



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SIMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANCORAMENTO MOLECULAR DO
METABÓLITO AZADIRACTINA À PROTEÍNA HIDROFOLATO REDUTASE**

MELQUISEDEQUE LUCENA FIGUEIREDO

CUITÉ PB

MELQUISEDEQUE LUCENA FIGUEIREDO

**SIMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANCORAMENTO MOLECULAR DO
METABÓLITO AZADIRACTINA À PROTEÍNA HIDROFOLATO REDUTASE**

.

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Campina Grande *Campus*
Cuité como requisito parcial para obtenção do Título
de Licenciado em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Magnólia de Araújo
Campos**

Cuité PB

2022

F475s Figueiredo, Melquisedeque Lucena.

Simulação e avaliação de ancoramento molecular do Metabólitoazadiractina à Proteína Hidrofolato Redutase. / Melquisedeque Lucena Figueiredo. - Cuité, 2022.

42 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2022.

"Orientação: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos".

Referências.

1. Doenças infecciosas. 2. *Candida*. 3. Infecções oportunistas. 4. *Candida Albicans*. 5. Biologia computacional. 6. Ancoramento molecular. 7. Metabólitoazadiractina. I. Campos, Magnólia de Araújo. II. Título.

CDU 616.9(043)

**SIMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANCORAMENTO MOLECULAR DO
METABÓLITO AZADIRACTINA À PROTEÍNA HIDROFOLATO REDUTASE**

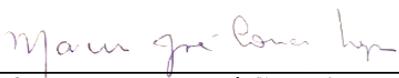
**Monografia apresentada ao Curso de
Biologia da Universidade Federal de Curso
de Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Campina Grande,
como requisito parcial para obtenção do
título de Licenciado em Ciências Biológicas.**

Aprovada em: 26 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos
Orientadora
UABQ/CES/UFCG



Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes
Membro Interno
UABQ/CES/UFCG



Prof. Dr. Rafael Trindade Maia
Membro Externo
UAEC/CDSA/UFCG

CUITÉ PB

À minha família, amigos e orientadora, por me ajudarem e darem força quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade Federal de Campina Grande - CES, pela oportunidade de realização desse curso.

A minha Orientadora, uma grande amiga e mãe científica Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, a quem sou eternamente grato por todo conhecimento transmitido, grato pela paciência e por todos os conselhos dados. Por me “adotar” academicamente, por acreditar em mim, e ser uma grande estimuladora dos meus sonhos, e por tantas vezes no decorrer desses cinco anos que se dispôs a me acolher genuinamente, e me amparar quando tudo parecia tão difícil. Dessa forma me mostrando a importância de ser um professor para além da sala de aula, gratidão por nossos caminhos terem se cruzado. Mãe, digna de muita admiração e carinho, te amo muitíssimo.

A minha amiga Henriqueta Monalisa Farias, que agora é Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação do CES-UFCG, que tanto contribuiu para minha formação, grato pela co-orientação de IC, que me proporcionou os primeiros passos para aprender mais sobre Docking molecular. E pela grande contribuição em parte substancial do presente trabalho, que não seria possível sem sua grande ajuda. Obrigado por todos os momentos lindos que tivemos, guardo todos com muito amor e carinho e imensa admiração por tudo que você é e representa pra mim. Te amo, sintá-se abraçada.

Ao corpo docente do CES-UFCG, por me motivar a cada aula e me ajudar a concretizar este sonho. Sou grato a todos os professores, em especial, Prof. Dr. Márcio Frazão, pela oportunidade que me deu no LaBan, a Profa. Dra. Michelle Gomes que me proporcionou minhas primeiras experiências dentro de um laboratório.

A todos os amigos que direta ou indiretamente participaram da minha formação, o meu muito eterno agradecimento. Obrigado! Pela contribuição valiosa durante toda a jornada. Agradeço com um forte abraço, em especial à minha amiga Larissa que foi um presente em minha vida, me ajudou em diversos momentos, chorou e sorriu comigo, te amo meu peixinho saltitante.

Gostaria de deixar registrado também meus agradecimentos e admiração as minhas amigas Kelly, Rayssa e Thay, todas foram fundamentais em diversos momentos no decorrer dessa jornada. Amo vocês.

Não posso deixar passar meus agradecimentos ao melhor e mais competente setor de serviço social que uma Universidade poderia ter, meu muito obrigado as melhores, Maria e Vanessa, vocês são dois anjos em minha vida, me deram forças e sempre estiveram comigo em momentos difíceis, que o universo retribua em dobro tudo que vocês fizeram por mim.

À minha psicóloga Eliane, que esteve comigo e me ajudou a passar pelas crises que tive durante a graduação. Sem sua ajuda eu não teria conseguido, muito obrigado por tanto.

A minha tia Ana Catarina, meu tio João e as minhas primas Haab e Jemima que durante a minha infância foram base fundamental e essencial para minha formação. Reflito sobre o amor e percebo que ele é mais que um sentimento, é uma forma de vida que transforma as pessoas em seres humanos completos, principalmente do

ponto de vista espiritual, e hoje aos 24 anos de idade, sinto e afirmo que tudo de mais bonito que existe em mim, vem do afeto e cuidado que recebi de vocês, esse afeto sublime, que teve o poder de gerar em mim emoções que me estimularam conquistar meus sonhos e metas. A vocês todo meu amor e carinho.

Ao meu amor Fabricio, que me apoia e me incentiva todos os dias, obrigado por tudo de bom que você desperta em mim. E ao nosso filhinho (felino) Frederico, que enche de “ronrons” terapêuticos.

Quando reflito no sentido da palavra gratidão eu penso que está relacionado com reconhecer a importância dos momentos da vida em todas as suas dimensões, saber reconhecer a ajuda das pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando com detalhes, e sim, ser grato é ficar atento aos detalhes da vida. Sou grato por cada detalhe, e hoje, dia vinte de junho de 22, nesse exato momento enquanto escrevo estes agradecimentos, percebo o quão grato a mim mesmo eu devo ser, pois me entreguei de coração, de corpo e alma aos detalhes e hoje reconheço a importância disso.

Acredito que quando nós entregamos de coração, a vida nos recompensa em dobro! Por isso, hoje prestes a concluir este ciclo da minha vida, já não tenho medo de ser uma pessoa carregada de ingratidão, pois me coloco frente a todos os momentos e me reconheço como um ser humano que preza pela gratidão e pelo amor. Grato aos amigos, e à vida pelas oportunidades.

Cada fase da vida tem um objetivo. Mesmo que as dores sejam fortes, elas servem para algum tipo de ensinamento. Por isso, gostaria de expressar minha gratidão às lições absorvidas desta fase em específico da minha vida. Reconheço a importância das coisas e aceito cada momento de dor e felicidade, e com isso me coloco a disposição de tudo de melhor que a vida tem a oferecer.

Por fim, minha eterna gratidão a Biologia. Que muito me ensinou, e que irá continuar me ensinando até os últimos dias da minha vida. Através desta ciência eu pude despertar em mim o compromisso com a vida! Com todas as formas de vida, respeitando sua subjetividade e compreendendo as diferenças de cada ser. Com ela, pude enxergar a vida pelas lentes do amor e pela Biologia do sentimento. Por isso, GRATIDÃO.

Muito Obrigado.

“O amor por todas as coisas vivas é o mais nobre atributo de um homem”.

(Charles Darwin)

“Por amor às causas perdidas”.

(Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

O gênero *Candida* constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas nos seres humanos, possuindo cerca de 200 espécies distintas. Diante disso, o uso da biologia computacional e as aplicações de suas ferramentas são indispensáveis para o avanço na produção de novos fármacos com maior eficácia e com tempo e valor reduzidos. A inibição do metabolismo do folato é uma importante estratégia no tratamento de doenças infecciosas. Na via metabólica do folato, a enzima diidrofolato redutase (DHFR) catalisa a redução do diidrofolato a tetraidrofolato. Este metabólito é essencial para a biossíntese de DNA e proteínas. Portanto, o desenvolvimento de novos antagonistas da diidrofolato redutase tem sido considerado como uma boa estratégia para melhorar o tratamento das doenças infecciosas. Nessa perspectiva, o presente trabalho teve por objetivo analisar a ancoragem molecular da proteína diidrofolato redutase de *Candida albicans* com o ligante azadiractina a fim de estudar seu potencial inibitório frente a tal proteína, explorando uma possível nova interação ou alvo molecular específico. Deste modo, foram realizados experimentos *in silico* de *docking* proteína-ligante no programa *Autodock 4.6*¹, resultando numa interação direta da azadiractina com o sítio ativo da DHFR, os dados estimados nos cálculos revelaram valores expressivamente negativos, para a energia livre de ligação variaram de -1.21 kcal/mol, no complexo 1, a -1.45 kcal/mol, no complexo 10, enquanto que para a energia intermolecular variaram de -5.08 a -9.43. Em sequência, as constantes de inibição (KI) variaram de 80,35 uM a 894,54 μM. Sendo a azadiractina um inibidor fraco devido aos valores de KI, mesmo se ligando diretamente ao sítio ativo da proteína.

