



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



TASSIANA BARBOSA DANTAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO TIMOL
SOBRE LINHAGENS DE *PENICILLIUM CITRINUM***

João Pessoa- PB

2017

TASSIANA BARBOSA DANTAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO TIMOL
SOBRE LINHAGENS DE *PENICILLIUM CITRINUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora

Prof^a Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa- PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192a Dantas, Tassiana Barbosa.

Avaliação da toxicidade e atividade antifúngica in vitro do timol sobre linhagens de *Penicillium citrinum*
/ Tassiana Barbosa Dantas. - João Pessoa, 2017.
134 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

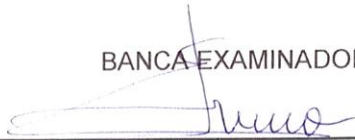
1. Farmacologia. 2. Produtos naturais. 3. *Penicillium*.
4. Atividade antifúngica. I. Lima, Edeltrudes de
Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

TASSIANA BARBOSA DANTAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO TIMOL
SOBRE LINHAGENS DE *PENICILLIUM CITRINUM***

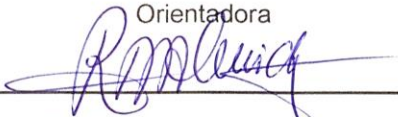
BANCA EXAMINADORA



Prof.^ª. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

(Universidade Federal da Paraíba)

Orientadora



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno

Prof.^ª. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Externo



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Externo

Aos meus pais. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, pelo dom da vida;

Aos meus pais, por sempre me guiarem pelos bons caminhos, com amor e dedicação. Aos meus familiares, por tornarem a vida mais fácil e alegre. Aos meus amigos, almas afins que docemente me acompanham nas lutas diárias;

À Prof.^a Dra Edeltrudes de Oliveira Lima, pelo apoio, pela orientação atenciosa e dedicada e por doar, tão gentilmente, seus conhecimentos àqueles que querem trilhar seus caminhos;

A toda equipe do Laboratório de Micologia, em especial à Professora Edeltrudes de Oliveira Lima, à aluna Daniele de Figueredo Silva e ao aluno Sávio Benvindo Ferreira, pela ajuda e convívio;

Ao Prof. Dr. Abrahão Oliveira, por suas sugestões e colaboração inestimável;

Aos amigos do Programa de Pós-graduação Carol, Danilo, Paula, Sávio e Thamara, por tornarem tudo mais leve e divertido, bem como aos colegas de turma, pela boa convivência e momentos agradáveis;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e da Universidade Federal da Paraíba, pelos ricos ensinamentos, em especial à Professora Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa e ao Prof. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos, por tão gentilmente me receberem em seus Laboratórios;

Às secretárias do Programa, Caroline Manguiera e Nilmar, pela presteza, gentileza e prontidão;

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Centro de Ciências da Saúde e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela oportunidade de realização deste curso;

A todos que, mesmo não tendo sido citados, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

DANTAS, T.B. Avaliação da toxicidade e atividade antifúngica *in vitro* do timol sobre linhagens de *Penicillium citrinum*. 134p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos- Área de Concentração: Farmacologia)- CCS/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

Fungos do gênero *Penicillium* podem ser encontrados nos mais variados substratos e afetam indivíduos imunocomprometidos, pacientes hospitalizados, animais e plantas diversas, além de comprometerem a qualidade do ar de ambientes internos. O uso indiscriminado de antibióticos e o decorrente quadro de resistência dos micro-organismos à terapêutica antimicrobiana convencional vêm impulsionando os pesquisadores a buscar fontes alternativas de compostos antimicrobianos, dentre elas as plantas medicinais e seus fitoconstituintes. É conhecido, também, que os produtos naturais não são livres da possibilidade de efeitos tóxicos ou adversos e, portanto, é de fundamental importância estudar sua toxicidade. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a atividade antifúngica *in vitro* de sete fitoconstituintes (geraniol, timol, carvacrol, citral, r-citronelal, s-citronelal, 7-hidróxi-citronelal, citronelal e isoeugenol) sobre doze linhagens de *Penicillium citrinum*, por meio do teste de microdiluição, selecionando-se o que apresentou melhor atividade para o prosseguimento dos testes. Para a realização dos estudos de atividade antioxidante e citotoxicidade foram utilizadas hemácias humanas obtidas do banco de sangue do Hospital Universitário Lauro Wanderley. O estudo da embriotoxicidade utilizou células embrionárias de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*). Verificou-se que o timol apresentou a melhor atividade biológica dentre os fitoconstituintes testados, inibindo o crescimento de 100% das linhagens na concentração de 64 µg/mL (CIM) e apresentando atividade do tipo fungicida para 50% das linhagens. O ácido peracético apresentou atividade antifúngica apenas na concentração correspondente ao alto nível de desinfecção proposto pelo fabricante, com CIM de 10.000 µg/mL. O antifúngico padrão apresentou CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ correspondente a 256 µg/mL. O timol apresentou valores de CFM semelhante aos valores da CIM para 1/4 das linhagens, enquanto o voriconazol, para 1/6 das linhagens. O efeito antifúngico do timol e do sanitizante controle não se deu pela desestabilização da parede celular ou pela complexação com o ergosterol da membrana plasmática. Não foram encontrados aditividade, sinergismo ou antagonismo resultantes da associação timol-voriconazol, avaliada pelo método de *checkerboard*. O timol demonstrou, por meio da análise *in silico*, boa biodisponibilidade oral e não apresentou efeitos mutagênico, tumorigênico ou reprodutivo. Estes dados foram confirmados pelas análises de toxicidade *in vitro*, as quais revelaram: baixa citotoxicidade frente a eritrócitos, com valores de hemólise apenas para o tipo sanguíneo O e abaixo dos 5%; diminuição dos danos eritrocitários causados pelo estresse osmótico; atividade antioxidante significativa para os tipos sanguíneos B e O; além de ausência de atividade antimutagênica em células embrionárias de ouriço-do-mar. Estes resultados sugerem que o timol representa uma nova e promissora possibilidade entre os produtos com atividade antifúngica contra *Penicillium citrinum*, além de apresentar atividade antioxidante significativa e algum grau de proteção de eritrócitos frente ao estresse osmótico.

Palavras-chave: Timol; *Penicillium citrinum*; Atividade Antifúngica; Citotoxicidade; Desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

DANTAS, T.B. Evaluation of toxicity and *in vitro* antifungal activity of thymol on *Penicillium citrinum* strains. 134p. Thesis (Doctoral Degree in Natural and Synthetic Bioactive Products - Concentration Area: Pharmacology) - CCS / Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2017.

Fungi of the genus *Penicillium* can be found in various substrates and affect immunocompromised people, hospitalized patients, many animals and plants, as well as compromise the quality of air indoors. The indiscriminate use of antibiotics and the resulting framework of resistance of microorganisms to conventional antimicrobial therapy has been stimulating researchers to seek alternative sources of antimicrobial compounds, among them the medicinal plants and their phytochemicals. It is also known that natural products are not free from the possibility of toxic or adverse effects and, therefore, study their toxicity is fundamental. In this context, the present study evaluated the *in vitro* antifungal activity of seven phytochemicals (geraniol, thymol, carvacrol, citral, r-citronellal, s-citronellal, 7-hydroxy-citronellal, citronellal and isoeugenol) on 12 strains of *Penicillium citrinum*, by microdilution test, selecting the one that presented the best activity for the continuation of the tests. For the accomplishment of antioxidant activity and cytotoxicity studies human red blood cells obtained from the blood bank of the Lauro Wanderley University Hospital were used. The embryotoxicity study used embryonic cells of sea urchin (*Echinometra lucunter*). It was verified that thymol presented the best biological activity among the phytochemicals tested, inhibiting the growth of 100% of the strains at the concentration of 64 µg / mL (MIC) and showing fungicidal activity for 50% of the strains. The peracetic acid presented antifungal activity only in the concentration corresponding to the high level of disinfection proposed by the manufacturer, with MIC of 10,000 µg / mL. The antifungal standard presented MIC₅₀ of 8 µg / mL and MIC₉₀ corresponding to 256 µg / mL. Thymol presented CFM values similar to the MIC values for 1/4 of the strains, while voriconazole showed it for 1/6 of the strains. The antifungal effect of thymol and the control sanitizer was not due to the destabilization of the cell wall or to the complexation with the ergosterol of the plasma membrane. No additivity, synergism or antagonism were found resulting from the combination of thymol-voriconazole, evaluated by the checkerboard method. Thymol showed good oral bioavailability and showed no mutagenic, tumorigenic or reproductive effects through *in silico* analysis. These data were confirmed by *in vitro* toxicity analyzes, which revealed: low erythrocyte cytotoxicity, with hemolysis values only for blood type O and below 5%; decreased erythrocyte damage caused by osmotic stress; significant antioxidant activity for B and O blood types; besides the absence of antimitotic activity in embryonic cells of sea urchin. These results suggest that thymol represents a new and promising possibility among products with antifungal activity against *Penicillium citrinum*, in addition to presenting significant antioxidant activity and some degree of protection of erythrocytes against osmotic stress.

Keywords: Thymol; *Penicillium citrinum*; Antifungal Activity; Cytotoxicity; Embryonic development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estruturas morfológicas e tipos de ramificação do conidióforo em <i>Penicillium</i> sp.....	21
Figura 2- Micrografia eletrônica de ramificações em <i>Penicillium</i> sp.....	22
Figura 3- Alvos de ação de drogas antifúngicas.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Resultados dos ensaios (n=3) de atividade antifúngica dos fitoconstituintes sobre linhagens de <i>P. citrinum</i> - Técnica de microdiluição.....	55
Tabela 2 – Média dos resultados de avaliação da CIM (n=3) de geraniol, timol, carvacrol e isoeugenol sobre linhagens de <i>P. citrinum</i>	56
Tabela 3 – Média dos resultados dos ensaios de CIM e CFM (n=3) de timol, voriconazol e PAC 200 sobre linhagens de <i>P. citrinum</i>	58
Tabela 4 – Razões CFM/CIM do timol e voriconazol contra linhagens de <i>P. citrinum</i>	65
Tabela 5- Efeito de timol e PAC 200® contra linhagens de <i>P. citrinum</i> na presença de sorbitol 0,8 mol/L.....	68
Tabela 6- Efeito de timol e PAC 200® contra linhagens de <i>P. citrinum</i> na presença de ergosterol 400 µg/mL.....	70
Tabela 7- Efeito de anfotericina B sobre linhagens de <i>P. citrinum</i> sem e com a adição de ergosterol 400 µg/mL.....	71
Tabela 8- Efeito da combinação do timol com o antifúngico padrão voriconazol contra linhagens de <i>P. citrinum</i>	75
Tabela 9 - Atividades previstas do timol para Pa > 70% através da ferramenta PASS <i>online</i>	78
Tabela 10- Análise teórica das propriedades físico-químicas do timol envolvidas na biodisponibilidade oral da droga após a "regra dos cinco de Lipinski".....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade do timol em eritrócitos humanos dos tipos A (a), B (b) e O (c).....	85
Gráfico 2. Atividade antihemolítica do timol sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl a 0,24%).....	87
Gráfico 3. Atividade antioxidante do timol frente à hemólise induzida por peróxido de hidrogênio nos tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c).....	90
Gráfico 4. Efeito do timol sobre primeira e segunda clivagens de células embrionárias de ouriço-do-mar.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Risco de toxicidade teórica de timol e voriconazol, pela ferramenta OSIRIS.....	81
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET- absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA/MS- Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

ASD- Ágar Sabouraud Dextrose

CBM- Concentração Bactericida Mínima

CCEN- Centro de Ciências Exatas e Naturais

CCS- Centro de Ciências da Saúde

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CIF- Concentração Inibitória Fracionada

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CIT- Citrinina

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CPA- ácido ciclopiazônico

CSD- Caldo Sabouraud Dextrose

DBM- Departamento de Biologia Molecular

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

FOE- Fragilidade Osmótica Eritrocitária

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

ICIF- Índice da concentração inibitória fracionada

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Índice Pa- probabilidade “de ser ativo”

Índice Pi- probabilidade “de ser inativo”

IPeFarM-UFPB- Laboratório de Análises Toxicológicas II do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB

LABID- Laboratório de Biologia do Desenvolvimento

MPA- Ácido micofenólico

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

nALH- número de aceptores de ligação hidrogênio

nDLH- número de grupos doadores de ligação hidrogênio

OMS- Organização Mundial de Saúde

OTA- Ocratoxina A

PASS *online*- Previsão do Espectro de Atividade para Substâncias

PAT- Patulina

pH- Potencial Hidrogeniônico

PIA- Ácido Penicílico

RQC- Roquefortina C

UFPB- Universidade Federal da Paraíba

VRE- Enterococcus resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Fungos, gênero <i>Penicillium</i> e infecções	19
2.2 Terapêutica antifúngica	25
2.3 Produtos naturais	30
2.4 Estudos de toxicidade	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Local da pesquisa	40
4.2 Posicionamento ético	40
4.3 Produtos naturais	40
4.4 Produtos-controle.....	41
4.5 Micro-organismos	42
4.6 Meios de cultura.....	42
4.7 Inóculo das espécies fúngicas	43
4.8 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	43
4.8.1 Triagem microbiológica.....	43
4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
4.8.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	46
4.9 Investigação do mecanismo de ação antifúngico	46
4.9.1 Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol.....	46
4.9.2 Ação dos produtos na membrana celular: interação com o ergosterol.....	47
4.10 Determinação do índice de concentração inibitória fracionada (pelo método de checkerboard) do timol associado com o voriconazol.....	47
4.11 Estudo <i>in silico</i>	48
4.11.1 PASS <i>online</i>	48
4.11.2 Análise teórica da toxicidade e dos parâmetros farmacocinéticos.....	49
4.12 Avaliação do efeito em eritrócitos humanos.	49
4.12.1 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos	49
4.12.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.....	50
4.12.3 Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.....	50
4.13 Avaliação do efeito embriotóxico dos fitoconstituintes.....	51
4.14 Análise estatística	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 Triagem microbiológica.....	54
5.2 Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	56
5.3 Ação do timol e pac200® na parede celular fúngica (ensaio com sorbitol).....	67
5.4 Interação do timol e pac 200® com o ergosterol.....	69
5.5 Índice de concentração inibitória fracionada (pelo método de checkerboard) do timol associado ao voriconazol.....	73
5.6 Estudos <i>in silico</i>	77
5.7 Efeito em eritrócitos humanos.....	84
4.12.1 Potencial hemolítico.....	84
4.12.2 Fragilidade osmótica.....	86
4.12.3 Potencial antioxidante na presença de Espécies Reativas de Oxigênio.	88
5.8 Efeito sobre a embriogênese de ouriço-do-mar.....	91
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXO- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	130

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos heterotróficos incluídos no Reino Fungi (DEACON, 2006). São seres ubíquos e eucariontes, amplamente distribuídos na natureza, que se nutrem por meio de substâncias orgânicas que o meio oferece, podendo ser encontrados em vegetais, animais, homem, detritos, alimentos, água, ar e solo. Podem ser saprófitos, parasitas ou simbiontes e de dois tipos morfológicos, leveduriformes (célula única) ou filamentosos (colônias filamentosas multicelulares) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Como vias de dispersão, podem utilizar o ar, água, insetos, homem e animais, sendo fatores como localidade, estação do ano e grau higroscópico do ar determinantes para as variações na incidência das espécies fúngicas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Apesar de serem muito numerosos, poucos fungos são descritos como patógenos. Estima-se que de mais de 5 milhões espécies, somente cerca de 300 sejam patógenas aos seres humanos (PERFECT, 2017), podendo, nesse caso, causar desde as comuns infecções humanas superficiais até doenças muito mais devastadoras, que podem ser ainda agravadas em indivíduos com sistema imunitário muito debilitado, como os encontrados em ambientes hospitalares, constituindo as chamadas infecções oportunistas (SULLIVAN; MORAN; COLEMAN, 2005; DEACON, 2006; BRASIL, 2009).

