrou que a atividade do *α- pineno* frente *C. albicans,* iniciou na T8h, neste ponto a contagem viável total começou a diminuir chegando a zero em T24h (LOŽIENĖ et al, 2018; SARACINO et al., 2022).

Assim sendo, em decorrência da ampla gama de atividades biológicas do *α-pineno* e a necessidade de compostos com ação antifungica, baixa toxicidade e baixo custo, permite-se estudar o mesmo como potencial fármaco que possa ser utilizado com segurança e eficácia contra infecções de elevada morbidade e mortalidade, provocadas por microrganismos do gênero *Candida.*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

O artigo “Efeito antifúngico de α- pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de Candida albicans” foi publicado no periódico *Research Society and Development*, volume XI, n. 4, 2022, link para acesso: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27748/32750.

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

Efeito antifúngico de α-pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*

Antifungal effect of α-pinene alone and in association with antifungals against *Candida albicans* strains

Efecto antifúngico del α-pineno solo y en asociación con antifúngicos contra cepas de *Candida albicans*

Recebido: 07/03/2022 | **Revisado:** 13/03/2022 | **Aceito:** 20/03/2022 | **Publicado:** 27/03/2022

Daniela Bomfim de Barros
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0707-0090
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: daniela.bomfim@ufpe.br
Luanna de Oliveira e Lima
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9479-1733
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: luanna.lima@academico.ufpb.br
Larissa Alves Silva
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5073-7033
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: larissa.silva@academico.ufpb.br
Mariana Cavalcante Fonseca
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2889-8321
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: marianacavalcantef@gmail.com
Hermes Diniz-Neto
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2878-1737
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: hermes.dn@ltf.ufpb.br
Walicyranison Plinio da Silva Rocha
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0639-2781
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: wps@academico.ufpb.br
Gheorgia Victoria de Medeiros Beltrão
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1331-742X
Centro Universitário Maurício de Nassau, Brasil
E-mail: gheorgiamedeiros@hotmail.com
Lúcio Roberto Cançado Castellano
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0851-5298
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: lucio.castellano@ccs.ufpb.br
Felipe Queiroga Sarmento Guerra
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2057-4821
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: fqsg@academico.ufpb.br
Márcia Vanusa da Silva
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2221-5029
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: marcia.vanusa@ufpe.br

Resumo

Causada por fungos do gênero *Candida* spp., a candidíase é relatada como problema de saúde pública, ocasionando infecções superficiais e sistêmicas. O aumento de cepas resistentes isoladas e a elevada toxicidade dos antifúngicos convencionais, têm estimulado a busca por alternativas a este cenário, tais como bioprodutos ou compostos isolados, como exemplo, os terpenos. Desta maneira, faz-se importante investigar a atividade antifúngica de α-pineno isolado e em associação com antifúngicos frente a cepas de *Candida albicans*. Para isso foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), pela técnica de microdiluição em caldo do terpeno isolado e o ensaio de associação (*checkerboard*) entre o α-pineno e antifúngicos, como fluconazol e anfotericina B. O α-pineno apresentou uma CIM entre 128 e512 µg/mL e a CFM teve os mesmos valores de CIM frente às cepas 8 cepas

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

ensaiadas. As demais concentrações não foram possíveis determinar a CFM, devido ao crescimento fúngico ser maior ou igual a CIMx4 (limite do teste). No ensaio de associação, a interação α- pineno e fluconazol foi indiferente, já as combinações entre α-pineno com a anfotericina B e a nistatina obtiveram efeitos sinérgicos. Assim, este estudo fortalece o α-pineno como um promissor agente antifúngico, pois este exibiu forte atividade inibitória frente a cepas de *Candida albicans*., com natureza fungicida. Adicionalmente, há a possibilidade deste ser utilizado de forma associativa aos derivados poliênicos (anfotericina B ou nistatina) como alternativa no tratamento da candidíase. Deve-se destacar que mais estudos precisam ser realizados acerca do mecanismo de ação e toxicidade deste composto.
Palavras-chave: Candida; Terpeno; Terapêutica; Produto natural; Associação.

Abstract

Caused by fungi of the genus *Candida* spp., candidiasis is reported as a public health problem, causing superficial and systemic infections. The increase in isolated resistant strains and the high toxicity of conventional antifungal agents have stimulated the search for alternatives to this scenario, such as bioproducts or isolated compounds, such as terpenes. Thus, it is important to investigate the antifungal activity of α-pinene alone and in association with antifungals against strains of *Candida albicans*. For this, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicide Concentration (MFC) were determined by the technique of microdilution in broth of the isolated terpene and the association assay (checkerboard) between α-pinene and antifungals, such as fluconazole and amphotericin. B. The α-pinene had a MIC between 128 and 512 µg/mL and the CFM had the same MIC values against the 8 strains tested. The other concentrations could not determine the CFM, due to the fungal growth being greater than or equal to MICx4 (test limit). In the association trial, the interaction between α-pinene and fluconazole was indifferent, whereas the combinations between α-pinene with amphotericin B and nystatin obtained synergistic effects. Thus, this study strengthens α-pinene as a promising antifungal agent, as it exhibited strong inhibitory activity against *Candida albicans* strains, with a fungicidal nature. Additionally, it may be used in association with polyene derivatives (amphotericin B or nystatin) as an alternative in the treatment of candidiasis. It should be noted that more studies need to be carried out on the mechanism of action and toxicity of this compound.
Keywords: Candida; Terpene; Therapy; Natural product; Association.

Resumen

Causada por hongos del género *Candida* spp., la candidiasis es reportada como un problema de salud pública, provocando infecciones superficiales y sistémicas. El aumento de cepas resistentes aisladas y la alta toxicidad de los antifúngicos convencionales han estimulado la búsqueda de alternativas a este escenario, como bioproductos o compuestos aislados, como los terpenos. Por lo tanto, es importante investigar la actividad antifúngica del α-pineno solo y en asociación con antifúngicos contra cepas de *Candida albicans*. Para ello se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima de Fungicida (MFC) mediante la técnica de microdilución en caldo del terpeno aislado y el ensayo de asociación (tablero) entre α-pineno y antifúngicos, como fluconazol y anfotericina. B. El α-pineno tuvo una MIC entre 128 y 512 µg/mL y el CFM tuvo los mismos valores de MIC frente a las 8 cepas probadas. Las otras concentraciones no pudieron determinar el CFM, debido a que el crecimiento fúngico fue mayor o igual a MICx4 (límite de prueba). En el ensayo de asociación, la interacción entre α-pineno y fluconazol fue indiferente, mientras que las combinaciones entre α-pineno con anfotericina B y nistatina obtuvieron efectos sinérgicos. Por lo tanto, este estudio fortalece al α-pineno como un agente antifúngico prometedor, ya que exhibió una fuerte actividad inhibidora contra las cepas de *Candida albicans*, con una naturaleza fungicida. Además, puede utilizarse en asociación con derivados poliénicos (anfotericina B o nistatina) como alternativa en el tratamiento de la candidiasis. Cabe señalar que es necesario realizar más estudios sobre el mecanismo de acción y la toxicidad de este compuesto.
Palabras clave: Cándida; Terpeno; Terapia; Producto natura; Asociación.

1. Introdução

Doenças causadas por fungos têm aumentado significativamente os indicadores de saúde de morbimortalidade em todo o mundo (Jenks et al., 2020). Estima-se que estas infecções afetem mais de um bilhão de indivíduos e que levem a óbito cerca de 1,5 milhão de pessoas por ano. Embora esses dados sejam alarmantes, as mesmas permanecem negligenciadas por autoridades sanitárias (Bongomin et al., 2017).

Infecções fúngicas são, em sua maioria, oportunistas, sendo capazes de ocasionar doenças em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com neoplasias, transplantados ou mesmo os que se encontram em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (Bongomin et al., 2017; Lass-Flörl et al., 2021). Dentre os principais agentes causadores de Infecções Fúngicas

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

Invasivas (IFI) encontram-se os fungos dos gêneros *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Candida*, com destaque para este último, cuja espécie *Candida albicans* está mais comumente associada aos casos de IFI (Song, 2020).

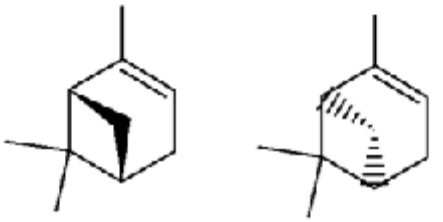
Leveduras da espécie *C. albicans* podem ser tanto comensais quanto patogênicas, levando a manifestações clínicas em indivíduos com imunossupressão, que variam desde a forma mucocutânea (candidíase orofaríngea, vaginal e cutânea) até a forma disseminada, mais grave, relacionada às infecções nosocomiais com elevadas taxas de mortalidade (Jawale & Biswas, 2021).

Os antifúngicos convencionais mais utilizados no tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. são os derivados azólicos (tais como: fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol e cetoconazol), os derivados polienos (tais como: anfotericina B e nistatina) e as equinocandinas (tais como caspofungina, micafungina e anidulofungina) (Kathiravan et al., 2012; Patil, 2015; Santos et al., 2018).

Entretanto, tratamentos prolongados com estes fármacos podem levar à efeitos citotóxicos, bem como resistência ao antifúngico, constituindo-se como um grave problema a ser solucionado (Kathiravan et al., 2012; Vieira & Santos, 2017). Nesse contexto, a busca de alternativas a este cenário é necessária, umas das frentes de pesquisa é a bioprospecção para obtenção de produtos naturais, pois a biodiversidade é uma fonte de uma grande variedade de compostos bioativos, (Doi et al., 2016; Oliveira et al., 2014), a exemplo dos terpenos, maiores e mais diversos metabólitos secundários de plantas, os quais desempenham importante papel na sua defesa, como fitoalexinas (Ninkuu et al., 2021).

Nas plantas, os pinenos apresentam atividade fungicida e têm sido usados há séculos para produzir sabores e fragrâncias. Diversas atividades biológicas estão associadas aos mesmos, incluindo o uso como inseticida natural (Silva et al., 2012). O α-pineno (Figura 1) é um terpeno constituinte majoritário de diversos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008), a exemplo dos óleos provenientes das plantas do gênero *Croton* spp. (Fortes & Guedes, 2006; Celedonio, 2008), possuindo atividade antifúngica contra às espécies de *C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. stellatoidea, C. guilhermondii, C. krusei e Cryptococcus neoformans* (Lima et al., 2005).

Figura 1: Fórmula estrutural plana do α-pineno.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2012).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de α-pineno isolado e em associação com antifúngicos convencionais frente às cepas de *Candida* spp.

2. Metodologia

2.1 Cepas fúngicas

Cepas de *Candida albicans* ensaiadas foram obtidas da Micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizadas 2 cepas padrão ATCC-76485, ATCC-90028 e 6 cepas clínicas (LM-587, LM 616, A-05, A-11, A-15 e A-20).

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

2.2 Reagentes de uso

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram ágar Sabouraud dextrose (ASD) e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, bem como o terpeno α-pineno, os antifúngicos, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80, foram obtidos comercialmente, oriundos do fabricante Sigma Aldrich®.

2.3 Preparação do Inóculo

Para preparação do inóculo, culturas de *Candida* spp., foram semeadas em meio nutriente e incubadas a 35±2 °C durante 24 e 48 h. Foram utilizados entre 4 e 5 colônias dessas culturas e, em seguida, suspensas em H_20 destilada estéril, ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, para obter um inóculo de 10^6 UFC/mL. Por fim, os inóculos foram separados para utilização nos ensaios (Hadacek & Greger, 2000; Ostrosky et al., 2008; Cleeland & Squires, 1991).

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011), com adaptações. A determinação da CIM do produto sobre cepas de *Candida albicans*, foram realizadas por meio da técnica de microdiluição em caldo com auxílio de microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de "U" (ALAMAR®).

Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de Caldo RPMI nos poços das placas. Em seguida, 100 µL do produto foi dispensado nas cavidades de cada coluna da placa. Logo depois, foi feita uma diluição seriada a uma razão de um para dois (1:2), de forma que as concentrações finais nos poços após a adição do inóculo foram de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada linha da placa refere-se a uma cepa fúngica específica. Concomitantemente, foram realizados controle com anfotericina B (1024 µg/mL até 0,5 µg/mL), caldo RPMI como controle de esterilidade e caldo RPMI com inóculo fúngico como controle de viabilidade das leveduras. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e as placas, hermeticamente fechadas e foram incubadas a 35±2°C por 24 h, posteriormente realizada a leitura.

A CIM da substância foi vista como a menor concentração capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico da maior porcentagem de cepas verificada nos poços, em comparação com seu controle. A expressão do resultado é feita pela média aritmética das CIM's dos três ensaios, sendo a atividade antifúngica do produto ativa ou inativa, seguindo os seguintes critérios: < abaixo de 500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600- 1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (Balouiri et al., 2016; Sartoratto et al., 2004).

Feita a leitura da CIM, retirou-se 10 µL do sobrenadante dos poços onde foi observada total inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x4) e adicionou-se em novas placas de cultura de células com meio ASD, posteriormente incubadas em temperatura de 35-37 °C por 24h. A CFM foi a menor concentração do α-pineno em que não aconteceu crescimento fúngico no meio. O resultado foi obtido pela média aritmética das CFM's obtidas nos ensaios feitos em triplicata (Balouiri et al., 2016; Ncube et al., 2008).

2.5 Ensaio de associação do terpeno com antifúngicos padrões frente às cepas de *Candida albicans*

Soluções do composto teste e dos antifúngicos foram solubilizadas e preparadas diluições em concentrações dobradas (2048 e 1024 µg/mL, respectivamente) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL foram diluídos seriadamente 1:2 em RPMI 1640. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura foi inserido 10 % da suspensão fúngica. Cada microplaca estéril foi preenchida no sentido vertical e horizontal, com o composto teste e um antifúngico por vez para a

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

obtenção do índice de Concentração Inibitória Fracionada (índice CIF). As placas preenchidas foram incubadas a temperatura e tempo adequados para cada espécie.

O índice CIF foi calculado através da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antifúngico e B o composto teste em teste. O CIF^A, por sua vez, será calculado pela relação CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (< 0.5), aditividade (0,5 – 1,0), indiferença (>1,0) ou antagonismo (>4,0) (Eliopoulos & Moellering, 1991).

3. Resultados e Discussão

O α-pineno foi testado frente à 8 linhagens de *Candida albicans* (2 cepas padrões ATCC: 76485 e 90028; e 2 cepas sistêmicas LM 587 e LM 616; e 4 cepas de amostras bucais: A 011, A 05, A 15 e A 20) e teve sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) melhor estabelecida. A concentração fungicida mínima (CFM) também foi avaliada, conforme observado na Tabela 1.

A molécula apresentou atividade inibitória contra todas as linhagens testadas, com uma CIM variando de 128 e 512 µg/mL. Frente as linhagens de *C. albicans* ATCC 76485 e LM 587 exibiu uma CIM de 128 µg/mL (≈25%) das 8 (100%) cepas, 256 µg/mL para as cepas ATCC 90028, LM 616, A 05, A 11 e A 15 (≈62,5%) e 512 µg/mL para a cepa A 20 (≈12,5%).

Para Sartoratto *et al*. (2004), a CIM da molécula pode ser considerada com forte/ótima atividade inibitória, visto que foi inferior a 500 µg/mL. Entretanto, ao considerar parâmetros estabelecidos por outros autores, a molécula pode ser considerada de atividade moderada (CIM entre 100 e 500 µg/mL) (Holetz et al., 2002; Machado et al., 2005; Santos et al., 2008).

A maioria dos estudos sobre o enantiômero α-pineno é com foco em células bacterianas, no entanto ainda são escassos os trabalhos sob a ótica da atividade antifúngica, havendo então uma deficiência de dados na literatura sobre α-pineno que se possa comparar com os resultados do presente estudo.

Silva et al. (2012) detectou a atividade antimicrobiana de isômeros e enantiômeros de pineno frente às células bacterianas e fúngicas. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) desses monoterpenos também foram determinadas, confirmando que os enantiômeros positivos exibiram atividade contra todos os fungos e bactérias testados, com MICs variando entre 117 e 4,150 µg / mL.

O terpeno apresentou uma CFM variando entre 128 e 512 µg/mL para as leveduras testadas. Contra as cepas de *C. albicans*, a substância exibiu uma CFM de 128 µg/mL para ATCC 76485 e LM 587 (25%) das 8 (100%) cepas, 256 µg/mL para a ATCC 90028 e LM 616 (25%) cepas e 512 µg/mL para a cepa A 20 (12,5%). No entanto, não foi possível determinar a CFM do produto para as cepas A 05, A 11 e A 15, visto que houve crescimento nas placas de todas as concentrações utilizadas no ensaio (CIM, CIMx2 e CIMx4), sugerindo que o α- pineno teve ação fungistática frente às cepas. Logo a natureza fungicida e fungistática foi dependente da cepa ensaiada.

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

Tabela 1 - Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do α pineno frente às linhagens de *Candida albicans*.

	Cepas	Alfa pineno				Anfotericina B	Controles	
		CIM	CFM	CFM/CIM	Natureza de Atividade	CIM	**MO	***Est
Candida albicans	ATCC-76485	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	ATCC- 90028	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM 587	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM 616	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	A 05	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 11	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 15	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 20	512	512	1	Fungicida	0,50	+	-

Legenda: **MO, microrganismo; ***Est, esterilidade; (+), presença de crescimento microbiano em todas as concentrações testadas; (-), ausência de crescimento em todas as concentrações testadas; ND, razão CFM:CIM não determinado. Fonte: Autores (2022).

Uma vez observado esta atividade antifúngica, verificou-se se o terpeno teste poderia ser utilizado em associação com antifúngicos convencionais. Os resultados do ensaio de associação do alfa pineno com anfotericina B, nistatina e fluconazol estão descritos na Tabela 4. Na associação entre o alfa pineno e os antifúngicos anfotericina B e nistatina frente à cepa ATCC 76485 foram observados efeitos de aditividade (ICIF: 0,5 - 1). Já a combinação entre o alfa pineno e fluconazol resultou em um tipo de interação indiferente (ICIF: >1) frente à cepa ATCC 76485.

Tabela 2 - Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre alfa pineno com anfotericina B, nistatina e fluconazol sobre a cepa ATCC 76485 de *Candida albicans*.

Cepas	Alfa pineno + Anfotericina B		Alfa pineno + Nistatina		Alfa pineno + Fluconazol	
	ICIF	Tipo de Interação	ICIF	Tipo de Interação	ICIF	Tipo de Interação
C. albicans (ATCC-76485)	1	Aditividade	1	Aditividade	2	Indiferente

Fonte: Autores (2022).

De acordo com esses resultados, a interação entre alfa pineno e fluconazol se mostrou indiferente, já as combinações de α- pineno e anfotericina B e nistatina obtiveram efeitos aditivos, sugerindo possível associação entre estes fármacos como alternativa terapêutica

4. Conclusão

Este trabalho demonstra um promissor agente antifúngico, α-pineno, pois este exibiu forte atividade inibitória frente às cepas de *Candida albicans*., com natureza fungicida. Adicionalmente há a possibilidade deste ser utilizado de forma associativa aos derivados poliênicos (anfotericina B ou nistatina) como alternativa no tratamento da candidíase. Deve-se destacar que mais estudos precisam ser realizados acerca do mecanismo de ação e toxicidade deste composto.

]

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse que poderia se constituir em um impedimento para a publicação deste artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem às Universidades Federal e de Pernambuco (UFPE) e Universidade Federal da Paraíba (UFPB), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio estrutural e financeiro para a execução do presente estudo.

Referências

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, *3*(4). https://doi.org/10.3390/jof3040057

Celedonio, N. R. (2008). Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* e seus constituintes: alfa-pineno e trans-cariofileno. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas).

Cleeland, R. & Squires, E. (1991). Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*, 3, 739-787.

CLSI. (2011). *M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition*. www.clsi.org.

Doi, A. M., Carlos, A., Pignatari, C., Edmond, M. B., Marra, R., Fernando, L., Camargo, A., & Siqueira, R. A. (2016). *Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program*. 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909

Dos Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga, V. F., Pinto, A. C., & Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the Copaifera genus. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(3), 277–281. https://doi.org/10.1590/s0074-02762008005000015

Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., & Zacchino, S. (2008). Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from Phytolacca tetramera Hauman. *Journal of Natural Products*, *71*(10), 1720–1725. https://doi.org/10.1021/np070660i

Eliopoulos, G. M. & Moellering, R. C. (1991). Antimicrobial combinations. *Antibiotics in laboratory medicine*, 434- 441.

