

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

CAMILA EVANGELISTA CARNIB NASCIMENTO

**PENTA-O-GALOIL-B-D-GLICOSE (PGG) POTENCIALIZA A
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL CONTRA**
Trichosporon asahii: análises *in silico* e *in vitro*

São Luís
2025

CAMILA EVANGELISTA CARNIB NASCIMENTO

**PENTA-O-GALOIL-B-D-GLICOSE (PGG) POTENCIALIZA A
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL CONTRA**

Trichosporon asahii: análises *in silico* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso
Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Martins de
Sousa

São Luís
2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Nascimento, Camila Evangelista Carnib.

Penta-o-galoil-B-D-glicose PGG potencializa a atividade antifúngica do fluconazol contra *Trichosporon asahii*: : análises in silico e in vitro / Camila Evangelista Carnib Nascimento. - 2025.

125 f.

Coorientador(a) 1: Eduardo Martins de Sousa.

Orientador(a): Rafael Cardoso Carvalho.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís-ma, Brasil, 2025.

1. *Trichosporon*. 2. Composto Fitoquímico. 3. Antifúngico. 4. Simulação de Acoplamento Molecular. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. de Sousa, Eduardo Martins. III. Título.

CAMILA EVANGELISTA CARNIB NASCIMENTO

**PENTA-O-GALOIL-B-D-GLICOSE (PGG) POTENCIALIZA A
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL CONTRA**
Trichosporon asahii: análises *in silico* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovação em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Afonso Abreu Gomes Júnior
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Marliete Carvalho da Costa
Universidade Ceuma

AGRADECIMENTOS

Agradeço, com profunda admiração e respeito, ao Professor Dr. Rafael Cardoso Carvalho, meu orientador, pela orientação atenta, pela confiança depositada em mim e por todo o apoio acadêmico e emocional ao longo dessa jornada. Suas contribuições, dedicação e incentivo foram fundamentais para a construção deste trabalho. Ao Professor Dr. Eduardo Martins de Sousa, coorientador, expressei minha sincera gratidão pelas sugestões precisas e pelo suporte científico durante todo o processo de pesquisa. Estendo meus agradecimentos aos professores e colegas do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada, pelo acolhimento, colaboração e pelo ambiente de aprendizado e troca que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço especialmente ao meu esposo Roberto, pelo amor incondicional, paciência e apoio constante mesmo nos momentos mais desafiadores. À minha mãe Eva, por ser exemplo de força e persistência, e ao meu filho Rafael, que é minha maior motivação e razão para seguir em frente. Sou grata também às minhas amigas Flávia e Mayane, pela presença constante, pelas palavras de encorajamento e pelo suporte prático, científico e emocional ao longo desta caminhada. A amizade e parceria de vocês tornaram este percurso mais leve e possível.

Reconheço e agradeço às instituições que viabilizaram esta pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e incentivo à produção científica. À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, pela formação de excelência, pelas oportunidades acadêmicas e por todo o suporte institucional durante o período de doutoramento.

RESUMO

Trichosporon asahii é um patógeno oportunista associado a infecções sistêmicas graves, frequentemente resistentes aos antifúngicos convencionais. Este estudo investigou o potencial antifúngico do penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG), isoladamente e em combinação com fluconazol (FLZ), por meio de abordagens *in silico*, *in vitro*. As análises *in silico* incluíram a predição de propriedades farmacocinéticas, toxicidade e similaridade estrutural com fármacos. Os ensaios *in vitro* compreenderam o teste de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ensaio de *checkerboard* para avaliação de sinergismo, e quantificação da viabilidade celular em biofilmes em formação e pré-formados. A docagem molecular avaliou a interação do PGG com as enzimas Erg11 e Erg2, alvos da via de biossíntese do ergosterol. Os resultados estão organizados em dois capítulos: (1) um artigo de revisão sistemática sobre os efeitos antimicrobianos *in vitro* e *in vivo* do PGG, que evidenciou ampla atividade, especialmente contra vírus e cepas multirresistentes, com efeitos como inibição de biofilmes, bloqueio da entrada e replicação microbiana, inibição enzimática e modulação de vias celulares; e (2) um estudo experimental que demonstrou ação sinérgica do PGG com FLZ contra *T. asahii* nas análises *in silico* e *in vitro*. As predições computacionais indicaram baixa toxicidade hepática e perfil farmacocinético favorável, embora com absorção gastrointestinal limitada. Nos ensaios *in vitro*, o PGG apresentou CIM de 1000 μ g/mL, efeito fungicida e sinergismo com FLZ (ICIF=0,31), reduzindo as concentrações necessárias de PGG e FLZ em 64 e 4 vezes, respectivamente; duas combinações testadas inibiram mais de 70% do crescimento fúngico e apresentaram atividade antibiofilme, inclusive em concentrações subinibitórias. A docagem revelou alta afinidade por Erg11 e Erg2, sugerindo um mecanismo de ação duplo. Os achados reforçam o potencial do PGG como candidato adjuvante no tratamento da tricosporonose sistêmica, recomendando sua validação em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: *Trichosporon*; Composto Fitoquímico; Antifúngico; 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose; Tanino Hidrolisável; Simulação de acoplamento molecular.