Dentre os vários possíveis patógenos oportunistas está o gênero anemófilo *Penicillium*, o qual possui grande quantidade de espécies, podendo ser causadores de infecções hospitalares, nas formas localizada ou disseminada, principalmente em indivíduos suscetíveis. Este gênero possui a capacidade de crescer em qualquer meio ambiente, visto que não são nutricionalmente exigentes, tolerando, assim, variadas condições físico-químicas e podendo ser encontrado em quase todos os substratos (PITT; HOCKING, 1997).

Por serem anemófilos e, portanto, utilizarem também o ar atmosférico como via de dispersão, a inalação de seus esporos pode levar ao desenvolvimento de complicações respiratórias como asma e rinite (MEZZARI et al., 2003), podendo,

ainda, contribuir para o desenvolvimento da denominada “Síndrome do Edifício Doente”, frequentemente observada como consequência de condições ambientais desfavoráveis em áreas internas, o que ocasiona danos à saúde dos ocupantes do local (QUADROS et al., 2009). Fungos do gênero *Penicillium* também podem desempenhar vários papéis em ecossistemas naturais, agricultura e biotecnologia, sendo, porém, especialmente importantes como organismos pós-colheita, podendo deteriorar produtos alimentares (SAMSON; HOEKSTRA; VAN OORSCHOT, 1984; PITT; HOCKING, 1997; HOLMES; ECKERT, 1999; MORALES et al., 2007).

À problemática das doenças causadas por fungos, soma-se o uso indiscriminado de antimicrobianos pela população em geral, o que pode causar resistência dos micro-organismos à terapêutica antimicrobiana e, por conseguinte, desperta o interesse na busca por fontes alternativas de compostos antimicrobianos, dentre elas as plantas medicinais (BANSOD; RAI, 2008).

Por constituírem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e objetivando a descoberta de compostos mais eficazes e menos tóxicos, as plantas têm sido intensamente estudadas. Isto porque possuem a habilidade de sintetizar, através do metabolismo secundário, vários compostos químicos de estruturas complexas, incluindo alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, fenilpropanóides, entre outros (AQUINO et al., 2003; MOREIRA et al., 2007; NYCHAS, 1996), que podem ser utilizados, inclusive, para o tratamento de diferentes doenças infecciosas (SAAD, 2010).

Sabe-se que os produtos naturais, apesar de serem considerados de menor risco em comparação com drogas sintéticas, não são completamente livres da possibilidade de efeitos tóxicos ou adversos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005), portanto, considera-se de fundamental importância a realização de estudos para investigação de sua toxicidade, a fim de garantir maior segurança no uso desses produtos.

Nesse contexto, considerando o aumento da incidência de infecções causadas por fungos ao longo dos últimos anos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) e o possível agravamento desse quadro quando se trata de indivíduos com sistema imunológico comprometido, além do grande número de doenças causadas por fungos que podem afetar plantas economicamente importantes e produtos

alimentares diversos, bem como considerando-se a crescente resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos convencionais, verifica-se a necessidade de realização de estudos relacionados à atividade biológica de produtos naturais sobre fungos do gênero *Penicillium*, frequentemente envolvido nessa problemática.

Igualmente, verifica-se a necessidade de investigações acerca da toxicidade de tais produtos naturais, objetivando garantir segurança e eficácia no uso de produtos derivados de plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos, gênero *Penicillium* e infecções

Os fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os fungos filamentosos. Estruturalmente, caracterizam-se por apresentar espessa parede celular constituída por glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente glucano e quitina, além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol, em vez do colesterol encontrado nas membranas celulares dos mamíferos (CAMPOS; MENEZES; PONE, 2004; BOWMAN; FREE, 2006; MURRAY, 2014).

A parede celular e a membrana plasmática desempenham papel importante na terapêutica antifúngica, atuando como alvos de vários fármacos. Normalmente, a parede protege o fungo de alterações na pressão osmótica e é determinante na manutenção da forma e integridade da célula fúngica, especialmente durante o crescimento e divisão celulares (SARTORATTO et al., 2004; BOWMAN, FREE, 2006). Já a membrana, constitui uma barreira de permeabilidade, por meio de seus lipídios, com um sistema seletivo de transporte de substâncias entre os ambientes intra e extracelular, viabilizado pelas proteínas intercaladas (WALKER, WHITE, 2005; BERG et al., 2010).

Os fungos filamentosos são os mais abundantes na natureza, porém, normalmente, não fazem parte da microbiota animal, utilizando as vias aéreas superiores ou soluções de continuidade na barreira epidérmica como vias de penetração no hospedeiro, ao contrário das leveduras, que são capazes de colonizar o homem e animais, podendo viver comensalmente sobre a pele, trato gastrointestinal e mucosas, causando, em caso de perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, diversos quadros infecciosos, com formas clínicas localizadas ou disseminadas (ANVISA, 2004; BRASIL, 2009).

A reprodução dos fungos é influenciada por fatores ambientais como luz, umidade, poluição atmosférica, substâncias nutritivas e temperatura, a qual, para os

fungos de importância médica, geralmente deve estar entre 20°C e 30°C (GOMPERTZ et al., 2005). Fungos de interesse médico podem ser filamentosos, leveduriformes ou dimórficos, consistindo, este último, em um subgrupo dos fungos filamentosos que pode se apresentar das duas formas, a depender da temperatura, teor de CO₂ e condições nutricionais (ANVISA, 2004; SULLIVAN; MORAN; COLEMAN, 2005; BRASIL, 2009).

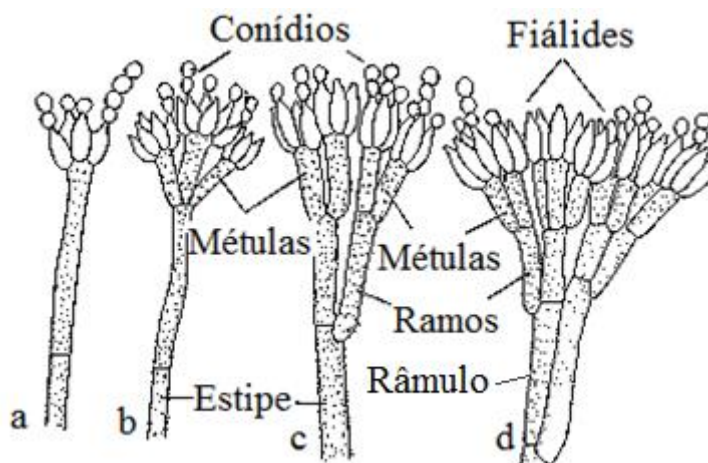
Relacionando-se com o ser humano de maneiras diversas, os fungos podem desempenhar vários papéis, sejam maléficos, como micoses, produção de metabólitos tóxicos em alimentos e doenças em culturas vegetais; ou benéficos, como decomposição e reciclagem de matéria orgânica, produção de antibióticos, auxílio no processamento alimentar (pão, produtos lácteos e bebidas alcoólicas), consumo direto na alimentação (cogumelos e queijos), além de controle biológico de pragas ou outros fungos patogênicos de plantas (DEACON, 2006; ROMANI, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O gênero *Penicillium* é constituído de fungos filamentosos anemófilos que pertencem ao grupo dos hialo-hifomicetos, por terem hifas hialinas e septadas. Compreende aproximadamente 225 espécies, incluindo *P. citrinum*, e são encontrados no solo, madeira, alimentos, vegetação em decomposição, além do ar (BRASIL, 2009; AVILÉS-ROBLES et al., 2016). As espécies de *Penicillium* geralmente têm baixa patogenicidade e raramente causam infecções, com exceção do *P. marneffe*, que é endêmico no Sudeste asiático. Todavia, *P. chrysogenum* também já foi relatado como uma causa incomum de infecção invasiva (AVILÉS-ROBLES et al., 2016).

As colônias de *Penicillium* crescem rapidamente e possuem textura variando entre aveludada, algodonosa, funicular ou fasciculada, sendo o reverso da placa geralmente pálido a amarelado. Microscopicamente, espécies de *Penicillium* são caracterizadas por seus conidióforos hialinos de paredes lisas ou ásperas, simples ou ramificados, semelhantes a pincéis, os quais terminam em grupos de fiáldes ampuliformes (forma de garrafa) ou acerosas (forma de agulha), de onde se originam longas cadeias de conídios, que podem ser globosos, elipsóides, cilíndricos ou fusiformes, hialinos ou esverdeados, com paredes lisas ou ásperas. O conidióforo é o conjunto do estipe e toda a estrutura por ele suportada (“penicilo”), conforme

mostrado na Figura 1 (PITT, 1979; SAMSON; HOEKSTRA; VAN OORSCHOT, 1984).

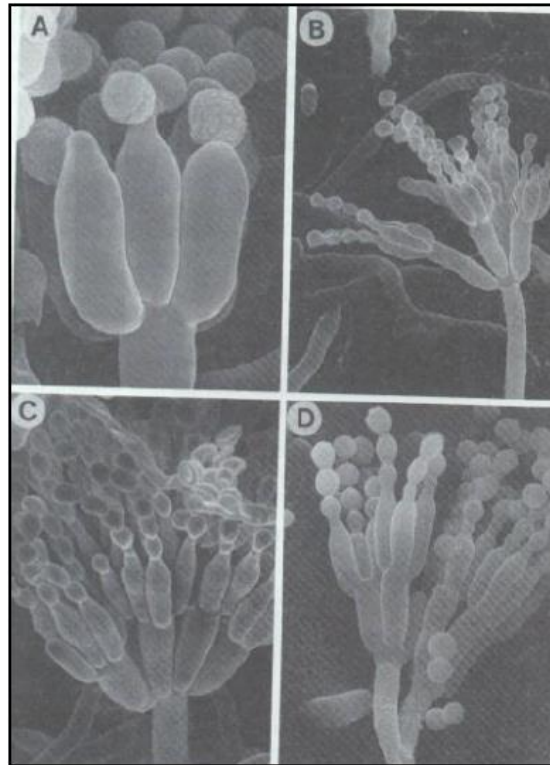
Figura 1- Estruturas morfológicas e tipos de ramificação do conidióforo em *Penicillium* sp.



(a) simples (monoverticilado); (b) ramificação em um estágio (biverticilado); (c) ramificação em dois estágios (terverticilado); (d) ramificação em três estágios (quaterverticilado). Fonte: adaptado de Samson; Hoekstra; Van Oorschot, 1984.

Com base no padrão de ramificação do penicilo, o gênero pode ser dividido em quatro subgêneros, os quais irão ser diferenciados pelo número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide e o estipe (Figura 2). O tipo de *Penicillium* mais simples designa-se monoverticilado, pois a fiálide assenta diretamente no estipe. O *Penicillium* diz-se biverticilado se tem apenas métulas, e terverticilado se tem métulas e ramos. Quando há, ainda, râmulos denomina-se quaterverticilado. Os quatro subgêneros são: *Aspergilloides* (monoverticilados), *Penicillium* (terverticilados e quaterverticilados), *Furcatum* e *Biverticillium* (ambos biverticilados) (PITT, 1979).

Figura 2- Micrografia eletrônica de ramificações em *Penicillium* sp.



(A) *P. glabrum* (Monoverticillata); (B) *P. citrinum* (Biverticillata, assimétrica); (C) *P. funiculosum* (Biverticillata, simétrica); (D) *P. Cyclopium* (Terverticillata). Escala em bar: 4μm (A,C); 10μm (B,D).
Fonte: PEBERDY, 1987.

Os fungos anemófilos, por serem contaminantes do ar, podem ocasionar danos à saúde humana, principalmente em ambientes fechados, isto porque as estruturas dos fungos encontradas nos esporos, micélio e metabólitos inalados do ar podem desencadear processos alérgicos, como rinite, asma alérgica, sinusite alérgica e micoses pulmonares (LACAZ et al., 2002; PEREIRA, 2007; FLORES; ONOFRE, 2010). Contudo, o estado imunitário do indivíduo é fator determinante para a habilidade dos fungos de causarem doenças em humanos (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000; OLIVEIRA; BORGES-PALUCH, 2015).

Os representantes do gênero *Penicillium* são também oportunistas, podendo causar formas localizadas ou disseminadas de infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis (BRASIL, 2009). As infecções oportunistas podem ser superficiais, quando os micro-organismos estão confinados às camadas

exteriores dos epitélios, ou disseminadas/sistêmicas, quando os agentes patogênicos penetram a barreira epitelial, entram na corrente sanguínea e disseminam-se por todo o corpo (SULLIVAN; MORAN; COLEMAN, 2005). Nesse contexto, fungos oportunistas podem ocasionar, além das reações alérgicas, doenças como otites, infecções urinárias, infecções oculares e até fungemias, as quais podem ser fatais em imunodeprimidos (FURTADO; FERRARONI, 1998; SIDRIM; MOREIRA, 1999; GRUMACH, 2001; CARMO et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Apesar de *Aspergillus* spp. serem os principais fungos filamentosos que causam infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, o número de casos relatados de infecção invasiva por outros fungos filamentosos, como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. e *Acremonium* spp., aumentou na última década (AVILÉS-ROBLES et al., 2016).