Fortes, J. C. & Guedes, M. I. F. (2006). Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* muell arg e de frações isoladas dos extratos de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 58.

Frost, D. J., Brandt, K. D., Cugier, D., & Goldman, R. (1995). A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *The Journal of Antibiotics*, *48*(4), 306–310. https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.306

Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, *11*(3), 137–147. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, A. G., Nakamura, C. V., Prado, B., & Filho, D. (2002). Screening Pl Medicinais 2.Pdf. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *97*(7), 1027–1031.

Jawala, C. V, & Biswas, P. S. (2021). ScienceDirect Local antifungal immunity in the kidney in disseminated candidiasis. *Current Opinion in Microbiology*, *62*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.04.005

Jenks, J. D., Gangneux, J. P., Schwartz, I. S., Alastruey-Izquierdo, A., Lagrou, K., Thompson, G. R., Lass-Flörl, C., Hoenigl, M., Adamski, Z., Arikan Akdagli, S., Arsic-Arsenijevic, V., Cornely, O. A., Friberg, N., Gow, N., Hadina, S., Hamal, P., Juerna-Ellam, M., Klimko, N., Klingspor, L., & Verweij, P. (2020). Diagnosis of breakthrough fungal infections in the clinical mycology laboratory: An ecmm consensus statement. *Journal of Fungi*, *6*(4), 1–19. https://doi.org/10.3390/jof6040216

Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). Bioorganic & Medicinal Chemistry The biology and chemistry of antifungal agents : A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *20*(19), 5678–5698. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045

Lass-Flörl, C., Samardzic, E., & Knoll, M. (2021). Serology anno 2021—fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*, *27*(9), 1230–1241. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.005

Lima, I. O., Oliveira, R. D. A. G., Lima, E. D. O., De Souza, E. L., Farias, N. P., & Navarro, D. D. F. (2005). Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *41*(2), 199–203. https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000200007

Research, Society and Development, v. 11, n. 4, e58711427748, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27748

Machado, K. E., Cechinel Filho, V., Tessarolo, M. L., Mallmann, R., Meyre-Silva, C., & Bella Cruz, A. (2005). Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, *43*(7), 636–639. https://doi.org/10.1080/13880200500303817

Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, *7*(12), 1797–1806. https://doi.org/10.5897/AJB07.613

Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11). https://doi.org/10.3390/ijms22115710

Oliveira, J. S.; Machado, K. C.; Freitas, R. M. (2014). Natural Products Applied a Neglected Diseases: Technological Forecasting. *Revista Geintec: Gestação, Inovação e Tecnologias*, 4, 729- 734.

Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*(2), 301–307. https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026

Patil, S. (2015). *Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies*. *6*(December), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391

Rajput, S. B., & Mohan Karuppayil, S. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *SpringerPlus*, *2*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-26

Santos, G. C. D. O., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., Rocha, F. M. G., & Monteiro, C. D. A. (2018). *Candida Infections and Therapeutic Strategies : Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents*. *9*(July), 1–23. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(4), 275–280. https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001

Silva, A. C. R. da, Lopes, P. M., Azevedo, M. M. B. de, Costa, D. C. M., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological Activities of a-Pinene and β-Pinene Enantiomers. *Molecules*, *17*(6), 6305–6316. https://doi.org/10.3390/molecules17066305

Song, B. (2020). *A 5-Year Review of Invasive Fungal Infection at an Academic Medical*. *10*(October), 1–10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.553648

Tacconi, L. (2018). Scientific Methodology. In Biodiversity and Ecological Economics. https://doi.org/10.4324/9781315096308-2

Valgus, J. M. (2003). What's new in antifungals? *Current Infectious Disease Reports*, *5*(1), 16–21. https://doi.org/10.1007/s11908-003-0060-4

Vieira, A. J. H. & Santos, J. I. (2017). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. RBAC, 49(3), 235- 239.

Zacchino, S. (2001). Estratégias para descoberta de novos agentes antifúngicos. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Ed. Argos.

4.2 ARTIGO 2

O artigo “**Antifungal activity of terpenes isolated from caatinga: a review**” foi publicado no periódico *Brazilian Journal of Biology,* volume 83, 2023, link para acesso: https://www.scielo.br/j/bjb/a/NNCHzjk9cqhYG3CqC53cvQv/?lang=en.

Brazilian Journal of Biology

ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antifungal activity of terpenes isolated from the Brazilian Caatinga: a review

Atividade antifúngica de terpenos isolados da caatinga: uma revisão

D. B. Barros[a*], N. S. Nascimento[b], A. P. Sousa[c], A. V. Barros[d], Y. W. B. Borges[d], W. M. N. Silva[d], A. B. S. Motta[e], J. E. L. Pinto[f], M. G. V. Sampaio[d], M. F. S. Barbosa[d], M. C. Fonseca[e], L. A. Silva[e], L. O. Lima[e], M. G. S. A. Borges[e], M. B. M. Oliveira[d], M. T. S. Correia[d], L. R. C. Castellano[a], F. Q. S. Guerra[g] and M. V. Silva[d]

[a]Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Biosciences Center, Post-graduation in Sciences, Recife, PB, Brasil
[b]Universidade de São Paulo – USP, Department of Biochemistry and Pharmaceutical Technology, São Paulo, SP, Brasil
[c]Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Physiology and Pathology, João Pessoa, PB, Brasil
[d]Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Department of Biochemistry, Recife, PB, Brasil
[e]Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Technical School of Health, Health Sciences Center, João Pessoa, PB, Brasil
[f]Universidade de São Paulo – USP, Post-graduation in Immunology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, SP, Brasil
[g]Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Pharmaceutical Sciences, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract

Terpenoids, also named terpenes or isoprenoids, are a family of natural products found in all living organisms. Many plants produce terpenoids as secondary metabolites, and these make up a large part of essential oils. One of most important characteristic is that the compounds are volatile, have odor and can be used in a variety of applications in different industrial segments and traditional medicine. Brazil has a rich and diverse flora that can be used as a source of research for obtaining new molecules. Within the Brazilian flora, it is worth mentioning the Caatinga as an exclusively Brazilian biome where plants adapt to a specific series of weather conditions and therefore become a great storehouse of the terpenoid compounds to be described herein. Fungal infections have become increasingly common, and a great demand for new agents with low toxicity and side effects has thus emerged. Scientists must search for new molecules exhibiting antifungal activity to develop new drugs. This review aims to analyze scientific data from the principal published studies describing the use of terpenes and their biological applications as antifungals.

Keywords: terpenoids, antifungal activity, Brazil, Northeast, essential oils.

Resumo

Os terpenóides, também chamados terpenos ou isoprenóides, são uma família de produtos naturais encontrados em todos os organismos vivos. Muitas plantas são produtoras destes metabolitos secundários, que constituem uma grande parte dos óleos essenciais. Uma das características mais importantes é que os compostos são voláteis, têm odor e podem ser utilizados numa variedade de aplicações em diferentes segmentos industriais ou na medicina tradicional. O Brasil tem uma flora rica e diversificada que pode ser utilizada como fonte de pesquisa para a obtenção de novas moléculas. Dentro desta flora, vale a pena mencionar a Caatinga como um bioma exclusivamente brasileiro que possui plantas adaptadas a uma série de condições climáticas e, portanto, um armazém de compostos a serem descritos. As infecções fúngicas são doenças cada vez mais comuns, devido a isso existe uma grande procura de novos agentes com baixa toxicidade e efeitos secundários. Os cientistas devem procurar novas moléculas que exibam atividade antifúngica para o desenvolvimento de novos medicamentos contra as infecções fúngicas. Esta revisão visa analisar dados científicos dos principais estudos publicados que descrevem o uso de terpenóides e as suas aplicações biológicas como antifúngicos.

Palavras-chave: terpenóides, atividade antifúngica, Brasil, Nordeste, óleos essenciais.

1. Introduction

The Caatinga's phytogeographic domains are primarily in Brazil's northeast and contain a significant number of native flora species. Plants from the Caatinga, present a considerable variety of secondary metabolites, phytoconstituents, and essential oils, and have thus stood out in the pharmaceutical industry (Moura et al., 2020).

*e-mail: daniela.bomfim@ufpe.br
Received: January 8, 2023 Accepted: May 10, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

These compounds are produced by plants in defense against disease, and can be classified into primary and secondary metabolites. Primary metabolites involve sugars, amino acids, proteins, and chlorophyll among others, while secondary metabolites involve alkaloids, terpenoids, and phenolic compounds, as well as flavonoids, and tannins, (Duduku et al., 2007).

Essential oils (EOs) are characterized as complex mixtures of compounds derived from the secondary metabolism of plants. Usually, volatiles present odors and may contain hundreds individual molecules formed essentially by monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoids, and isothiocyanates (Felipe and Bicas, 2017).

In general, monoterpenes, and sesquiterpenes, and their oxygenated derivatives are principal components of EOs. The concentration of these molecules varies, and some molecules can make up to 70% of the EO total, being thus principal components and therefore responsible for the EO's attributed biological activity (Sharifi-Rad et al., 2017).

Increases in fungal resistance and the lack of therapeutic options to treat fungal infections has contributed to the advent of new, more effective, and less toxic therapies (Singh and Sharma, 2015). In the northeastern Caatinga, medicinal plants are widely used in folk medicine by local communities due to the presence of terpenes (Alves et al., 2016).

In addition to the development of fungal resistance, whether inherent or acquired, pharmacotherapy for fungal infections has been limited due to host toxicity, the struggle is to find an effective drug against eukaryotic fungal cells (Silva et al., 2012). This review aims to analyze scientific data from the principal published studies describing the use of terpenoids from Caatinga plants and their biological applications as antifungal agents.

2. Material and Methods

Our study consisted of a bibliographic review based on the following descriptors: Terpenoids, Antifungal activity, Caatinga, Northeast, and Essential Oils. The results were collected through the electronic databases Medline/PubMed and Science Direct, in Portuguese and English. Research inclusion criteria related to antifungal activity found in Brazilian Caatinga vegetation species were considered. However, the exclusion criteria were not applied, as articles are scarce. Papers with classic citations in the area between the years 1976 - 1995 were collected; and recent literature from 2003 to 2021 was also analyzed.

3. Results and Discussion

3.1. *Caatinga ethnopharmacology*

Many cultures maintain millennial traditions of using medicinal plants for different purposes and in different ways (Rodrigues et al., 2018). In ethnopharmacology, scientific proof concerning active principles and pharmacological activities of plant-derived products (which combat pathologies) can be obtained, and the manufacture of new medicines becomes possible (Dantas et al., 2018). The current growth in demand for natural products, in addition to social factors and economic constraints in needy communities and regional cultures, are related to the great diversity of pharmacological compounds being used today (Macedo et al., 2020).

The botanical diversity found in Brazil favors the use of medicinal plants, and the Caatinga is the only exclusive Brazilian domain containing these plants. The Caatinga represents about 10% of the national territory and about 60% of Northeastern Brazil. The Caatinga is characterized by its great diversity, (its diverse and endemic flora is composed mainly of annual herbaceous and woody shrub species, with 932 plant species recorded in the region, and of which 380 are endemic). Yet the Caatinga still suffers from a scarcity of ethnopharmacological study and/or scientific characterization (Torres et al., 2021), and legislative and practical problems in maintaining the biome are still frequently encountered (Vasconcelos et al., 2017).

Exploring the ethnobotanical diversity of the Caatinga, Roque et al. (2010) recorded the use of 62 native plants suitable for a pharmacological application based on the common knowledge of a rural community in the municipality of Caicó, Rio Grande do Norte. The most commonly mentioned species were aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), cumaru (*Amburana cearensis*), marmeleiro (*Croton blanchetianus*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), and carrapicho (*Acanthospermum hispidum*).

Due to the known bioactive potential of their chemical compounds, certain Caatinga species have demonstrated pharmacological activity. Emiliano and Balliano (2019) evaluated the pharmacological activities of *Croton heliotropiifolius* and *Croton argyrophyllus*, which are traditionally used as antifungal and anti-inflammatory drugs, while Neri et al. (2021) evaluated the antioxidant activity of *Croton argyrophyllus*. Previously used in popular medicine as anti-inflammatories, another 15 plants from the Caatinga have also shown potential for sun protection.

3.2. *Phytochemistry*

Many different phytochemical compounds are present in high concentrations in the Caatinga flora (Moura et al., 2019). The application of laboratory analysis, phytochemical typology, and experimental studies can determine the medicinal efficacy of their use, which is culturally disseminated by local populations. Secondary metabolites, the main phytochemical constituents with bioactive properties, combat many types of microorganisms, including filamentous fungi, yeasts, and bacteria. The principal secondary metabolites listed in the literature are the terpenes, phenolic compounds, nitrogen and organosulfur compounds, and alkaloids. However, in many medicinal plant groups, the terpene group (terpenoids) are prominent (Verruck et al., 2018).

3.3. *Terpenoids*

Terpenoids, are mostly found in plants as secondary metabolites, although they can also be found in animals as sterols and squalene. Currently, there are at least 60,000 terpenoids, making them the most significant and oldest family of natural products found on earth. (Cox-Georgian et al., 2019).

Terpenes play many roles in living organisms, they protect microorganisms, animals, and plants from both abiotic and biotic stress. Terpenoid compounds can help ward off pathogens, predators, and other natural plant competitors (Gershenzon; Dudareva, 2007), as well as serve medicinal purposes.

3.4. Classifications

Terpenes are classified according to the number of isoprene (C_5H_8) units (Figure 1) present in their molecule, which can be: hemiterpenes (C_5H_8), monoterpenes ($C_{10}H_{16}$) sesquiterpenes ($C_{15}H_{24}$), diterpenes ($C_{20}H_{32}$), sesquiterpenes ($C_{25}H_{40}$), triterpenes ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenes ($C_{40}H_{64}$) or polyterpenes (C_{50} or >, and H_{50-80} or >) (Mcgarvey and Croteau', 1995).

3.5. Monoterpenes

The vast part of monoterpenes are volatile and primary constituents of essential oils or essences, such as menthol, linalool, and citral. Monoterpenes constitute 90% of essential oils and have many pharmacological activities already described in the literature, such as analgesic, anti-inflammatory, antidepressant, and anticonvulsant activity (Peixoto-Neves et al., 2010). Two monoterpenes that stand out for their antifungal activity and known in the literature are thymol and carvacrol (Figure 2) which are aromatic monoterpenes very present in plants such as *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (Baldim et al., 2022).

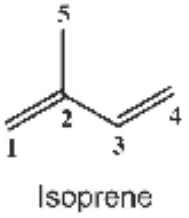
3.6. Diterpenes

Diterpenes are part of a large and diverse class of unique metabolites that can be considered the result of natural factors, they can provide chemical defense against predators, mechanical injury, phytophages, pathogens, mechanical injury, and ecological interactions They often represent an alternative metabolic strategy to increase the average life of certain organic substances inside the cell, as well as other environmental factors. Diterpenes, mainly polycyclic with a carboxyl group, are present in various plant resins, such as copaiba (*Copaifera langsdorfii*, Fabaceae). There are several studies investigating and evaluating the activities of diterpenes isolated from copaifera, including copalic acid (Figure 3) as a therapeutic alternative for fighting against microorganisms. (Abrão et al., 2015).

3.7. Sesquiterpenes

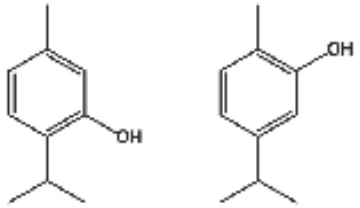
The structural diversity of sesquiterpenes promotes a variety of pharmacological activities, not only through discovery of new molecules but also through improvements in drug development against emerging threats. Although sesquiterpenes are a class of terpenes, they can be categorized according to their biosynthetic origin, for example, carotenoids (MEP pathway cleavage products), drimanes, farnesene, and cyclic sesquiterpenes (FPP) (Chappell et al., 2010).

Some compounds originating from the MEP pathway (Figure 4), such as β-caryophyllene, can be found in a variety of plants, as an example, one of the most prominent constituents of the essential oils of *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis*, exhibits antioxidant and anticancer activity (Donati et al., 2015). β-caryophyllene, also found in *Croton zehntneri* and *Eugenia uniflora* essential oils, presents antifungal activity (Santos et al., 2020; Costa et al., 2022).



Isoprene

Figure 1. Formula of isoprene (Felipe and Bicas, 2017).



Thymo Carvacrol

Figure 2. Formula of thymol and carvacrol (Felipe and Bicas, 2017).

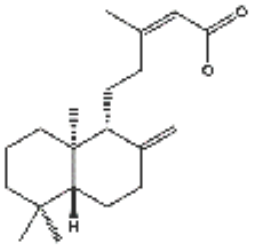


Figure 3. Molecular structure of copalic acid diterpene (Medeiros et al., 2021).

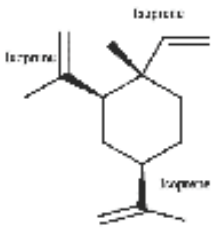


Figure 4. Sesquiterpene molecule (Dias and Amaro, 2020).

3.8. Triterpenes

Triterpenes are hydrocarbons that have relatively complex cyclic structures formed by the condensation of two FPPs, such as squalene (Figure 5). These are principally found in nature as 1-5 ring systems, and are formed in plants, animals, and fungi by numerous terpene synthases such as: squalene synthase, triterpene synthase, and oxidosqualene cyclase (OSC) (Garg et al., 2020).

3.9. Antifungal activity

There are a variety of terpenes that present antifungal activity. In Table 1, the results of the most recent studies can be found, summarized about terpenes whether extracted from Caatinga plants, or through synthetic processes. These molecules: terpinene-4-ol, limonene, γ-terpinene, E-cinnamaldehyde, Linalool, α terpineol, (-)-borneol, β-caryophyllene, germacrene D, and bicyclogermacrene present good antifungal activity, with significant biotechnological potential. However, overall, their mechanisms of action still need evaluation.

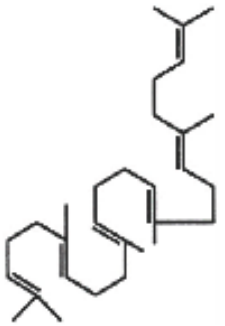


Figure 5. Structure of squalene (Dias and Amaro, 2020).

Table 1. Terpenes isolated from Caatinga species and related antimicrobial activities.

Species	Part of the Plant/ Extraction type	Terpenes	Activity investigated	Main results	Reference
Eugenia uniflora	Essential oil	β - Elemene, Caryophyllene, D-Germacrene, Bicyclogermacrene, α-Bulnesene, Germacrene B, Selina-1,3,7 (11)-trien-8-one, Germacrone, selina-1,3,7 (11)-trien-8-one epoxide	Antifungal activity and virulence inhibition against *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*	High concentrations of essential oil were required to obtain an antifungal effect, with no synergism on the combination with fluconazole - regardless, good results were obtained in relation to *C. albicans* and *C. tropicalis*	(Santos et al., 2018)
Lippia gracilis	Essential oil, and essential oil emulsions	α-Thujene α-Pinene, Mircene, α Terpinene, p-Cimene, Limonene 1,8 Cineol, γ-Terpinene, Linalol, Terpinen-4-ol Metyl tymol, Tymol, Carvacrol, β-Cariofilene, α-Humulene, Viridiflorene, Biciclogermacrene, Espathulenol, Caryophyllene Oxide	Antifungal activity of the oil and its nanoemulsions against *Thielaviopis paradoxa*	MIC was 0.23 ± 0.3 mg/mL, and MFC 0.80 ± 0.08 mg/mL, the fungicide potential was maintained at the nanoemulsion developed.	(Cruz et al., 2018)
Lippia alba	Essential oil of leaves	Marjority: 6-methy-5-hepten-2-one, nerol/geraniol, citral (neral/geranial), E-caryophyllene	Antimicrobial activity (antifungal and antibacterial) against 16 microorganisms, and cytotoxic activity against cell lines B16F10Nex2, MCF-7, HUVEC, CT26WT, A549, MDA-MB-231, CACO 2, and CHO.	Cytotoxic activity was observed in tumor cell lines B16F10Nex2 and A549. The essential oil showed activity in all yeasts strains, except *C. albicans*.	(Santos et al., 2016)
R. echinus Schauer	Essential oil	Marjority: β-Caryophyllene and bicyclogermacrene	Antifungical activity against *Candida albicans*, *C. krusei* and *tropicalis*, and *E. coli*,	The essential oil itself was not relevant for clinical use, but it showed capability to enhance antibacterial and antifungal activity of nystatin and fluconazole.	(Duarte et al., 2016)

Table 1. Continued...