ABSTRACT

Trichosporon asahii is an opportunistic pathogen associated with severe systemic infections, often resistant to conventional antifungal agents. This study investigated the antifungal potential of penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG), alone and in combination with fluconazole (FLZ), through *in silico*, *in vitro*. *In silico* analyses included the prediction of pharmacokinetic properties, toxicity, and drug-likeness. *In vitro* assays comprised broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), checkerboard testing for synergy assessment, and quantification of cell viability in developing and mature biofilms. Molecular docking evaluated the interaction of PGG with Erg11 and Erg2 enzymes, key targets in the ergosterol biosynthesis pathway. The results are presented in two chapters: (1) a systematic review article on the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial effects of PGG, which demonstrated broad activity, particularly against viruses and multidrug-resistant strains, with effects including biofilm inhibition, blockage of microbial entry and replication, enzyme inhibition, and modulation of cellular pathways; and (2) an experimental study reporting the synergistic action of PGG with FLZ against *T. asahii* in *in silico* and *in vitro* analyses. Computational predictions indicated low hepatotoxicity and a favorable pharmacokinetic profile, although with limited gastrointestinal absorption. In *in vitro* assays, PGG exhibited an MIC of 1000 μ g/mL, fungicidal activity, and synergy with FLZ (FICI = 0.31), reducing the required concentrations of PGG and FLZ by 64- and 4-fold, respectively; two tested combinations inhibited >70% of fungal growth and displayed antibiofilm activity, even at subinhibitory concentrations. Docking analysis revealed high affinity for Erg11 and Erg2, suggesting a dual mechanism of action. These findings support the potential of PGG as an adjuvant candidate for the treatment of systemic trichosporonosis and warrant further validation in *in vivo* models.

Keywords: *Trichosporon*; Antifungal Agents; Phytochemicals; penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose; Hydrolyzable Tannin; Molecular Docking Simulation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CFM	Concentração fungicida mínima
CFU	Unidade formadora de colônias;
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COMB	Combinação
CVC	Cateter Venoso Central
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DSL	Pontuação de semelhança com droga
Erg11	lanosterol 14 α -desmetilase
Erg2	C8-esterol isomerase
FLZ	Fluconazol
G-HHDP-G	Galoil-Hexahidroxidifenoil (HHDP)-Glicose
GXM	glucuronoxilomanano
HPLC	high-performance liquid chromatography
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MOPS	Ácido morfolinopropanossulfônico
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide
Pa	Potencial de atividade
PASS	Online Prediction of Activity Spectra for Substances
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PDB	Protein Data Bank
PDB	Protein data bank;
PGG	Penta-O-galloyl- β -D-glucose
Pi	Potencial de inatividade
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAD	Saboraud Agar Dextose
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA TESE

Figura 1. Colônias de <i>T. asahii</i> em ágar Sabouraud dextrose após 48h de incubação a 37°C.	11
Figura 2. Estrutura química do PGG: cinco anéis galoil (a) ligados a uma molécula de glicose (b) por ligação de éster (c)	15
Figura 3. Esquema de determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo na placa de 96 poços.	21
Figura 4. Esquema de avaliação da combinação do PGG com FLZ frente a <i>T. asahii</i> .	22
Figura 5. Fórmula para cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), utilizada para determinar a interação entre o fluconazol (FLZ) e o Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG) frente a <i>Trichosporon asahii</i> . O ICIF é obtido pela soma das razões entre a CIM de cada fármaco em combinação e a CIM do mesmo fármaco isolado.	22
Figura 6. Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição da formação ou manutenção do biofilme de <i>T. asahii</i> após tratamento com Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG), Fluconazol (FLZ) ou suas combinações. O cálculo baseia-se na relação entre a média da densidade óptica (μDO) obtida nos poços tratados e no controle de crescimento, medida a 530nm.	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 <i>Trichosporon</i> spp.	10
2.2 Infecção por <i>Trichosporon asahii</i>	12
2.3 <i>Trichosporon</i> spp. e formação de biofilme	13
3 OBJETIVOS	17
3.1 Geral	17
3.2 Específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Análises <i>in silico</i>	18
4.1.1 Predição das atividades biológicas do Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG)	18
4.1.2 Predição das características farmacocinéticas, efeitos tóxicos e semelhança com fármacos	18
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	19
4.2.1 Produtos químicos	19
4.2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da combinação do PGG e FLZ	21
4.2.5 Ensaio de formação de biofilme	22
4.3 Docagem molecular	24
4.2.3 Docagem molecular	25
4.3 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	26
5.1. Capítulo 1- Antimicrobial effect of Pentagalloylglucose (PGG) <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> : a systematic review	26
5.2. Capítulo 2 - Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) enhances the antifungal activity Fluconazole against <i>Trichosporon asahii</i> : <i>in silico</i> and <i>in vitro</i> evidence	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXO A- ARTIGOS PUBLICADOS	123