Cabe ressaltar, ainda, a importância do fungo dimórfico *Penicillium marneffe*, única espécie de *Penicillium* regularmente patogênica para os humanos, responsável pela infecção denominada penicilose, uma infecção sistêmica que resulta em fungemia, infecções pulmonares, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões na pele, ossos e mucosas, sintomas digestivos, além de envolvimento do sistema reticuloendotelial (WONG, 2007; ZHANG et al., 2016). A via infecciosa para os seres humanos é a inalação dos conidiósporos, o que causa infecção pulmonar, seguida de disseminação sistemática hematológica, especialmente para o fígado, baço e linfonodos (VANITTANAKOM et al., 2006).

Acredita-se que o rato-selvagem-do-bambu (*Rhysomys sinensis*) seja o hospedeiro natural do *P. marneffe*, mas ainda faltam evidências definitivas de que os roedores fazem parte do ciclo infeccioso (LI et al., 2011). Não é certo se a infecção humana é resultado da exposição a animais infectados ou se ambos, os ratos de bambu e humanos, são infectados devido à exposição a uma fonte ambiental comum, sendo esta última hipótese mais sugerida pelos estudos atuais (WONG; WONG, 2011).

A penicilose é geograficamente restrita, tendo casos registrados em países do Sudeste asiático, incluindo Tailândia, Sul da China, Hong Kong, Vietnã, Indonésia e

Laos, ocorrendo em indivíduos imunocompetentes, porém, principalmente, em pacientes imunocomprometidos, como os coinfectados com HIV, nos quais se observa alta taxa de mortalidade (WONG et al., 2001; WONG, 2007; YE et al., 2015; HEE; PIL; CHO, 2017). Sabe-se que a penicilose ocupa o terceiro lugar em pacientes infectados pelo HIV na Tailândia, sendo superado apenas pela criptococose e tuberculose (DUONG, 1996). Todavia, atualmente, existem relatos de penicilose em pacientes imunocompetentes ou provenientes de áreas não-endêmicas (AKATA et al., 2014; WANG P. et al., 2017).

Pela avaliação da história do paciente ou pelo exame físico, não existem indicadores claros específicos de infecção por *Penicillium*, portanto, uma suspeita clínica de infecção com *Penicillium* deve ser considerada no diagnóstico diferencial na presença de hifas híbridas septadas após exame direto ou em espécimes de patologia (AVILÉS-ROBLES et al., 2016).

Ainda, é importante destacar a problemática da produção de diversas micotoxinas por espécies de *Penicillium*, como *P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum* e *P. verrucosum* (FRISVAD; THRANE, 2002). As micotoxinas são metabólitos de fungos filamentosos que podem originar graves problemas de contaminação em culturas vegetais, alimentos e rações mal armazenados, as quais incluem a citrinina (CIT), ácido ciclopiazônico (CPA), ácido micofenólico (MPA), glicopeptídios nefrotóxicos, ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), ácido penicílico (PIA), penitrem A e roquefortina C (RQC) (FRISVAD; THRANE, 2002). Tais micotoxinas podem gerar efeitos tóxicos diversos em mamíferos, como carcinogenicidade, teratogenicidade, genotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e imunotoxicidade (CIEGLER; VESONDER; JACKSON, 1977; RUNDBERGETA; WILKINS, 2002; FRISVAD; THRANE, 2002; LIU et al., 2003; KEBLYS et al., 2004; FRISVAD et al., 2006; OH et al., 2012).

De forma positiva, espécies de *Penicillium* podem ser exploradas para uma gama de aplicações industriais, como na indústria do queijo, produção de antibióticos e enzimas (LI et al., 2007; VISAGIE; ROETS; JACOBS, 2009). Ainda, o gênero *Penicillium* pode constituir até 67% do total de biomassa fúngica de determinados solos (CHRISTENSEN et al., 2000), ambiente no qual desempenha

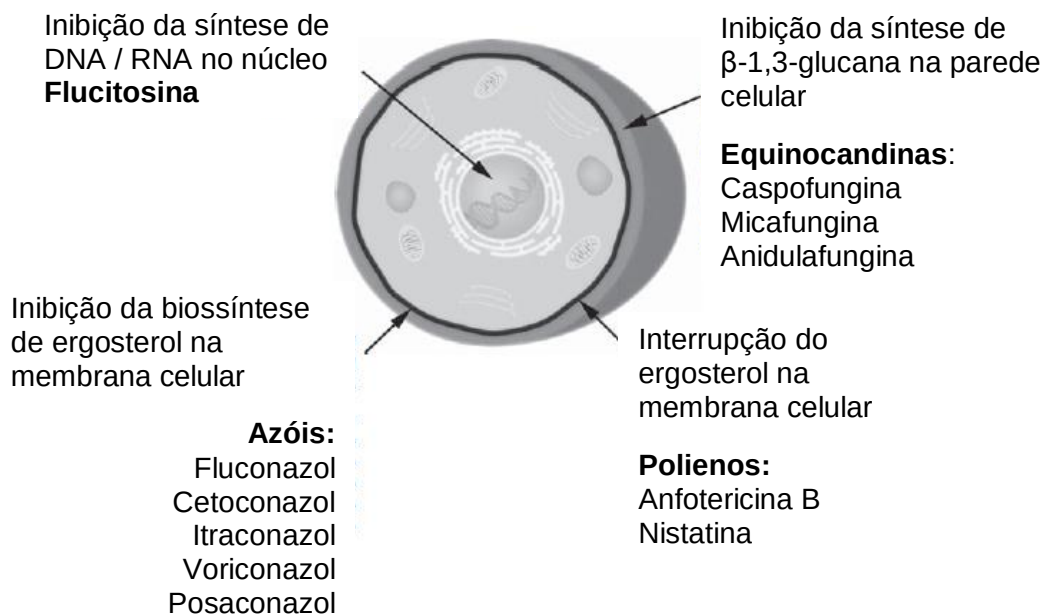
papel importante, sendo responsável, em conjunto com outros micro-organismos, pela decomposição de matéria orgânica e manutenção da fertilidade de nitrogênio do solo (SENEVIRATNE; JAYASINGHEARACHCHI, 2005).

2.2 Terapêutica antifúngica

Quando se compara com as infecções bacterianas, observa-se que para o tratamento de infecções fúngicas existem poucas drogas disponíveis, o que pode ser atribuído à dificuldade em identificar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos, dada a natureza eucariótica das células dos fungos (GÓES, 2009).

Os principais alvos das drogas antifúngicas são a parede celular, membrana e o núcleo da célula fúngica (RANG; DALE, 2012), conforme mostrado na figura 3.

Figura 3- Alvos de ação de drogas antifúngicas



Fonte: Adaptado de CHANDRASEKAR, 2011.

A terapêutica contra micoses sistêmicas iniciou-se por volta de 1940 com as sulfanamidas, sendo, na década seguinte, disponibilizada a anfotericina B, de largo espectro antifúngico e eficácia. O mecanismo fungicida da anfotericina B deve-se à sua ligação ao ergosterol da membrana plasmática, causando alteração na permeabilidade e perda de constituintes citoplasmáticos, além de levar a uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990). Outra droga, a 5-fluorocitosina, age pelo comprometimento da síntese do DNA (GOODMAN; GILMAN, 2012) e foi considerada sinérgica da anfotericina B, principalmente contra *Cryptococcus* spp. (MARTINEZ, 2006).

A partir de 1970 iniciou-se o uso clínico do grupo de drogas azólicas, com os imidazólicos (miconazol, cetoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, tioconazol e sulconazol), causando grande impacto na terapia antifúngica, pelo seu largo espectro de ação. Nos anos 1990, os triazólicos de primeira geração (fluconazol e itraconazol), com maior biodisponibilidade e atividade mais intensa, juntaram-se aos imidazólicos (MARTINEZ, 2006), sendo, posteriormente, liberados para uso médico os triazóis de segunda geração- voriconazol, posaconazol e ravuconazol (RANG; DALE, 2012). Os azóis comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana plasmática pela inibição da esterol 14- α -desmetilase, levando também ao acúmulo de 14- α -metilesteróis, que podem desagregar o arranjo das cadeias dos fosfolípidios, afetando as funções de sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, o que, por fim, inibe o crescimento de fungos (BENNETT, 2006; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Em seguida, foram desenvolvidas formulações lipídicas de anfotericina B (forma lipossomal, dispersão coloidal e complexo lipídico), buscando menor toxicidade, além de duas novas classes de antifúngicos: as alilaminas, representadas pela terbinafina, com maior emprego em micoses da pele e unha, e as equinocandinas, das quais a caspofungina é a mais conhecida no Brasil (MARTINEZ, 2006). As equinocandinas inibem a síntese de β -1,3-D-glucano, um dos principais componentes da parede celular fúngica, resultando em desequilíbrio osmótico, lise da parede celular e morte do micro-organismo (DERESINSKI; STEVENS, 2003; CHANDRASEKAR, 2011). Essa classe tem a vantagem de afetar

a parede celular, estrutura ausente nas células dos mamíferos, o que torna a ação antifúngica mais específica. Além disso, as equinocandinas possuem efeitos adversos menos frequentes do que os da anfotericina B e menor interação com outros medicamentos do que as drogas azólicas. Todavia, seu uso é limitado a infecções mais graves, devido ao espectro de ação restrito e administração exclusivamente endovenosa (MARTINEZ, 2006; LAI et al., 2008).

Segundo Avilés-Robles et al. (2016), atualmente, não há antimicrobiano de escolha para o manejo da penicilose, existindo alguns relatos de casos sobre tratamentos bem sucedidos de infecções oportunistas por *Penicillium* com anfotericina B, itraconazol ou fluconazol.

Sabe-se que infecção por *P. marneffe* quando disseminada e não tratada é quase sempre fatal, no entanto, a penicilose é facilmente tratável com antifúngicos disponíveis (SIRISANTHANA et al., 1998). Tradicionalmente, recomenda-se o uso combinado de anfotericina B e itraconazol, por cerca de três meses, seguido por profilaxia secundária, a fim de prevenir uma infecção por recaída, com uma dose diária mais baixa de itraconazol, durante pelo menos 6 meses, até a contagem de células CD4 ser superior a 100 células/mm³ (SIRISANTHANA et al., 1998; CHAIWARITH et al., 2007). A anfotericina B lipossomal também tem sido usada (WONG, 2007). Em casos onde esse regime de tratamento falhar, voriconazol é recomendado para ser usado por cerca de três meses antes de iniciar a profilaxia secundária (SUPPARATPINYO; SCHLAMM, 2007; KAPLAN et al., 2009).

A duração do tratamento também não é padronizada. Foram publicados casos de infecções disseminadas, causadas por *P. chrysogenum* e *Penicillium marneffe*, que responderam bem ao tratamento intravenoso com anfotericina B, sendo o itraconazol oral posteriormente administrado em regime ambulatorial durante várias semanas. No entanto, falhas de tratamento com anfotericina B também foram relatadas. (AVILÉS-ROBLES et al., 2016).

Qiu et al. (2015) fizeram uma análise retrospectiva de 14 casos de infecção disseminada de *Penicillium marneffe* com lesões osteolíticas, verificando que doze pacientes receberam desoxicolato de anfotericina B por via intravenosa (0,6-1,0 mg/kg/dia) seguido de itraconazol oral (400 mg/dia), porém, observaram taxa de

recorrência pronunciada após o término do tratamento, correspondente a 50% dos que sobreviveram.

Estudo *in vitro* realizado por Diekema et al. (2003) documentou a susceptibilidade de 35 isolados de *Penicillium* spp., principalmente, aos antifúngicos caspofungina, posaconazol, voriconazol, ravuconazol e anfotericina, tendo o itraconazol apresentado resultados inferiores. De acordo com os autores, os menores valores de CIM₅₀ foram observados para caspofungina, posaconazol, voriconazol e ravuconazol.

Wang P. et al. (2017), estudando um caso de penicilose em paciente imunocompetente proveniente de região não-endêmica, verificaram que, após o tratamento com voriconazol, todos os sintomas melhoraram gradualmente.

Segundo Panapruksachat et al. (2016), até o presente momento, não foi reportada a existência de linhagens de *P. marneffe* resistentes aos azólicos, em contraste com o que ocorre com os principais fungos oportunistas (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*), para os quais as complicações causadas pela resistência aos azóis constituem um grave problema (SNELDERS et al., 2008; CANNON et al., 2009; CHOWDHARY et al., 2013; GULLO et al., 2013; SHI et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Todavia, considerando o típico tratamento profilático com azóis para casos de infecção por *P. marneffe*, foi estudada a existência de possíveis mecanismos de resistência nessa espécie fúngica, verificando-se a existência de 46 transportadores cassete de ligação ao ATP (*ATP-binding cassette* ou ABC), dentre os quais um teria sido relacionado à possibilidade de causar aumento da resistência aos azólicos (PANAPRUKSACHAT et al., 2016).

Nesse contexto, é possível observar que não há um consenso universal sobre os critérios para administração de um regime quimioterápico específico ou de profilaxia antifúngica para infecções oportunistas. Ocorre que, sendo difícil estabelecer um diagnóstico precoce definitivo no curso da infecção, muitos pacientes de alto risco são tratados empiricamente ou profilaticamente com antifúngicos, muitas vezes estabelecidos pelos próprios protocolos dos hospitais terciários (BROOKS et al., 2014).

Sabe-se que, atualmente, a terapêutica antifúngica apresenta algumas limitações, principalmente relacionadas à toxicidade sobre as células humanas e à resistência, tanto intrínseca como adquirida, por parte dos fungos (NISHI et al., 2009). O desenvolvimento de micro-organismos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais, devido ao uso abusivo e indiscriminado, resulta no surgimento de doenças infecciosas de difícil controle (AKINPELU, 2001). Ademais, o fenômeno da resistência torna-se ainda mais preocupante quando se considera a limitação no número de antifúngicos disponíveis e clinicamente úteis e a crescente população de imunocomprometidos vulneráveis ao risco de infecção fúngica (LAFAYETTE et al., 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mudanças na população microbiana podem levar ao surgimento de micro-organismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em patógenos antigos, como o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas. Isolados fúngicos com reduzida sensibilidade (resistentes) geralmente surgem a partir de uma taxa natural de mutação genética muito baixa e, pela aplicação de um fungicida na concentração recomendada, ocorre controle dos isolados sensíveis, enquanto que os isolados resistentes tornam-se dominantes na população dos patógenos sob a pressão seletiva do uso do fungicida ao longo do tempo; de modo que poderão ocorrer, eventualmente, falhas no controle da doença, o que representa ameaça à saúde humana e traz prejuízos econômicos (KOENRAADT; SOMERVILLE; JONES, 1992; COWEN; ANDERSON; KOHN, 2002; BARALDI et al., 2003; ANDERSON, 2005).