Species	Part of the Plant/ Extraction type	Terpenes	Activity investigated	Main results	Reference
Eremanthus arboreus	Essential oils	Main component: α-Bisabolol	Chemical composition and literature review of its antimicrobial activities	As the main component of the essential oil, is α-Bisabolol, it has pharmaceutical potential to present antimicrobial, larvicide, anti-inflammatory and antinociceptive.	(Macedo et al., 2020)
Lippia gracilis	Leaves/ hydrodistilled	Carvacrol, thymol	Antifungal activity	The biomass formation of the *F. oxysporum* biofilm was inhibited completely at essential oils concentrations ranging from 0.3125 to 10 mg ml^{-1}.	(Oliveira et al., 2021)
Lippia sidoides, *Lippia gracilis*	Leaves/ hydrodistillation	Thymol, carvacrol	Antifungal activity	At concentrations of 0.3 µl. mL^{-1}, both the essential oils of L. gracilis and *L. sidoides* inhibited 100% mycelial growth of *Colletotrichum sp.*	(Araújo et al., 2018)
Eugenia uniflora L.	Leaves/ hydro-distillation	Mono- and sesquiterpenes	Antifungal activity and potential anti-virulence	The concentration that reduced microorganismal growth was ≥8,192 µg/mL while the IC50 varied, this being between 1892.47 and 12491.80 µg/ mL (oil), 10.07 – 80.78 µg/mL (fluconazole) and 18.53 – 295.60 µg/mL (fluconazole + oil). 295.60 µg/mL (fluconazole + oil).	(Santos et al., 2018)
Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae)	Leaves/ hydro-distillation	Linalool, trans-ocimenone and caryophyllene oxide	Antifungal activity	The essential oils showed antifungal activity, mainly against *S. sclerotiorum*, a fungi species related with diseases in soybean plants, with 100% of growth inhibition.	(Arruda et al., 2019)
Croton tricolor	Stems/ hydrodistillation	Epiglobulol, α-bisabolol, α-trans-bergamotol and β-caryophyllene.	Antifungal activity	Essential oils concentrations from 1.0 to 1024 µg/mL inhibited the growth of all tested strains,	(Miranda et al., 2019)
Nectandra, and *Ocotea* genera	Seeds, leaves, stem barks, and twigs/ hydrodistillation	β-caryophyllene, germacrene D, bicyclogermacrene, caryophyllene oxide, α-bisabolol, bicyclogermacrenal, phenylpropanoids, safrole, 6-methoxyelemicin, apiole, limonene, α-pinene, β-pinene, 1,8-cineole, and camphor.	Antimicrobial activity	Several biological activities have been attributed to these oils, especially cytotoxic, antioxidant and antifungal potential, among other pharmacological applications.	(Xavier et al., 2020)

Table 1. Continued...

Species	Part of the Plant/ Extraction type	Terpenes	Activity investigated	Main results	Reference
Mentha piperita L.	Essential oils, and citral and limonene	The chemical nature of the essential oils were not studied. Citral and Limonene.	Screening and selection the best product with antifungal activity against *C. albicans* strains isolated from dental prostheses	Of all essential oils and molecules, citral presented the best antifungal activity, against strains nystatin resistant	(Freire et al., 2017)
Algrizea minor	The essential oil was extracted by hydrodistillation of the leaves	b-Pinene and a-Pinene (monoterpene)	The antimicrobial activity of *Algrizea minor* essential oil, which contains as main constituents b-Pinene and a-Pinene	*Candida albicans* ATCC 10231 (500 mg/mL) and *Candida glabrata* ATCC 15126 (1000 mg/mL)	(Veras et al., 2020)
Schinus terebinthifolia	Essential oils from leaves by hydrodistillation	Terpenes	Antichemotactic and Antifungal Action of the Essential Oils from *Cryptocarya aschersoniana*, *Schinus terebinthifolia*, and *Cinnamomum amoenum*	Resulting in MIC ranging from 125 µg/mL to over 500 µg/mL. *C. aschersoniana* oil inhibited the growth of species of the genera *Trichophyton* and *Microsporum* and combined terbinafine resulted in an additive interaction effect	(Maciel et al., 2019)
Eugenia uniflora	Leaves extract	Terpenes	Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against. Dermatophytes.	An inhibitory effect on dermatophytes growth was observed for essential oil from leaves of E. uniflora cultivated in the Brazilian cerrado for AcE of E. uniflora, which exhibited moderate activity against most clinical isolates (MIC90 of 125.0 µg/mL)	(Biasi-Garbin et al., 2016)

Zheng et al. (2015) investigated Citral's action mechanism against *Penicillium digitatum*. Mitochondria were extracted and visualized using scanning electron microscopy. Intracellular and extracellular ATP levels were evaluated, as well as effects on respiratory metabolism, citric acid (CA), and enzymatic activity related to TCA metabolism. The study results revealed that citral was involved in inhibiting respiratory metabolism by affecting mitochondrial morphology and function. According to the study, citral diminished enzymatic activity related to TCA and its metabolic functions. The same species, *P. digitatum*, presented sensibility against another terpene, citronellal. However, its mechanism of action was different. Ouyang et al. (2021) showed that *P. digitatum* membrane integrity was affected in cells treated with citronellal, and ergosterol biosynthesis was modified.

Further, citronellal inhibitory activity was diminished when exogenous ergosterol was added to restore ergosterol to normal levels. Consequently, membrane structure was also restored, and an accumulation of ergosta-7,22-dienol was observed, which made the authors suppose that this terpene, citronellal, down regulates the ERG3 gene. The ERG3 gene is involved in lanosterol conversion into ergosterol, a fundamental component of the fungal membrane. Therefore, through this mechanism, citronellal interferes in fungal plasmatic membrane integrity. These examples show how certain terpenes act depending on their molecular structures and the peculiarity of the targeted cell.

As shown before, the same cell can be affected differently by distinct molecules with differing mechanisms. Shi et al. (2019) demonstrated how derivatives of the same molecule, β-pinene, can act differently. This type of study helps to understand which portion of a molecule interacts with the target cell. The β-pinene derivatives presented better results against some species than others. The study also showed both moderate and significant antifungal activity through pinene skeleton fusion with the amide portion of acylthiourea.

In analysis of structure-activity relationships, it was shown that a trifluoromethyl group at the benzene ring of the derivatives, or a fluor atom and nitro group, could significantly improve activity.

Brilhante et al. (2019) demonstrated the effects of Terpinen-4-ol against species of *Sporothrix schenckii* complex, a human pathogen that causes sporotrichosis. The authors investigated its effects against the planktonic and biofilm forms of *S. schenckii*. Terpinen-4-ol was effective against both fungi forms, being responsible for membrane alterations through ergosterol reductions. The authors also combined the terpene with other drugs, such as ergosterol synthesis inhibitors, such as ITC (14-α-demethylase inhibitor), and TRB (squalene epoxidase inhibitor). Synergism was observed for both associations, with distinct inhibition points in the ergosterol biosynthesis cascade.

Besides the mechanisms discussed here, many others still need elucidation. Research for alternatives to infections caused by drug-resistant strains makes this field of research fundamental. It is also essential to focus on combination therapeutics, as was discussed in the literature (Brilhante et al., 2019), it is a worldwide tendency, and is becoming an important focus in modern pharmacology. Since terpenes represent a class of molecules with diverse structures and many activities that still need elucidation, they are also a promising discovery field for further research.

4. Future Perspectives

Knowledge concerning bioactive molecules has increased significantly over the past few years, and phytochemicals isolated from plants can be found which have various applications in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries (antifungal applications). Terpenoids are found in such diverse applications, this review analyzes data from studies describing the fungicidal activity of terpenes and prospects for future use. Terpenoids present differing mechanisms of action, and can interfere with microbial membrane functions, or suppress virulence factors such as production of enzymes and toxins, or by acting against fungal biofilm formation.

Due to its large territory, Brazil has a rich and diverse flora that can be studied and explored. The Caatinga, as a Brazilian exclusivity, still presents plants that are little known. Such resources may provide new molecules and a diversity of applications for industry. Preservation of this biome and new bio-prospective research of its grand potential are of great importance.

References

ABRÃO, F., ARAÚJO COSTA, L.D., ALVES, J.M., SENEDESE, J.M., CASTRO, P.T., AMBRÓSIO, S.R., VENEZIANI, R.C.S., BASTOS, J.K., TAVARES, D.C. and MARTINS, C.H.G., 2015. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, pp. 443. http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0961-4. PMid:26691920.

ALVES, M.F., CASTRO NIZIO, D.A., SAMPAIO, T.S., NASCIMENTO JUNIOR, A.F., ANDRADE BRITO, F., MELO, J.O., BLANK, M.F.A., CACILIARDI, P.R., MACHADO, S.M.F. and BLANK, A.F., 2016. Myrcia lundiana Kiaersk native populations have different essential oil composition and antifungal activity against Lasiodiplodia theobromae. *Industrial Crops and Products*, vol. 85, pp. 266-273. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.039.

ARAÚJO, J.M.S., DE SIQUEIRA, A.C.P., BLANK, A.F., NARAIN, N. and DE AQUINO SANTANA, L.C.L., 2018. A cassava starch–chitosan edible coating enriched with Lippia sidoides Cham. essential oil and pomegranate peel extract for preservation of Italian tomatoes (Lycopersicon esculentum Mill.) stored at room temperature. *Food and Bioprocess Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1750-1760. http://dx.doi.org/10.1007/s11947-018-2139-9.

ARRUDA, R.D.C.O., VICTÓRIO, C.P., BOARETTO, A.C., CAROLLO, C.A., DA SILVA FARIAS, C., MARCHETTI, C.R. and SILVA, D.B., 2019. Essential oil composition, antifungal activity and leaf anatomy of Lippia alba (Verbenaceae) from Brazilian Chaco. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 13, no. 4, pp. 79-88. http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2018.6700.

BALDIM, I., PAZIANI, M.H., BARIÃO, P.H.G., KRESS, M.R.Z. and OLIVEIRA, W.P., 2022. Nanostructured lipid carriers loaded with lippia sidoides essential oil as a strategy to combat the multidrug-resistant Candida auris. *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, pp. 180. http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14010180. PMid:35057078.

BIASI-GARBIN, R.P., DEMITTO, F.D.O., AMARAL, R.C.R.D., FERREIRA, M.R.A., SOARES, L.A.L., SVIDZINSKI, T.I.E. and YAMADA-OGATTA, S.F., 2016. Antifungal potential of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 58, pp. 18. http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658018. PMid:27007561.

BRILHANTE, R.S.N., PEREIRA, V.S., OLIVEIRA, J.S., RODRIGUES, A., DE CAMARGO, Z.P., PEREIRA-NETO, W.A., NASCIMENTO, N.R.F., CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J.C. and ROCHA, M.F.G., 2019. Terpinen-4-ol inhibits the growth of Sporothrix schenckii complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiology*, vol. 14, no. 14, pp. 1221-1233. http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2019-0146. PMid:31625442.

CHAPPELL, J., COATES, R.M., LEW, M. and HUNG-WEN, L., 2010. Sesquiterpenes. In: L. MANDER and H.-W. LI, eds. *Comprehensive natural products II. Chemistry and biology*. USA: Elsevier, vol. 1, pp. 609-641.

COSTA, J.S., CRUZ, E.N.S., SETZER, W.N., SILVA, J.K.R., MAIA, J.G.S. and FIGUEIREDO, P.L.B., 2022. Essentials oils from Brazilian *Eugenia* and *Syzygium* species and their biological activities. *Biomolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 1155. http://dx.doi.org/10.3390/biom10081155. PMID: 32781744

COX-GEORGIAN, D., RAMADOSS, N., DONA, C. and BASU, C., 2019. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. In: N. JOSHEE, S. DHEKNEY and P. PARAJULI, eds. *Medicinal plants*. Cham: Springer, pp. 333-359. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15.

CRUZ, E.M., MENDONÇA, M.C., BLANK, A.F., SAMPAIO, T.S., PINTO, J.A., CACILIARDI, P.R. and WARWICK, D.R., 2018. Lippia gracilis Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of Thielaviopis paradoxa. *Industrial Crops and Products*, vol. 117, pp. 245-251. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.068.

DANTAS, T. L., LUCENA NOGUEIRA, P., ARRUDA, T. A., CATÃO, R. M. R., and MORAIS, M. R., 2018. Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais: atividade antimicrobiana de extratos de *Allium sativum* L. (alho) e *Bixa orellana* L. (urucum). *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, vol. 14, no. 1, pp. 36-42.

DIAS, C. and AMARO, L., 2020. Strategies to preserve postharvest quality of horticultural crops and superficial scald control: from diphenylamine antioxidant usage to more recent approaches. *Antioxidants*, vol. 9, no. 4, pp. 356. http://dx.doi.org/10.3390/antiox9040356. PMid:32344588.

DONATI, M., MONDIN, A., CHEN, Z., MIRANDA, F.M., NASCIMENTO JUNIOR, B.B., SCHIRATO, G., PASTORE, P. and FROLDI, G., 2015. Radical scavenging and antimicrobial activities of Croton zehntneri, Pterodon emarginatus and Schinopsis brasiliensis essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β-caryophyllene and myrcene. *Natural Product Research*, vol. 29, no. 10, pp. 939-946. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.964709. PMid:25280163.

DUARTE, A.E., DE MENEZES, I.R.A., BEZERRA MORAIS BRAGA, M.F., LEITE, N.F., BARROS, L.M., WACZUK, E.P. and ESCOBAR BURGER, M., 2016. Antimicrobial activity and Modulatory effect of essential oil from the leaf of Rhaphiodon echinus (Nees & Mart) Schauer on some antimicrobial drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 21, no. 6, pp. 743. http://dx.doi.org/10.3390/molecules21060743. PMid:27338314.

DUDUKU, K., ROSALAM, S. and AWANG, B., 2007. Phytochemical antioxidants for health and medicine - A move towards nature. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, vol. 2, no. 4, pp. 97-104.

EMILIANO, S.A. and BALLIANO, T.L., 2019. Prospecção de artigos e patentes sobre plantas medicinais presentes na caatinga brasileira. *Cadernos de Prospecção*, vol. 12, no. 3, pp. 615. http://dx.doi.org/10.9771/cp.v12i3.27324.

FELIPE, L.O. and BICAS, J.L., 2017. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola*, vol. 39, no. 2, pp. 120-130. http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068.

FREIRE, J.C.P., JÚNIOR, J.K.D.O., SILVA, D.D.F., SOUSA, J.P.D., GUERRA, F.Q.S. and DE OLIVEIRA LIMA, E., 2017. Antifungal activity of essential oils against Candida albicans strains isolated from users of dental prostheses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, pp. 7158756. http://dx.doi.org/10.1155/2017/7158756. PMid:29234423.

GARG, A., SHARMA, R., DEY, P., KUNDU, A., KIM, H.S., BHAKTA, T. and KUMAR, A., 2020. Analysis of triterpenes and triterpenoids. In: A.S. Silva, S.F. Nabavi, M. Saeedi and S.M. Nabavi, eds. *Recent advances in natural products analysis*. Amsterdam: Elsevier, pp. 393-426. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00011-1.

GERSHENZON, J. and DUDAREVA, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, vol. 3, no. 7, pp. 408-414. http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.5. PMid:17576428.

MACEDO, G.F., ALMEIDA-BEZERRA, J.W., DA SILVA, V.B., LIMA, E.E., DE MENEZES, S.A., PORTELA, B.Y.M., BRAGA, B.L.P., BEZERRA, J.S., OLIVEIRA, M.C., ALENCAR, D.R., COSTA, A.R., SOUZA, M.A., CRUZ NETO, J., PEREIRA, T.C. and SILVA, F.S.H., 2020. Eremanthus arboreus (Gardner) Macleish (Candeeiro): natural source of α-Bisabolol. *Research, Social Development*, vol. 9, no. 10, pp. e9599109270. http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9270.

MACIEL, A.J., LACERDA, C.P., DANIELLI, L.J., BORDIGNON, S.A., FUENTEFRIA, A.M. and APEL, M.A., 2019. Antichemotactic and antifungal action of the essential oils from Cryptocarya aschersoniana, Schinus terebinthifolia, and Cinnamomum amoenum. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 16, no. 8, pp. e1900204. http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201900204. PMid:31298500.

MCCARVEY, D.J. and CROTEAU, R., 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, vol. 7, no. 7, pp. 1015-1026. PMid:7640522.

MEDEIROS, V.C., DURÁN, F.J. and LANG, K.L., 2021. Copalic acid: occurrence, chemistry, and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 31, no. 4, pp. 375-386. http://dx.doi.org/10.1007/s43450-021-00173-2.

MIRANDA, F.M., BRAGA DO NASCIMENTO JUNIOR, B., AGUIAR, R.M., PEREIRA, R.S., DE OLIVEIRA TEIXEIRA, A., DE OLIVEIRA, D.M. and FROLDI, G., 2019. Promising antifungal activity of Croton tricolor stem essential oil against Candida yeasts. *The Journal of Essential Oil Research*, vol. 31, no. 3, pp. 223-227. http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2018.1539416.

MOURA, D.F., MARTINS, R.D. and SILVA, M.V., 2019. Nerolidol: Fitoconstituinte de óleos essenciais de plantas da caatinga. *Brazilian Journal of Development*, vol. 5, no. 12, pp. 33402-33416. http://dx.doi.org/10.34117/bjdv5n12-384.

MOURA, D.F., ROCHA, T.A., MELO BARROS, D., SILVA, M.M., OLIVEIRA FERREIRA, S.A., MARTINS, R.D. and SILVA, M.V., 2020. Avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com Nerolidol. *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, no. 1, pp. 5172-5183. http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n1-375.

NERI, T.S., SILVA, K.W.L., MAIOR, L.P.S., OLIVEIRA-SILVA, S.K., AZEVEDO, P.V.M., GOMES, D.C.S., SOUZA, M.A., PAVÃO, J.M.S.J., COSTA, J.C., CUNHA, A.L., FERREIRA-JÚNIOR, C.C., MATOS-ROCHA, T.J., SANTOS, A.F. and FONSECA, S.A., 2021. Phytochemical characterization, antioxidant potential and antibacterial activity of the Croton argyrophylloides Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 83, pp. e236649. http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.236649. PMid:34669789.

OLIVEIRA, T.N.S., SILVA-FILHO, C.M.S., MALVEIRA, E.A., AGUIAR, T.K.B., SANTOS, H.S., ALBUQUERQUE, C.C. and VASCONCELOS, M.A., 2021. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from Lippia gracilis Schauer against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 130, no. 4, pp. 1117-1129. http://dx.doi.org/10.1111/jam.14857. PMid:32961612.

OUYANG, Q., LIU, Y., OKETCH, O.R., ZHANG, M., SHAO, X. and TAO, N., 2021. Citronellal exerts its antifungal activity by targeting ergosterol biosynthesis in *Penicillium digitatum*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, vol. 7, no. 6, pp. 432. http://dx.doi.org/10.3390/jof7060432. PMid:34072578.

PEIXOTO-NEVES, D., SILVA-ALVES, K. S., GOMES, M. D. M., LIMA, F. C., LAHLOU, S., MAGALHÃES, P. J. C., CECCATTO, V. M., COELHO-DE-SOUZA, A. N., and LEAL-CARDOSO, J. H., 2010. Efeitos vasorelaxantes dos isômeros do fenol monoterpênico, carvacrol e timol, na aorta isolada de ratos. *Farmacologia Fundamental e Clínica*, vol. 24, no. 3, pp. 341-350.

RODRIGUES, F.F.G., COLARES, A.V., NONATO, C.D.F.A., GALVÃO-RODRIGUES, F.F., MOTA, M.L., BRAGA, M.F.B.M. and COSTA, J.G.M., 2018. In vitro antimicrobial activity of the essential oil from Vanillosmopsis arborea Baker (Asteraceae) and its major constituent, α-bisabolol. *Microbial Pathogenesis*, vol. 125, pp. 144-149. http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.024. PMid:30219391.

ROQUE, A.D.A., ROCHA, R.D.M. and LOIOLA, M.I.B., 2010. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 12, no. 1, pp. 31-42. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000100006.

SANTOS, A.R.B., LANJEIRA, D., DIAS, L.R.C., SOUSA, E.S., MELO, C.D.S., LIMA, S.C., SILVA, P.H.S. and SOBRINHO, C.A., 2020. Chemical composition and control of Sclerotium rolfsii Sacc by essential oils. *African Journal of Microbiological Research*, vol. 14, no. 4, pp. 119-128. http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2020.9286.