Palavras-Chave: *Candida albicans*, DHFR, docking molecular, nim.

ABSTRACT

The *Candida* genus is the main group of yeasts that cause opportunistic infections in human beings, with around 200 different species. Facing this, the use of computational biology and the application of its tools are indispensable to the advance on the production of new drugs with higher efficiency and reduced demanded time and value. The inhibition of the folate metabolism is an important strategy on treatments of infectious diseases. On the metabolic pathway of folate, the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) catalyzes the reduction of dihydrofolate into tetrahydrofolate. This metabolite is essential to the biosynthesis of DNA and proteins. Therefore, the development of new antagonist of dihydrofolate reductase have been considered a good strategy to optimize the treatment of infectious diseases. On this perspective, the present work aimed to analyze the molecular anchoring of the protein dihydrofolate reductase of *Candida albicans* with the ligand azadiractine in order to study its inhibitory potential facing said protein, exploring a possible new interaction or specific molecular target. On this wise, in silico protein-ligand experiments were done on Autodock 4.6, resulting in a direct interaction of Azadiractine with the active site of DHFR. The estimated data in the calculations revealed expressively negative values, for the free energy of binding, they ranged from -1.21 kcal/mol, on complex 1, to -1.45 kcal/mol, on complex 10, while for the intermolecular energy they ranged from -5.08 to -9.43. In sequence, the inhibition constants (KI) ranged from 80,35 μM to 894,54 μM . Azadirachtin is a weak inhibitor due to KI values, even if it binds directly to the active site of the protein.

Keywords: *Candida albicans*, DHFR, molecular docking, neen.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da formação do complexo proteína-ligante no docking molecular24
- Figura 2.** Visualização da estrutura tridimensional da proteína diidrofolato reductase (DHFR) 26
- Figura 3.** Visualização da estrutura tridimensional da molécula da azadiractina 26
- Figura 4.** Gráfico de Ramachandran da enzima DHFR. A seta preta indica os resíduos localizados na região mais favorável (vermelho), a seta branca corresponde aos resíduos localizados na região adicional mais permissiva (amarelo) e a seta azul aponta para a região não permissiva (bege). 30
- Figura 5.** Imagem representativa do docking molecular gerado pelo Autodock4, evidenciando o local de ancoragem da azadiractina (em vermelho) em uma das cadeias da Holoenzima DHFR (lilás), no sítio ativo que fica próximo do sítio da co-enzima NADPH (verde). O complexo teve uma distância de 1,76 Å. 32
- Figura 6.** Representação 2D das interações intermoleculares entre a molécula ligante azadiractina e os principais aminoácidos interagentes do local de ligação na enzima DHFR, obtida do software DS Visualizer (2014). Diagrama bidimensional da molécula da azadiractina e os aminoácidos interagentes da proteína DHFR..... 33

LISTAS DE TABELA

Tabela 1. Ramachandran da proteína DHFR 30

Tabela 2. Energia livre de ligação e energia intermolecular estimadas pelo programa *AutoDock4* para complexos formados entre a enzima diidrofolato redutase e o metabólito azadiractina..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHF- Diidrofolato

DHFR – Diidrofolato redutase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

LGA – Algoritmo Genético Lamarckiano

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PABA – Tetraidrofolato

PDB – Protein Data Bank

THF – Tetrahidrofolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Importância de prospectar antifúngicos para <i>Candida albicans</i>.....	17
3.2 Diidrofolato redutase (DHFR).....	20
3.3 Azadiracta <i>Indica</i> Juss.....	21
3.4 Azadiractina.....	21
3.5 Acoplamento <i>in silico</i> de receptor-ligante	22
4 METODOLOGIA	24
4.1 Refinamento do modelo	25
4.2 Validação do modelo.....	25
4.3 Estrutura da proteína diidrofolato redutase.....	25
4.4 Estrutura do ligante.....	26
4.5 Preparo dos alvos biológicos (Edição de arquivos PDB)	27
4.6 Pré-Ancoragem usando o programa Autogrid	27
4.7 Docking molecular	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Validação do modelo 3D da DHFR por intermédio do gráfico de Ramachandran.....	29
5.2 Cálculos energéticos obtidos na ancoragem molecular entre a DHFR e azadiractina	27
5.3 Interação intermolecular entre os aminoácidos da enzima DHFR e azadiractina	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Antes dos adventos tecnológicos e das grandes descobertas que envolvem as variadas técnicas moleculares, a humanidade dependia exclusivamente de medicamentos oriundos de fontes naturais. As plantas medicinais estavam sendo amplamente utilizadas para várias terapias, como também alguns produtos medicamentosos consistiam em substâncias de origem animal ou mineral. Com o avanço crescente das ciências, muitos aspectos experimentaram mudanças, não só em relação à tecnologia em si, como também aos fatores ligados à saúde (EDLER, 2006).

De maneira empírica, sobreveio o interesse por substâncias que restabelecessem frente a determinados tipos de doenças. Não se compreendia o porquê; era sabido apenas que determinada planta poderia ser recomendada para uma enfermidade específica, observando apenas os efeitos causados. Com o passar do tempo, diante do avanço da ciência e da tecnologia, os pesquisadores, ao isolarem compostos em seus laboratórios químicos, despertavam em si o interesse pelas ações farmacológicas dos mesmos. Em geral, era realizado um grande número de experimentos para ser descoberta a ação farmacológica ou toxicológica de uma dada substância, o que acarretava em desperdício de tempo e material, tornando a pesquisa significativamente custosa. Precisava-se, então, aprimorar todo o processo que envolve a descoberta de fármacos, em busca de maior eficiência para se estabelecer métodos de prevenção mais eficazes.

Com o aumento da resistência microbiana aos fármacos, a indústria farmacêutica segue numa busca incessante por drogas capazes de combater as inúmeras doenças decorrentes de patógenos (YAMADA-OGATTA *et al.*, 2015). Infecções fúngicas resistentes a medicamentos estão se manifestando cada vez mais como um importante problema clínico (PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Somando-se a isso, Berman e Krysan (2020) apontaram que existe uma proporção significativa de pacientes que não respondem à terapia, apesar de estar infectada com fungos suscetíveis às drogas disponíveis no mercado, e as opções de tratamento estão se tornando limitadas. Dentre estes pacientes se sobressaem os casos referentes à imunodeficiência, por exemplo: pacientes com AIDS; transplantados ou com câncer que carecem de terapia imunossupressora; e os submetidos a processos cirúrgicos invasivos, sendo estes também os principais acometidos em função dessas infecções (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; CHANG *et al.*, 2016).

Os altos níveis de morbidade atingindo 65,3% e mortalidade com 72,2% resultantes de infecções em pacientes hospitalizados mostram que *C. albicans* tornou-se um patógeno humano de grande relevância clínica. (RODRIGUES *et al.*, 2017; DOI *et al.*, 2016). Por isso, torna-se necessário entender o mecanismo de ação, bem como as vias afetadas pelo uso de tais fármacos para que seja possível encontrar um tratamento eficiente, de forma que este patógeno não se torne resistente a tal medicamento.

Nessa perspectiva, segundo Mariano *et al.* (2021), o uso da biologia computacional e aplicações de suas ferramentas são indispensáveis para o avanço na produção de novos fármacos, assim como, no estudo de mecanismos de ação, facilitando um avanço eficaz nas etapas de estudos farmacológicos e, por conseguinte, obter novos fármacos com maior eficácia e com tempo e valor reduzidos. Assim, conhecer as interações específicas entre a proteína e substrato é fundamental para a caracterização e comportamento do sítio ativo para entender como um fármaco interage com sítios de ligação de uma determinada proteína de forma a inibir a ação da mesma.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar a ancoragem molecular da proteína DHFR com o ligante Azadiractina, explorando seu potencial inibitório como uma possível nova interação ou alvo molecular específico frente a tal proteína. Destaca-se que a proteína di-hidrofolato DHFR da *Candida* catalisa a redução do ácido fólico e di-hidrofolico em ácido tetra-hidrofolico, sendo essa uma reação essencial para a síntese de glicina e purina e para a síntese de precursores de DNA (SHENKIN; ROBERTS, 2016), bem como sua relação e interação com uma molécula da planta de nim (*Azadirachta indica* Jussieu), a azadiractina. Esta é extremamente conhecida por suas propriedades tóxicas e repelentes contra insetos, mas também por suas propriedades antissépticas, contraceptivas, antipiréticas, antifúngicas e antiparasitárias (MORDUE; LUNTZ; NISBET, 2000). No entanto, ainda permanece desconhecido qual o modo de ação ao nível molecular e celular e propriedades estruturais da molécula de azadiractina, sendo, portanto, necessário estudos computacionais por técnicas modernas de interação molecular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a ancoragem molecular do ligante azadiractina de nim (*Azadirachta indica* Jussieu) com a proteína diidrofolato redutase (DHFR) de *Candida albicans*, por meio de ensaios *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