Contribuindo para o fenótipo de resistência a drogas nos fungos, podem ser citados vários mecanismos, tais como: modificações na membrana plasmática/parede celular, reduzindo a permeabilidade ou captação da droga; alterações estruturais no sítio alvo, impedindo a ligação do fármaco; aumento no efluxo das drogas; superprodução da enzima-alvo, de modo que o fármaco não inibe completamente a reação bioquímica; existência de via alternativa na célula que compensa a perda de função decorrente da atividade da droga; alterações nos níveis intracelulares dos alvos; inibição de "enzimas" fúngicas que convertem o fármaco inativo em sua forma ativa; e secreção de enzimas que degradam o

fármaco pela célula (GHANNOUM; RICE, 1999; MA; MICHAILIDES, 2005; DEISING, REIMANN, PASCHOLATI, 2008).

A crescente resistência a novos agentes é fato preocupante, visto que pode haver o comprometimento da eficácia terapêutica da maioria das drogas antifúngicas, pelo surgimento de linhagens resistentes a drogas e superinfecção com estas linhagens (LAFAYETTE et al., 2010; CHANDRASEKAR, 2011). Assim, fatores como toxicidade, custos do tratamento, interações medicamentosas significativas, biodisponibilidade insuficiente das drogas antifúngicas convencionais, além da diversidade de linhagens resistentes às drogas clássicas, têm levado à busca incessante por novos agentes antifúngicos, mais seguros e mais efetivos que os existentes (CAVALEIRO et al., 2006; FENNER et al., 2006; KHAN et al., 2010; MARUI et al., 2010; SAAD et al., 2010). Para tanto, os vegetais constituem valiosa fonte de busca, visto que a diversidade molecular dos produtos naturais é superior a dos produtos derivados de síntese química (NOVAIS, 2003).

Deve-se considerar, especialmente com relação aos antifúngicos, que um novo agente precisa ter máxima especificidade para os micro-organismos, com baixa toxicidade para o hospedeiro, já que a similaridade compartilhada entre patógeno e hospedeiro é um dos maiores desafios no desenvolvimento de drogas antifúngicas eficazes; além disso, precisam ser escolhidos alvos bem caracterizados, de papéis fisiológicos compreendidos e essenciais ao desenvolvimento dos fungos (CIHLAR et al., 2002; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

2.3 Produtos naturais

As plantas medicinais ocupam papel de destaque na busca por fontes alternativas de compostos antimicrobianos, de modo que moléculas ativas provenientes de plantas medicinais e ervas têm se tornado de grande interesse (BARIS et al., 2006; BANSOD; RAI, 2008; MATASYOH et al., 2009). Elas possuem aplicações versáteis e representam uma fonte de inovação de agentes terapêuticos para várias condições, incluindo doenças infecciosas (KOEHN, CARTER, 2005; PATERSON, ANDERSON, 2005; COS et al., 2006; SAAD, 2010).

Produtos naturais com propriedades terapêuticas são utilizados desde o início da história da civilização humana, sendo frequentemente empregados na medicina popular e amplamente utilizadas pelas chamadas medicinas tradicionais, ou não ocidentais, em suas práticas terapêuticas (FOGLIO et al., 2006), por constituírem uma fonte valiosa de produtos para prevenção, tratamento e cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais (CHOI et al.; 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; ANTUNES et al., 2006).

Tem-se que, nos últimos 25 anos, cerca de 30% dos novos fármacos aprovados são produtos naturais ou substâncias derivadas, quando se trata de anticancerígenos, esse número aumenta para 42% (NEWMAN; CRAGG, 2007). Ainda, referindo-se a doenças infecciosas, 70% das novas drogas tiveram origem nas fontes naturais (GULLO; HUGHES, 2005). Verificou-se, também, que 50% dos medicamentos aprovados, entre 1981 e 2006, pelo FDA são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA; PINTO, 2010).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários ou macromoléculas, que são essenciais à sobrevivência dos vegetais e incluem lipídeos, protédeos, glicídeos e nucleotídeos; e os metabólitos secundários ou micromoléculas, originados à custa de energia pelos produtos do metabolismo primário, com estrutura complexa, baixa massa molecular e atividades biológicas marcantes, sendo encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas e estando, ainda, diretamente envolvidos na adequação da planta ao seu meio, desempenhando várias funções, dentre elas, a defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios ultravioletas e atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (POSER, MENTZ, 2004; FUMAGALI et al., 2008).

Nesse contexto, por meio de seu metabolismo secundário, as plantas sintetizam uma série de compostos biologicamente ativos (NAKAMURA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006), de estruturas complexas, incluindo alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, fenilpropanóides, entre outros (NYCHAS, 1996; AQUINO et al., 2003; MOREIRA et al., 2007). Portanto, por possuírem diversidade de constituintes, as plantas proporcionam grandes chances de obterem-se

moléculas protótipos (NASCIMENTO; LOCATELLI; FREITAS, 2000; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA, M.R.F. et al., 2006).

O Brasil apresenta grande diversidade vegetal, atraindo a atenção de etnofarmacologistas ao redor do mundo (SCORZONI ET al., 2007). Aliando-se essa diversidade vegetal ao conhecimento tradicional e à tecnologia capaz de validar cientificamente esse aprendizado, tem-se como resultado um grande potencial do país para o desenvolvimento de fitomedicamentos (BARBOSA-FILHO et al., 2005; BRANDÃO et al., 2006; GRÉGIO et al., 2006). Todavia, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial como fonte de novos produtos naturais é ainda pouco explorado.

Os produtos naturais pesquisados como alternativas para o controle de fungos, que podem agir induzindo resistência e/ou produzindo atividade antimicrobiana direta, podem ser extratos vegetais ou óleos essenciais (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008). Sabe-se que os óleos possuem uma complexidade estrutural marcante, podendo conter mais de 60 constituintes individuais, os fitoconstituintes, os quais são responsáveis por sua atividade biológica (LIMA et al., 2006). Assim, tem se tornado cada vez mais comum o desenvolvimento de medidas de controle de doenças fúngicas utilizando fitoconstituintes, como alternativa aos produtos químicos sintéticos, objetivando menor toxicidade e maior eficácia (REDDY et al., 2007), devido à capacidade de alguns fitoconstituintes serem prejudiciais para os fungos e, dessa forma, poderem ser utilizados para proteger culturas vegetais, animais, humanos, alimentos e rações contra fungos toxigênicos e micotoxinas (OMAF, 2004; ANJORIN, SALAKO; MAKUN, 2013).

Todavia, ainda verifica-se que grande parte dos estudos está direcionada a avaliar o efeito antimicrobiano de óleos essenciais e extratos (NASCIMENTO; LOCATELLI; FREITAS, 2000; SEIDIL, 2002; ARAÚJO et al., 2004; LIMA et al., 2005; SOUZA et al., 2005), sendo a atividade dos fitoconstituintes ainda pouco enfatizada. Portanto, considera-se de suma importância o direcionamento dos estudos para os efeitos de constituintes isolados das plantas.

Os fitoconstituintes geraniol, timol, carvacrol, citral, R-citronelal, S-citronelal, 7-hidróxi-citronelal, citronelal e isoeugenol foram escolhidos para esta pesquisa por apresentarem relatos na literatura de suas consideráveis atividades antimicrobianas. Desempenhando papel fundamental na escolha dessas substâncias esteve a necessidade de investigar suas atividades antimicrobianas especificamente sobre o gênero *Penicillium*, visto que, foram observados poucos estudos nesse sentido.

Timol e carvacrol são monoterpenos aromáticos isômeros encontrados em diversas plantas, como, por exemplo, orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), biossintetizados a partir do γ -terpineno e do p-cimeno (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Possuem fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, sendo que, em temperatura ambiente, o carvacrol apresenta-se na forma líquida e o timol na forma de cristais (HOLLAND et al., 2014). Várias atividades já foram descritas para esses compostos, tais como atividade antifúngica (REGINATO et al., 2017), antibacteriana (ENGEL et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2017; KHAN et al., 2017; MOON et al., 2017), inseticida (GAIRE et al., 2017; PARK et al., 2017), acaricida (ROSADO-AGUILAR et al., 2017), larvicida (PAVELA, 2015), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), neuroprotetora (DELGADO-MARÍN; SÁNCHEZ-BORZONE; GARCÍA, 2017), antitumoral (LESGARDS et al., 2014; CHAUHAN et al., 2017; LI; WEN; DU et al., 2017), ansiolítica (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017), entre outras.

O geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) é um monoterpeno alcoólico acíclico, de fórmula química $C_{10}H_{18}$, sendo constituído por uma mistura de dois isômeros cis/trans- o geraniol propriamente dito (trans) e o nerol (cis). Apresenta-se como um óleo amarelo claro, sendo insolúvel em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos. É um constituinte de vários óleos essenciais e ocorre, por exemplo, no óleo de palmarosa, óleo de citronela e óleo de rosas. É muito utilizado como fragrância para vários produtos de limpeza domésticos e cosméticos, possuindo, também, propriedades bioquímicas e farmacológicas (CHEN; VILJOEN, 2010). Estudos apontam que o geraniol possui ação inseticida e repelente de insetos (JEON et al., 2009; QUALLS; XUE, 2009; GAIRE et al., 2017), antitumoral (BURKE et al., 1997; BURKE et al., 2002; ONG et al., 2006; POLO; DE BRAVO, 2006; WISEMAN; WERNER; CROWELL, 2007; MADANKUMAR et al., 2017; SHANMUGAPRIYA; SUBRAMANIAN; KANIMOZHI, 2017); anti-inflamatória

(HASAN; SULTANA, 2015), antidiabética (BABUKUMAR et al., 2017), anti-isquêmica (EL-BASSOSSY et al., 2017), cardioprotetora (CRESPO et al., 2017), antinociceptiva (LV et al., 2017), antioxidante (CHOI et al., 2000; TIWARI; KAKKAR, 2009; OZKAYA et al., 2016), entre outras atividades.

Além disso, o geraniol possui atividade antimicrobiana relevante, sendo eficaz contra fungos diversos, tais como: *Saccharomyces cerevisiae* (DALLEAU et al., 2008); *Cryptococcus neoformans* (VIOLLON; CHAUMONT, 1994); *Colletorichum camelliae* (ZHANG et al., 2006); *Botrytis cinérea*, *Mucor piriformis* (ERLAND et al., 2016); *Candida albicans* (MARUYAMA et al., 2008; SHARMA; KHAN; MANZOOR, 2016); além de fungos do gênero *Penicillium*, como o *Penicillium expansum* (ERLAND et al., 2016). O geraniol também é ativo contra os patógenos *Salmonella typhimurium* e *E. coli* (SI et al., 2006); *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (YNOUYE; YAMAGUCHI; TAKIZAWA, 2001); *Erwinia amylovora* (SCORTICHINI; ROSSI, 2008); *Mycobacterium tuberculosis* (CANTRELL; FRANZBLAU; FISCHER, 2001); entre outros.

O isoeugenol, éter fenólico derivado do eugenol, é um fenilpropeno encontrado em diversas plantas (ELSAYED et al., 2016; KIM et al., 2016). Está presente na noz-moscada, cravo-da-índia e canela (HYLDGAARD et al., 2015), possuindo inúmeras atividades biológicas identificadas, tais como atividade antifúngica (MANSOUR; YOUSEF; KIM, 1996; CHENG et al., 2008), antibacteriana (FAITH; YOUSEF; LUCHANSKY, 1992; HYLDGAARD et al., 2015; KIM et al., 2016), nematocida (PARK et al., 2007), antioxidante (RAJAKUMAR; RAO, 1993), larvicida (PAVELA, 2015), inseticida (HUANG et al., 2002), acaricida (KIM; KIM; AHN, 2003), fumigante (YEOM et al., 2013), anti-inflamatória (KAUR; SULTANA, 2012), antitumoral (ATSUMI et al., 2000; FUJISAWA et al., 2004; ELSAYED et al., 2016), neuromoduladora (HWANG, 1992), neuroprotetora (PRASAD; MURALIDHARA, 2013), entre outras.

O citronelal é um monoterpenóide, predominantemente formado pelo metabolismo secundário de plantas, sendo uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus* (MEDEIROS, 2016). É encontrado em cerca de 50 óleos essenciais,

juntamente com citral, geranial, linalol e citronelol (PYBUS; SELL, 1999), sendo tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica dos enantiômeros R e S. Possui inúmeras atividades biológicas, dentre elas ação antimicrobiana, antioxidante, herbicida, inseticida e repelente (SINGH et al., 2009; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; TOMAZ et al., 2014; BATUBARA et al., 2015). Estudos ainda apontam, para o citronelal, atividade nematocida (CHOI et al., 2007; BARROS et al., 2009), antifúngica contra *Pyricularia (Magnaporthe) grisea*, *Aspergillus spp.* e *Colletotrichum musae* (AGUIAR et al., 2014), antinociceptiva (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011), sedativa (JAGER; SAABY, 2011), entre outras.

Sobre as atividades biológicas dos compostos R-citronelal, S-citronelal e 7-hidróxi-citronelal, um número bem menor de estudos foi realizado. Estudos atribuem atividade antifúngica contra linhagens de *Candida tropicalis* ao 7-hidróxi-citronelal (OLIVEIRA-FILHO et al., 2017), atividade antibacteriana ao S-citronelal (SATO; RIST; UCHBAUER, 2006), além de atividade anticâncer ao R-citronelal (STONE et al., 2013).