SANTOS, J.F.S., ROCHA, J.E., BEZERRA, C.F., DO NASCIMENTO SILVA, M.K., DE MATOS, Y.M.L.S., DE FREITAS, T.S. and MORAIS-BRAGA, M.F.B., 2018. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the Eugenia uniflora essential oil against Candida spp. *Food Chemistry*, vol. 261, pp. 233-239. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015. PMid:29739588.

SANTOS, N.O.D., PASCON, R.C., VALLIM, M.A., FIGUEIREDO, C.R., SOARES, M.G., LAGO, J.H.G. and SARTORELLI, P., 2016. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of Lippia alba (Verbenaceae). *Medicines (Basel, Switzerland)*, vol. 3, no. 3, pp. 22. http://dx.doi.org/10.3390/medicines3030022. PMid:28930132.

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G.C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M., TUNDIS, R., SHARIFI-RAD, M., LOIZZO, M.R., ADEMILUYI, A.O., SHARIFI-RAD, R., AYATOLLAHI, S.A. and IRITI, M., 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 22, no. 1, pp. 70. http://dx.doi.org/10.3390/molecules22010070. PMid:28045446.

SHI, Y., SI, H., WANG, P., CHEN, S., SHANG, S., ZHANQIAN, C., WANG, Z. and LIAO, S., 2019. Derivatization of natural compound β-pinene enhances its in vitro antifungal activity against plant pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 24, no. 17, pp. 3144. http://dx.doi.org/10.3390/molecules24173144. PMid:31470567.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W. and AZEREDO, J., 2012. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 288-305. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. PMid:21569057.

SINGH, B., and SHARMA, R. A., 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, vol. 5, no. 2, pp. 129-151. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2. PMID: 28324581.

TORRES, S.B., DOS SANTOS, A.N.A., BARBOSA, M.V.C. and CABRAL, A.C.S., 2021. Potencial terapêutico das ervas medicinais da caatinga região do nordeste brasileiro: therapeutic potential of medicinal herbs from the caatinga region of northeastern Brazil. *Archives of Health*, vol. 2, no. 4, pp. 1301-1304.

VASCONCELOS, A. D. M., HENRIQUES, I. C. N., SOUZA, M. P., SOUSA SANTOS, W., SOUSA SANTOS, W., and RAMOS, C. C., 2017. Caracterização florística e fitossociológica em área de Caatinga para fins de manejo florestal no município de São Francisco-PI. *Agropecuária Científica no Semiárido*, vol. 13, no. 4, pp. 329-337. http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v13i4.967.

VERAS, B.O., DOS SANTOS, Y.Q., OLIVEIRA, F.C.D.S., ALMEIDA, J.R.G.D.S., DA SILVA, A.C., CORREIA, M.T.D.S. and DA SILVA, M.V., 2020. Algrizea Minor Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. *Natural Product Research*, vol. 34, no. 20, pp. 3013-3017. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1602832. PMid:31014086.

VERRUCK, S., PRUDENCIO, E.S. and SILVEIRA, S.M., 2018. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos*, vol. 4, no. 1, pp. 111-124. http://dx.doi.org/10.5965/24473650412018111.

XAVIER, J.K.A., ALVES, N.S.F., SETZER, W.N. and DA SILVA, J.K.R., 2020. Chemical diversity and Rogical activities of essential oils from Licaria, Nectrandra and Ocotea Species (Lauraceae) with occurrence in Brazilian biomes. *Biomolecules*, vol. 10, no. 6, pp. 869. http://dx.doi.org/10.3390/biom10060869. PMid:32517106.

ZHENG, S., JING, C., WANG, X., OUYANG, Q., JIA, L. and TAO, N., 2015. Citral exerts its antifungal activity against Penicillium digitatum by affecting the mitochondrial morphology and function. *Food Chemistry*, vol. 178, pp. 76-81. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.077. PMid:25704686.

4.3 ARTIGO 3

O artigo “**α-pinene: docking study, cytotoxicity, mechanism of action, and anti-biofilm effect against *Candida albicans***” foi publicado no periódico *Antibiotics* volume 12, numero 3, 2023, link para acesso: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36978347/.

antibiotics

Article

α-Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*

Daniela Bomfim de Barros [1,2,3], Luanna de Oliveira e Lima [2], Larissa Alves da Silva [2], Mariana Cavalcante Fonseca [2], Rafael Carlos Ferreira [4], Hermes Diniz Neto [5], Danielle da Nóbrega Alves [6], Walicyranison Plinio da Silva Rocha [2], Luciana Scotti [7], Edeltrudes de Oliveira Lima [2], Marianna Vieira Sobral [4], Lúcio Roberto Cançado Castellano [3], Juliana Moura-Mendes [8,*], Felipe Queiroga Sarmento Guerra [2,*] and Márcia Vanusa da Silva [1]

1 Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
2 Department of Pharmaceutical Sciences, Paraíba Federal University, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
3 Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Technical School of Health, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
4 Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
5 University Hospital Julio Muller, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá 78060-900, MT, Brazil
6 Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
7 Cheminformatics Laboratory, Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Quality Management, University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
8 Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay
* Correspondence: jmendes@rec.una.py (J.M.-M.); fqsg@academico.ufpb.br (F.Q.S.G.)

check for updates

Citation: Bomfim de Barros, D.; de Oliveira e Lima, L.; Alves da Silva, L.; Cavalcante Fonseca, M.; Ferreira, R.C.; Diniz Neto, H.; da Nóbrega Alves, D.; da Silva Rocha, W.P.; Scotti, L.; de Oliveira Lima, E.; et al. α-Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. *Antibiotics* 2023, *12*, 480. https://doi.org/10.3390/antibiotics12030480

Academic Editors: Claudia Cafarchia and Domenico Schillaci

Received: 18 January 2023
Revised: 17 February 2023
Accepted: 23 February 2023
Published: 28 February 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: *Candida albicans* is associated with serious infections in immunocompromised patients. Terpenes are natural-product derivatives, widely studied as antifungal alternatives. In a previous study reported by our group, the antifungal activity of α-pinene against *C. albicans* was verified; α-pinene presented an MIC between 128–512 μg/mL. In this study, we evaluate time-kill, a mechanism of action using in silico and in vitro tests, anti-biofilm activity against the *Candida albicans*, and toxicity against human cells (HaCaT). Results from the molecular-docking simulation demonstrated that thymidylate synthase (−52 kcal mol^{-1}), and δ-14-sterol reductase (−44 kcal mol^{-1}) presented the best interactions. Our in vitro results suggest that α-pinene's antifungal activity involves binding to ergosterol in the cellular membrane. In the time-kill assay, the antifungal activity was not time-dependent, and also inhibited biofilm formation, while rupturing up to 88% of existing biofilm. It was non-cytotoxic to human keratinocytes. Our study supports α-pinene as a candidate to treat fungal infections caused by *C. albicans*.

Keywords: natural product; terpenes; fungicidal activity; biofilm; candidiasis; in silico; in vitro

1. Introduction

The advance of medicine has increased life expectancy and aided in the treatment of many diseases, yet this has also caused much greater susceptibility to opportunistic fungal diseases [1]. Patients hospitalized and receiving chemotherapy, bone marrow transplants, and those with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other immune-deficiency diseases are often exposed to invasive fungal infections (IFI) [2]. IFIs are frequently associated with *Aspergillus*, *Cryptococcus*, and *Candida* [1]. *Candida* species are responsible for many cases of septicemia, bringing high mortality rates and medical costs as well [3,4]. *Candida albicans*, a fungus that inhabits the gastrointestinal and genitourinary tracts, and the oral and conjunctive microbiota is the species most isolated as an etiological agent of candidiasis [2,5]. *Candida albicans* is the third most-commonly isolated microorganism in bloodstream infections in hospitalized patients [6]. The World Health Organization

(WHO) recently published a list of priority pathogenic fungi that pose a threat to public health. Of the 19 fungal species mentioned in the document, *Candida albicans* was noted as a high-priority- (critical) level pathogen, due to the risks of morbidity and mortality. The publication is intended to strengthen the global response to fungal infections and use of antifungal agents [7].

Common antifungals used in *Candida* treatment, the azoles, are a first choice for their wide activity, low cost, and for being safe [8,9]. Polyenes, and in more severe cases of candidemia, fluoropyrimidines, and echinocandins are also prescribed, the latter being the best option for patients with neutropenia [8,10,11]. However, treatment is still a challenge [9], as it can lead to cytotoxic effects and antifungal resistance [10], often caused by self-diagnosis and indiscriminate use. The high relapse rate has created a rather worrying scenario [2,8]. Antifungal-therapy failures result in prolonged illness, higher toxicity, and more deaths [12]. To reverse this situation, the WHO is attempting incentivize more research in the area [7].

In view of the known increasing resistance to synthetic antifungals and to their toxicity, it has become more urgent to promote studies involving natural substances [2]. Natural products and their derivatives have long been a source of bioactive compounds, including those with antifungal activity, low toxicity, and low costs [13,14]. Synthetic substances are expensive to synthesize, and new synthetic compounds that overcome pre-clinical and clinical stages of fungal infections are rare [15]. Among the more promising natural compounds are the monoterpenes, such as pinenes. These can be found in the essential oils of coniferous trees (pine), and in turpentine, rosemary, and lavender [13]. One of the most relevant pinenes is α-pinene, which presents antifungal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis* [16–18].

As reported by our group [19], the antifungal activity of α-pinene against planktonic strains of *C. albicans* has been verified, whether alone or in association with other drugs. A-pinene presented an MIC between 128–512 µg/mL and the MFC presented the same values, which demonstrated its fungicidal effect. Despite the promising results of the study, better assessment of the effects of α-pinene against *C. albicans*, such as biofilm activity, and possible mechanism action, as well as cytotoxicity, are needed.

The present work aimed to perform molecular-docking, toxicity, and mechanism-of-action analysis, anti-biofilm-effect evaluations, and time-kill assays for α-pinene against *C. albicans*.

2. Results

2.1. Docking Prediction

As demonstrated in Table 1, α-pinene presented negative ligand–receptor interaction energies for the molecular targets, demonstrating affinities mainly for thymidylate synthase (−52 kcal mol^{-1}) and δ -14-sterol reductase (−44 kcal mol^{-1}).

Table 1. Binding-energy (kcal mol^{-1}) values of α-pinene with the molecular targets 1,3-β-glucan synthase (2JOY), δ-14-sterol reductase (4QUV), 14-α-demethylase (3JUV), and thymidylate synthase (3QJ7).

	Compounds			
	14-α-Demethylase (3JUV)	**δ-14-Sterol Reductase (4QUV)**	**1,3-β-Glucan Synthase (2J0Y)**	**Thimidylate Synthase (3QJ7)**
Energy (kcal/mol)	−16	−44	−32	−52

Figure 1 shows that the α-pinene interactions with the amino-acid residues are mediated by hydrogen bonds (depicted in blue). The structures (in blue, red, and green, respectively), correspond to hydrogen, steric, and electrostatic bonds.

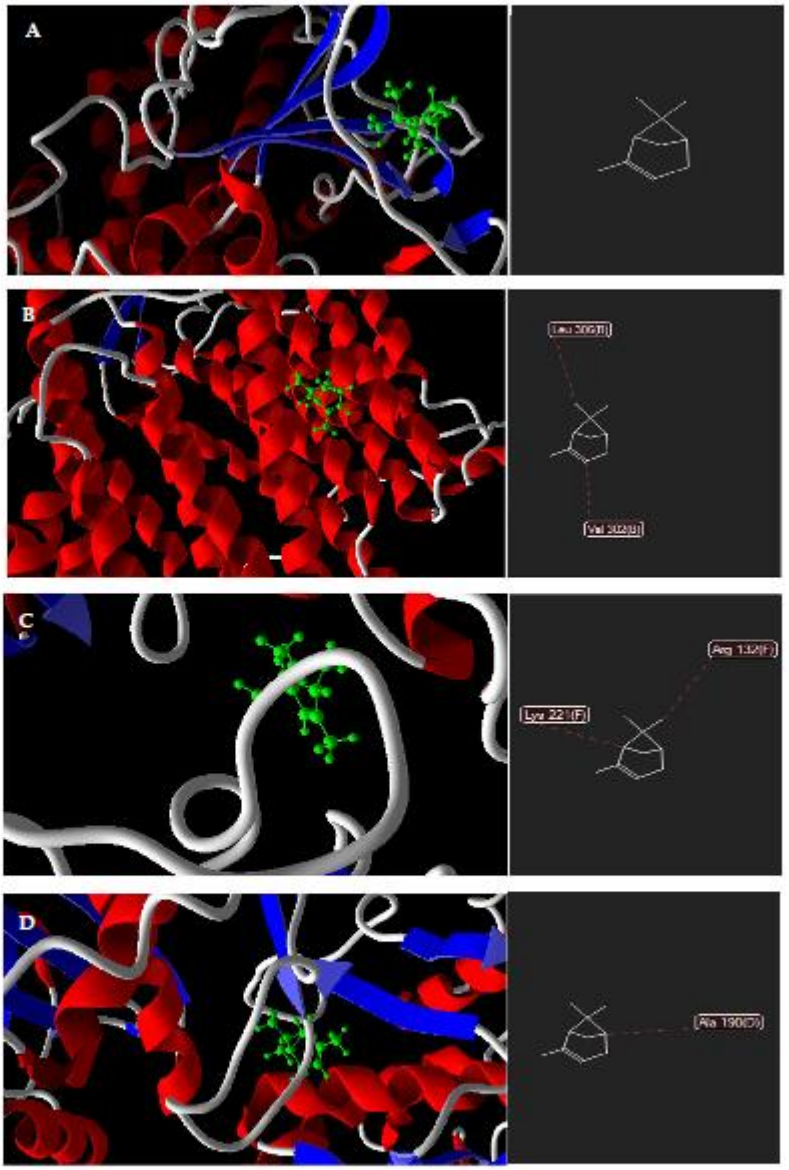


Figure 1. PDB ID protein—α-pinene interaction maps. **(A)** Map of interactions between the PDB protein ID 3JUV (14-α-demethylase) and α-pinene; **(B)** Map of interactions between the PDB ID 4QUV protein (δ -14-sterol reductase) and α-pinene; **(C)** Map of interactions between the PDB ID 2J0Y protein (1,3-β-glucan synthase) and α-pinene; **(D)** Map of interactions between the PDB ID 3QJ7 protein (thymidylate synthase) and α-pinene.

2.2. *Sorbitol and Exogenous-Ergosterol Assays*

Sorbitol is an osmotic protector that minimizes the effects of chemical agent(s) on the fungal cell wall. In our study, the presence of an osmotic protector did not affect the minimum concentration of α-pinene required to inhibit cell growth for *C. albicans* ATCC 76485, suggesting that its mechanism of action is not related to disruption of the cell wall (Table 2).

Table 2. MIC values (µg/mL) of drugs in the absence and presence of sorbitol (0.8 M) and exogenous ergosterol (1.008 mM) against *C. albicans* ATCC 76485. Values are expressed in µg/mL.

Drugs	Sorbitol		Ergosterol	
	Absence	Presence	Absence	Presence
α-pinene	128	128	128	>512
Caspofungin	0.062	2	NA	NA
Amphotericin B	NA	NA	1.25	>512

NA: not applicable.

On the other hand, our findings showed that the MIC of α-pinene increased (from 128 µg/mL to >512 µg/mL) in the presence of exogenous ergosterol. This suggests the disruption of cell-membrane permeability is likely related to membrane-ergosterol binding (Table 2).

2.3. *Time-Kill Assay*

While subjected to different concentrations of the α-pinene, yeast growth was analyzed over time. *C. albicans* ATCC 76485 was subjected to the experimental method for microbial death kinetics (Figure 2). The graph presents the log10 of CFU/mL versus time of exposure in the presence of α-pinene (MIC/2, MIC, and MIC × 2), the standard antifungal, and the control. The graph reveals that the α-pinene concentrations of MIC/2 and MIC present fungicide activity at 4 h of exposure, since there was a reduction of less than 3 $\log_{10}$ CFU/mL of the initial inoculum. This behavior was also seen for the MIC × 2 concentrations at up to 2 h of exposure. Therefore, it was possible to identify in the time-kill tests the fact that fungicidal activity of α-pinene is not time-dependent.

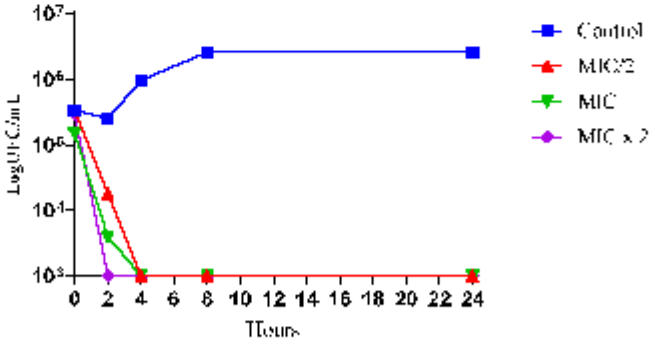


Figure 2. Time-kill curve for *C. albicans* ATCC 76485 when exposed to various concentrations of α-pinene at different time intervals. MIC: Minimum Inhibitory Concentration CFU: Colony Forming Unit.

2.4. *α-Pinene Anti-Biofilm Activity*

Rupture percentages of existing (mature) biofilm are shown in Figure 3. According to the data obtained, we observed that α-pinene presented significant rates of biofilm

rupture at all tested concentrations (MIC, MIC × 2, and MIC × 4) and for all strains (except the A05 strain, which was less than 50%). The highest rupture rates (between 71% and 88%) were observed for the higher concentrations of the substance, and there were no significant differences between biofilm rupture rates between species when tested at the same concentrations.

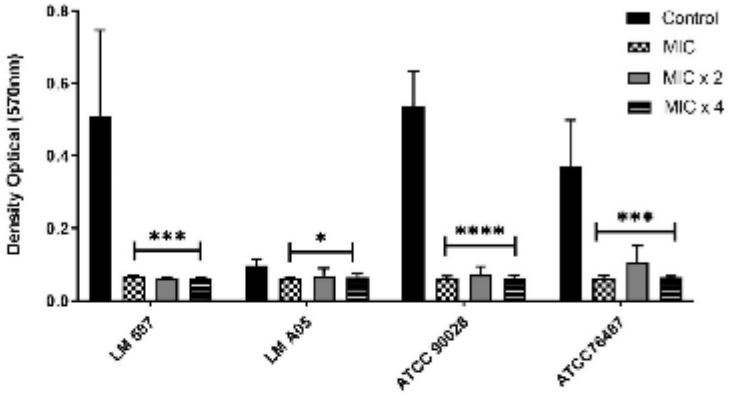


Figure 3. Rupture of mature *C. albicans* biofilm after exposure to different concentrations of α-pinene. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ as compared to the control group. MIC: Minimum Inhibitory Concentration; LM: from the UFPB Mycology Laboratory.

2.5. Cytotoxicity Assay against HaCaT Cells

After 24 h of treatment, α-pinene induced significant cytotoxicity at 1024 µg/mL, with 54.98 ± 2.22% inhibition of cell proliferation. At 48 h of incubation, significant α-pinene cytotoxic effect was observed between 512 and 1024 µg/mL, with the respective inhibition of cell-growth percentages of 17.29 ± 1.93% and 78.11 ± 0.32% (Figure 4).

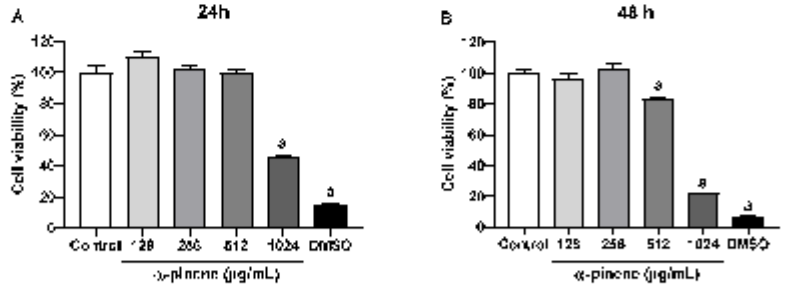


Figure 4. Cytotoxicity of α-pinene against human cell line HaCaT at 24 and 48 h. (**A**): Cell viability after 24 h of α-pinene treatment. (**B**): Cell viability after 48 h of α-pinene treatment. Data were analyzed with GraphPad Prism 8.0 software and presented as the mean ± SEM of three independent tests performed in quadruplicate. Significant difference ($p < 0.05$) when compared to drug-free growth control (a).