- Gerar complexos proteína DHFR–ligante azadiractina, por meio de simulações computacionais de docking molecular usando o software Autodock4;
- Validar as interações proteína-ligante, por meio de valores de energia de ligação e distância usando o software Autodock4;
- Validar as interações proteína-ligante, por meio da identificação de aminoácidos interagentes, usando o software Discovery Studio Visualizer;
- Estudar o potencial inibitório do ligante azadiractina, por meio das análises dos complexos proteína-ligante.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância de prospectar antifúngicos para *Candida albicans*

Pappas *et al.* (2018) relata que as espécies do gênero *Candida* refletem em um problema de saúde pelo aparecimento de cepas e de novas espécies cada vez mais resistentes aos antifúngicos, que estão disponíveis para o tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos. Isto faz com que muitas vezes estas infecções não sejam tratáveis, trazendo malefícios para o paciente. Diante deste cenário é importante e necessário prospectar novos antifúngicos visando a busca por métodos alternativos. Estudando os principais mecanismos de resistência deste gênero aos antifúngicos, assim como as particularidades relacionadas a candidíase, seja ela invasiva ou superficial, se estabelece a possibilidade de um direcionamento de pesquisas que visem a busca de novos antifúngicos, com enfoque em novos alvos terapêuticos, estratégias de prevenção e tratamento destas infecções, resultando na atualização constante dos tratamentos disponíveis.

De acordo com Pappas *et al.* (2018), o gênero *Candida* é listado como a terceira causa das septicemias em geral no mundo. A *Candida albicans* segue sendo no decorrer dos anos a espécie mais frequentemente encontrada nas infecções propiciadas pelas espécies do gênero *Candida*, perdurando em 65,3% das infecções, por este gênero, em torno do mundo (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Segundo Doi *et al.* (2016), no Brasil, o gênero *Candida* foi relatado como o sétimo agente etiológico determinante das infecções sanguíneas, sendo *C. albicans* (34,3%) a espécie mais prevalente dessas infecções, com uma taxa de mortalidade de 72,2%. Colombo e Guimarães (2003) apontam que essa é uma espécie adaptada ao corpo humano, que possui um alto nível de mortalidade, podendo colonizá-lo em condições de normalidade fisiológica sem produzir sintoma algum.

Esses micro-organismos podem ser encontrados na microbiota da mucosa reprodutiva e gastrointestinal, vivendo de forma simbiote em 50-70% dos indivíduos saudáveis (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007). A colonização feita por *Candida* permite certas vantagens, ao colonizar o ser humano as espécies conseguem assimilar os nutrientes necessários para sobrevivência. Essa condição acaba limitando o crescimento de outros fungos oportunistas, trazendo equilíbrio a microbiota e promovendo uma melhor resposta imunológica (MARTINS *et al.*, 2014).

Esta espécie é um micro-organismo comensal que pode se tornar patogênico em condições de baixa imunidade do hospedeiro, e, por causa destas características, são considerados patógenos oportunistas (MONOD; ZEPÉLIN, 2002). Comumente sob condições ideais de desenvolvimento, esses micro-organismos se tornam patógenos humanos e causam infecções que são denominadas de Candidíase.

Kabir, Hussain e Ahmad (2012) relatam que dentre os fatores que colaboram para as infecções causadas por esse organismo podem ser elencados dois principais, e estes influenciam o fator de patogenicidade de *C. albicans*: o estado imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno. Foram identificadas nas últimas três décadas uma enorme quantidade de fatores de virulência, como desenvolvimento de biofilmes, capacidade de adesão, hidrofobicidade da superfície celular, transição morfológica e produção de enzimas hidrolíticas (ZANNI *et al.*, 2017). Outra característica associada com a patogenicidade em humanos, como aponta a autora e a capacidade de multiplicação à altas temperaturas, como entre 39°C e 42°C.,

A Candidíase é um termo usado amplamente para intitular infecções causadas por fungos do gênero *Candida*, sejam elas mucocutâneas ou superficiais, bem como infecções invasivas de órgãos profundos ou sangue (candidemia) (HANI *et al.*, 2015; PAPPAS *et al.*, 2018). A candidíase mucocutânea ou superficial acomete pele, cabelos, unhas e membranas mucosas. De acordo com Hellstein & Marek (2019), a candidíase oral - que pode ser classificada como intraoral, faríngea e perioral, e pelo estágio agudo ou crônico - acomete preferencialmente os indivíduos com SIDA, idosos com próteses dentárias e fumantes. Os sintomas causados por essa infecção são variáveis e irão depender da região acometida pela infecção (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

Os sintomas vão desde o surgimento de aftas na boca e dificuldades para engolir, manchas na boca e na língua, até dores abdominais e perda de apetite nos casos de candidíase no esôfago (HANI *et al.*, 2015). Tem-se também a candidíase vulvovaginal, que é uma infecção caracterizada por prurido, dispareunia, ardor e pela eliminação de corrimento vaginal, sintomas que aumentam no período pré-menstrual com a elevação da acidez vaginal. A candidíase acomete cerca de 50% das mulheres (com casos de recorrência), e pode atingir bebês do sexo feminino neonatas. A candidíase postular afeta usuários de drogas, mas também pode ocorrer em pacientes hospitalizados e/ou imunossuprimidos, acometendo a pele e o couro cabeludo (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

Os métodos atuais de controle são os antifúngicos, como por exemplo os antifúngicos azóis que agem inibindo a enzima do citocromo P450 14 α -lanosteroldesmetilase que participa de uma das etapas mais importantes da rota da biossíntese de ergosterol nas leveduras e fungos filamentosos (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016). Serhan *et al.* (2014) indicam que os antifúngicos Alilaminas e Polienos apresentam também ação bem definida contra ao ergosterol, que é um componente importante da membrana celular do fungo. O primeiro age de formar a inibir a biossíntese de ergosterol através da inibição da enzima escelano epoxidase, dessa forma e capaz de bloquear o crescimento fúngico. Já os polienos interagem diretamente com o ergosterol, e através desta interação ocorre a formação de poros transmembranais. Estes acarretarão na criação de um canal iônico que por consequência ocasiona vazamento e perda de íons resultando em um desequilíbrio eletroquímico (COHEN, 2010).

De acordo com Prasad, Shah e Rawal (2016), os inibidores de parede celular fúngica fazem parte dos métodos de controle, onde as equinocandinas atuam por intermédio de um único mecanismo de ação. O mesmo inibe a síntese da parede celular de fungos, e através da inibição não competitiva da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase. Esta enzima é capaz de realizar a síntese do polímero (1,3)- β -D-glucana, que por sua vez é constituinte importante da parede celular, que liga covalentemente ao outro polímero a (1,6)- β -D-glucana, e juntos com a quitina formam uma rede tridimensional complexa de microfibrilas (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016). Através da inibição se estabelece a inibição de biossíntese da parede celular, com isso causando a lise e prejuízo a integridade celular do organismo (EMRI *et al.*, 2014).

As limitações que esses métodos de controle possuem se relacionam com os mecanismos de resistência do gênero *Candida* aos antifúngicos. A resistência aos azóis em *C. albicans* estão bem definidas e são associadas principalmente à expressão aumentada da bomba de efluxo de drogas, à maior expressão e modificação na estrutura de sítios alvos, além da formação de biofilme (SANGLARD *et al.*, 1995). Com a expressão da bomba de efluxo ocorre uma baixa concentração do agente antifúngico no interior da célula fúngica, e essa baixa concentração confere resistência a essas drogas (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Perlin, Rautemaa-Richardson e Alastruey-Izquierdo (2017) relatam em seu trabalho que a formação de biofilme pelas espécies de *Candida* spp. aparece como um importante mecanismo para a falta de ação dos antifúngicos azólicos. Este é um

mecanismo de resistência comum também às demais classes de antifúngicos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Biofilmes maduros apresentam uma estrutura bem consolidada, constituindo uma matriz extracelular forte que promove a ligação das células à uma superfície, ligação intercelular e agregação arquitetada. Sejam esses biofilmes de um mesmo micro-organismo ou de dois ou mais desses, essa matriz é responsável por manter uma barreira mecânica estável e também proteger os micro-organismos das drogas antimicrobianas e, portanto, desempenham papel na resistência a essas drogas (FLEMMING & WINGENDER, 2010). A resistência aos polienos se estabelece pela interação com o ergosterol presente na membrana plasmática das células de *Candida* spp. formando poros que ligam o interior da célula com o meio externo e fazem o micro-organismo perder o seu equilíbrio osmótico e os nutrientes essenciais a sua sobrevivência (KOO *et al.*, 2017).