O terpenóide citral possui inúmeras atividades biológicas descritas em estudos diversos, como por exemplo, atividade antifúngica contra *Candida sp.* (SILVA et al., 2008), *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus* (MESA-ARANGO et al., 2009); atividade antimicrobiana contra patógenos diversos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA), *Aspergillus niger*, *Klebsiella pneumoniae* e *Propionibacterium acnes* (HAYES; MARKOVIC, 2002); atividade antitumoral (MESA-ARANGO et al., 2009; THOMAS et al., 2016; SANCHES et al., 2017); antileishmania (SANTIN et al., 2009; MACHADO et al., 2012); anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010); relaxante (SADRAEI, GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003); antioxidante (WANG Y. et al., 2016); anti-inflamatória (MARTINS et al., 2017); entre outras.

2.4 Estudos de toxicidade

Existe, ainda, para grande parte da população, a ideia de que as plantas medicinais não representam qualquer risco para a saúde humana, por serem “naturais” e por serem amplamente utilizadas pela população mundial desde os tempos remotos, todavia, sabe-se que os produtos naturais não estão livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos, podendo ter constituintes biologicamente ativos bastante tóxicos, apesar de serem popularmente considerados de menor risco quando comparados com as drogas sintéticas (DE SMET, 2004; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Assim, fica evidente a necessidade de avaliar o balanço entre a atividade farmacológica *versus* a toxicidade de um determinado produto natural, para verificar sua aplicabilidade terapêutica (OLIVEIRA-FILHO, 2015). Para tanto, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* são aplicados visando à obtenção de informações sobre a toxicidade de uma substância química (PAILARD et al., 1999; TALMADGE et al., 2007).

Como modelo para avaliar o efeito tóxico ou protetor de uma substância sobre a membrana celular, experimentalmente, os eritrócitos têm sido muito utilizados, visto que se trata de um tipo de célula com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991; SCHIAR et al., 2007). Portanto, tornam-se vulneráveis a reações envolvendo radicais livres e suscetíveis à peroxidação dos lipídeos de membrana e à hemólise (REDDY et al., 2007).

Estudos apontam compostos isolados de plantas, como polifenóis, glicosídeos, saponinas e triterpenoides, como possíveis causadores de alterações nas membranas das células vermelhas do sangue, com posterior hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; BADER et al., 1996; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997). Desse modo, a ocorrência de hemólise após a exposição ao produto teste pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como o primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (BRANDÃO et al., 2005; SCHIAR et al., 2007).

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas continuamente pelo metabolismo normal das células e tecidos, desempenhando *in vivo* funções variadas, relacionadas à produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização entre as células, entre outras (ROTH, 1997). Todavia, caso haja produção excessiva das ROS, pode ocorrer oxidação de biomoléculas, como as proteínas, aminoácidos, lipídeos e DNA, levando a danos celulares e morte (IGNARO et al., 1999). Assim, as ROS podem estar envolvidas em uma variedade de doenças, como asma, inflamação, artrite, neurodegeneração, doença de Parkinson, entre outras (PERRY et al., 2000).

Nessa perspectiva, substâncias naturais que possuam potencial atividade antioxidante representam uma esperança para o tratamento de uma variedade de doenças, o que, segundo Halliwell (1997), representa a capacidade de uma substância presente em baixas concentrações, quando comparada ao substrato oxidável, atrasar ou inibir a oxidação desse substrato de maneira eficaz.

Outro teste, o de fragilidade osmótica eritrocitária, por sua vez, é eficiente na avaliação da estabilidade das membranas e efeitos toxicológicos das substâncias (RODRIGUES, 2009), de modo que a resistência das hemácias à hemólise, ou seja, a habilidade de manter a integridade estrutural quando expostas a estresse osmótico, vai caracterizar a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) (ALDRICH; SAUNDERS, 2006).

Outro modelo experimental bastante utilizado em estudos científicos, desde o século XIX, é o desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar, organismos do filo Echinodermata e classe Echinoidea que representam um dos grupos mais encontrados nas faixas litorâneas do planeta (SMITH et al., 1993; WADA; SATOH, 1994; LEITE, 2015).

Algumas características dos ouriços-do-mar motivam sua utilização como modelo experimental em estudos científicos, tais como: ampla distribuição geográfica, fácil coleta e simples manutenção em laboratório; obtenção de grande número de gametas a partir de um único indivíduo, de forma não invasiva; alta eficiência na fertilização *in vitro*; desenvolvimento embrionário rápido e sincrônico; cultivo de embriões não necessita de ambiente estéril, sendo realizado em água do

mar; e, por fim, ciclo embrionário apresentando várias semelhanças com o de células humanas, o que permite utilizar o modelo para a prospecção de compostos com atividade antimitótica (MONTENEGRO et al., 2004; SEMENOVA; KISELYOV; SEMENOV, 2006; MILITAO et al., 2007; LEITE, 2015).

Além disso, desempenhando papel essencial dentre os métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto específico, estão as ferramentas de previsão ou métodos de previsão assistida por computador, os quais são rápidos, reprodutíveis e normalmente baseados em biorreguladores humanos, podendo ser úteis para estudar compostos hipotéticos ou já existentes (ANGELO; MAX; MARKUS, 2006; SRINIVAS et al., 2014; OLIVEIRA-FILHO, 2015). Ocupando papel de destaque dentre as ferramentas de previsão, estão os estudos com modelos *in silico*, os quais são utilizados para avaliação da toxicidade de um composto no meio metabólico de mamíferos, tendo, inclusive, sua utilização na seara regulatória incentivada pela legislação recente (MARCHANT, 2012).

Ainda, ferramentas que permitam determinar os perfis farmacocinético (ADME) e toxicológico (ADMET) também ocupam importante papel na definição de biodisponibilidade e efeitos tóxicos de uma molécula sobre a qual se tenha interesse, o que, por fim, contribui para a diminuição do tempo e custo do processo de produção e desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al., 2004).

Nesta perspectiva, considera-se de fundamental importância investigar a ação de fitoconstituintes sobre fungos do gênero *Penicillium*, além de seu mecanismo, a fim de possibilitar a descoberta de substâncias antimicrobianas mais eficazes no combate a este gênero fúngico. Ainda, é sobremaneira importante avaliar a toxicidade *in vitro* de tais produtos naturais, objetivando determinar sua segurança, bem como determinar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos, através de ferramentas de previsão, com o propósito de determinar sua possível aplicabilidade terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de fitoconstituintes sobre doze linhagens de *Penicillium citrinum*, com aprofundamento dos estudos relacionados àquele que apresentou melhor atividade antifúngica (timol), incluindo estudos de toxicidade *in silico* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar *screening* microbiológico de fitoconstituintes;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do fitoconstituente que apresentou melhor atividade antifúngica no *screening*, bem como do antifúngico padrão (voriconazol);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do sanitizante ácido peracético;
- Analisar a ação do timol e ácido peracético sobre a parede celular fúngica;
- Verificar a ação do timol e ácido peracético sobre a membrana celular fúngica, a partir da sua capacidade de interagir com o ergosterol;
- Investigar a interferência do timol sobre o efeito do antifúngico padrão;
- Analisar *in silico* a toxicidade e os parâmetros farmacocinéticos do timol;
- Comparar a toxicidade *in silico* do timol com a do antifúngico controle, o voriconazol;
- Estudar o efeito do timol em eritrócitos humanos, por meio da avaliação do potencial hemolítico, da fragilidade osmótica e do potencial antioxidante na presença de Espécies Reativas de Oxigênio;
- Avaliar o efeito antimitótico do timol sobre células embrionárias de ouriços-do-mar (*Echinometra lucunter*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Parcerias, para o apoio no desenvolvimento do trabalho, foram realizadas: no Laboratório de Ensaio Toxicológicos II (LABETOX) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB (IPeFarM-UFPB); e no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento (LABID) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) – UFPB.

4.2 Posicionamento ético

Os aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos foram levados em consideração para a realização deste trabalho. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley (CEP-HULW), através do Parecer Consubstanciado de número 2.192.256.

4.3 Produtos naturais

Foram utilizados fitoconstituintes obtidos da empresa Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., situada em São Paulo, e disponíveis no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPB. Os produtos naturais estudados foram:

- Geraniol;

- Timol;
- Carvacrol;
- Citral;
- R-citronelal;
- S-citronelal;
- 7-hidróxi-citronelal;
- Citronelal;
- Isoeugenol.

As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em Tween 80 a 2% e DMSO em uma proporção de até 10%, e utilizando água destilada estéril para alcançar as concentrações desejadas (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Para melhorar a solubilidade e facilitar a dispersão de substâncias lipossolúveis no meio de cultura, é comum a utilização de solventes, detergentes ou agentes emulsificantes, como Tween 20, Tween 80, DMSO e etanol (GROPPO et al., 2002; BAYDAR et al., 2004; BRUNI et al., 2004). Contudo, faz-se necessário observar se o próprio agente emulsificador não possui atividade antimicrobiana. Dessa forma, evidenciar o crescimento das linhagens em RPMI-1640, DMSO (5%) e Tween 80 (2%), sem monoterpenos ou antifúngicos, foi uma das preocupações do presente estudo, a fim de confirmar que o impedimento no crescimento dos micro-organismos foi realmente uma consequência da presença do monoterpeno ou antifúngico, não existindo interferência do agente emulsificante no crescimento das linhagens.

4.4 Produtos-controle

Os produtos utilizados como controle na execução das metodologias, adquiridos da Sigma-Aldrich®, foram os seguintes: voriconazol, anfotericina B, ergosterol e sorbitol. As soluções também foram preparadas no momento de execução dos testes.

Utilizou-se também o produto sanitizante PAC 200[®] (lote 968216), composto por ácido peracético em pó, fabricado pela Adhetech Química Indústria e Comércio Ltda., com registro na Anvisa número 317140074. O PAC 200[®] foi preparado nas concentrações recomendadas pelo fabricante para obtenção da ação fungicida (100, 200 e 2000 ppm).

4.5 Micro-organismos

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 12 linhagens de *Penicillium citrinum*, 11 obtidas da coleção do Laboratório de Micologia (LM 2, LM 3, LM 4, LM 8, LM 30, LM 145, LM 155, LM 157, LM 161, LM 171 e LM 278) e uma linhagem de referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-Fiocruz)- INCQS-40011, as quais foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose inclinado (DIFCO Laboratories Ltda.), a temperatura ambiente (28° a 30°C) e a 4°C. As linhagens da coleção do Laboratório de Micologia possuem origens diversas, sendo LM 3, LM 4 e LM 157 de origem ambiental, e o restante, de origem clínica; LM 2, LM 145 e LM 278 foram obtidas de unha; LM 30, LM 161 e LM 171 foram obtidas de pele; e LM 155 e LM 8 foram obtidas de ouvido.

4.6 Meios de cultura

Para manutenção das linhagens selecionadas e realização dos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados Ágar Sabouraud Dextrose – ASD e Caldo Sabouraud Dextrose – CSD, ambos obtidos da DIFCO Laboratories Ltda (Detroit, MI, EUA); além de RPMI-1640-L-glutamina (sem bicarbonato de sódio), da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil), os quais foram preparados conforme instruções do fabricante.

4.7 Inóculo das espécies fúngicas

As linhagens fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura ASD, por 10-14 dias, a temperatura de 28 a 30°C, com a finalidade de atingirem o crescimento satisfatório. Para o preparo da suspensão das linhagens, colônias fúngicas foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de inoculação em “L”, as suspensões foram obtidas. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (FANEM), comparando-se e ajustando-se, posteriormente, sua turbidez com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Por fim, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões foram ajustadas no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; SANTOS; HAMDAN, 2005).

A quantificação do inóculo foi confirmada por meio do plaqueamento de 0,01 mL das suspensões em ASD. As placas foram incubadas a 28°C e examinadas diariamente para a contagem das colônias, determinando as UFC em 1 mL.

4.8 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

4.8.1 Triagem microbiológica

A triagem microbiológica para avaliação do poder antifúngico dos fitoconstituintes em estudo foi realizada com base na técnica microdiluição em meio líquido (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; HADACEK; GREGER, 2000; KONEMAN et al., 2008). Em placas estéreis de 96 poços com tampa, foram

colocados 100 µL de RPMI-1640, além de 100 µL da solução dos produtos naturais na concentração de 1024 µg/mL, ambos duplamente concentrados, de maneira que cada linha da placa correspondeu a um fitoconstituente testado. Foi avaliada a atividade antifúngica de geraniol, timol, carvacrol, citral, R-citronelal, S-citronelal, 7-hidróxi-citronelal, citronelal e isoeugenol.

Em seguida, foram inoculados 10 µL da suspensão fúngica, previamente preparada, na concentração de 10^6 UFC/mL de cada micro-organismo, sendo cada coluna da placa correspondente a uma das doze linhagens de *Penicillium* avaliadas. Foram realizados, concomitantemente, controles da esterilidade do meio, da viabilidade das linhagens e da interferência dos solventes. O sistema foi incubado a 28°C por 7 dias e, logo após, foi avaliado o poder antifúngico dos produtos, sendo selecionados aqueles que apresentaram melhor perfil de inibição visual do crescimento dos micro-organismos, quando comparados ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicata. 1111111111`

Tem-se que a microdiluição em caldo e a difusão em ágar são as técnicas mais comumente utilizadas para a realização de triagens microbiológicas de produtos naturais com potencial antibacteriano ou antifúngico, sejam eles extratos de plantas ou substâncias puras (COWAN, 1999; ALVES et al., 2008). Todavia, a microdiluição é preferível por possibilitar a obtenção de resultados quantitativos, através da CIM (CAMPANA et al., 2011).

4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se os fitoconstituintes selecionados na triagem microbiológica. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; HADACEK; GREGER, 2000). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL de RPMI-1640 duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da solução dos fitoconstituintes na concentração inicial de 1024 µg/mL (também duplamente

concentrados), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024 a 0,5 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontrava-se a maior concentração e, na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados nas cavidades 10 µL do inóculo, de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, das linhagens fúngicas, correspondendo cada coluna da placa a uma linhagem.

Para verificar a ausência de interferência dos solventes DMSO e Tween 80, utilizados na preparação da solução dos fitoconstituintes, sobre os resultados, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do RPMI-1640 duplamente concentrado, DMSO (até 10%), Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão fúngica. Além disso, um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do do RPMI-1640 duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada linhagem. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram colocados 200 µL do do RPMI-1640 em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos. Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para o antifúngico padrão Voriconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura.

As CIMs para os fitoconstituintes, o antifúngico e o sanitizante foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado foi expresso pela média das Concentrações Inibitórias Mínimas obtidas nos três ensaios.