3. Discussion

In silico assays, particularly molecular docking, are important tools in medicinal chemistry. They serve to predict molecular interactions between structures, generally a receptor protein and a ligand. Docking analysis calculates the energy values needed to perform the coupling in each of the possible linking sites [20]. There are no previous

studies reporting the interaction of α-pinene with the tested enzymes. In the study, the α-pinene-thymidylate synthase interaction presented the lowest binding energy, leading to a prediction that the phytoconstituent has the ability to bind to this receptor with consequent activity involving fungal-DNA synthesis [21].

Many drugs available for clinical use interact directly with ergosterol, causing damage to the fungal cell membrane. It can be verified whether test products interact directly with ergosterol, and if the effects of the selected compounds on the fungal cell are due to binding to ergosterol present in the membrane, since in the presence of exogenous ergosterol in the culture medium, prevention of membrane-ergosterol binding occurs. The MIC of the product tends to increase in the presence of exogenous ergosterol, because it will need higher concentrations to interact with membrane ergosterol [22]. The exogenous-ergosterol and sorbitol assays in the present work suggest that the antifungal activity of α-pinene may be related to ergosterol binding in the fungal cytoplasmic membrane, and the data described is unprecedented.

Yeast growth over time was analyzed using various concentrations of test product and including a viable cell count, verifying fungistatic or fungicidal action, and the analysis of the microorganism–test-product interaction, to characterize concentration/activity dynamics over time [23].

It was seen that α-pinene presents a fungicidal effect, and that this effect occurs after 4 h of exposure to the drug, corroborating what was observed in our previous study [19], which demonstrated a fungicidal effect through the determination of MIC and MFC.

Silva et al. [13], aiming to determine the death-time curve of *C. albicans* and MRSA, observed that α-pinene positive enantiomers were fungicidal after 60 min of exposure. Bactericidal effect was observed after 6 h of incubation. Discordant with our study, this result can be explained by the fact that a different strain of *C. albicans* was used. Saracino et al. [24], observed no α-pinene effect against *C. albicans* in the first 6 h, a decrease in cell viability at 8 h, and complete cell death at 24 h.

Biofilms are sessile microbial communities surrounded by self-produced extracellular matrices which are considerably more resistant to conventional antifungals and require higher effective concentrations. Assaying anti-biofilms is therefore important [25,26]. The data obtained demonstrate that α-pinene was able to perform mature biofilm disruption at all concentrations tested (MIC, MIC × 2, and MIC × 4).

The α-pinene biofilm-formation-inhibition assay has already been conducted, demonstrating 100% inhibition at the MIC [13]. However this is the first study that explores the potential of α-pinene in the eradication of preexisting biofilm. HaCaT cells, an immortalized keratinocyte lineage, have been widely used in in vitro assays, and are an important tool for studies of epidermal homeostasis and its pathophysiology [27]. In this study, the cytotoxicity of α-pinene against HaCaT cells at 24 h and 48 h was also evaluated. At 24 h, the test substance caused cell death only at the maximum concentration, 1024 µg/mL. At 48 h, the result was similar, with viability above 50% MIC, being cytotoxic only at the highest concentration.

Similar results were also obtained in a study of α-pinene photo-protective activity. HaCaT cells were subjected to a single UVA-radiation dose in the presence of the substance (30 µM), and different cellular endpoints were analyzed. The 31.25 µM concentration revealed a viability percentage above 50%, with α-pinene being cytotoxic only at 1000 µM. The study demonstrated that α-pinene prevents UVA-induced oxidative stress, and inhibits ROS generation, and lipid peroxidation in HaCaT cells [28].

Karthikeyan et al. [29], also demonstrated that the substance prevents UVA-induced photo-aging through the maintenance of intracellular antioxidants, modulation of Bax/Bcl-2 expression, and preventing cell death by hindering the activation of apoptotic-effect mediators, such as the expression of caspase-3. The monoterpene also suppressed metalloproteinases and inhibited the UVA-induced activation of proangiogenic and inflammatory-protein expression, preventing the photo-aging process.

In the docking tests, it was observed that α-pinene presents better interaction with thymidylate synthase, revealing fungicidal activity against *Candida albicans* through a mechanism of action likely related to ergosterol complexation. In the time-kill assay, it was demonstrated that the fungicidal activity of α-pinene is not time dependent, and that it also inhibits biofilm formation, with up to 88% rupture of preexisting biofilms. The cytotoxicity test revealed that α-pinene was not toxic to human keratinocytes.

4. Materials and Methods

4.1. Test Substance, Antifungal Drugs, and Culture Media

The test substance α-pinene, the antifungals (amphotericin B; caspofungin), ergosterol, and dimethylsulfoxide (DMSO) were commercially obtained from the manufacturer Sigma Aldrich®. Sorbitol was obtained from VETEC Química Fina Ltd.a-Rio de Janeiro/RJ. The culture medium Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for the maintenance of the *Candida* strains. The liquid culture medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-L-glutamine (without sodium bicarbonate) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) was used for the antifungal assays. Both culture media were prepared according to the manufacturer's instructions. The α-pinene was dis-solved in DMSO (with a final concentration of 0.13% and 1% for the cytotoxicity Aasay and anti-fungal activity, respectively).

4.2. Microorganisms

The following strains were used in the experiments: *Candida albicans* ATCC 76485, *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM 587, and *C. albicans* A05. The strains were provided by the Mycology Laboratory at the Federal University of Paraíba-UFPB. The microorganisms were kept in SDA at 4 °C until the realization of the tests. Prior to each experiment, the cells were reactivated on SDA agar plates for inoculum preparation, and the microorganism colonies were suspended in a 0.85% sterile NaCl solution, and then adjusted to the 0.5 scale of McFarland standard [30,31].

4.3. Molecular Docking

The structure of α-pinene was downloaded from PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/; accessed on 1 February 2022), in sdf format. The receptors investigated were: 14-α-demethylase, δ-14-sterol reductase, 1,3-β-glucan synthase, and thymidylate synthase. These were downloaded from the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do accessed on 5 February 2022) with the respective IDs: 3UV [32], 4QUV [33], 2J0Y [34], and 3QJ7 [35]. The ligand and selected receptors were docked using the Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD) [36].

The proteins and ligand structures were prepared using the default parameter settings in the software. Characteristic models that were expected to be relevant for binding the α-pinene ligand were also generated. The MolDock evaluation model [GRID] was used as the evaluation function, and the MolDock search facility was used [37].

4.4. Mechanism of Action

4.4.1. Effect on the Fungal Cell Wall

To evaluate the fungal-cell-wall–terpene interaction, the MICs of the products were evaluated in the presence and absence of an osmotic stabilizer, 0.8 M sorbitol. If the product acted on the fungal cell wall, it would cause cell lysis in the absence of the osmotic stabilizer, but would allow fungal growth in the presence of sorbitol. Thus, the antifungal products' MIC's were compared in the absence and presence of 0.8 M sorbitol.

Determination of the product MICs (in the presence of sorbitol) was performed similarly to the normal MIC determinations. In each plate well, 100 µL of RPMI 1640 liquid medium previously supplemented with sorbitol (MW = 182.17) (VETEC Química Fina Ltd.a—Rio de Janeiro/RJ) was added, both doubly concentrated. Subsequently, 100 µL of the product solution, also doubly concentrated, was added to the wells of the first row

of the plate. Through a serial dilution (ratio of two), concentrations of 1024 µg/mL to 0.125 µg/mL of the products were obtained. In the case of sorbitol, each well presented a final concentration of 0.8 M. Finally, 10 µL of the fungal inoculum was added to the wells, and each column of the plate referred to a specific fungal strain.

A microorganism control was performed, in which 100 µL of the same RPMI 1640, sorbitol (0.8 M), and 10 µL of the inoculum of each species were added to the well. A sterility control was also performed, placing 200 µL of RPMI 1640 in a well without the fungal suspension. And finally, a control with DMSO (DMSO 1% + inoculum + RPMI 1640) was performed.

The same procedure was also performed with the antifungal caspofungin serving as a control, since it acts against the growth of fungi by inhibiting β-1,3-D-glucansynthase present in the cell wall. The plates were incubated for 24 h at a temperature of 35–37 °C, and a subsequent visual reading of the plates was performed [22,38].

4.4.2. Ergosterol Binding Assay

Determination of the product MICs with and without exogenous ergosterol (400 µg/mL) was performed in the RPMI 1640 medium, according to the methodology described above. The culture medium (RPMI 1640) was used in the absence and presence of ergosterol (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Finally, a control was performed with amphotericin B, which has a known mechanism of action of interaction with membrane ergosterol [39].

4.5. Time-Kill

The microorganism death-time curve was used to assess the minimum time required for the death of the fungal strains in the presence of the phytoconstituent (26). The yeast strains´ response was observed for minimum inhibitory concentrations of the product during 24 h. First, 1 mL of the fungal suspension was inoculated into 9 mL of SDA with the substance in increasing concentrations, with MIC/2, MIC and MIC × 2, respectively, corresponding to 128 µg/mL, 256 µg/mL and 512 µg/mL. Fungal-growth control was also performed. At intervals of 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h after incubation, 10 µL of the inoculum was uniformly seeded on SDA plate. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24–48 h. At the end of the incubation period, the existing CFU in the Petri dishes were counted, and the numbers per mL of solution in each period were determined for each substance in its 3 concentrations. The experiment was performed in duplicate, and the time-to-death curves were made by plotting the mean colony count (log10 CFU/mL) as a function of time (in hours) with the GraphPad Prism software. Antifungal activity for the substance was considered when there was growth greater than or equal to 3 log10 (99.9%), and fungistatic activity when there was a reduction in growth of less than 3 log10 (<99.9%) CFU/mL [40].

4.6. Biofilm Eradication

In order to observe whether the monoterpene was capable of causing damage to mature biofilm, 10 µL of *Candida albicans* fungal inoculum, strains LM 587, LM A05, ATCC 90028, and ATCC 76485 were incubated for 48 h at 35 ± 2 °C in 100 µL of RPMI broth, to form biofilms. After discarding the contents of the wells, 100µL of RPMI 1640 broth, containing different concentrations of α-pinene (MIC, MIC × 2, and MIC × 4) was added and incubated again for 48 h at 35 ± 2 °C. At the end of the incubation period, quantification was performed using the crystal-violet assay. Briefly, the biofilm-coated wells of the 96-well plates were washed twice with 150 µL of PBS, and then air-dried for 45 min. Afterwards, each well was stained with 110 µL of 0.4% aqueous crystal violet, also for 45 min. Then, each well was washed four times with 350 µL of sterile distilled water and immediately stained with 200 µL of 95% ethanol. Finally, after another 45 min of decolorization, 100 µL of the solution was transferred to a new well and the amount of crystal-violet stain in the decolorizing solution was measured with a microtiter plate reader (SpectraMAX 340 Adjustable Microplate Reader; Molecular Devices Ltd., Sunnyvale, CA, USA) at 595 nm. The analyses were performed in triplicate, and the results expressed as the arithmetic mean

of the absorption values obtained, these being plotted in graphs with the statistical software GraphPad Prism GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA. To calculate the percentage of rupture of the biofilm formed, the formula used was: biofilm rupture % = 100 − [(ABS590 test/ABS590 control) × 100] [41].

4.7. Cytotoxicity Assay against HaCaT Cells

To evaluate the cytotoxicity of α-pinene, an MTT assay was performed. The human cell line HaCaT (keratinocytes) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 3×10^5 cell/mL. Following a 24 h period, the cells were incubated, together with α-pinene (128, 256, 512, or 1024 µg/mL) dissolved in DMSO (0.13%). Each experiment was performed in quadruplicate. The positive control was treated with DMSO (20%). Finally, a control with DMSO (DMSO+ cell line HaCaT + DMEM) was performed. After incubation for 24 h and 48 h, the supernatant was discarded, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/mL) was added, and these were incubated together for another 4 h. The formazan deposited was dissolved with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (100 µL). The optical densities were measured using a microplate reader (Synergy HT, BioTek®, Santa Clara, CA, USA) at 570 nm [42].

5. Conclusions

The α-pinene presented fungicidal activity against *Candida albicans* through a mechanism of action likely related to ergosterol complexation, yet other pathways may be related. The docking test showed that the best molecular interaction for α-pinene was with thymidylate synthase. In the time-kill assay, its antifungal activity was not time-dependent, and α-pinene also inhibited biofilm formation, while rupturing up to 88% of existing or preformed biofilm. α-pinene was non-cytotoxic to human keratinocytes. Our study supports α-pinene as a candidate to treat fungal infections caused by *C. albicans*.

Author Contributions: Conceptualization, D.B.d.B., F.Q.S.G. and M.V.d.S.; data preparation, D.B.d.B., J.M.-M. and F.Q.S.G.; formal analysis, D.B.d.B., J.M.-M., F.Q.S.G. and L.S.; investigation, D.B.d.B., J.M.-M.; L.d.O.e.L., M.C.F., R.C.F., H.D.N., D.d.N.A., W.P.d.S.R., L.S., M.V.S., L.A.d.S., L.R.C.C., F.Q.S.G. and M.V.d.S.; methodology, D.B.d.B., L.d.O.e.L., E.d.O.L. and F.Q.S.G.; writing—original draft preparation, D.B.d.B., J.M.-M., R.C.F. and F.Q.S.G.; writing—review and editing, D.B.d.B., J.M.-M., W.P.d.S.R., F.Q.S.G. and M.V.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)—financial support.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the Federal University of Paraíba, and the Federal University of Pernambuco and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting and fellowships.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mendonça, A.; Santos, H.; Franco-Duarte, R.; Sampaio, P. Fungal Infections Diagnosis—Past, Present and Future. *Res. Microbiol.* **2022**, *173*, 103915. [CrossRef] [PubMed]
2. Nami, S.; Mohammadi, R.; Vakili, M.; Khezripour, K.; Mirzaei, H.; Morovati, H. Fungal Vaccines, Mechanism of Actions and Immunology: A Comprehensive Review. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 333–344. [CrossRef] [PubMed]
3. Sakagami, T.; Kawano, T.; Yamashita, K.; Yamada, E.; Fujino, N.; Kaeriyama, M.; Fukuda, Y.; Nomura, N.; Mitsuyama, J.; Suematsu, H.; et al. Antifungal Susceptibility Trend and Analysis of Resistance Mechanism for Candida Species Isolated from Bloodstream at a Japanese University Hospital. *J. Infect. Chemother.* **2019**, *25*, 34–40. [CrossRef]

4. Pereira, R.; dos Santos Fontenelle, R.O.; de Brito, E.H.S.; de Morais, S.M. Biofilm of Candida Albicans: Formation, Regulation and Resistance. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 11–22. [CrossRef] [PubMed]
5. Armstrong-James, D.; Brown, G.D.; Netea, M.G.; Zelante, T.; Gresnigt, M.S.; van de Veerdonk, F.L.; Levitz, S.M. Immunotherapeutic Approaches to Treatment of Fungal Diseases. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e393–e402. [CrossRef]
6. Shields, R.K.; Kline, E.G.; Healey, K.R.; Kordalewska, M.; Perlin, D.S.; Hong Nguyen, M.; Clancy, C.J. Spontaneous Mutational Frequency and Fks Mutation Rates Vary by Echinocandin Agent against Candida Glabrata. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01692-18. [CrossRef]
7. WHO. *WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022; ISBN 9789240060241.
8. da Raimundo, J.S.; de Toledo, C.E.M. Plantas Com Atividade Antifúngica No Tratamento Da Candidíase: Uma Revisão Bibliográfica Plants With Antifungal Activity in the Treatment of Candidiasis. *Rev. UNINGÁ Rev.* **2017**, *29*, 75–80.
9. Bohner, F.; Papp, C.; Gácser, A. The Effect of Antifungal Resistance Development on the Virulence of Candida Species. *FEMS Yeast Res.* **2022**, *22*, foac019. [CrossRef]
10. Cortés, J.A.; Ruiz, J.F.; Melgarejo-Moreno, L.N. Candidemia En Colombia. *Biomédica* **2020**, *40*, 195–207. [CrossRef]
11. Tortorano, A.M.; Prigitano, A.; Morroni, G.; Brescini, L.; Barchiesi, F. Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 5543–5553. [CrossRef]
12. Qadri, H.; Haseeb Shah, A.; Mudasir Ahmad, S.; Alshehri, B.; Almilaibary, A.; Ahmad Mir, M. Natural Products and Their Semi-Synthetic Derivatives against Antimicrobial-Resistant Human Pathogenic Bacteria and Fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* **2022**, *29*, 103376. [CrossRef] [PubMed]
13. Da Silva, A.C.R.; Lopes, P.M.; de Azevedo, M.M.B.; Costa, D.C.M.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S. Biological Activities of A-Pinene and β-Pinene Enantiomers. *Molecules* **2012**, *17*, 6305–6316. [CrossRef] [PubMed]
14. Doi, A.M.; Carlos, A.; Pignatari, C.; Edmond, M.B.; Marra, R.; Fernando, L.; Camargo, A.; Siqueira, R.A. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146909. [CrossRef]
15. Viegas, C., Jr.; da Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quím. Nova* **2006**, *29*, 326–337. [CrossRef]
16. Salehi, B.; Upadhyay, S.; Orhan, I.E.; Jugran, A.K.; Baghalpour, N.; Cho, W.C.; Sharifi-Rad, J. Therapeutic Potential of α- and β-Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules* **2019**, *9*, 738. [CrossRef]
17. Park, B.B.; An, J.Y.; Park, S.U. Recent Studies on Pinene and Its Biological and Pharmacological Activities. *EXCLI J.* **2021**, *20*, 812–818. [CrossRef]
18. Allenspach, M.; Steuer, C. α-Pinene: A Never-Ending Story. *Phytochemistry* **2021**, *190*, 112857. [CrossRef]
19. de Barros, D.B.; e Lima, L.D.O.; Silva, L.A.; Fonseca, M.C.; Diniz-Neto, H.; da Silva Rocha, W.P.; de Medeiros Beltrão, G.V.; Castellano, L.R.C.; Guerra, F.Q.S.; da Silva, M.V. Antifungal Effect of α-Pinene Alone and in Association with Antifungals against Candida Albicans Strains Efecto. *Res. Soc. Dev.* **2022**, *11*, e58711427748.
20. da Alves, D.N.; Monteiro, A.F.M.; Andrade, P.N.; Lazarini, J.G.; Abilio, G.M.F.; Guerra, F.Q.S.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Rosalen, P.L.; de Castro, R.D. Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on Candida Spp., and Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. *Molecules* **2020**, *25*, 5969. [CrossRef]
21. Ferreira, E.S.; Cordeiro, L.V.; Silva, D.F.; Souza, H.D.S.; Lima, E.O.; Castro, R.D.D.E. Antifungal Activity and Mechanism of Action of 2-Chloro- N -Phenylacetamide: A New Molecule with Activity against Strains of Aspergillus Flavus. *An. Acad. Bras. Ciências* **2021**, *93*, 1–15. [CrossRef]
22. Vieira, A.J.H.; Santos, J.I. Mecanismos de Resistência de Candida Albicans Aos Antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol e Caspofungina. *RBAC* **2017**, *49*, 235–239. [CrossRef]
23. Clerya, M.; Leite, A.; Parente, A.; Bezerra, D.B.; De Sousa, J.P.; Queiroga, F.; Guerra, S.; Lima, E.D.O. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against Candida Albicans. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2014**, *2014*, 378280. [CrossRef]
24. Saracino, I.M.; Foschi, C.; Pavoni, M.; Spigarelli, R.; Valerii, M.C.; Spisni, E. Antifungal Activity of Natural Compounds vs. Candida Spp.: A Mixture of Cinnamaldehyde and Eugenol Shows Promising In Vitro Results. *Antibiotics* **2022**, *11*, 73. [CrossRef] [PubMed]
25. Ramage, G.; Mowat, E.; Jones, B.; Williams, C.; Lopez-ribot, J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* **2009**, *35*, 340–355. [CrossRef] [PubMed]
26. Rangel, L.; Luiz, P.; Lacet, G.; Ferreira, S.; Almeida, I.; Galbiatti, F.; Carvalho, D.; Roberto, L.; Dias, R.; Castro, D. Archives of Oral Biology Antifungal Activity, Mode of Action and Anti-Bio Fi Lm Effects of Laurus Nobilis Linnaeus Essential Oil against Candida spp. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *73*, 179–185. [CrossRef]
27. Seo, M.; Kang, T.J.; Lee, C.H.; Lee, A.; Noh, M. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope- Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 171–176. [CrossRef] [PubMed]
28. Karthikeyan, R.; Kanimozhi, G.; Prasad, N.R.; Agilan, B.; Ganesan, M.; Srithar, G. *Alpha Pinene Modulates UVA-Induced Oxidative Stress, DNA Damage and Apoptosis in Human Skin Epidermal Keratinocytes*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 212, ISBN 9842305384.