3.2 Diidrofolato redutase (DHFR)

A DHFR é uma enzima alvo para o tratamento de infecções bacterianas, câncer e parasitoses, sendo considerada uma proteína chave no metabolismo do folato. Lima-Pallone, Catharino e Godoy (2008) demonstraram que nas últimas décadas, os folatos vêm alcançando um grande reconhecimento devido ao papel importante e essencial no metabolismo de aminoácidos, funções neurológicas e crescimento. O ácido fólico (ácido pteroil glutâmico) é uma vitamina hidrossolúvel, com estrutura molecular formada pela subestrutura pterina, conectada a amina do ácido para-aminobenzóico (PABA), que por sua vez está ligado ao ácido glutâmico, através do seu grupo amino e da carbonila deste aminoácido (ENGELKING *et al.*, 2015).

De acordo com Shenkin e Roberts (2016), a enzima diidrofolato redutase, frente à síntese do folato, é responsável por converter o diidrofolato (DHF), a forma ativa do ácido fólico. A síntese adequada do tetraidrofolato (THF) é importante para posterior geração de 5-metil-THF, dessa forma, seguindo com os processos de metilação (KALMBACH *et al.*, 2008). A importância da DHFR na manutenção da homeostase do folato faz dela um importante alvo para novas drogas. A inibição da enzima limita as concentrações de THF que, por consequência acarreta na diminuição da síntese de DNA, reduzindo dessa forma a proliferação celular (BANERJEE *et al.*, 1995).

Conforme Whitlow e colaboradores (1997), o modelo cristal final contém 2 cadeias polipeptídicas de DHFR de *C. albicans*, apresentando um subdomínio de ligação a adenosina e um subdomínio rico em alças em cada cadeia. A estrutura tridimensional

encontrada tanto nessa espécie de fungos, como em humanos, em bactérias e outros microrganismos, forma um arranjo funcionalmente ativo pelo complexo com sua co-enzima NADPH, por isso cada subdomínio de ligação a adenosina está complexado com 1 molécula da co-enzima NADPH, sendo uma em cada domínio de cada cadeia (Figura 2). O sítio ativo da DHFR de *C. albicans* está localizado entre os dois subdomínios citados e é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Met²⁵, Ile⁹, Glu³², Ile³³, Phe³⁶, Met⁵⁴, Thr⁵⁸, Ser⁶¹, Ile⁶², Leu⁶⁹, Arg⁷², Ile¹¹².

3.3 *Azadiracta Indica* Juss

Azadiracta indica Juss é uma árvore pertencente à família das Meliáceas, originária da Índia e conhecida popularmente com nim. De acordo com Govindachari, Gopalakrishnan e Suresh (1999), o nim foi introduzido no Brasil, pela primeira vez, de forma oficial pela Fundação Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em 1986. Na região Nordeste do Brasil (Bioma Catinga), o nim foi introduzido por sua capacidade de produzir frutos em grandes escalas e alavancar o comércio de madeiras (BRUEL, 2006). Em contrapartida a chegada do nim no Nordeste Brasileiro trouxe muitos prejuízos levando em consideração o alto grau de competitividade da planta com as demais espécies nativas da região. Sua dominância pode ser dada pela ação de substâncias alelopáticas que liberam substâncias que provocam efeitos no desenvolvimento de outras espécies vegetais (BRASIL, 2003).

Elas podem reduzir o crescimento inicial e depois inibi-lo além de provocar perda da biodiversidade por sombreamento, levando a exposição do solo e conseqüentemente assoreamento de cursos d'água. (LEÃO; ALMEIDA, 2009). Diversas aplicações biotecnológicas estão associadas ao nim. Como árvore, essa planta é usada para arborização de ruas e praças, ou para sombra em torno das casas e no pasto. A madeira é resistente a cupins e pode ser explorada comercialmente. Das folhas, sementes e cascas pode-se extrair uma quantidade de compostos bioativos, tais como metabolitos secundários, tendo terpenóides como um de seus principais componentes. Além desses, tecidos e órgãos de nim podem ser usados em preparações de extratos aquosos ou alcoólicos, os quais têm sido utilizados como repelentes, inseticidas (GOVINDACHARI; GOPALAKRISHNAN; SURESH, 1999). Aplicações de biocompostos extraídos de nim na saúde humana também incluem antimicrobianos, anti-inflamatórios, no tratamento de hipertensão e febre.

Em virtude da importância de viroses causadoras de doenças em plantas e em

humanos, a planta nim tem sido estudada também quanto às suas propriedades antivirais, direcionados para o combate à Dengue e a recente Chikungunya, tanto pelo controle do mosquito vetor (*Aedes Aegypti*) (MUKESH *et al.*, 2014), quanto pela busca por moléculas capazes de inativar proteínas virais e fúngicas fundamentais para sua proliferação no hospedeiro (OLIVEIRA; GOMES, 2016). Entretanto, novos estudos envolvendo aplicações biotecnológicas mediadas pela planta nim requerem um conhecimento prévio sobre as tendências das tecnologias já patenteadas, visando não repetir tecnologias já protegidas e fundamentar novas tecnologias, seja por invenção ou por inovação.

3.4 Azadiractina

Os componentes químicos contidos na planta nim, presente na semente do fruto, apresentam alto potencial de ação contra diversos sistemas biológicos. Os compostos que possuem esta característica são os limonóides, substâncias amargas, conhecidas como meliacinas ou tetranotriterpenóides (ALVES *et al.*, 2009). Considera-se que em volta de 550 espécies de insetos artrópodes apresentam alguma sensibilidade a estes compostos (MORGAN, 2009).

A azadiractina é caracterizada como uma substância não volátil, altamente polar, solúvel em solventes polares (metanol e etanol) e ligeiramente solúvel em água (MORGAN, 2009). Essa proteína vem sendo muito estudada para detectar seu modo de ação, e cuidados com a toxicidade. Além de insetos, esse princípio ativo pode influenciar outros organismos como nematoides, caramujos, crustáceos, fungos, viroses de planta e estimular em aproximadamente 25% no aumento de minhocas, melhorando o solo (PRAKASH; BHOJWANI; SRIVASTAVA, 2002).

De acordo com Morgan (2009), a azadiractina expressa a função de biopesticida, pois a mesma possui a capacidade de regular o crescimento de insetos e artrópodes. Seu princípio ativo afeta na síntese de RNA e no metabolismo dos hormônios cerebrais das pragas agrícolas. Prakash, Bhojwani e Shrivastava (2002) atribuíram outros efeitos sobre pragas como: regulação de crescimento, efeito antialimentar, repelência ao depositar ovos, interações nas funções bioquímicas e fisiológicas, até a morte.

Azadiractina também possui atividade antifúngica, com potencial controle de fitopatógeno indicando assim a presença de componentes com características elicitoras, ou seja, são compostos que atuam na defesa contra predadores e infecções. Na ação fungitóxica direta ocorre a inibição do crescimento micelial e a germinação de esporos

tal como a capacidade de indução do acúmulo de fitoalexinas (HASHMAT; AZAD; AHMED, 2012; DHRA *et al.*, 2018). No entanto, ainda permanece desconhecido qual o modo de ação ao nível molecular e celular e propriedades estruturais da molécula de azadiractina, sendo, portanto, necessário estudos computacionais por técnicas modernas de interação molecular.

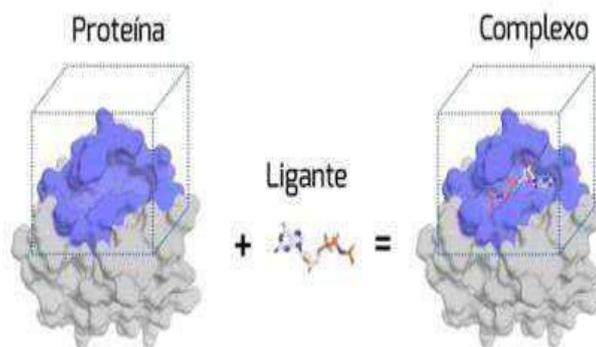
Fitoalexinas são metabólitos secundários, que possuem como características um baixo peso molecular e que são produzidos por plantas em resposta a estresses físicos, químicos e biológicos, sendo assim altamente competentes para inibir a atividade patogênica. Quando se trata de fungos, o modo de ação inclui a granulação citoplasmática, desorganização celular, ruptura de membrana plasmática, inibição de enzimas fúngicas, causando a inibição da germinação e redução ou inibição de crescimento micelial, germinação e alongamento do tubo germinativo (CARVALHO, 2010; STANGARLIN *et al.*, 1999).

3.5 Acoplamento *in silico* de receptor-ligante

Segundo Rodrigues *et al.* (2012), a técnica de *Docking* Molecular se mostra como sendo uma das ferramentas da bioinformática que surgem como uma alternativa promissora para o aprimoramento farmacológico, e tem se mostrado de suma importância no que tange o uso de recursos computacionais. Essas ferramentas têm como propósito contribuir no avanço das pesquisas, problemas e empasses biológicos, envolvendo também aplicações que se relacionam diretamente com a saúde humana e com o planejamento de novos medicamentos (MORGON; COUTINHO, 2007).