Considera-se como efetiva e clinicamente aplicável a terapia antimicrobiana na qual, primariamente, o sítio de infecção seja alcançado pelo agente terapêutico e que, posteriormente, este promova a cessação ou inibição da progressão da invasão microbiana, facilitando a ação das defesas do hospedeiro para controlar a infecção (CLEELAND; SQUIRES, 1991). Portanto, na prática clínica, o valor da CIM de um antimicrobiano significa que esta concentração deve ser obtida no sítio da infecção para que o crescimento microbiano seja potencialmente inibido (KONEMAN et al., 2008).

A atividade biológica dos produtos foi interpretada, através de sua CIM, conforme os seguintes critérios: menor que 100 µg/mL = atividade excelente/ótima; 100-500 µg/mL = atividade moderada; 500-1000 µg/mL = baixa atividade; maior que 1000 µg/mL = produto inativo (HOLETZ et al., 2002).

4.8.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima foi determinada, para o fitoconstituente que apresentou melhor resultado no teste da CIM, para as 12 linhagens de *P. citrinum*. Após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL da menor concentração com capacidade de inibir o crescimento dos fungos, além das duas concentrações imediatamente superiores (CIMx2 e CIMx4), foram retiradas das cavidades da placa de microdiluição e dispensadas em nova placa de 96 poços contendo meio RPMI. O sistema foi incubado a 28 °C por 72 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do fitoconstituente na qual não houve crescimento visível (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008). Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para voriconazol. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média foi calculada.

4.9 Investigação do mecanismo de ação antifúngica

4.9.1 Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol

A fim de investigar a ação do fitoconstituente escolhido e ácido peracético sobre a parede celular fúngica foi realizado o ensaio com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Para tanto, o ensaio comparou as Concentrações Inibitórias Mínimas dos produtos antifúngicos sobre as linhagens de *P. citrinum* INCQS-40011, LM 3, LM 161 e LM 171, na ausência e na presença de sorbitol, através do método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U”, semelhante ao

item 4.7.2. Neste caso foi utilizado meio de cultura previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) a 0,8 mol/L. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média dos resultados (FROST et al., 1995; ESCALANTE et al., 2008).

Também foram realizados controles de viabilidade das linhagens e esterilidade do meio. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 8 dias e, então, realizada a leitura (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).

4.9.2 Ação dos produtos na membrana celular: interação com o ergosterol

A determinação da CIM dos produtos, contra as linhagens de *P. citrinum* IHCQS-40011, LM 3, LM 161 e LM 171, foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U”, de forma semelhante protocolo exposto na determinação da CIM, item 4.7.2. Neste caso, especificamente, foi utilizado meio de cultura previamente adicionado de 400 µg/mL de ergosterol. Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de ergosterol exógeno. Foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cujo mecanismo de ação envolve a interação com ergosterol da membrana, para servir como controle positivo dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 8 dias para realização da leitura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média dos resultados (ESCALANTE et al., 2008).

4.10 Determinação do índice de concentração inibitória fracionada (pelo método de *checkerboard*) do timol associado com o voriconazol

As combinações do fitoconstituente escolhido com o antifúngico comercial voriconazol foram testadas em triplicata contra as linhagens de *P. citrinum* INCQS-40011, LM 3, LM 161 e LM 171, utilizando a técnica de microdiluição *checkerboard* (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991). Inicialmente, 100 µL de caldo foram

adicionados nos poços da placa de microdiluição. Em seguida, foi adicionado o fitoconstituente no sentido vertical e o antifúngico no sentido horizontal da placa. Cada produto foi testado em diferentes concentrações ($CIM \times 8$, $CIM \times 4$, $CIM \times 2$, CIM , $CIM \div 2$, $CIM \div 4$, $CIM \div 8$ e $CIM \div 16$). Por fim, foram adicionados 10 μ L da suspensão fúngica. As placas foram incubadas a 28 °C por 72h.

O índice CIF foi calculado através da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antibiótico e B o composto em teste. O CIF^A , por sua vez, foi 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 ($\leq 0,5$), aditividade ($>0,5$ e <1), indiferença (≥ 1 e <4) ou antagonismo ($\geq 4,0$) (LEWIS et al., 2002).

4.11 Ensaios *in silico*

4.11.1 PASS *online*

O PASS *online* (Previsão do Espectro de Atividade para Substâncias) é um software projetado para avaliação do potencial biológico de uma molécula orgânica, de forma geral, sobre o organismo humano, por meio de previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura do composto. O PASS *online* permite investigar o espectro de atividade biológica de um composto, que corresponde aos diferentes tipos de atividades que podem resultar da interação do composto com entidades biológicas, através dos índices Pa (probabilidade “de ser ativo”) e Pi (probabilidade “de ser inativo”), os quais permitirão categorizar um composto potencial como pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

4.11.2 Análise teórica da toxicidade e dos parâmetros farmacocinéticos

A fim de analisar a toxicidade teórica e os parâmetros farmacocinéticos do fitoconstituente escolhido, a estrutura foi submetida ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), através do programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugscore.html>).

A partir desta análise, foram identificados os potenciais *druglikeness* e *drug-score*, relacionados a descritores topológicos, além de outras propriedades, como o cLogP e massa molecular (TETKO, 2005). Esta avaliação também incluiu a análise teórica dos efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução (ABREU, 2008).

Por fim, visando uma possível administração por via oral e boa absorção gastrointestinal, avaliou-se o fitoconstituente utilizando a “Regra dos cinco” de Lipinski, a qual estabelece que, para que um composto tenha boa disponibilidade oral teórica, pelo menos três de quatro requisitos devem ser apresentados. Nesse sentido, para serem absorvidos, compostos precisam possuir massa molecular inferior a 500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) inferior a 5, número de aceptores de ligação hidrogênio (nALH) inferior a 10 e número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor que 5 (LIPINSKI, 2001).

4.12 Avaliação do efeito em eritrócitos humanos

4.12.1 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Foi investigada a citotoxicidade do fitoconstituente sobre células sanguíneas dos tipos A, B e O. Para tanto, uma amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o

sedimento da última centrifugação ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% (RANGEL et al., 1997).

O fitoconstituente teste em diferentes concentrações foi adicionado a 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. As amostras foram, então, incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Foram realizados controles negativo (uma suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos- 0 % de hemólise) e positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1%- 100 % de hemólise). Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.12.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. Soluções do produto teste em diferentes concentrações foram incubadas em tubos contendo 2 ml de uma suspensão de eritrócitos por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio (0,24%) e agitados a 100 rpm, por uma hora a 22 ± 2 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001).

4.12.3 Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

O experimento foi realizado de acordo com o estudo de Bilton et al. (2012), com pequenas modificações, consistindo na incubação da substância nas concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500 µg/mL com 2 mL de uma solução de

eritrócitos a 0,5% por 2h a 25 ± 2 °C na presença de uma solução de peróxido de hidrogênio (0,3%). Foram utilizados os grupos controle: negativo (solução de eritrócitos - 0 % de hemólise), positivo (solução de eritrócitos na presença da solução de peróxido de hidrogênio - H_2O_2 40 mM - 100 % de hemólise) e um padrão ($\text{Hb} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Vitamina C}$ 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Decorridas 2h horas, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada fazendo-se a leitura de uma alíquota do sobrenadante por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em comparação ao controle positivo ($\text{Hb} + \text{H}_2\text{O}_2$).

4.13 Avaliação do efeito embriotóxico dos fitoconstituintes

Para a avaliação do efeito embriotóxico, foi feita a verificação da ação antimitótica do fitoconstituente com melhor atividade antifúngica sobre células embrionárias de ouriço-do-mar, conforme protocolo experimental de Leite et al. (2012). Para tanto, ouriços-do-mar adultos (*Echinometra lucunter*) foram coletados no Oceano Atlântico na costa de João Pessoa- Paraíba ($7^{\circ}09'S, 34^{\circ}47'O$). Os animais foram retirados do seu habitat com o auxílio de facas e garfos, uma vez que são comumente encontrados em locas feitas em rochas nas regiões entremarés. Os animais foram transportados para o laboratório em recipientes plásticos contendo água do mar e, em seguida, lavados com água do mar filtrada (para a retirada de fezes, micro-organismos e parasitas aderidos à superfície) e colocados em reservatórios contendo 4 litros de água do mar filtrada por cada animal, sob suprimento de oxigênio constante.

A captura dos animais foi previamente autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Ministério do Meio Ambiente (autorização número 32105-2). Não é necessária a submissão do presente procedimento ao Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, aplica-se somente

aos animais das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata (§3º, art. 2) (BRASIL, 2008).

A desova foi induzida por injeção intracelomática de KCl 0,5M (2-3 mL), e os gametas obtidos até no máximo 15 minutos após a injeção. Gametas masculinos foram identificados como a secreção branca e os femininos como a secreção alaranjada. Gametas masculinos secos foram coletados com pipeta de Pasteur de vidro e mantidos a 4°C até o uso (não mais que 5 dias). Os ovos foram coletados diretamente na água e lavados duas vezes em 500 mL da água do mar filtrada. A suspensão de ovos foi ajustada para 2×10^4 células/mL. O esperma seco foi diluído em água do mar filtrada na proporção de 1:5.000, para que pudesse ser realizado o procedimento de fertilização. A fertilização foi confirmada em microscópio de luz pela elevação do envelope vitelínico.

Os embriões (1×10^4 embriões / mL) foram incubados em placas multipoços estéreis a $26 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ e fitoconstituente teste foi adicionado, em diferentes concentrações, 5 minutos após a fertilização. Cento e vinte minutos após a fertilização, 200 μL da suspensão de embriões foram fixados com o mesmo volume de formaldeído a 4% e armazenadas a $4 ^\circ\text{C}$. A análise dos estágios embrionários (primeira clivagem e segunda clivagem) foram realizadas com um microscópio óptico (ampliação de 400 x). Cem embriões foram avaliados para cada uma das amostras. Controles negativos contendo a mesma quantidade de DMSO utilizada na diluição dos produtos foram realizados, a fim de certificar que o DMSO não apresentou qualquer efeito no embrião. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com três repetições cada (LEITE et al., 2012).

4.14 Análise estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se média aritmética para a quase totalidade dos resultados, excetuando-se apenas os dados de toxicidade, que passaram pela análise de variância (ANOVA) seguida dos testes de Dunnett (para a avaliação de toxicidade sobre as células sanguíneas) e de Bonferroni (para a análise da embriotoxicidade). Os resultados foram considerados

significantes quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com o *software* GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, San Diego, CA, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem microbiológica

No presente estudo, inicialmente, foi avaliado o poder antifúngico dos fitoconstituintes geraniol, timol, carvacrol, citral, R-citronelal, S-citronelal, 7-hidróxi-citronelal, citronelal e isoeugenol, que foram escolhidos para a pesquisa devido a relatos na literatura de suas consideráveis atividades antimicrobianas ou pela necessidade de investigação de suas atividades antimicrobianas especificamente direcionadas ao gênero *Penicillium*, devido à existência de poucos estudos nesse sentido.

Geralmente utilizada como teste preliminar, a triagem microbiológica é de fundamental importância para a avaliação do potencial antimicrobiano de produtos naturais, visto que possibilita, a partir dos resultados obtidos, a elaboração de uma sequência de estudos mais detalhados, o que, por fim, levará ao aprofundamento das informações relacionadas à atividade antifúngica dos compostos.

Pela análise da Tabela 1, observa-se que os compostos que apresentaram excelente atividade biológica foram timol, geraniol, isoeugenol e carvacrol, sendo que, os três primeiros, inibiram o crescimento das linhagens em sua totalidade, e o carvacrol inibiu aproximadamente 90% das linhagens de *Penicillium citrinum* estudadas.

Observa-se, ainda, que o citronelal, os enantiômeros R/S-citronelal e o derivado 7-hidróxi-citronelal apresentaram, juntamente com o citral, baixa atividade sobre as linhagens de *P. citrinum* estudadas, verificando-se nenhuma inibição de crescimento das linhagens avaliadas frente aos isômeros R/S-citronelal, além de 25% de inibição para citral e citronelal e, apenas, aproximadamente 10% para o 7-hidróxi-citronelal (Tabela 1).

Tabela 1—Resultados dos ensaios (n=3) de atividade antifúngica dos fitoconstituintes sobre linhagens de *P. citrinum*- Técnica de microdiluição.

Linhagens	Fitoconstituintes (1024 µg/mL)								
	timol	geraniol	isoeugenol	carvacrol	Citronelal	R-citronelal	S-citronelal	7-hidróxi-citronelal	citral
INCQS-40011	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LM 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LM 3	-	-	-	-	+	+	+	+	-
LM 4	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LM 8	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LM 30	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LM 145	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LM 171	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Controle da linhagem	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Crescimento microbiano no meio de cultura; (-): Ausência de crescimento microbiano no meio de cultura.

A partir dos dados iniciais referentes à triagem microbiológica de diversos fitoconstituintes sobre as linhagens de *Penicillium citrinum* avaliadas, prosseguiu-se com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo (MURRAY, 1999), excelente meio para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos, além de constituir uma ferramenta de pesquisa útil na determinação da atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (ANDREWS, 2001; ALVES et al., 2008).

5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a triagem inicial, na qual timol, geraniol, isoeugenol e carvacrol apresentaram resultados muito satisfatórios na inibição do crescimento das linhagens de *P. citrinum*, procedeu-se uma nova triagem, desta vez com a determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados. Para tanto, selecionou-se a técnica da microdiluição em caldo, método econômico, sensível e altamente reprodutível (SCORZONI et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008), para testar concentrações de geraniol, isoeugenol, timol e carvacrol que variaram de 1024 a 0,5 µg/mL, com controle concomitante da viabilidade das linhagens, esterilidade do meio e interferência dos solventes DMSO e Tween 80 nos resultados.

Tabela 2 – Média dos resultados da avaliação da CIM (n=3) de geraniol, timol, carvacrol e isoeugenol sobre linhagens de *P. citrinum*.