29. Karthikeyan, R.; Kanimozhi, G.; Madahavan, N.R.; Agilan, B.; Ganesan, M.; Prasad, N.R.; Rathinaraj, P. *Alpha-Pinene Attenuates UVA-Induced Photoaging through Inhibition of Matrix Metalloproteinases Expression in Mouse Skin*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 217, ISBN 9842305384.
30. Hadacek, F.; Greger, H. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 137–147. [CrossRef]
31. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed.; Approved Standard; CLSI: Wayne, PA, USA, 2008; Volume 28, p. 13.
32. Strushkevich, N.; Usanov, S.A.; Park, H.W. Structural Basis of Human CYP51 Inhibition by Antifungal Azoles. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 1067–1078. [CrossRef]
33. Li, X.; Roberti, R.; Blobel, G. Structure of an Integral Membrane Sterol Reductase from Methylomicrobium Alcaliphilum. *Nature* **2015**, *517*, 104–107. [CrossRef]
34. Garlatti, V.; Belloy, N.; Martin, L.; Lacroix, M.; Matsushita, M.; Endo, Y.; Fujita, T.; Fontecilla-Camps, J.C.; Arlaud, G.J.; Thielens, N.M.; et al. Structural Insights into the Innate Immune Recognition Specificities of L- and H-Ficolins. *EMBO J.* **2007**, *26*, 623–633. [CrossRef]
35. Harshbarger, W. Crystal Structures of Binary and Ternary Complexes of Thymidylate Synthase (ThyA) from Mycobacterium Tuberculosis: Insights into Selectivity and Inhibition. Ph.D. Thesis, Texas A&M University, College Station, TX, USA, 2012.
36. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. NIH Public Access. *J. Comput. Chem.* **2010**, *30*, 2785–2791. [CrossRef] [PubMed]
37. Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA—An Open Platform to Develop Chemo-Bio-Informatics Applications, Using Plug-in Architecture and Script Programming. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2004**, *18*, 167–173. [CrossRef] [PubMed]
38. Frost, D.J.; Brandt, K.D.; Cugier, D.; Goldman, R. A Whole-Cell Candida Albicans Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 306–310. [CrossRef] [PubMed]
39. Klepser, M.E.; Ernst, E.J.; Lewis, R.E.; Ernst, M.E.; Pfaller, M.A. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1207–1212. [CrossRef]
40. Klepser, M.E.; Malone, D.; Lewis, R.E.; Ernst, E.J. Evaluation of Voriconazole Pharmacodynamics Using Time-Kill Methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1917–1920. [CrossRef]
41. Rajasekharan, S.K.; Ramesh, S.; Satish, A.S.; Lee, J. Antibiofilm and Anti- β -Lactamase Activities of Burdock Root Extract and Chlorogenic Acid against Klebsiella Pneumoniae. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 542–551. [CrossRef]
42. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos, apresentados e discutidos nesta pesquisa conclui-se, portanto, que o α-pineno:

- Possui atividade antifúngica frente cepas de *Candida albicans*, com potencial fungicida para 50% das linhagens testadas;
- Sua interação com fluconazol se mostrou indiferente, já as combinações com anfotericina B e nistatina obtiveram efeitos aditivos, sugerindo possível associação entre estes fármacos como alternativa terapêutica;
- Sua atividade antifúngica envolve ligação com o ergosterol da membrana celular fúngica;
- No ensaio de *time kill* foi visto que a atividade antifúngica não foi tempo dependente;
- Foi capaz de destruir o biofilme pré-formado, rompendo até 88% do biofilme já existente;
- Não apresentou citotoxicidade frente a queratinócitos humanos (células HaCaT);
- Sugere-se então que o α-pinene seja utilizado para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. albicans.*

6 SÚMULA CURRICULAR

TRABALHOS APRESENTADOS EM SIMPÓSIO:

- BORGES, M.G.S.A; SILVA, M. L.; ANJOS, A. S.; BELTRÃO, G.V.M.; SILVA, L.A.; NETO, H. D.; BARROS, D. B. Potencial antifúngico da resina de geoprópolis contra cepas do gênero *Candida* spp. III Simpósio de Proteínas Bioativas, 2021, Recife.

- BELTRÃO, G.V.M.; BORGES, M.G.S.A; SILVA, M. L.; ANJOS, A. S.; SILVA, L.A.; NETO, H. D.; BARROS, D. B. Atividade antimicrobiana de *Allium sativum* frente a *Candida albicans*. III Simpósio de Proteínas Bioativas, 2021, Recife.

- SILVA, M. L.; BELTRÃO, G.V.M.; BORGES, M.G.S.A; ANJOS, A. S.; SILVA, L.A.; NETO, H. D.; BARROS, D. B. Potencial antimicrobiano da *Cinara scolymus* aplicada ao combate de *Fusobacterium nucleatum*. III Simpósio de Proteínas Bioativas, 2021, Recife.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO INTERNACIONAL:

- BARROS, D. B.; LIMA, L. O.; SILVA, L. A.; BELTRÃO, G. V. M. B.; FONSECA, M. C.; NETO, H. D.; CASTELLANO, L. R.; GONDIM, B. L. C.; GUERRA, F. Q. S.; SILVA, M. V. Avaliação da atividade antifúngica de b asarol frente cepas de *Candida albicans.* XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Assunción, 2021.

- SOUZA, K. S.; BARROS, D. B.; SILVA, M. R. F.; SÁ, R. A. Q. C.; LINS, H. T. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Aplicação biotecnológica de microrganismos na biorremediação de ambientes impactados com polietileno. XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Assunción, 2021.

CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS:

- BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; SILVA, L. A.; ARAÚJO, R. S., ALEXANDRE, H. M. S.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.F.; BORGES, M. G. S. A.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; GUERRA, F. Q. S. G; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M.; CASTELLANO, L. R. C. A Utilização dos óleos essenciais na odontologia: uma revisão. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. 1ª ed. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; BORGES, M. G. S. A.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ALBUQUERQUE, L. G.; SILVA, L. A.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; ARAÚJO, R. S., ALEXANDRE, H. M. S.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; CASTELLANO, L. R. C.; GUERRA, F. Q. S. G; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M. A O uso terapêutico do óleo de copaíba: uma revisão. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. 1ª ed. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- ARAÚJO, R. S.; ALEXANDRE, H. M. S.; SILVA, L. A.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; BORGES, M. G. S. A.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; GUERRA, F. Q. S.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M.; CASTELLANO, L. R. C. Óleos essenciais com atividade in vitro contra as formas parasitárias de *Leishmania amazonensis*: uma revisão da literatura. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. 1ª ed. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- ALEXANDRE, H. M. S.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, L. A.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; BORGES, M. G. S. A.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; GUERRA, F. Q. S. G; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M.; CASTELLANO, L. R. C. Potencial antimicrobiano da *Schinus terebinthifolius raddi* (AROEIRAVERMELHA): uma revisão da literatura. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. 1ª ed. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- BORGES, M. G. S. A.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SILVA, L. A.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; ARAÚJO, R. S., ALEXANDRE, H. M. S.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; CASTELLANO, L. R. C.; GUERRA, F. Q. S. G; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M. Potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos e alcoólicos da *Eugenia uniflora* e do óleo essencial da *Lippia origanoides*: uma revisão. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. 1ª ed. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- ANJOS, A. S.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; BORGES, M. G. S. A.; SILVA, M. L.; SILVA, ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SILVA, L. A.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; ARAÚJO, R. S., ALEXANDRE, H. M. S.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; CASTELLANO, L. R. C.; GUERRA, F. Q. S.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M.; G; M. Uso do óleo essencial da *Myracrodruon urundeuva allemão* (aroeira do sertão) frente a *Sthapylococcus aureus*. In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

- SILVA, L. A.; LIMA, L. O.; FONSECA, M. C.; ARAÚJO, R. S., ALEXANDRE, H. M. S.; BARROS, D. B.; AMORIM, L. C.; BARBOSA, L. M. M.; COSTA, B. F. B.; BORGES, M. G. S. A.; ANJOS, A. S.; SILVA, M. L.; ULICIO, L. M.; LEITE, Y. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; SANTOS, W. F.; BELTRÃO, G. V. M.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M.; CASTELLANO, L. R. C.; GUERRA, F. Q. S. G; Atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides cham*) FRENTE A CEPAS DE *Candida* spp.: uma abordagem literária. . In: Lúcio Roberto Cançado Castellano, Marcos Vinicius da Silva (Org). BIOMAS BRASILEIROS: TRADIÇÃO E INOVAÇÃO NO COMBATE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS – ISBN 978-65-995536-1-5. João Pessoa: Editora Creative, 2022.

ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO:

- VINICIUS, M. et al. Novel Therapeutic Options for Chagas Disease Based on Bioactive Compounds from Algae, Bacteria and Fungi Species. p. 7513–7528, 2021.

ARTIGOS PUBLICADOS COMO PRIMEIRA AUTORA:

- BARROS, D. B. de.; LIMA, L. de O. e.; SILVA, L. A..; FONSECA, M. C..; DINIZ-NETO, H.; ROCHA, W. P. da S..; BELTRÃO, G. V. de M..; CASTELLANO, L. R. C..; GUERRA, F. Q. S..; SILVA, M. V. da. Antifungal effect of α-pinene alone and in association with antifungals against Candida albicans strains. **Research, Society and Development**, *[S. l.]*, v. 11, n. 4, p. e58711427748, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i4.27748. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27748. Acesso em: 26 feb. 2024.
- Barros, D. B., Nascimento, N. S., Sousa, A. P., Barros, A. V., Borges, Y. W. B., Silva, W. M. N., Motta, A. B. S., Pinto, J. E. L., Sampaio, M. G. V., Barbosa, M. F. S., Fonseca, M. C., Silva, L. A., Lima, L. O., Borges, M. G. S. A., Oliveira, M. B. M., Correia, M. T. S., Castellano, L. R. C., Guerra, F. Q. S., & Silva, M. V.. (2023). Antifungal activity of terpenes isolated from the

Brazilian Caatinga: a review. **Brazilian Journal of Biology**, 83, e270966. https://doi.org/10.1590/1519-6984.270966

- BARROS, D. B., LIMA, L. O., SILVA, L. A., FONSECA, M. C., FERREIRA, R. C., NETO, H. D., ALVES, D. N., ROCHA, W. P. S., SCOTTI, L., LIMA, E. O., SOBRAL, M. V., CASTELLANO, L. R. C., MENDES, J. M., GUERRA, F. Q. S., SILVA, M. V. (2023). α-Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. **Antibiotics (Basel, Switzerland),** *12*(3), 480. https://doi.org/10.3390/antibiotics12030480

REFERÊNCIAS

ALLENSPACH, M; STEUER, C; α-Pinene: A never-ending story. **Phytochemistry**. Ed. 190. v. 11. 2021.

ALLENSPACH, M; VALDER, C; FLAMM, D; GRISONI, F; STEUER, C. Verification of Chromatographic Profile of Primary Essential Oil of Pinus sylvestris L. Combined with Chemometric Analysis. **Molecules**. Ed. 25. 2020.

ALVES, J; TARRÉS, A.C; RELLO J. How to Identify Invasive Candidemia in ICU-A Narrative Review. **Antibiotics (Basel).** Ed. 11. v. 12. p. 1804. 2022.

ALVES, K.D.Q; OLIVEIRA SANTOS, A.C.A; CAVALCANTI D.S.P; BATISTA, F.L. General aspects of vulvovaginal candidiasis: a literature review. SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde.** Ed. 1. v.8. 2022.

BARANTSEVICH, N; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics (Basel)**. Ed. 11. 2022.

BAUER, Fernanda J et al. Epidemiologia e Avaliação de Métodos Diagnósticos em Micoses Superficiais em Serviço de Dermatologia de Hospital Público em Santos, Brasil. **Rev Soc Port Dermatol Venereol**. v. 79, n. 4, p. 35-40, dez. 2021.

BERGMAN, M.E; DAVIS, B; PHILLIPS, M.A. **Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action.** Molecules. Canadá. Ed. 24. 2019.

BHATTACHARYA, S; SAE-TIA, S; FRIES, B.C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics (Basel).** Ed. 9. v. 6. p. 312. 2020.

BOHNER et al., The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species, ***FEMS Yeast Research,*** Ed. 1. v. 22. 2022.

BONI, G. C. Avaliação da atividade anti-Candida de compostos purificados isolados de diferentes espécies de Mentha. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas. 2016.

BORGES, M.F.D.A.; LACERDA, R.D.S. CORREIA, J.P.D.A.; DE MELO, T.R.; FERREIRA, S.B. Potential Antibacterial Action of α-Pinene. **Med. Sci. Fórum**. Ed. 12. v. 1. p. 11. 2022.

CÉSAR, K. K. F. A. Ação antifúngica de extratos e frações de Annona muricata L. sobre Candida spp. **Society and Development**, v. 10. 2021.

CHEN, H; ZHOU, X; REN, B; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in Candida albicans. **Virulence.** Ed.11. 2020.

CLANCY, C.J; NGUYEN, M.H. Diagnosing Invasive Candidiasis. **J Clin Microbiol**. Ed. 56. v. 5. 2018.

COOKE, G; WATSON, C; DECKX, L; PIROTTA, M; SMITH, J; VAN DRIEL, M.L. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). **Cochrane Database Syst Rev.** Ed. 1. v. 1. 2022.

CORTÉS, J.A; RUIZ, J.F; MELGAREJO-MORENO, L.N; LEMOS, E.V. Candidemia in Colombia**. Biomedica.** Ed. 40. 2020.

COTTIER, F; HALL, R.A. Face/Off: The Interchangeable Side of Candida Albicans. **Front Cell Infect Microbiol.** Ed. 9. p. 471. 2020.

CZECHOWICZ, P; NOWICKA, J; GOŚCINIAK, G. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis**. Int J Mol Sci.** Ed. 23. v. 11. p. 5895. 2022.

DANTAS, K.C; MAUAD, T; DE ANDRÉ, C.D.S; BIERRENBACH, A.L; SALDIVA, P.H.N. A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Sci Rep.** Ed. 11. v. 1. p. 3943. 2021.

D'ENFERT et al., The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon Candida albicans infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev.** Ed. 45. 2021.

DING, X; KAMBARA, H; GUO, R; KANNEGANTI, A; ACOSTA-ZALDÍVAR, M; LI, J; LIU, F; BEI, T; QI, W; XIE, X; HAN, W; LIU, N; ZHANG, C; ZHANG, X; YU, H; ZHAO, L; MA, F; KÖHLER, J.R; LUO, H.R. Inflammasome-mediated GSDMD activation facilitates escape of Candida albicans from macrophages. **Nat Commun.** Ed. 12. 2021.

Doi, A.M; Pignatari, A.C; Edmond, M.B; Marra, A.R; Camargo, L.F; Siqueira, R.A; da Mota, V.P; Colombo, A.L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One.** Ed. 11. v. 1. 2016.

EIX, E. F; NETT, J. E. How Biofilm Growth Affects Candida-Host Interactions**. Front. Microbiol**. Ed. 11. 2020.

FARR, A; EFFENDY, I; FREY, T.B; HOF, H; MAYSER, P; PETRICEVIC, L; RUHNKE, M; SCHALLER, M; SCHAEFER, A.P.A; SUSTR, V; WILLINGER, B; MENDLING, W. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). **Mycoses.** Ed. 64. v. 6. p. 583-602. 2021.

FEIRIA, S. N. B. Avaliação do efeito antifúngico e inibição de fatores morfológicos em *Candida spp*. por espécies de *Mentha*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas. 2015.

FIORITI et al., "Antifungal Combinations against Candida Species: From Bench to Bedside" **Journal of Fungi**. Ed. 8. no. 10. p. 1077. 2022.

FISHER, M.C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nat Rev Microbiol**. v. 20. p. 557–571. 2022.

FONSECA, F.L; GUIMARÃES, M.C.S. Descortinando a negligência na micologia médica: panorama da contribuição brasileira na área. **Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. 2018.

GOMES, E. Os terríveis malefícios da Candida Albicans. Ser da Natureza. 2012.

HELLSTEIN, J.W; MAREK, C.L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol**. Ed. 13. v. 1. p. 25-32. 2019.

HILLESHEIM, F.R. *Candida auris:* situação atual no Brasil e no Mundo. Florianópolis, 2022.

HOU, J; ZHANG, Y; ZHU, Y; ZHOU, B; REN, C; LIANG, S; GUO, Y. α-Pinene Induces Apoptotic Cell Death via Caspase Activation in Human Ovarian Cancer Cells. **Med Sci Monit**. Ed. 25. 2019.

JEZIOREK, M; FREJ-MĄDRZAK, M; CHOROSZY-KRÓL, I. The influence of diet on gastrointestinal Candida spp. colonization and the susceptibility of Candida spp. to antifungal drugs. **Rocz Panstw Zakl Hig.** Ed. 70. 2019.

JUNQUEIRA, J.C; MYLONAKIS, E. Editorial: Candida biofilms. **Front Microbiol.** Ed. 4. 2022.

KACHMAR, M.R; NACEIRI; MRABTI, H; BELLAHMAR, M; OUAHBI, A; HALOUI, Z; EL BADAOUI, K; BOUYAHYA, A; CHAKIR, S. Traditional Knowledge of Medicinal Plants Used in the Northeastern Part of Morocco. **Evid Based Complement Alternat Med. Marrocos.** 2021.

KALIA, N; SINGH, J; KAUR, M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** Ed.19. 2020.

KARTHIKEYAN, R; KANIMOZHI, G; PRASAD, N.R; AGILAN, B; GANESAN, M; SRITHAR, G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. **Life Sciences**. Ed. 212. 2018.

KATHIRAVAN, M. K. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry The biology and chemistry of antifungal agents : A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KAYAASLAN, B. et al. Incidence and risk factors for COVID-19 associated candidemia (CAC) in ICU patients. **Mycoses**, v. 65, n. 5, p. 508–516, 2022.

KHOSHNAZAR, M; PARVARDEH, S; BIGDELI, M.R. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.** [S.l]. Ed. 29. 2020.

Koc HC, Xiao J, Liu W, Li Y, Chen G. Long COVID and its Management. **Int J Biol Sci.** Ed. 18. v. 12. p. 4768-4780. 2022.

KUCHI, B.H; BALASUBRAMANIAN, B; MEYYAZHAGAN, A; PUSHPARAJ, K; EASWARAN, M; PAPPUSAMY, M; ALWIN, R.A; ARUMUGAM, V.A; TSIBIZOVA, V; MSAAD, A.A; ALJOWAIE, R.M; SARAVANAN, M; DI RENZO, G.C. Opportunistic mycoses in COVID-19 patients/survivors: Epidemic inside a pandemic. **J Infect Public Health**. Ed. 14. v. 11. p. 1720-1726. 2021.

LEITE N.F.S; GONDIM, C.N.F.L; MARTINS, R.A.A; SIYADATPANAH, A; NOROUZI, R; KIM, B; SOBRAL, C.E.S; GONDIM, G.E.C; RIBEIRO-FILHO, J; COUTINHO, H.D.M. Potentiation of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDR Bacterial Strains with (+)-α-Pinene and (-)-Borneol. **Biomed Res Int.** 2022.

LI, H; MIAO, M.X; JIA, C.L; CAO, Y.B; YAN, T.H; JIANG, Y.Y; YANG, F. Interactions between Candida albicans and the resident microbiota. **Front Microbiol. China.** Ed. 13. 2022.

LILIENFELD-T.V.M; WAGENER, J; EINSELE, H; CORNELY, O.A; KURZAI, O. Invasive Fungal Infection. **Dtsch Arztebl Int**. Ed. 116. v. 16. p. 271-278. 2019.

LOCKHART, S.R; GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. **Seminars in Diagnostic Pathology**. Ed. 3. v. 16. p. 177-181. 2019.

LOPES, J.P; LIONAKIS, M.S. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. **Virulence.** Ed. 13. v. 1. p. 89-121. 2022.