Conhecido como atracamento molecular ou ancoragem molecular, a técnica trata-se um experimento *in silico* (computacional) que tem como objetivo simular a interatividade entre duas moléculas, sendo assim capaz de gerar complexos proteína-ligante ou ainda proteína-proteína como aponta Verli (2014). O modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer, em 1894, serviu como base para diversas metodologias de *docking*. Neste modelo, o receptor (comumente uma proteína) pode ser comparado a uma “fechadura”, seu sítio de ligação com o “buraco da fechadura” e o ligante como uma possível “chave”, como é visto na figura 1 a seguir.

Figura 1. Representação da formação do complexo proteína-ligante no *docking* molecular.



Fonte: VERLI (2014).

A complementaridade das características físico-químicas e estruturais das moléculas interagentes no processo são tidas como a chave para reconhecimento molecular. Essas características físico-químicas determinam o nível de afinidade e de especificidade do ligante frente à proteína, e estão associados com as interações intermoleculares presentes no complexo. Estas interações compreendem as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals, interações provenientes do efeito hidrofóbico, além de interações eletrostáticas e as ligações covalentes que possam ser geradas no decorrer do processo de interação receptor-ligante.

As propriedades estruturais, no que lhe diz respeito, estão ligadas aos arranjos espaciais moleculares, dados por variações na orientação, posicionamento espacial e rotações de ligações químicas das moléculas interagentes (VERLI, 2014). Deste modo, diante do contexto apresentado, a técnica de *docking* representa uma possibilidade competente, rápida e de baixo custo para o estudo inicial da molécula azadiractina frente à proteína DHFR.

4 METODOLOGIA

4.1 Refinamento do modelo

Para otimização da geometria e das condições termodinâmicas locais e global do modelo obtido, a estrutura foi submetida à uma minimização de energia. A minimização de energia é uma técnica na qual por meio de algoritmos e métodos computacionais busca-se a conformação com menor perturbação entrópica dentre as possíveis variações conformacionais da estrutura inicialmente submetida minimização. Para a minimização de energia do modelo proposto foi utilizado o servidor CHIRON (<http://troll.med.unc.edu/chiron/login.php>) (RAMACHANDRAN *et al.*, 2010; KOTA *et al.*, 2011). O modelo final foi então validado com a utilização de ferramentas de avaliação da qualidade estrutural.

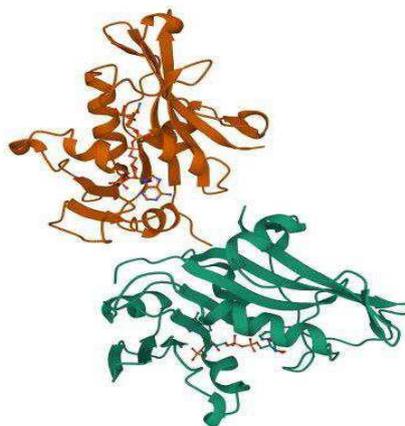
4.2 Validação do modelo

A estrutura tridimensional refinada teve sua qualidade estereoquímica validada pelo diagrama de Ramachandran, o qual foi obtido através do PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

4.3 Estrutura da proteína diidrofolato redutase

As coordenadas atômicas para a enzima dihydrofolatereductase (DHFR) de *Cândida albicans* foram obtidas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) através do código de acesso “1AI9” (WHITLOW *et al.*, 1997). Vale ressaltar que o artigo que disponibilizou a estrutura apontava que a DHFR é uma enzima pequena, de aproximadamente 20 KDa e constituída por 192 resíduos.

Figura 2. Imagem da estrutura tridimensional da enzima dihydrofolate reductase (DHFR), indicando as duas cadeias polipeptídicas, complexada com a co-enzima NADPH em cada uma delas.

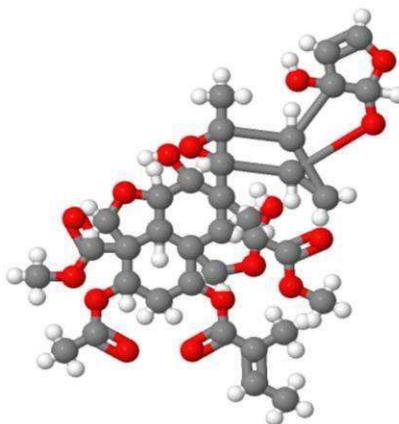


Fonte: (<https://www.rcsb.org/>)

4.4 Estrutura do ligante

A azadiractina é um tetranortriterpenóide da classe dos limonóides, com fórmula química $C_{35}H_{44}O_{16}$, que é extraído das sementes de nim, encontrando-se intimamente relacionado com outros compostos extraídos das mesmas, nomeadamente, nimbin e salanin (MORGAN, 2009, PRAKASH; BHOJWANI; SRIVASTAVA, 2002). Apresenta uma estrutura extremamente complexa, da qual fazem parte dezesseis centros estéricos (sete quaternários e nove secundários), dezesseis átomos de oxigênio organizados em quatro grupos éster, dois grupos hidroxila, um hemiacetal, um epóxido e um grupo dihidrofurano (CASTRO *et al.*, 2014; MORGAN, 2009).

Figura 3. Visualização da estrutura tridimensional da molécula da azadiractina.



Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 2022.

4.5 Preparo dos alvos biológicos (Edição de arquivos PDB)

É importante ressaltar que os arquivos obtidos no *Protein Data Bank* (PDB) não estão prontos para o processo de ancoragem, pois geralmente apresentam problemas potenciais em sua estrutura, tais como: átomos ausentes, resíduos de água, quebras de correntes e etc. Diante disto, a molécula foi submetida a um processo de correção, onde foram removidos os resíduos de água, adicionados átomos de hidrogênio e respectivos átomos de acordo com a biblioteca do programa. Feito isso, a proteína foi salva em extensão “.pdbqt”.

Para o preparo das moléculas dos ligantes a serem ancorados, foi adotado o mesmo procedimento que foi utilizado para o alvo biológico, salvando também em extensão “.pdbqt”.

4.6 Pré-Ancoragem usando o programa *Autogrid*

Nesta fase, também chamada de pré-ancoragem foi preparado o sistema para realização dos experimentos de ancoragem (MORRIS *et al.*, 2009). Os hidrogênios polares foram adicionados e as cargas de Gasteiger de cada átomo do sistema foram calculadas. A caixa de interação foi definida no software *Autogrid*, sendo de tamanho 126Åx126Åx126Å (direções x, y e z), mapeando energias de interação para diversos tipos de átomos dos ligantes com o sítio ativo da macromolécula (proteína). O tamanho escolhido foi suficiente para envolver todos os aminoácidos do sítio ativo e adjacentes, juntamente com o ligante. Estes mapas foram utilizados posteriormente pelo programa *AutoDock* para a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante.

4.7 Docking molecular

Esta fase foi a responsável por reunir todos os arquivos obtidos nos passos anteriores e realizar a ancoragem propriamente dita (MORRIS *et al.*, 2009). Além da ancoragem, o *Autodock* calculou a energia livre de ligação de cada posição do ligante com a macromolécula, a partir dos mapas que foram gerados na fase *Autogrid*. Para o procedimento foi realizada a ancoragem rígida para o receptor e flexível para o ligante, e aplicado o algoritmo Lamarckian GA, no qual um algoritmo genético tradicional é usado para busca conformacional global, combinado com o algoritmo de busca conformacional local (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997).

Dentre os complexos gerados a partir da ancoragem, foram selecionados aqueles

com melhores conformações e valores de energia, e suas estruturas tridimensionais salvas em formato PDB. Essas escolhas levaram em consideração os menores valores de energia livre de ligação, e energia intermolecular por serem as mais prováveis para justificar a interação proteína-ligante.