<i>P. citrinum</i>	Fitoconstituente (µg/mL)			
	Timol CIM	Geraniol CIM	Isoeugenol CIM	Carvacrol CIM
INCQS-40011	64	256	64	512
LM 2	8	256	64	512
LM 3	16	256	64	512
LM 4	64	512	256	512
LM 8	8	256	64	512
LM 30	32	256	64	512
LM 145	64	256	64	512
LM 155	8	512	256	512
LM 157	32	512	128	512
LM 161	32	512	128	512
LM 171	32	256	128	512
LM 278	64	256	128	512

A partir dos ensaios de determinação da CIM, verificou-se que o carvacrol apresentou CIM de 512 µg/mL, concentração na qual inibiu o crescimento de 100% das linhagens de *Penicillium citrinum* avaliadas. Enquanto que o geraniol apresentou uma CIM₅₀ de 256 µg/mL, e o isoeugenol revelou um valor de 64 µg/mL para sua CIM₅₀, valores correspondentes à inibição de pelo menos 50% do crescimento das linhagens. Dentre os fitoconstituintes testados, os melhores resultados foram verificados para o timol, que apresentou valores de CIM variando de 8 a 64 µg/mL, a depender da linhagem avaliada (Tabela 2).

Concordando parcialmente com o presente estudo, Bouddine et al. (2012), verificaram, utilizando os métodos de diluição em caldo, difusão em disco e microatmosfera, que o timol apresentou, contra *Aspergillus niger*, a melhor atividade antifúngica (com base no estudo das CIMs) dentre os fitoconstituintes estudados- timol, carvacrol e eugenol.

A análise desses resultados desencadeou o interesse por estudos mais aprofundados acerca da ação antifúngica do timol sobre linhagens de *Penicillium citrinum*, linhagens estas que possuem origens diversas- clínica, ambiental, além de um micro-organismo padrão de referência.

As determinações dos valores de CIM e CFM do timol, sobre as doze linhagens de *P. citrinum*, foram realizadas pelo método de microdiluição, e os seus respectivos valores, bem como os controles realizados, encontram-se representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Média dos resultados dos ensaios de CIM e CFM (n=3) de timol, voriconazol e PAC 200 sobre linhagens de *P. citrinum*.

<i>P. citrinum</i>	Timol (µg/mL)		Voriconazol (µg/mL)		PAC 200 (µg/mL)	Controle da linhagem	Controle do meio
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM		
INCQS-40011	64	128	256	NE*	10000	+	-
LM 2	8	32	64	128	10000	+	-
LM 3	16	32	0,5	2	10000	+	-
LM 4	64	128	+	-	10000	+	-
LM 8	8	+	0,5	+	10000	+	-
LM 30	32	+	8	16	10000	+	-
LM 145	64	+	32	32	10000	+	-
LM 155	8	32	64	64	10000	+	-
LM 157	32	32	1	4	10000	+	-
LM 161	32	32	2	8	10000	+	-
LM 171	32	32	2	8	10000	+	-
LM 278	64	+	256	+	10000	+	-

(+): Crescimento microbiano no meio de cultura; (-): Ausência de crescimento microbiano no meio de cultura; CIM- Concentração Inibitória Mínima; CFM- Concentração Fungicida Mínima.

A partir da análise dos resultados obtidos, observa-se que o timol teve seu valor de CIM₅₀ estabelecido em 32 µg/mL, concentração na qual inibiu 66,7% das linhagens. Já a concentração de 64 µg/mL correspondeu à inibição de 100% das linhagens. Portanto, pode-se afirmar que o timol apresentou atividade antimicrobiana considerada ótima, em concordância com Sartoratto et al. (2004), que afirmam que os compostos que possuem CIM variando de 50 a 500 µg/mL podem ser considerados de atividade antimicrobiana ótima, bem como, em concordância com

Holetz et al. (2002), que atribuem atividade ótima a compostos que apresentem CIM menor que 100 µg/mL.

Os resultados encontrados mostraram-se compatíveis, por vezes mais satisfatórios, com os achados de outros autores, como, por exemplo, o estudo de Zabka e Pavela (2013), que avaliou a ação de 21 compostos fenólicos, dentre eles o timol, sobre espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, encontrando valores de CIM₅₀ variando de 30 a 52 µg/mL, além de CIM variando de 76 a 255 µg/mL (ZABKA; PAVELA, 2013).

Chavan e Tupe (2014) investigaram a ação do timol sobre leveduras envolvidas na deterioração do vinho (*Candida azyma*, *Candida quercitrusa*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygoascus steatolyticus*), encontrando valores de CIM que variaram de 16 a 128 µg/mL.

Avaliando a ação do timol sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, De Castro et al. (2015) encontraram valores de CIM de 39 µg/mL, para *C. albicans* e *C. krusei*, e de 78 µg/mL, para *C. tropicalis*.

Guarda et al. (2011), que avaliaram o potencial de utilização do timol como antimicrobiano em embalagens de alimentos, investigando sua ação contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, obtiveram Concentrações Inibitórias Mínimas que variaram de 125 a 250 µg/mL. Em um estudo realizado por Kerekes et al. (2016), utilizando filés de peito de frango inoculados com *Listeria monocytogenes*, observou-se que o timol causou uma redução de 1 a 3 log nas unidades formadoras de colônia e, além disso, também proporcionou um odor agradável ao alimento. Miladi et al. (2017) avaliaram o uso de timol na destruição do biofilme de doze linhagens de *Salmonella typhimurium* e identificaram valores de CIM que variaram de 32 a 128 µg/mL.

Analisando comparativamente a CIM e CFM, foi observado que o timol apresentou valores de CFM semelhante aos valores da CIM para 1/4 das linhagens, mostrando, também, valores de CFM superiores ao valor de CIMx4 para quatro

linhagens. Já o voriconazol apresentou valor de CFM semelhante aos valores da CIM para 1/6 das linhagens, mostrando, também, valores de CFM superiores ao valor de CIMx4 para três linhagens.

Investigação acerca da ação do timol sobre fungos envolvidos na deterioração de alimentos (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinérea*, *Cladosporium* spp., *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus oryzae*) encontrou valores de CIM variando de 100 a 500 µg/mL e CFM de 125 a 500 µg/mL. Todavia, para as espécies de *Penicillium* estudadas, quais foram *P. citrinum* e *P. chrysogenum*, os valores de CIM foram de 250 e 500 µg/mL, respectivamente, já os valores de CFM foram, respectivamente, 300 e 550 µg/mL (ABBASZADEH et al., 2014).

Um estudo avaliou a atividade do timol sobre diversos fungos, tais como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderma viride* e *Candida albicans*; e contra várias bactérias, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* e *Staphylococcus aureus*. Foram encontrados, para as bactérias, valores de CIM de 10-100 µg/mL e de CBM de 50-150 µg/mL, já para os fungos os valores de CIM e CFM variaram de 10 a 50 µg/mL (GIWELI et al., 2012).

Wang T.H. et al. (2016), estudando a ação do timol sobre os patógenos orais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Escherichia coli*, encontraram valores de CIM variando de 100 a 200 µg/mL e de CFM, de 200 a 400 µg/mL. Kifer; Mužinić e Klarić MŠ (2016) encontraram valores de CIM que variaram de 250 a 375 µg/mL, estudando a ação de timol sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

De Lira et al. (2012) encontraram, para o timol, valores de CIM variando de 128 a 256 µg/mL e, assim como no presente estudo, valores maiores para a CFM, variando de 128 a 1024 µg/mL. Wattanasatcha, Rengpipat e Wanichwecharungruang (2012) avaliando a atividade do timol, de forma livre e em

nanoesferas, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, observaram CIM variando de 10 a 156 µg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 156 a 313 µg/mL, para o timol livre, bem como CIM de 10-313 µg/mL e CBM de 156-1250 µg/mL, para o timol encapsulado.

Heo et al. (2012) verificaram que o timol apresentou CIM e CBM variando de 10 a 320 µg/mL, ao avaliarem a atividade desse fitoconstituente sobre bactérias patogênicas de peixes- *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. anguillarum*.

Como controle nos testes, foi utilizado o antifúngico voriconazol, derivado sintético do fluconazol e antifúngico triazólico de segunda geração, o qual apresenta amplo e potente espectro de ação contra diversos gêneros fúngicos, dentre eles o *Penicillium* (SABO; ABDEL-RAHMANL, 2000; BIZARRO; DINIS, 2003, SIDRIM; ROCHA, 2004; GIMENO; MARTINEZ, 2007). Nos testes realizados, o antifúngico padrão apresentou CIM₅₀ de 8 µg/mL, apresentando, ainda, valor mais elevado para a CIM₉₀, correspondente a 256 µg/mL.

Também foi utilizando um sanitizante controle com ação antifúngica, o PAC 200[®], sanitizante em pó à base de ácido peracético para desinfecção de frutas, verduras, legumes, utensílios em geral e superfícies, registrado na ANVISA/MS sob o número 317140044.

O ácido peracético (CH₃COOOH) é um produto biodegradável com o alto poder biocida, possui diversas aplicações e demonstra excelente atividade esporicida, bactericida, virucida e fungicida em baixas concentrações (<0,3%) (BALDRY, 1983; BLOCK, 1991; OSSIA-ONGAGNA; SABATIER, 1993; KITIS, 2004; BERNET et al., 2005). Há relatos que o principal mecanismo de ação dessa substância está envolvido com a desnaturação de proteínas e enzimas e aumento na permeabilidade da parede celular, devido ao rompimento das ligações sulfidrilo (SH) e enxofre (SS) (BALDRY, 1988; BLOCK, 1991).

O ácido peracético possui a vantagem de se decompor em subprodutos seguros (ácido acético, água e oxigênio), além de estar livre de decomposição por peroxidases e permanecer ativo na presença de cargas orgânicas (LENSING; OEI,

1984; MALCHESKY, 1993; DAGHER et al., 2017). Sua principal aplicação é como um esterilizante líquido a baixa temperatura para dispositivos médicos e hemodializadores, também sendo usado como um esterilizante de superfície ambiental (CROW, 1992; MALCHESKY, 1993). Em estudo realizado por Wheeldon et al. (2008), observou-se a atividade do ácido contra esporos de *Clostridium difficile*, mesmo na presença de matéria orgânica, o que reflete o verdadeiro ambiente clínico.

Elbouchtaoui et al. (2015), apontaram sua atividade contra dois dos principais fungos que afetam culturas agrícolas importantes, *P. digitatum* e *Botrytis cinerea*. Mari, Gregori e Donati (2004) revelaram a atividade do ácido peracético contra *Monilinia laxa* e *Rhizopus stolonifer*. Shirron et al. (2009), estudando a eficácia de diferentes métodos de saneamento contra bactérias indicadoras e patógenos entéricos humanos em pepino e salsa, demonstraram a atividade do ácido peracético na redução da população de micro-organismos aeróbios totais.

Em um estudo comparativo realizado com vários antimicrobianos (ácido peracético, cloreto de cetilpiridínio, hipoclorito de sódio, ácido láctico acidificado, ácido propiônico e arginato láurico), observou-se que o ácido peracético, juntamente com o arginato láurico, foram responsáveis pelos melhores efeitos na diminuição da contagem de *Salmonella heidelberg* em frangos (MOORE et al., 2017).

Um estudo realizado por Ayoub et al. (2017) avaliou o efeito da combinação, sobre *Botrytis cinerea*, de ácido peracético com dois fungicidas comumente utilizados em culturas agrícolas, a fim de minimizar a quantidade de produtos químicos nocivos. Observou-se que essa combinação diminuiu em mais de 95% a concentração de pesticida necessária para a atividade fungicida.

Dagher et al. (2017) realizaram um estudo com o Bioxy[®], produto à base de ácido peracético, no qual observaram que uma solução aquosa do produto a 0,2% (equivalente a 200 ppm de ácido peracético) causou uma redução de 6,76 log de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA); uma solução aquosa a 5% causou uma redução de 3,93 log de *Mycobacterium bovis*; uma solução a 1% reduziu *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Pseudomonas aeruginosa*.

em 6,31 log e 7,18 log, respectivamente; e uma solução a 5% de Bioxy[®] reduziu os esporos de *Clostridium difficile* em 5.36 log.

De acordo com instruções do fabricante, o produto deve ser utilizado: em 0,5 g/L de água (100 ppm ou 500 µg/mL) para desinfecção de nível leve, no caso de frutas, verduras e congêneres; em 1,0 g/L de água (200 ppm ou 1.000 µg/mL) para desinfecção de nível médio (semicrítica), no caso de superfícies fixas, como pisos, ralos, vasos sanitários, paredes e afins, com auxílio de pano ou esponja; e em 10 g/L de água (2000 ppm ou 10.000 µg/mL) para desinfecção de nível alto (crítica), para o caso de superfícies fixas, como pisos, ralos, vasos sanitários, paredes e afins.

A ação do produto foi testada sobre as linhagens de *P. citrinum* estudadas nas concentrações recomendadas pelo fabricante, para os três níveis de desinfecção- leve, semicrítico e crítico. A inibição do crescimento das linhagens ocorreu apenas na concentração correspondente ao nível de desinfecção alto (crítico) proposto pelo fabricante, de forma que na concentração de 10.000 µg/mL observou-se a inibição do crescimento de 100% das linhagens.

Não existe ainda um consenso sobre o nível de inibição aceitável na comparação da atividade entre produtos naturais e antimicrobianos padrões. Analisando comparativamente a CIM dos produtos testados, observa-se que o voriconazol apresentou melhores resultados que o timol para aproximadamente 58% das linhagens, sendo a atividade do timol melhor que a do voriconazol para aproximadamente 42% dos micro-organismos, o que sugere uma atividade bastante satisfatória do produto natural, visto que sua atividade aproximou-se da atividade do antifúngico padrão testado para quase metade das linhagens. Já quando se compara a ação desses produtos com a do sanitizante controle, constata-se uma ação inferior do produto à base de ácido peracético, o qual foi eficaz apenas na maior concentração indicada pelo fabricante. Além da necessidade de utilização de grande concentração do ácido peracético para o combate eficaz à espécie fúngica estudada, sabe-se que uma de suas características marcantes é a instabilidade, o que limita sua utilização como antifúngico (PEDERSEN et al., 2015).

É de fundamental importância avaliar a natureza do efeito antifúngico da substância, no tocante à inibição ou morte do micro-organismo testado. Para tanto, utiliza-se a razão CBM/CIM, para bactérias, e a razão CFM/CIM, para fungos. Nesse sentido, verificou-se a existência de mais de um critério para a avaliação da natureza da ação de uma substância química contra determinado agente patogênico, de maneira que, alguns autores, consideram uma substância como bactericida ou fungicida quando a sua razão CBM/CIM ou CFM/CIM está compreendida entre 1:1 a 2:1, considerando também que, para razão > 2:1, o modo de ação antimicrobiano é provavelmente bacteriostático ou fungistático (CLSI, 2009; HAFIDH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; PADLA, SOLIS, RAGASA, 2012). Já segundo o critério de outros autores, quando a razão CFM/CIM for menor ou igual a 4, a ação da substância será considerada como fungicida; sendo considerada fungistática para valores maiores do que 4 (HAZEN, 1998; MELETIADIS et al., 2007; FARSHORIA et al., 2010). A Tabela 4 mostra os valores das Razões CFM/CIM do timol e voriconazol contra as linhagens de *P. citrinum* estudadas.