LOŽIENĖ, K; ŠVEDIENĖ J; PAŠKEVIČIUS, A; RAUDONIENĖ, V; SYTAR O; KOSYAN A. Influence of plant origin natural α-pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. **Fitoterapia. Lituânia.** Ed. 127. 2018.

MELKINA, O.E; PLYUTA, V.A; KHMEL, I.A; ZAVILGELSKY, G.B. The Mode of Action of Cyclic Monoterpenes (-)-Limoneneand (+)-α-Pinene on Bacterial Cells. **Biomolecules.** Ed. 11. 2021.

MENEZES, R. P.; FERREIRA, J. C.; SÁ, W. M.; MOREIRA, T. A.; et al. Frequency of *Candida* species in a tertiary care hospital in Triangulo Mineiro, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 57. 2015.

MOHAMMADI, S; PAJOHIDEH, Z.S; IRAVANI, M; MOJAB, F; MARAGHI, E. Comparing the Effectiveness of Arnebia euchroma with ClotrimazoleVaginal Cream for the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: A Randomized Controlled Triple-Blind Trial. **Iran J Nurs Midwifery Res.** Ed. 27. v. 2. p. 112-118. 2022.

MONDAY, L.M; PARRAGA, A.T; ALANGADEN, G. T2Candida for the Diagnosis and Management of Invasive Candida Infections. **J Fungi (Basel).** Ed.7. v. 3. p. 178. 2021.

MORA CARPIO, A.L; CLIMACO, A. Fungemia Candidiasis**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.** 2022.

MOREIRA, M.A.M. Terapêutica antifúngica: novas moléculas, novas formas de administração e diferentes estratégias para alcançar a toxicidade seletiva. **Dissertação de mestado.** 2021.

MOURA, S. S. T. Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no brasil contra patógenos humanos. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pósgraduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina. 2020.

MULET BAYONA, J. V. et al. Evaluation of a novel chromogenic medium for Candida spp. identification and comparison with CHROMagar™ Candida for the detection of Candida auris in surveillance samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 98, n. 4, p. 115168, 2020.

MUNDULA, T; RICCI, F; BARBETTA, B; BACCINI, M; AMEDEI, A. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients.** Ed. 11. v. 10. p. 2449. 2019.

NAVEEN, K.V.; SARAVANAKUMAR, K., SATHIYASEELAN, A, et al. Human Fungal Infection, Immune Response, and Clinical Challenge—a Perspective During COVID-19 Pandemic. **Appl Biochem Biotechnol**. Ed. 194. p. 4244–4257. 2022.

NINKUU, V; ZHANG, L; YAN, J; FU, Z; YANG, T; ZENG, H. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. **Int J Mol Sci.** Ed. 22. 2021.

NISHIMOTO, A.T; SHARMA, C; ROGERS, P.D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus Candida albicans**. J Antimicrob Chemother**. Ed. 75. v. 2. p. 257-270. 2020.

NÓBREGA, J.R; SILVA, D.D.F; ANDRADE JÚNIOR, F.P.D;SOUSA, P.M.S.; FIGUEIREDO, P.T.R.D; CORDEIRO, L.V; LIMA, E.D.O. Antifungal action of α-pinene

against Candida spp. isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid. **Natural product research**. Ed. 35. 2021.

NUCCI, M. et al. Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic. **Mycoses**, v. 64, n. 2, p. 152–156, 2021.

OHNISHI, Y.O, et al. Doenças fúngicas sistêmicas em pacientes internados em um hospital público de referência em Belém, estado do Pará, Amazônia brasileira. **Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua**. v. 13. 2022.

OLIVEIRA SANTOS et al., Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Front. Microbiol.** Ed. 9. p. 1351. 2018.

OLIVEIRA, J. S.; MACHADO, K. C.; FREITAS, R. M. Natural products applied a neglected diseases. **Technological**. v. 4, p. 729–734, 2014.

OLUM, R; BALUKU, J.B; OKIDI, R, et al. Prevalence of HIV-associated esophageal candidiasis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **Trop Med Health**. Ed. 48. v.82. 2020.

OWUSU ADJEI, M; ZHOU, X; MAO, M; RAFIQUE, F; MA, J. MicroRNAs Roles in Plants Secondary Metabolism. **Plant Signal Behav.** Ed. 16. 2021.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Publishing Group**, v. 4, n. May, p. 1–20, 2018.

PATIL, S; RAO, R.S, MAJUMDAR, B; ANIL, S. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. **Front Microbiol**. Ed. 6. p. 1391. 2015.

PIASECKI, M.A. Epidemiologia das doenças fúngicas invasivas em um hospital geral de Passo Fundo – **Monografia**. RS. Passo Fundo. 2019.

PINHO, F. V. S. A.; CRUZ, L. C.; RODRIGUES N. R.; et al. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of Duguetia furfuracea A. St.-Hill. **Oxid Med Cell Longev**. 2016.

POISSY, et al., funginos; Allfun French Study Groups. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Crit Care.** Ed. 24. v. 1. p. 109. 2020

PONDE, N.O; LORTAL, L; RAMAGE, G; NAGLIK, J.R; RICHARDSON, J.P. Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions**. Crit Rev Microbiol.** Ed. 47. 2021.

PRISTOV, K.E; GHANNOUM, M.A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect**. Ed. 25. v. 7. p. 792-798. 2019.

PUEL, A. Human inborn errors of immunity underlying superficial or invasive candidiasis. **Hum Genet.** Ed. 139. v. 6-7. p. 1011-1022. 2020.

QADRI, H; HASEEB, S.A; MUDASIR, A.S; ALSHEHRI, B; ALMILAIBARY, A; AHMAD, M.M. Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. **Saudi J Biol Sci.** Ed. 29. v. 9. p. 103376. 2022

QUINDÓS et al., Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs**. Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. Ed. 24. v. 2. p. e172-e180. 2019.

RAFIQ, N.B. Candidiasis. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.** 2022.

RAHMAN et al. Natural therapeutics and nutraceuticals for lung diseases: Traditional significance, phytochemistry, and pharmacology. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 150. p 113041. 2022.

RAI, L. S. et al. Regulators of commensal and pathogenic life-styles of an opportunistic fungus—*Candida albicans*. **Yeast**, v. 38, n. 4, p. 243–250, 2021.

RAYENS, E. NORRIS, K.A; Prevalence and Healthcare Burden of Fungal Infections in the United States. **Open Forum Infectious Diseases** Ed. 1. V. 9. 2022.

RHODES, J; FISHER, M.C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. **Curr Opin Microbiol.** Ed. 52. 2019.

RIBEIRO, V.P; ARRUDA, C; ABD EL-SALAM, M; BASTOS, J.K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharm Biol.** Ed. 56. 2018.

RIERA, F.O; CAEIRO, J.P; ANGIOLINI, S.C; VIGEZZI, C, RODRIGUEZ, E; ICELY, P.A; SOTOMAYOR, C.E. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics (Basel).** Ed. 11. v. 7. p. 877. 2022.

ROCHA, W.N; NEVES, L; XIMENES, M; ALBUQUERQUE, M.E. Gênero Candida - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência**. Research, Society and Development**. Ed. 4. v. 10. 2021.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. Em: Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data. [s.l.] **Jenny Stanford Publishing**, 2021. p. 399–411.

ROSATI, D; BRUNO, M; JAEGER, M; TEN OEVER, J; NETEA, M.G. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective**. Microorganisms.** Ed.8. 2020.

ROUZÉ, et al., Is (1,3)-β-D-glucan useless to guide antifungal therapy in ICU?. **Intensive Care Med** Ed. 48. p. 930–932. 2022.

SALEHI, B; UPADHYAY, S; ERDOGAN, O.I; KUMAR J.A; JAYAWEERA L.D.S; DIAS A.D; SHAROPOV, F; TAHERI, Y; MARTINS, N; BAGHALPOUR, N; CHO, W.C; SHARIFI-RAD, J. Therapeutic Potential of α- and β-Pinene: A Miracle Gift of Nature. [S.l]. **Biomolecules.** Ed. 9. 2019.

SANTOS, G. C. D. O. et al. Candida Infections and Therapeutic Strategies : Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Front Microbiol.** v. 9. p. 1–23. 2018.

SARACINO, I.M; FOSCHI, C; PAVONI, M; SPIGARELLI, R; VALERII M.C; SPISNI, E. Antifungal Activity of Natural Compounds vs. Candida spp.: A Mixture of Cinnamaldehyde and Eugenol Shows Promising In Vitro Results. **Antibiotics (Basel).** Ed. 11. 2022.

SARI et al. Antifungal screening and in silico mechanistic studies of an in-house azole library**. Chem Biol Drug Des**. Ed. 94. v. 5. p. 1944-1955. 2019.

SCHLEUSENER, J. et al. Treatment of the Candida subspecies Candida albicans and Candida parapsilosis with two far-UVC sources to minimise mycoses in clinical practice. **Mycoses**, n. June 2022, p. 25–28, 2022.

SCHREINER, L; BAUER, P; BUETTNER, A. Resolving the smell of wood - identification of odour-active compounds in Scots pine (Pinus sylvestris L.)**. Sci Rep.** Ed. 8. 2018.

SHARMA, S. et al. Post coronavirus disease mucormycosis : a deadly addition to the pandemic spectrum. **J Laryngol Otol.** Ed. 135. v. 5. p. 442-447. 2021.

SILVA, A. C. R. DA et al. Biological Activities of a-Pinene and β-Pinene Enantiomers. **Molecules,** v. 17, n. 6, p. 6305–6316, 25 maio 2012.

SINGLA, R.K; DUBEY, A.K. Molecules and Metabolites from Natural Products as Inhibitors of Biofilm in Candida spp. pathogens. **Curr Top Med Chem.** Ed. 19. v. 28. p. 2567-2578. 2019.

SOARES, D. M. Atividade antifúngica do óleo essencial de *origanum majorana l*. (manjerona) sobre cepas de *candida albicans*. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Acre. 2018.

SYCZ, Z; TICHACZEK-GOSKA, D; WOJNICZ, D. Anti-Planktonic and Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes-Asiatic Acid and Ursolic Acid as Promising Antibacterial Future Pharmaceuticals. **Biomolecules.** Ed. 12. 2022.

TAYLOR, M; BRIZUELA, M; RAJA, A. Oral Candidiasis**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.** 2022.

THOMFORD, N.E; SENTHEBANE, D.A; ROWE, A; MUNRO, D; SEELE, P; MAROYI, A; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **Int J Mol Sci.** Ed. 19. 2018.

TORTORANO, A.M; PRIGITANO, A; MORRONI, G; BRESCINI, L; BARCHIESI, F. Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. **Infect Drug Resist.** Ed. 14. p. 5543-5553. 2021.

TOSCAN, C. M. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. 2010.

UTEGENOVA, G.A; PALLISTER, K.B; KUSHNARENKO, S.V; ÖZEK, G; ÖZEK, T; ABIDKULOVA, K.T; KIRPOTINA, L.N; SCHEPETKIN, I.A; QUINN, M.T; VOYICH, J.M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Ferula* L. Species against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules.** Ed. 23. 2018.

VILLA, S; HAMIDEH, M; WEINSTOCK, A; QASIM, M.N; HAZBUN, T.R; SELLAM, A; HERNDAY, A.D; THANGAMANI, S. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in Candida albicans. **FEMS Yeast Res.** Ed. 1. 2020.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para Candida Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo da Saúde**, v.38. 2014.

WESTON, G.K; CLUNAS, H; JIMENEZ, N.C. A Review of the Potential Use of Pinene and Linalool as Terpene-Based Medicines for Brain Health: Discovering Novel Therapeutics in the Flavours and Fragrances of Cannabis. **Frontiers in Psychiatry.** v.12. 2021.

.

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

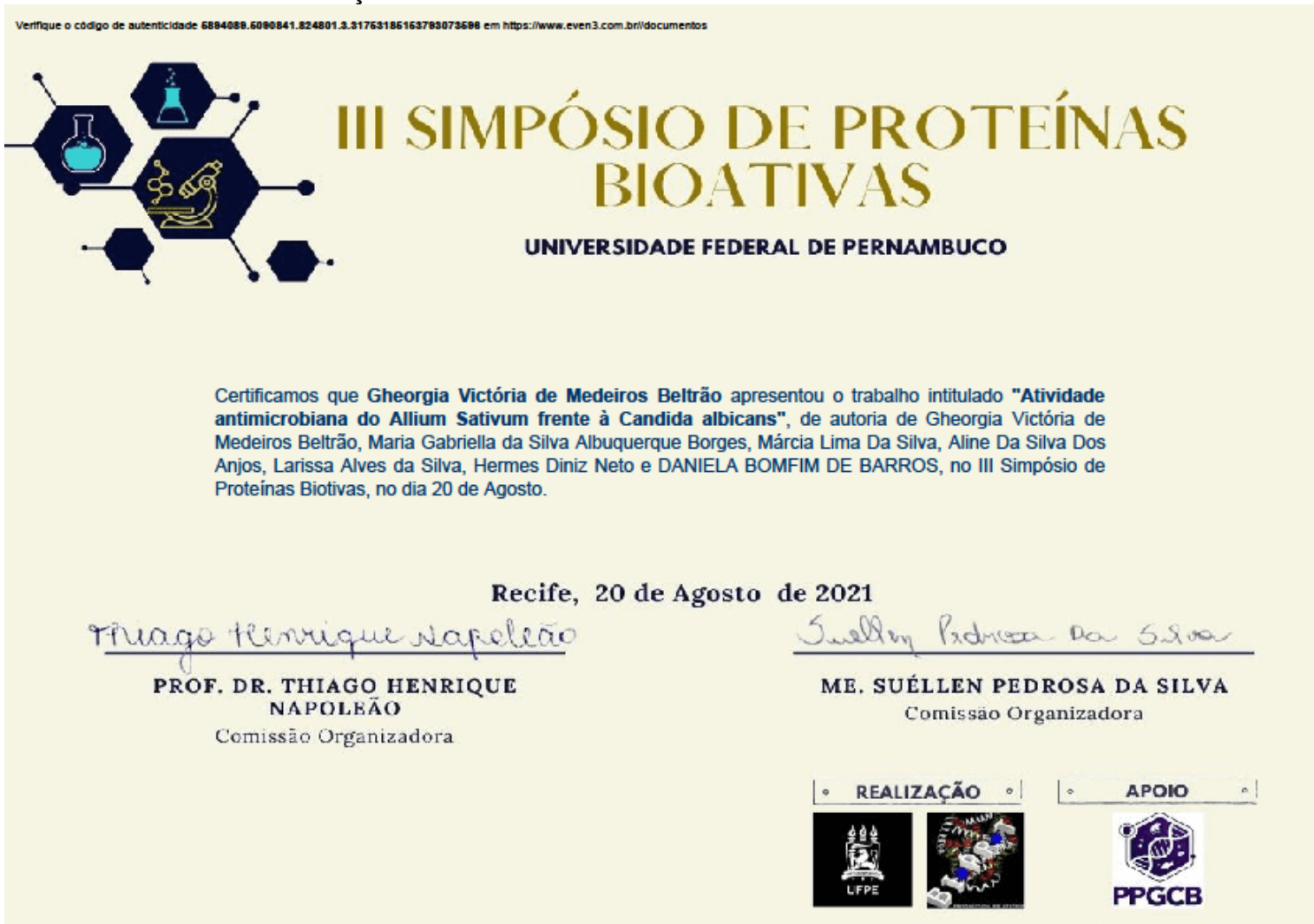
WILLEMS, H.M.E; AHMED, S.S; LIU, J; XU, Z; PETERS, B.M. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. **J Fungi (Basel).** Ed. 6. 2020.

YANQUN, LI; DEXIN, KONG; YING, FU; MICHAEL, R; SUSSMAN;, HONG W.U. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Ed.148. 2020.

YAO, P; LIU, Y. Terpenoids: Natural Compounds for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Therapy. Molecules**. Ed. 28. 2022.

ZARAGOZA, R; MASEDA, E. PEMÁN, J. Tratamiento antifúngico individualizado en el paciente crítico con infección fúngica invasora. **Revista Iberoamericana de Micología.** v. 38. p. 68-74. 2021.

ANEXO A – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM SIMPÓSIO



Verifique o código de autenticidade 5894089.5090841.824801.3.31753185153793073598 em https://www.even3.com.br//documentos

III SIMPÓSIO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Certificamos que **Gheorgia Victória de Medeiros Beltrão** apresentou o trabalho intitulado **"Atividade antimicrobiana do Allium Sativum frente à Candida albicans"**, de autoria de Gheorgia Victória de Medeiros Beltrão, Maria Gabriella da Silva Albuquerque Borges, Márcia Lima Da Silva, Aline Da Silva Dos Anjos, Larissa Alves da Silva, Hermes Diniz Neto e DANIELA BOMFIM DE BARROS, no III Simpósio de Proteínas Biotivas, no dia 20 de Agosto.

Recife, 20 de Agosto de 2021

Thiago Henrique Napoleão

PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
Comissão Organizadora

Suéllen Pedrosa da Silva

ME. SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA
Comissão Organizadora

REALIZAÇÃO

LFPE

APOIO

PPGCB

Verifique o código de autenticidade 2813261.0403844.683613.8.31763192976223073178 em https://www.even3.com.br//documentos

III SIMPÓSIO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Certificamos que **Márcia Lima Da Silva** apresentou o trabalho intitulado **"POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA Cynara scolymus APLICADA AO COMBATE DE FUSOBACTERIM NUCLEATUM"**, de autoria de Márcia Lima Da Silva, Maria Gabriella da Silva Albuquerque Borges, Aline Da Silva Dos Anjos, Gheorgia Victória de Medeiros Beltrão, Larissa Alves da Silva, Hermes Diniz Neto e DANIELA BOMFIM DE BARROS, no III Simpósio de Proteínas Biotivas, no dia 20 de Agosto.

Recife, 20 de Agosto de 2021

Thiago Henrique Napoleão

PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
Comissão Organizadora

Suellen Pedrosa Da Silva

ME. SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA
Comissão Organizadora

REALIZAÇÃO

APOIO

Verifique o código de autenticidade 3317631.3383213.307803.8.3176313383213307803 em https://www.even3.com.br/documentos

III SIMPÓSIO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Certificamos que **Maria Gabriella da Silva Albuquerque Borges** apresentou o trabalho intitulado **"POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA RESINA DE GEOPRÓPOLIS CONTRA CEPAS DO GÊNERO *Candida* spp."**, de autoria de Maria Gabriella da Silva Albuquerque Borges, no III Simpósio de Proteínas Biotivas, no dia 20 de Agosto.