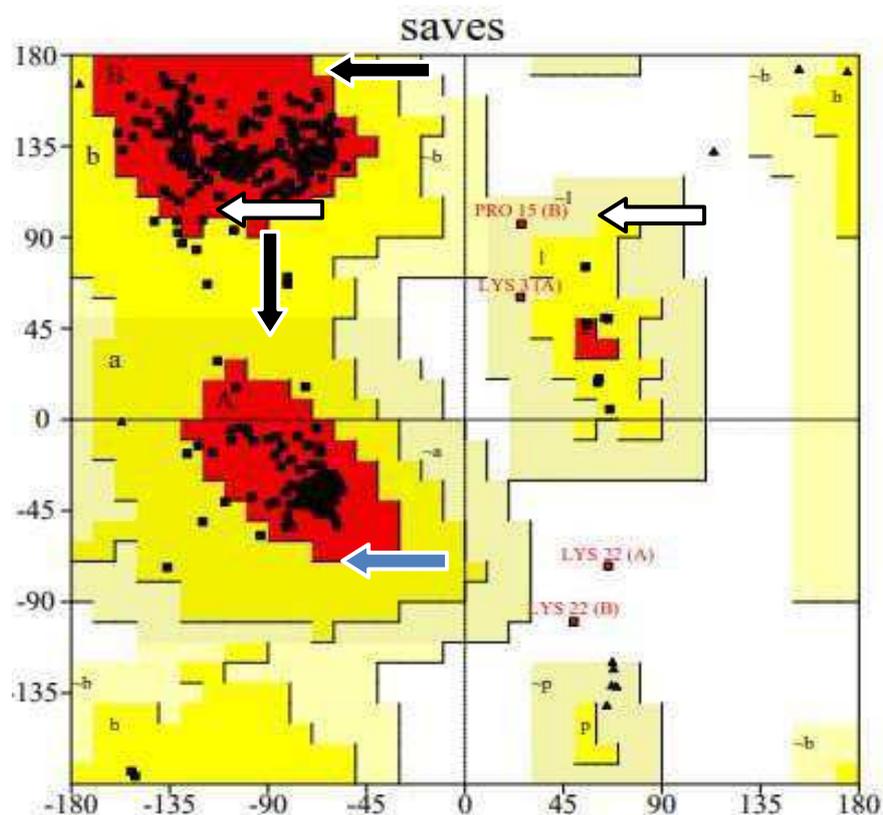
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 validação do modelo 3D da DHFR

Para ter certeza de que a molécula se encontra em condições adequadas ao docking, modelo da enzima DHFR foi submetido à análise de qualidade. Foi feita uma análise da proteína no software Procheck (disponível em: <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>), por meio do gráfico de Ramachandran. A distribuição dos resíduos pode ser vista no gráfico de Ramachandran (figura 4), e os valores para cada região do gráfico estão dispostos na tabela 2.

O gráfico de Ramachandran é provavelmente a ferramenta mais importante na determinação da qualidade da proteína, pois aponta a existência de impedimentos estereoquímicos na cadeia principal dos aminoácidos. (LASKOWSKI *et al.*, 1996). Para ser considerado um bom modelo, o resultado do gráfico de Ramachandran deve apresentar, na região mais favorável (A, B e L), mais de 90% dos resíduos, desconsiderando os resíduos das extremidades que apresentam padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos. (LASKOWSKI *et al.*, 1993). Dos aminoácidos correspondentes à proteína, a maioria estiveram na região com valores de angulação mais favoráveis, e a região preferencial. Isto sugere a boa qualidade de predição dos modelos, através do software utilizado, e maior confiabilidade dos dados obtidos *in silico*.

Figura 4. Gráfico de Ramachandran da enzima DHFR. A seta preta indica os resíduos localizados na região mais favorável (vermelho), a seta branca corresponde aos resíduos localizados na região adicional mais permissiva (amarelo) e a seta azul aponta para a região não permissiva (bege).



Fonte: Gerado pelo Procheck

Tabela 1. Resultados do gráfico de Ramachandran da proteína DHFR.

Regiões	Siglas	Nº de resíduos	%
Mais favoráveis	[A,B,L]	317	92.7%
Adicionais Mais permissivas	[a,b,l,p]	22	6.4%
Permissivas	[~a,~b,~l,~p]	1	0.3%
Não Permissivas	[XX]	2	0.6%

Fonte: Gerado pelo Procheck

5.2 Cálculos energéticos obtidos na ancoragem molecular entre a DHFR e azadiractina

Os melhores complexos gerados a partir do *docking* molecular entre a proteína diidrofolato redutase (DHFR) e o metabólito azadiractina foram ranqueados na ordem dos complexos gerados pelo Programa Autodock, de acordo com os cálculos energéticos (Tabela 2). Os dados estimados nos cálculos revelaram valores expressivamente negativos, que para a energia livre de ligação variaram de -1.21 kcal/mol, no complexo 1, a -1.45 kcal/mol, no complexo 10, enquanto que para a energia intermolecular variaram de -5.08 a -9.43. De acordo com Braz (2016) estes valores indicam que todas as conformações são termodinamicamente favoráveis à ocorrência das moléculas em um complexo do que separadas uma das outras. Em sequência, as constantes de inibição Ki variaram de 80,35 uM a 894,54 µM.

Tabela 2: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre diidrofolato redutase e o metabólito azadiractina.

Complexos	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	KI
1	-1.21	-5.08	103.53 µM
2	-3.2	-7.07	110.75 µM
3	-3.98	-7.86	133.63 µM
4	-4.01	-7.89	187.96 µM
5	-2.34	-6.22	682.51 µM
6	-5.55	-9.43	894.54 µM
7	-3.17	-7.05	977,36 µM
8	-4.2	-8.08	333,10 µM
9	-3.47	-7.35	194,77 µM
10	-1.45	-5.32	80,35 µM

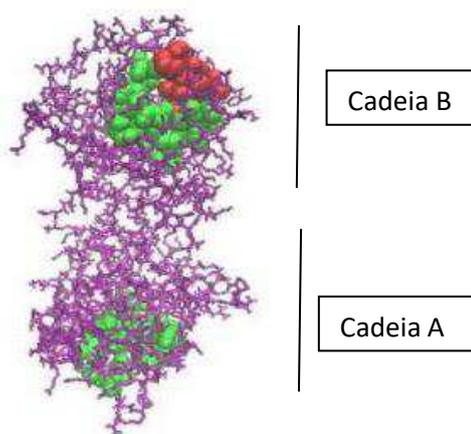
Fonte – Autoria própria a partir do *Autodock4*.

5.3 Interação intermolecular entre os aminoácidos da enzima DHFR e azadiractina

A interação intermolecular entre os aminoácidos da enzima DHFR e o ligante azadiractina foi estudada para o complexo 8 da Tabela 1, selecionado por apresentar valores energéticos de ligação e intermolecular, -4.2 e -8.08, respectivamente, que sugerem uma conformação de maior acoplamento na receptor-ligante. A análise da distância de acoplamento tridimensional entre as moléculas interagentes revelou que o complexo 8

apresentou a menor distância entre as conformações (1,76 Å). Na Figura 5 é possível observar a visão geral do docking, onde o ligante azadiractina em vermelho encontra-se ancorado em uma das cadeias da proteína (cadeia B).

Figura 5: Imagem representativa do docking molecular gerado pelo Autodock4, evidenciando o local de ancoragem da azadiractina (em vermelho) em uma das cadeias da Holoenzima DHFR (lilás), no sítio ativo que fica próximo do sítio da co-enzima NADPH (verde). O complexo teve uma distância de 1,76 Å.

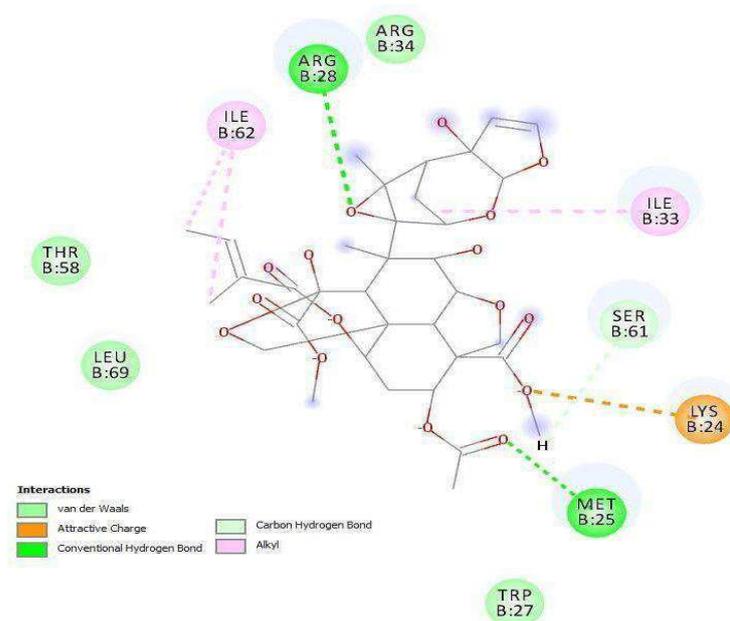


Fonte: Autoria própria a partir do software Autodock4.

Expandindo essa visão, na Figura 6 é possível visualizar a representação bidimensional das interações intermoleculares do complexo 8, evidenciando a estrutura do ligante azadiractina e todos os principais aminoácidos interagentes do local de ligação na enzima DHFR de *C. albicans*.

As interações intermoleculares demonstradas na Figura 6, os aminoácidos interagentes da DHFR de *C. albicans* que são os responsáveis pela ótima interação do sistema enzima-azadiractina estão ligados por relação às ligações dos aminoácidos presentes no sítio da proteína, temos: forças de Van der Waals, atração de cargas, ligação hidrogênio-carbono, ligações convencionais de hidrogênio e ligações alquil.