Recife, 20 de Agosto de 2021

Thiago Henrique Napoleão

PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
Comissão Organizadora

Suellen Pedrosa da Silva

ME. SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA
Comissão Organizadora

REALIZAÇÃO

APOIO

ANEXO B – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO INTERNACIONAL

ALAM 2021
ASUNCIÓN - PARAGUAY
XXV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
25 AL 28 DE AGOSTO

XXV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
V CONGRESO PARAGUAYO DE MICROBIOLOGÍA
IX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
I CONGRESO PARAGUAYO DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS DEL LABORATORIO

ALAM 2021

ASOCIACIÓN DE BIOQUÍMICOS DEL PARAGUAY

IFCC

Se otorga el presente certificado a:

Karolayne Silva Souza, Daniela Bomfim de Barros, Milena Roberta Freire da Silva, Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá, Hevellin Talita Sousa Lins, Maria Betânia Melo de Oliveira

Por haber presentado en la sesión de presentaciones orales del **XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021**, el trabajo titulado:

APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MICRORGANISMOS NA BIOREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS COM POLIETILENO

Dr. José Pereira

Prof. Dra. María Montserrat Blanes

ALAM 2021
ASUNCIÓN - PARAGUAY
XXV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
25 AL 28 DE AGOSTO

XXV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
V CONGRESO PARAGUAYO DE MICROBIOLOGÍA
IX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
I CONGRESO PARAGUAYO DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS DEL LABORATORIO

ALAM 2021

ASOCIACIÓN DE BIOQUÍMICOS DEL PARAGUAY

ifcc

Se otorga el presente certificado a:

Daniela Bomfim de Barros, Luanna de Oliveira e Lima, Larissa Alves da Silva, Gheorgia Victória de Medeiros Beltrão, Mariana Cavalcante Fonseca, Hermes Diniz Neto, Lúcio Roberto Cançado Castellano, Brenna Louise Cavalcanti Gondim, Felipe Queiroga Sarmento Guerra, Márcia Vanusa da Silva

Por haber presentado en la sesión de presentaciones orales del **XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021**, el trabajo titulado:

Avaliação da atividade antifúngica de ?- asarol frente a cepas de Candida albicans

DC. José Pereira
Presidente XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología y V Congreso Paraguayo de Microbiología

Prof. Dra. María Montserrat Blanes
Presidenta IX Congreso Nacional de Bioquímica Clínica y I Congreso Paraguayo de Bioquímica y Ciencias del Laboratorio

ANEXO C– CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS

O Uso Terapêutico do Óleo de Copaíba: Uma Revisão

Lyncon De Morais Ulicio[1], Yasmin De Medeiros Leite[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[1], Aline Da Silva Dos Anjos[1], Márcia Lima Da Silva[1], Lucas Gomes De Albuquerque[1], Larissa Alves Da Silva[3], Luanna De Oliveira E Lima[3], Mariana Cavalcante Fonseca[3], Rubens Da Silva Araújo[3], Heivila Monique Da Silva Alexandre[3], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[4], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Lúcio Roberto Cançado Castellano[7], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[8], Márcia Vanusa Da Silva[9], Maria Betânia Melo De Oliveira[9]

[1] Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP
[2] Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE
[3] Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB
[4] Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB
[5] Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE
[6] Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP
[7] Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.
[8] Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB
[9] Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

RESUMO

A *Copaíba* é uma árvore comum na América Latina e na África Ocidental, que pode ser encontrada no Brasil nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônia. Na classificação botânica, a *copaíba* pertence a família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinioideae* e gênero *Copaífera*. O óleo que é extraído demonstrou ter ação anti-inflamatória, cicatrização, analgésico, antibacteriano, propriedades antifúngicas e antitumorais. O presente trabalho teve como objetivo fazer uma revisão de literatura, apresentando o uso do óleo-resina de *Copaíba*, árvore nativa de nosso território, apontando os diversos usos na medicina popular. Os resultados demonstraram que a partir desse estudo pode-se avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de *Copaíba*, apresentando atividade bacteriostática e fungistática. Avaliou-se o efeito fungitóxicodo óleo de resina e do óleo essencial desta planta. Sugere -se que é possível extrair compostos com ação antimicrobiana de vegetais disponíveis em nossa país. São necessárias novas pesquisas referentes estas plantas medicinais de uso popular, cujas propriedades possam auxiliar em tratamentos terapêuticos e possam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Copaíba. óleo. antibacteriano. antifúngico.

https://doi.org/10.53924/biomas1.02

A Utilização dos Óleos Essenciais na Odontologia: Uma Revisão

Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[1], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Larissa Alves Da Silva[3], Rubens Da Silva Araújo[3], Heivila Monique Da Silva Alexandre[3], Luanna De Oliveira E Lima[3], Mariana Cavalcante Fonseca[3], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[4], Aline Da Silva Dos Anjos[4], Márcia Lima Da Silva[4], Lyncon De Morais Ulicio[4], Yasmin De Medeiros Leite[4]; Lucas Gomes De Albuquerque[4]; Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[7], Márcia Vanusa Da Silva[8], Maria Betânia Melo De Oliveira[8], Lúcio Roberto Cançado Castellano[9].

[1] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*
[3] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[8] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*
[9] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*

RESUMO

O Brasil é o país com maior diversidade de plantas nativas do mundo distribuída por seis grandes biomas nacionais (Amazônia, Caatinga, Cerrados, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas). Nas últimas décadas, tem aumentado a procura por medicamentos alternativos, sendo principalmente originários de extratos naturais. Os óleos essenciais são substâncias naturais complexas, voláteis, lipofílicas e de baixo peso molecular, encontrados nas plantas aromáticas. Dentro da Odontologia, os óleos essenciais desempenham importante papel como agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos e na analgesia para a realização dos procedimentos. O presente trabalho trata-se de uma revisão da literatura de caráter descritivo realizado a partir de buscas de artigos científicos em bancos de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Pubmed, Lilacs e Scielo, A cavidade bucal é uma área que pode ser amplamente beneficiada pelas pesquisas com fitoterápicos devido às ações antimicrobianas sem causar o aumento da resistência bacteriana e alteração na microbiota oral. Além disso, propriedades como controle da cárie e de gengivite em longo prazo foram constatadas, bem como atividade contra a perda progressiva de estruturas periodontais. Os estudos também observaram atividade antifúngica dos óleos essenciais, bem como ação anti-inflamatória. O Brasil possui enorme potencial para desenvolver fitoterápicos, possibilitando tratamentos alternativos para as afecções odontológicas, algumas plantas com propriedades para o desenvolvimento medicamentoso são: Cravo da Índia, Romã, Malva, Tanchagem, Amoreira, Sálvia, Camomila, Aroeira-do-sertão. Contudo, as pesquisas científicas, infelizmente, ainda são escassas sobre os benefícios dos produtos naturais nacionais para a área odontológica e elucidação de suas propriedades farmacológicas.

Palavras-chave: Óleos voláteis, plantas medicinais, odontologia, odontologia baseada em evidências.

https://doi.org/10.53924/biomas1.03

Óleos Essenciais com Atividade *in vitro* Contra as Formas Parasitárias de *Leishmania amazonensis*: Uma Revisão da Literatura

Rubens Da Silva Araújo[1], Heivila Monique Da Silva Alexandre[1], Larissa Alves Da Silva[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[3], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[3], Luanna De Oliveira E Lima[1], Mariana Cavalcante Fonseca[1], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[4], Aline Da Silva Dos Anjos[4], Márcia Lima Da Silva[4], Lyncon De Morais Ulicio[4], Yasmin De Medeiros Leite[4], Lucas Gomes De Albuquerque[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[7], Márcia Vanusa Da Silva[8], Maria Betânia Melo De Oliveira[8], Lúcio Roberto Cançado Castellano[9].

[1] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*[1]
[3] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[8] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*
[9] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*

RESUMO

A leishmaniose trata-se de um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários de gênero *Leishmania*. No Brasil, os principais vetores são os insetos flebotomíneos, e os principais representantes são o *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*, sendo os mamíferos os hospedeiros vertebrados naturais. Visto que os tratamentos disponíveis atualmente são pouco satisfatórios, a busca por novas alternativas efetivas tem crescido, e o uso de plantas medicinais e seus derivados vem ganhando destaque. Dentre os produtos derivados, destacam-se os óleos essenciais e seus fitoconstituintes. Devido fatores como a baixa densidade e rápida difusão através da membrana das células em razão da sua lipossolubilidade, os óleos essenciais tendem a melhorar a inserção dos compostos bioativos afetando os parasitos e se mostrando eficazes no tratamento e prevenção de doenças parasitárias. Foi observado que diversos constituintes, como p-cimeno, 1,8-cineol, (-) α-bisabolol, apresentaram efeito danoso à espécies causadoras da leishmaniose, desde toxicidade, alterações na estrutura, até atividade leishmanicida. Dessa forma, os óleos essenciais de diversas plantas encontradas no bioma brasileiro têm mostrado importante impacto *in vitro* frente *Leishmania amazonensis*, se tornando candidatos promissores no desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-leishmania.

Palavras - chave: Óleos essenciais, *Leishmania amazonenses*, tratamento, *in vitro*.

https://doi.org/10.53924/biomas1.05

Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* cham) Frente a Cepas de *Candida* spp.: Uma Abordagem Literária

Larissa Alves Da Silva[1]; Luanna De Oliveira E Lima[1], Mariana Cavalcante Fonseca[1], Rubens Da Silva Araújo[1], Heivila Monique Da Silva Alexandre[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[3], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[3], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[4], Aline Da Silva Dos Anjos[4], Márcia Lima Da Silva[4], Lyncon De Morais Ulicio[4], Yasmin De Medeiros Leite[4]; Lucas Gomes De Albuquerque[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Márcia Vanusa Da Silva[7], Maria Betânia Melo De Oliveira[7], Lúcio Roberto Cançado Castellano[8], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[9].

[1] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*
[3] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*
[8] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*
[9] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*

RESUMO

Candida spp é um gênero de fungo que causa frequentemente doenças infecciosas humanas como a candidíase. As terapias dessa micose têm enfrentado diversos problemas como o aparecimento de cepas resistentes e alta toxicidade dos medicamentos atuais, dessa forma, constatou-se a importância de revisar estudos já feitos com óleos essenciais, nos quais possuem baixa toxicidade e com propriedades fungitóxicas e fungistáticas. A partir disso, esse trabalho teve como objetivo revisar em várias bases de dados acadêmicos a atividade antifúngica do óleo essencial alecrim-pimenta frente as cepas de *candida* spp. Como resultado, foi verificado nos estudos que o óleo essencial que foi obtido e preparado por meio das folhas de *L. sidoides*, apresenta atividade antifúngica contra tais cepas de candida, e a sua ação é devido ao composto majoritário presente na planta, o timol, que é um tipo de monoterpeno, que apresentou um potencial expressivo de relevância clínica, sendo um dos principais constituintes de vários óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas , possuindo característica favorável por possuir solubilidade em água e baixa toxicidade, ocasionando alterações morfológicas no microrganismo, impedindo o crescimento ou reduzindo estruturas como hifas e pseudohifas.

Palavras – chave: Cândida, óleo essencial, antifúngica, timol.

https://doi.org/10.53924/biomas1.06

Potencial Antimicrobiano Da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha): Uma Revisão Da Literatura

Heivila Monique Da Silva Alexandre[1], Rubens Da Silva Araújo[1], Larissa Alves Da Silva[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[3], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[3], Luanna De Oliveira E Lima[1], Mariana Cavalcante Fonseca[1], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[4], Aline Da Silva Dos Anjos[4], Márcia Lima Da Silva[4], Lyncon De Morais Ulicio[4], Yasmin De Medeiros Leite[4], Lucas Gomes De Albuquerque[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[7], Márcia Vanusa Da Silva[8], Maria Betânia Melo De Oliveira[8], Lúcio Roberto Cançado Castellano[9].

[1] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*[1]
[3] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[8] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*
[9] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*

RESUMO

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é conhecida popularmente como aroeira e pertence à família botânica Anacardiaceae. É uma árvore com ampla distribuição mundial utilizada tradicionalmente no tratamento de diversas enfermidades, tais como as doenças infecciosas. A terapêutica dessas doenças tem enfrentado uma série de problemas, dentre eles o aparecimento de cepas resistentes e alta taxa de toxicidade dos medicamentos atuais. A partir disso, esse trabalho objetivou pesquisar, em bases de dados acadêmicas, o potencial antimicrobiano da *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha) frente a diferentes cepas. Como resultado, verificou-se que o óleo essencial extraído das folhas da aroeira já era usado tradicionalmente no tratamento de problemas respiratórios, micose e infecções por Candida, sendo sua atividade terapêutica atribuída às elevadas concentrações de monoterpenos de sua composição. Em estudos recentes, verificou-se que os experimentos demonstraram resultados satisfatórios em relação a atividade antibacteriana e antifúngica da *Schinus terebinthifolius* sobre várias cepas. Além disso, foi visto que uma lectina isolada dessa árvore apresentou uma maior atividade antibacteriana em relação ao extrato da folha, que não afetou, por exemplo, espécies como *Kl. Pneumoniae, Ps. Aeruginosa e Salmonela enteritidis*. Resultados semelhantes apresentaram outros estudos, nestes, os autores sugeriram que o aumento da atividade antimicrobiana se deu em função do aumento da concentração de lectina, sendo este um dos principais metabólitos das folhas da *Schinus terebinthifolius*. Entretanto, apesar do amplo espectro antimicrobiano apresentado, faz-se necessário a realização de estudos aprofundados que assegurem seus efeitos. Assim, dado seu potencial terapêutico e isolamento de seus metabólitos, serão desenvolvidos promissores candidatos a fármacos.

Palavras-chave: Plantas medicinais, fitoterápicos. *Schinus terebinthifolius,* antimicrobiano.

https://doi.org/10.53924/biomas1.09

Potencial Antimicrobiano Dos Extratos Hidroalcóolicos E Alcóolicos Da *Eugenia uniflora E Do* Óleo Essencial Da *Lippia origanoides*: Uma Revisão

Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Aline Da Silva Dos Anjos[1], Márcia Lima Da Silva[1], Lyncon De Morais Ulicio[1], Yasmin De Medeiros Leite[1], Lucas Gomes De Albuquerque[1], Larissa Alves Da Silva[3], Luanna De Oliveira E Lima[3], Mariana Cavalcante Fonseca[3], Rubens Da Silva Araújo[3], Heivila Monique Da Silva Alexandre[3], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[4], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Lúcio Roberto Cançado Castellano[7], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[8], Márcia Vanusa Da Silva[9], Maria Betânia Melo De Oliveira[9].

[1] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*
[3] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*
[8] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[9] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*

RESUMO

Atualmente, as plantas medicinais e seus derivados representam uma importante parcela dos remédios empregados pela população. A crescente resistência medicamentosa, ocorre devido à inerente seleção natural, seja pelo uso inadequado de antimicrobianos ou por métodos alternativos de resistência. Esta situação tem forçado o desenvolvimento de novas pesquisas, sendo os extratos e óleos vegetais promissores quanto à ação antimicrobiana. O bioma Cerrado, com sua riqueza vegetal, contribui com incentivos à produção nacional e à pesquisa, no intuito de identificar novas espécies vegetais e compostos bioativos, que possuam propriedades terapêuticas e potencial atividade antimicrobiana. Foram realizadas buscas nas Bases de Dados do Portal de Periódicos CAPES, PubMed, Science Direct e Scielo. O extrato alcoólico da *Eugenia uniflora* (pitangueira), apresentou atividade antibacteriana contra linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* o extrato hidroalcóolico apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. O óleo essencial da *Lippia origanoide* (alecrim – pimenta), foi testado frente as cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella cholerae* apresentando atividade antibacteriana, e o extrato etanólico apresentou perfil de sensibilidade contra estirpes de *Sthaphylococcus aureus* e *Streptococcus muttans*. Os estudos evidenciam, a capacidade que o bioma Cerrado possui para a elaboração de novas alternativas terapêuticas, O potencial antimicrobiano das espécies é atribuído a presença de taninos e carvacrol na composição química da *E. uniflora* e *L. origanoides,* respectivamente, e poderiam, serem utilizados para a mineração de potenciais agentes medicamentosos, em combate aos patógenos resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados.

https://doi.org/10.53924/biomas1.10

Uso Do Óleo Essencial Da *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira Do Sertão) Frente a *Staphylococcus aureus*

Aline Da Silva Dos Anjos[1], Daniela Bomfim De Barros[2], Luciclaudio Cassimiro De Amorim[2], Maria Gabriella Da Silva Albuquerque Borges[1], Márcia Lima Da Silva[1], Lyncon De Morais Ulicio[1]; Yasmin De Medeiros Leite[1], Lucas Gomes De Albuquerque[1], Larissa Alves Da Silva[3], Luanna De Oliveira E Lima[3], Mariana Cavalcante Fonseca[3], Rubens Da Silva Araújo[3], Heivila Monique Da Silva Alexandre[3], Laryssa Mylenna Madruga Barbosa[4], Bruno Ferraz Barbosa Da Costa[4], Whanderson Falcão Dos Santos[5], Gheorgia Victória De Medeiros Beltrão[6], Lúcio Roberto Cançado Castellano[7], Felipe Queiroga Sarmento Guerra[8], Márcia Vanusa Da Silva[9], Maria Betânia Melo De Oliveira[9].

[1] *Bacharel em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[2] *Doutorando em Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- UFPE*
[3] *Graduando do curso de Farmácia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[4] *Graduando do curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[5] *Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco- UPE*
[6] *Graduanda em Biomedicina. Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU/ JP*
[7] *Professor efetivo da Escola Técnica de Saúde. Universidade Federal da Paraíba- UFPB.*
[8] *Professor efetivo do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba- UFPB*
[9] *Professora associada do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.*

RESUMO

Atualmente, vêm intensificando-se as pesquisas no âmbito da química medicinal, com o objetivo de elucidar o consumo de plantas medicinais, seja por meio da obtenção de extratos, compostos isolados, frações ou óleos essenciais que apresentem algum tipo de atividade biológica (ARAÚJO, 2017). Nesse cenário, destaca-se a *Myracrodruon urundeuva Allemão*, conhecida popularmente como aroeira do sertão, pertencente à família Anacardiaceae e que possui efeitos antiinflmatórios e cicatrizantes. Encontrada em um bioma caracterizado pela sua biodiversidade, a Caatinga ainda apresenta abundância em plantas que possuem efeitos terapêuticos, alimentícios, farmacêuticos e produtoras de óleos essenciais, onde, por sua vez, destacam-se para utilização de produtos naturais pertinentes para uso farmacólogo e cosmético. Testada para avaliação de atividade antimicrobiana, o óleo essencial, extraído das folhas da *Myracrodruon urundeuva Allemão* frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus,* característico em possibilitar infecções leves e graves na pele, apresentou resultados positivos em concentrações de inibição desejadas, proveniente da ação dos terpenóides, onde o terpeno α-pineno apresentou uma atividade superior a 85% frente as cepas do patógeno (ARAÚJO, 2017).

Palavras-chave: Caatinga, *Myracrodruon urundeuva Allemão*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobiano.

https://doi.org/10.53924/biomas1.11

ANEXO D– ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

7513

Current Medicinal Chemistry, 2021, *28*, 7513-7528

REVIEW ARTICLE

Novel Therapeutic Options for Chagas Disease Based on Bioactive Compounds from Algae, Bacteria and Fungi Species

Marcos Vinicius da Silva[1,*], Brenna Louise Cavalcanti Gondim[2,3], Tamires Marielem de Carvalho-Costa[1], Maria Tays Mendes[4], Marcela Rezende Lemes[1], Rafaela Miranda Barbosa[1], Talita Nunes Cardoso[2], Natália Santos Nascimento[2], Daniela Bomfim Barros[2,5], Márcia Vanusa da Silva[5], Juliana Reis Machado[6] and Lúcio Roberto Cançado Castellano[2]

[1]Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil; [2]Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Technical School of Health, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil; [3]Department of Dentistry, Centro Universitário UNIESP, João Pessoa, Paraíba, Brazil; [4]Department of Microbiology & Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA; [5]Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; [6]Department of Pathology, Genetics and Evolution, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: December 31, 2020
Revised: April 27, 2021
Accepted: April 28, 2021

DOI: 10.2174/0929867328666210806101559

Abstract: Chagas Disease, also known as American trypanosomiasis, is a Neglected Tropical Disease that affects around seven million people, especially in Latin America. Noteworthy, there has been an increase in the numbers of case reports in non-endemic areas, such as North America, Europe, Japan, and Australia. The disease is a vector-borne disease caused by the pathogen Trypanosoma cruzi being transmitted by infected bugs. It is known that about forty percent of infected patients develop cardiac, digestive, or neurological alterations. There are only two drugs currently used for treatment, benznidazole and nifurtimox. However, both therapeutic regimens present several limitations, such as toxicity, mutagenicity and low efficiency during the chronic phase. Some reports in the literature point to the occurrence of parasite resistance. To overcome these limitations, the bioprospection of novel molecules as alternatives is one of the major goals to improve therapeutic success in this chronic disease. Bioprospecting active metabolites from natural resources might bring new hopes for disease control and parasite elimination. Here we summarize the most recent advances to identify and test Algae, Bacteria and Fungi-derived bioactive compounds with trypanocidal activity using experimental models, *in vitro* testing and *in silico* approaches.

Keywords: Chagas disease, trypanosoma cruzi, virulence factors, therapeutics, algal proteins, fungal proteins.

1. INTRODUCTION

1.1. General Aspects of Chagas Disease

Described over 100 years ago by the researcher Carlos Chagas, Chagas Disease still has a considerable epidemiological relevance [1, 2]. Worldwide, mostly in Latin America, 6 to 7 million people are estimated to be infected with the parasite, *Trypanosoma cruzi* [3]. Despite the efforts to control this disease in endemic areas, there has been a growing increase in case reports in non-endemic areas, like North America, Europe, Japan, and Australia [4]. Only in the USA, the estimative is that more than 300,000 people are infected [5]. In these locations, non-vectorial pathways are the main sources of protozoa [6-8]. This increase can be explained, in part, by the increase in the migration of infected people [9-11].

The disease presents two phases. The acute phase is characterized by nonspecific symptoms that often do not lead to an accurate diagnosis. Only 1-2% of infected patients present symptoms being more severe in children under 2 years of age [12]. During this phase, the inflammatory response is responsible for the effi-

*Address correspondence to this author at the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil; Tel: +55 34 33185299; E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

1875-533X/21 $65.00+.00

© 2021 Bentham Science Publishers

Current Medicinal Chemistry