Figura 6. Representação 2D das interações intermoleculares entre a molécula ligante azadiractina e os principais aminoácidos interagentes do local de ligação na enzima DHFR, obtida do software DS Visualizer (2014).



Fonte: Autores a partir do Software Biovia Discovery Studio Visualizer (2014).

Os resíduos THR58, LEU69, TRP27 e ARG34 apresentaram contatos próximos com o ligante azadiractina, por meio de forças de Van der Waals, indicando maior afinidade na cavidade hidrofóbica. Ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals são interações não iônicas, consideravelmente fracas, não influenciando na interação como um todo, mas que são importantes para aumentar a superfície de contato do acoplamento no sistema.

O resíduo LYS24 encontra-se ligado a azadiractina por uma ligação de atração de cargas, enquanto que os resíduos ILE33 e ILE62 estão ligados por ligações alquílicas. Além disso, ligações de hidrogênio foram encontradas com a ARG28 e MET25, enquanto que a azadiractina se ligou covalentemente ao resíduo SER61 da DHFR de *C. albicans*, numa ligação hidrogênio-carbono.

Essa demonstração de uma interação direta com o sítio ativo da DHFR por meio de ligações covalentes com a SER61, além da energia livre de ligação favorável, indicam uma alta taxa de negatividade, atingindo -1.21 kcal/mol, o que mostra menor perda de energia na união dessas moléculas. Para este complexo escolhido (complexo 8), uma vez que os valores da constante de inibição apontam uma baixa inibição do ligante

azadiractina, atingindo até 80 μM , embora esteja se ligando covalentemente ao sítio ativo da proteína. A literatura aponta que, valores abaixo de 50 μM a ancoragem já causa disfuncionalidade na proteína, em outras palavras, o ligante em questão consegue interferir diretamente na funcionalidade da proteína (MAIA, 2013), não sendo este o caso do complexo 8. Logo, é possível apontar um ponto positivo que a molécula da azadiractina possui, leva-se em consideração a interação ao sítio ativo, sendo estes resultados um ponto que deve ser explorado para melhores entendimentos a cerca desta interação azadiractina-DHFR.

Essa hipótese também está suportada pela demonstração de Whitlow *et al.* (1997), em que dentre os 12 aminoácidos que compõem o sítio ativo da DHFR, 09 resíduos são conservados idênticos tanto na DHFR de humanos quanto na de *C. albicans* (Ile7/Ile9, Glu30/Glu32, Phe34/Phe36, Met52/Met54, Thr56/Thr58, Ser59/Ser61, Ile60/Ile62, Leu67/Leu69 e Arg70/Arg72), enquanto que somente 03 são homólogos (humanos/*C. albicans*: Leu22/Met25, Phe31/Ile33; Val115/Ile112).

Analisando os 10 aminoácidos demonstrados a partir da Figura 5, 06 resíduos da DHFR de *C. albicans* estão interagindo com a azadiractina como resíduos âncora do sítio ativo. São eles: Ser61, Met25, Ile33, Thr58, Ile62 e Leu69. Uma vez que 04 dos resíduos, âncora interagentes são conservados dentro do sítio ativo que se liga a DHF, na enzima DHFR de *C. albicans*, esta evidência sugere que a azadiractina deve desempenhar função biológica nesse sistema, certamente se tem uma ação inibitória da azadiractina, por interagir com o sítio ativo da DHFR, mas levando em consideração os valores de inibição, considerasse que a molécula é um inibidor fraco.

A inibição no sítio de ligação da primeira proteína a ser convertida na via do folato, conseqüentemente impedirá a sua conversão em THF, que é a forma ativa do folato. Especula-se que este potencial inibitório nesta via metabólica do folato deva impactar diversos efeitos fisiológicos advindos dos produtos da via: a biossíntese do DNA, a divisão celular, o metabolismo de aminoácidos, interferindo na síntese de proteínas importantes como neurotransmissores, na expressão gênica e no crescimento, entre outros. Por esta razão, a via do folato é de grande importância clínica.

Estudos sobre os efeitos fisiológicos da azadiractina sobre insetos estão mais avançados, revelando uma ou mais vias metabólicas que envolvem inibição do crescimento e desenvolvimento, aumentada taxa de mortalidade, efeitos diretos e

indiretos sob células e tecidos, incluindo o sistema endócrino. Neste sentido, os efeitos estimados por esta via do folato parecem seguir nesta mesma direção.

A busca por inibidores capazes de se ligarem a DHFR mutadas, onde o fungo *C. albicans* apresenta resistência aos fármacos, levou a uma análise cristalográfica por raios X dos inibidores da 5-(4'-fenil)sulfanil-2,4-diaminoquinazolina no complexo ternário com DHFR de *C. albicans*/NADPH (WHITLOW *et al.*, 1997). Os autores revelaram dois modos distintos de ligação quando verificaram que os ligantes se ligam com o grupo fenilo orientada no plano do sistema de anel de quinazolina e posicionado adjacente à hélice-C. Em contraste, os inibidores mais seletivos com substituintes 4' maiores (terc-butil e N-morfolino) foram ligados à enzima com o grupo fenil perpendicular ao anel da quinazolina e posicionados na região do domínio de ligação a adenosina que tipicamente liga a porção do NADPH (WHITLOW *et al.*, 1997). Aqui, nós mostramos que a azadiractina se liga bem acoplada dentro do sítio ativo, por várias ligações intermoleculares, incluindo ligação covalente, em 06 dos 12 aminoácidos descritos para o sítio ativo da DHFR de *C. albicans*.

O desenvolvimento e estudo das técnicas computacionais como o *docking* molecular vem se demonstrando, ao longo dos anos, como importantes aliados nas pesquisas bioquímicas e farmacêuticas. Ao decorrer do tempo a farmacologia esteve ligada apenas às análises experimentais para a viabilização de fármacos, demandando alto custo e grande quantidade de tempo. Hoje por meio de técnicas computacionais se tornou possível o avanço em diversas etapas para a indústria farmacêutica, desde a predição de novas moléculas até a elucidação de novos comportamentos frente a novos alvos propostos. O conhecimento de interação especializada entre a proteína e o ligante são fundamentais para o estudo comportamental de seu sítio ativo e interação química.

Com a análise da interação molecular feita através do *docking* foi possível constatar a interação direta da azadiractina com o sítio da proteína, apesar do mesmo possuir uma baixa inibição como aponta os valores de KI. Essa análise consente com a literatura, sendo a azadiractina um metabólito que apresenta uma imensa variedade de atividades biológicas, incluindo suas propriedades antifúngicas, mas que carece de estudos mais aprofundados para o melhor entendimento desta interação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ganhos deste trabalho foram demonstrar uma potencial aplicação biotecnológica para a molécula azadiractina da planta nim como um possível inibidor antifúngico para *Candida albicans* e um potencial modo de ação antifúngico da azadiractina por ligação ao sítio ativo da enzima diidrofolato redutase DHFR, por meio de ferramentas computacionais. Estes estudos podem ser a constituição inicial para futuras pesquisas que demonstrem com clareza o quão impactante é esta interação frente à ação do metabólito azadiractina por experimentos *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-FATTANI, Mohammed A.; DOUGLAS, L. Julia. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 8, p. 999-1008, 1 ago. 2006. DOI: <https://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>.

ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 319-327, out. 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442007000500004>.

ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 319-327, out. 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442007000500004>.

ALVES, Priscila D. *et al.* Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 510-515, jun. 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000400001>.

ANDRICOPULO, Adriano; SALUM, Livia; ABRAHAM, Donald. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 771-790, 1 jun. 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.2174/156802609789207127>.

BANERJEE, D. *et al.* Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review. **Acta Biochim Pol**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 457-464, 1995.

BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 22-38, fev. 2010.

BARBEDO, Leonardo S; SGARBI, Diana BG. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BERMAN, Judith; KRYSAN, Damian J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 319-331, 11 fev. 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.

BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. 2014. Disponível em: <http://accelrys.com/products/datasheets/discovery-studio-visualizer.pdf>. Acesso em: jul de 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a diversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF, 2003.

BRAZ, Luana Camilla Cordeiro. **Investigação in silico da interação do monoterpeno 4-terpineol com o receptor GABA A**. 84 f. Monografia (Graduação) – Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2016.

BRUEL, Betina Ortiz. **Restauração da floresta atlântica no litoral do Paraná: avaliação de dois sistemas de plantio e da regeneração natural**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CALDERONE, Richard *et al.* Antifungal drug discovery: the process and outcomes. **Future Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 791-805, jun. 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.32>.

CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 133, p. 86-96, jun. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>.

CASTRO, Elton A. S. de *et al.* Structure and electronic properties of azadirachtin. **Journal Of Molecular Modeling**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 1-7, fev. 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00894-014-2084-0>.

CHANG, Ya-Lin *et al.* New facets of antifungal therapy. **Virulence**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 222-236, 7 nov. 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1257457>.

CHEN, Sharon C.-A.; SLAVIN, Monica A.; SORRELL, Tania C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. **Drugs**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 11-41, jan. 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.2165/11585270-000000000-00000>.

CHIBBER, Sandesh *et al.* In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 104, n. 3, p. 387-393, set. 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.04.005>.

CHITTY, Jessica; FRASER, James. Purine Acquisition and Synthesis by Human Fungal Pathogens. **Microorganisms**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 33-48, 8 jun. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/microorganisms5020033>.

COHEN, B. Eleazar. Amphotericin B Membrane Action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. **The Journal Of Membrane Biology**, [S.L.], v. 238, n. 1-3, p. 1-20, 18 nov. 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00232-010-9313-y>.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 599-607, out. 2003. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822003000500010>.

DOI, André Mario *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-9, 25 jan. 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>.

EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 396-404, 1997. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)77022-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8).

EMRI, Tamás *et al.* Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 97, n. 8, p. 3267-3284, 6 mar. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4761-9>.

ENGELKING, Larry R. **Textbook of Veterinary Physiological Chemistry**. 3 ed. Elsevier: Kidlington, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66047-0>.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 623-633, 2 ago. 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

GOVINDACHARI, T. R.; GOPALAKRISHNAN, Geetha; SURESH, G. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 558-560, dez. 1999. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x\(99\)00087-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00087-8).

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 24-36, 1 jul. 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.19142/rpq.v2i4.66>.

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, [S.L.], v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300006>.

HANI, Umme *et al.* Candidiasis: a fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders - Drug Targets**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 42-52, 22 abr. 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.2174/1871526515666150320162036>.

HASHMAT, Imam; AZAD, Hussain; AHMED, Ajj. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: an overview. **International Research Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 1, n. 6, p. 76-79, out. 2012.

HELLSTEIN, John W.; MAREK, Cindy L. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. **Head And Neck Pathology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 25-32, 29 jan. 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6>.

KABIR, M. Anaul; HUSSAIN, Mohammad Asif; AHMAD, Zulfiqar. Candida albicans: a model organism for studying fungal pathogens. **Isrn Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-15, 29 set. 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.5402/2012/538694>.

KALMBACH, Renee D *et al.* Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 88, n. 3, p. 763-768, 1 set. 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/ajcn/88.3.763>.

KOO, Hyun *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 740-755, 25 set. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.

KOTA, Pradeep *et al.* Gaia: automated quality assessment of protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2209-2215, 23 jun. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr374>.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1 abr. 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.1107/s0021889892009944>.

LEÃO, Tarciso Cotrim Carneiro; ALMEIDA, Walkiria Rejane de. **Contextualização sobre espécies exóticas invasoras**. Recife: Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste, 2009.

LIMA-PALLONE, Juliana Azevedo; CATHARINO, Rodrigo Ramos; GODOY, Helena Teixeira. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 530-535, 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000300013>.

LU, Yang; SU, Chang; LIU, Haoping. Candida albicans hyphal initiation and elongation. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 707-714, dez. 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.001>.

MAIA, Rafael Trindade. **Análise in silico e polimorfismo genético das glutatona transferases da classe epsilon de anopheles gambiae (diptera: culicidae)**: possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos. 153 f. Tese (Doutorado) - Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MARIANO, Diego *et al.* **BIOINFO – Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, Lagoa Santa: Alfahelix, v. 1, 302 p., 2021. DOI: <https://doi.org/10.51780/978-6-599-275326>.

MARTINS, Natália *et al.* Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, [S.L.], v. 177, n. 5-6, p. 223-240, 1 maio 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>.

MONOD, M.; ZEPELIN, M. Borg-Von. Secreted Aspartic Proteases as Virulence Factors of *Candida* Species. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 383, n. 7-8, p. 1087-1093, 27 jan. 2002. DOI: <https://dx.doi.org/10.1515/bc.2002.117>.

MORDUE(LUNTZ), A. Jennifer; NISBET, Alasdair J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 615-632, dez. 2000. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s0301-80592000000400001>.

MORGAN, E. David. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 4096-4105, jun. 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.11.081>

MORGON, Nelson H.; COUTINHO, Kaline Rabelo. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. Editora Livraria da Física, 2007.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal Of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, dez. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>.

MUKESH, Y. *et al.* Studies on repellent activity of seed oils alone and in combination on mosquito, *Aedes aegypti*, **Journal of Environmental Biology**, v. 35, p. 917-922, 2014.

OLIVEIRA, Daniel A. de; GOMES, Yagly G. dos Santos. Geometria de equilíbrio da molécula de Azadirachtin através de métodos semiempíricos e Ab initio em comparação com os dados experimentais fornecidos pela difração de raios X. **Eclética Química**, v. 41, p. 94-100, 2016.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-10, 11 maio 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>.

PEIXOTO, Juliana Vieira *et al.* Candidíase: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, Cianorte, v. 8, n. 2, p. 75-82, ago. 2014.

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 383-392, dez. 2017. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30316-x](https://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30316-x).

PERLROTH, Joshua; CHOI, Bryan; SPELLBERG, Brad. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 321-346, jan. 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/13693780701218689>.

PIANALTO, Kaila; ALSPAUGH, J. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 2-26, 2 out. 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/jof2040026>.

POLSHAKOV, V. I. Dihydrofolate reductase: structural aspects of mechanisms of enzyme catalysis and inhibition. **Russian Chemical Bulletin**, [S.L.], v. 50, n. 10, p. 1733-1751, jan. 2001. DOI: <https://dx.doi.org/10.1023/a:1014313625350>.

PRAKASH, Gunjan; BHOJWANI, Sant S.; SRIVASTAVA, Ashok K. Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 185-193, ago. 2002. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/bf02932968>.

PRASAD, Rajendra; SHAH, Abdul Haseeb; RAWAL, Manpreet Kaur. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 327-349, 2016. DOI: https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_14.

RAMACHANDRAN, Srinivas *et al.* Automated minimization of steric clashes in protein structures. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 1, p. 261-270, 5 nov. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22879>.

RODRIGUES, Célia *et al.* Candida glabrata Biofilms: how far have we come?. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 11-41, 1 mar. 2017. MDPI AG. <https://dx.doi.org/10.3390/jof3010011>.

ROSSI, Tatiane de *et al.* Interações entre Candida albicans e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 15-28, 30 jul. 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n1p15>.

SANGLARD, D *et al.* Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 39, n. 11, p. 2378-2386, nov. 1995. DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/aac.39.11.2378>.

SCHOLL, Theresa O; JOHNSON, William G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 1295-1303, 1 maio 2000. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1295s>.

SERHAN, George *et al.* The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in Saccharomyces cerevisiae by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-4, 12 maio 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-13-18>.

SHENKIN, Alan; ROBERTS, Norman B. Vitaminas e elementos-traço. In: BURTINS, Carl A.; BRUNS, David E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7. ed., p. 895-983. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SHILS, Maurice E. *et al.* **Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 10 ed. São Paulo: Manole, 2009.

VANDEPUTTE, Patrick; FERRARI, Selene; COSTE, Alix T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-26, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2012/713687>.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse *et al.* Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Jddg: Journal der Deutschen**

Dermatologischen Gesellschaft, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 381-394, 29 abr. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/ddg.12097>.

VERLI, Hugo (org.). **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1 ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2014.

VILLAR, Cristina Cunha; KASHLEVA, Helena; DONGARI-BAGTZOGLOU, Anna. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. **Oral Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 262-269, ago. 2004. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00150.x>.

VUPPALA, Srimai *et al.* Structure-based lead optimization to improve the antifungal potency of the tetrahydroimidazo pyridine inhibitors targeted to *Candida albicans* dihydrofolate reductase and lanosterol 14-alpha-demethylase. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 1674-1682, 31 jul. 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00044-019-02404-7>.

WHITLOW, Marc *et al.* X-ray Crystallographic Studies of *Candida albicans* Dihydrofolate Reductase. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 272, n. 48, p. 30289-30298, nov. 1997. DOI: <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.48.30289>.

WOLYNES, Peter G. Evolution, energy landscapes and the paradoxes of protein folding. **Biochimie**, [S.L.], v. 119, p. 218-230, dez. 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.007>.

YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie *et al.* (org.). **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL/ Departamento de Microbiologia, 2015.

ZANNI, Pâmela Cristina Mastellaro Delvas *et al.* Virulence factors and genetic variability of vaginal *Candida albicans* isolates from HIV-infected women in the post-highly active antiretroviral era. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 1-10, 3 ago. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201759044>.

ZIARRUSTA, Gorka Barrenetxea. Vulvovaginitis candidiásica. **Rev Iberoam Micol**, Bilbao, v. 19, n. 1, p. 22-24, mar. 2002.