Tabela 4 – Razões CFM/CIM do timol e voriconazol contra linhagens de *P. citrinum*.

Linhagens	Timol (µg/mL)		Voriconazol (µg/mL)	
	CFM/CIM	Efeito	CFM/CIM	Efeito
INCQS-40011	128/64=2	Fungicida	Maior que 4	Fungistático
LM 2	32/8=4	Fungicida/ Fungistático*	128/64=2	Fungicida
LM 3	32/16=2	Fungicida	2/0,5=4	Fungicida/ Fungistático*
LM 4	128/64=2	Fungicida	NE*	ND**
LM 8	Maior que 4	Fungistático	Maior que 4	Fungistático
LM 30	Maior que 4	Fungistático	16/8=2	Fungicida
LM 145	Maior que 4	Fungistático	32/32=1	Fungicida
LM 155	32/8=4	Fungicida/ Fungistático*	64/64=1	Fungicida
LM 157	32/32=1	Fungicida	4/1=4	Fungicida/ Fungistático*
LM 161	32/32=1	Fungicida	8/2=4	Fungicida/ Fungistático*
LM 171	32/32=1	Fungicida	8/2=4	Fungicida/ Fungistático*
LM 278	Maior que 4	Fungistático	Maior que 4	Fungistático

NE* - o valor de CIM foi maior que 1024; ND**- não foi possível determinar a relação, por ausência do valor de CIM; Fungicida/ Fungistático*- a substância será classificada como fungicida ou fungistática, a depender do critério escolhido.

Pela análise dos valores acima, verifica-se que, de acordo com o primeiro critério, seguido por autores diversos, que estabelece ação fungicida para valores de razão CFM/CIM de 1 ou 2, o timol apresentou ação fungicida para 1/2 das linhagens de *P. citrinum* avaliadas, e o voriconazol apresentou ação fungicida para 1/3 das

linhagens estudadas. Já, de acordo com o critério no qual a substância será considerada fungicida quando possuir razão CFM/CIM menor ou igual a 4, o timol apresentou ação fungicida para aproximadamente 67% das linhagens avaliadas, o que também foi observado para o voriconazol.

Portanto, pela análise dos resultados obtidos, é possível afirmar que o timol possui ação fungicida considerável, podendo ser comparada à atividade do antifúngico padrão testado, o voriconazol, mostrando-se, ainda, superior a este, quando se leva em conta o primeiro critério de ação fungicida. Esta análise é importante, pois a atividade fungicida é considerada clinicamente mais importante que a fungistática, visto que o uso profilático de drogas fungistáticas tem sido associado a um aumento da frequência de resistência inata ou adquirida em isolados clínicos (MONK; GOFFEAU, 2008).

Os controles realizados nos testes asseguraram que: o RPMI-1640 utilizado nos ensaios não estava contaminado com micro-organismos, visto que não foi observado crescimento microbiano; que todas as linhagens cresceram quando cultivadas na ausência de drogas, confirmando a viabilidade do inóculo fúngico; e que não houve inibição do crescimento fúngico por DMSO e Tween, confirmando que o impedimento do crescimento nos testes foi devido à presença dos produtos antifúngicos.

Portanto, após verificar a concordância dos resultados aqui apresentados com os de outros autores, justifica-se a continuidade e o aprofundamento dos estudos, visto que esses resultados sugerem o amplo potencial de uso do timol, produto natural com ação comprovadamente comparável ao antifúngico padrão e ao sanitizante controle utilizados no presente estudo.

Com base nos resultados de CIM e CFM, foram escolhidas, para os ensaios subsequentes, a linhagem ambiental LM 3 e as linhagens clínicas LM 161 e LM 171, todas de *P.citrinum*; além disso, foi utilizada a linhagem padrão IHCQS-40011.

Diversos autores, cujos estudos foram citados anteriormente, atribuem atividade antimicrobiana ao timol, porém, existe uma escassez de estudos relacionados à ação deste fitoconstituente sobre o gênero *Penicillium*, incluindo

investigações acerca de seu mecanismo de ação sobre linhagens desse gênero fúngico.

5.3 Ação do timol e pac200[®] na parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)

É conhecido que duas estruturas presentes nos fungos apresentam-se como alvos importantes para ação de fármacos antifúngicos: a parede celular e a membrana plasmática. Exemplos de fármacos que atuam sobre a parede celular fúngica são as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina), as quais são lipopeptídeos, utilizados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, que atuam inibindo a enzima β -1,3-glicano sintase, o que desestabiliza a parede celular, resultando no extravasamento dos componentes intracelulares e, por fim, causando a lise da célula fúngica (PANTÓN, 2008; SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Com o objetivo de verificar se o timol age sobre a parede celular de *P. citrinum*, foi realizado o ensaio com sorbitol, o qual utiliza este protetor osmótico para estabilizar o protoplasto dos fungos para, em seguida, comparar os valores de CIM dos produtos na ausência e presença do sorbitol (FROST et al., 1995). Isto se deve ao fato de que, se uma droga atuar sobre a parede celular fúngica, o seu efeito antifúngico não será observado em um meio que contenha um estabilizador osmótico, como o sorbitol (FROST et al., 1995). Assim, segundo Escalante et al. (2008), caso o produto atue, de alguma forma, sobre a parede celular, ocorrerá lise das células fúngicas na ausência de um estabilizador osmótico, ocorrendo, todavia, crescimento na presença do suporte osmótico, o que será verificado pelo aumento do valor de CIM do produto no meio com sorbitol (SVETAZ et al., 2007). A tabela 5 mostra o efeito de timol e PAC 200[®] contra linhagens de *P. citrinum* na presença de sorbitol 0,8 mol/L.

Tabela 5- Efeito de timol e PAC 200[®] contra linhagens de *P. citrinum* na presença de sorbitol 0,8 mol/L.

Linhagens	Ensaio com sorbitol	
	CIM timol	CIM PAC 200 [®]
INCQS-40011	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 3	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 161	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 171	Não houve alteração	Não houve alteração

Observou-se que os valores de CIM do timol e do sanitizante PAC 200[®], sobre as linhagens de *Penicillium* avaliadas, não sofreram alterações na presença do sorbitol, sugerindo que esses produtos não atuam pela desestabilização da parede celular, mas possivelmente afetando outro alvo.

A escassez de estudos envolvendo a ação de timol e ácido peracético sobre linhagens do gênero *Penicillium* entrava a comparação com os dados encontrados no presente estudo. Contudo, avaliando estudos que testaram a ação do timol sobre outros micro-organismos patogênicos, verifica-se que o timol parece, de fato, não interferir com a parede celular fúngica. Como pode ser observado no estudo de De Castro et al. (2015), o qual avaliou o mecanismo da atividade antifúngica de timol sobre linhagens de *Candida* envolvidas em infecções de cavidade oral, verificando que não houve alteração na CIM na presença do sorbitol.

Considerando-se que o fitoconstituente em estudo não apresentou efeito sobre a parede celular, de acordo com o teste realizado, prosseguiu-se com o estudo de seu efeito sobre a membrana celular fúngica, através do ensaio de interação com o ergosterol.

5.4 Interação do timol e Pac 200[®] com o ergosterol

O ergosterol é o principal componente esterol da membrana celular dos fungos, sendo responsável pela manutenção da função e integridade celular (RODRIGUEZ et al., 1985). Produtos com atividade antifúngica podem atuar sobre a membrana plasmática do fungo, por meio do ergosterol, de duas maneiras: pela formação de complexos ou inibindo sua biossíntese (CZUB, BAGINSKI, 2006; VANDEPUTTE et al., 2012). Fármacos, como a anfotericina B, podem ocasionar danos à membrana celular fúngica ao interagir diretamente com o ergosterol, formando complexos com este e originando, então, poros, que irão desestabilizar a membrana plasmática, com extravasamento de componentes intracelulares e, por fim, lise celular (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; MINNEBRUGGEN et al., 2010).

Escalante et al. (2008) dizem que, quando a atividade antifúngica do produto for causada pela ligação ao ergosterol, a presença de ergosterol exógeno irá impedir a ligação do produto ao da membrana celular fúngica, de forma que o produto formará complexos com o exógeno, ao invés do membranar, tendo como resultado o aumento na sua CIM, em comparação ao controle sem adição de ergosterol. Portanto, Para tanto, a CIM dos produtos foi determinada sem e com a adição de ergosterol ao meio (Tabela 6).

Tabela 6- Efeito de timol e PAC 200[®] contra linhagens de *P. citrinum* na presença de ergosterol 400 µg/mL.

Linhagens	Ensaio com ergosterol	
	CIM timol	CIM PAC 200 [®]
INCQS-40011	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 3	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 161	Não houve alteração	Não houve alteração
LM 171	Não houve alteração	Não houve alteração

Como pode ser observado na Tabela 6, os valores de CIM do timol e do PAC 200[®] não sofreram alterações com a adição de 400 µg/mL de ergosterol exógeno ao meio de cultura, sugerindo que a atuação desses produtos parece não ocorrer pela interação (complexação) com o ergosterol.

Para o teste em questão, realizou-se concomitantemente um controle com a anfotericina B, que, conhecidamente, atua por interação com o ergosterol da membrana plasmática. A Tabela 7 mostra os valores da CIM de anfotericina B sem e com a adição de ergosterol.

Tabela 7- Efeito de anfotericina B sobre linhagens de *P. citrinum* com e sem a adição de ergosterol 400 µg/mL.

Linhagens	Ensaio com ergosterol	
	CIM	CIM
	Sem adição de ergosterol	Com adição de ergosterol
INCQS-40011	16	Superiores a CIMx8
LM 3	2	Superiores a CIMx128
LM 161	2	Superiores a CIMx128
LM 171	4	Superiores a CIMx64

Conforme o esperado, o valor de CIM da anfotericina B aumentou, para todas as linhagens de *P. citrinum* avaliadas, com a adição do ergosterol, alcançando valores até 128 vezes maiores que a CIM original, como, por exemplo, para as linhagens LM 3 e LM161.

Atualmente, verifica-se a existência de alguns estudos que apontam a interferência do timol na membrana celular, porém existem poucas pesquisas que avaliam a possível interação direta do timol com o ergosterol da membrana celular fúngica, o que dificulta a comparação. Nesse sentido, Pinto et al. (2006) investigaram a ação do timol sobre linhagens de *Candida*, *Aspergillus* e fungos dermatófitos, verificando, através da técnica de citometria de fluxo, que o timol causou lesão da membrana citoplasmática, além de diminuição na quantidade de ergosterol. Gill et al. (2016) verificaram que a atividade antifúngica do timol, sobre linhagens de *Fusarium graminearum*, era devido à inativação de células via ruptura da membrana e subsequente desorganização de organelas.

Uma investigação acerca do mecanismo de ação de timol sobre leveduras envolvidas na deterioração do vinho (*Candida azyma*, *Candida quercitrusa*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*,

Issatchenkia orientalis, *Issatchenkia terricola*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygoascus steatolyticus*) demonstrou que o mecanismo antifúngico primário foi o dano à membrana com extravasamento do conteúdo citoplasmático e, secundariamente, houve a depleção do ergosterol (CHAVAN; TUPE, 2014).

Sob uma perspectiva mais aprofundada, Marei, Rasoul e Abdelgaleil (2012) identificaram que o mecanismo da ação antifúngica do timol sobre patógenos de plantas (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *P. digitatum* e *Aspergillus niger*) envolveu forte efeito inibitório sobre a atividade das enzimas pectina metil esterase (PME) e celulase. A PME modifica o grau de metilesterificação de pectinas, que são componentes da parede celular de fungos. Essa mudança na estrutura da pectina está associada a alterações na adesão celular, plasticidade, pH e conteúdo iônico da parede celular, o que influencia o desenvolvimento dos fungos, a integridade e a permeabilidade da membrana. Além disso, os fungos produzem celulase para degradar paredes celulares durante a patogênese, de maneira que a inibição dessa enzima afeta o desenvolvimento da doença (GOODMAN; KIRALY; ZAITLIN, 1967).

Já Ahmad et al. (2011), avaliando o mecanismo de ação do timol sobre linhagens de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, verificaram que o composto inibiu fortemente a biossíntese do ergosterol, de forma que a síntese foi totalmente bloqueada quando se utilizou o seu valor de CIM. Além disso, observou-se, a partir das técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal, que o timol também teria agido sobre a integridade da membrana, devido provavelmente à presença, na sua molécula, do grupamento hidroxila ligado ao anel fenólico. Este grupamento seria responsável por aumentar a capacidade hidrofílica do monoterpeno, podendo ajudá-lo a se dissolver na membrana microbiana, por fim, prejudicando-a (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Observa-se que, apesar de algumas pesquisas indicarem a desestabilização da membrana plasmática como mecanismo de ação para o timol sobre vários micro-organismos, poucos estudos indicam que isto se deva efetivamente à complexação com o ergosterol membranar, como por exemplo, De castro et al. (2015), que estudaram o efeito de timol sobre linhagens de *Candida* envolvidas em infecções de cavidade oral, bem como o mecanismo da ação antifúngica, observando um

aumento da CIM em oito vezes com a adição de ergosterol exógeno. Além de Mota et al. (2012), que estudaram linhagens de *Rhizopus oryzae*, nas quais o timol interagiu com ergosterol e aumentou o valor da CIM em relação ao controle.

Portanto, apesar de muitos estudos apontarem a perturbação da integridade da membrana e o extravasamento de conteúdo citoplasmático como sendo os mecanismos de ação do timol sobre diversos micro-organismos, não se deve descartar a possibilidade de que a interação com outros alvos da célula microbiana possa desempenhar um papel fundamental no efeito antimicrobiano dessa substância. Dessa forma, torna-se necessária a realização de mais estudos acerca de todas as possibilidades de mecanismo de ação dessa substância.

5.5 Índice de concentração inibitória fracionada (método de *checkerboard*) do timol associado ao voriconazol

Como meio para tentar contornar a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos existentes, garantir maior eficácia para o tratamento, prolongar a duração do efeito, permitir a redução da dose e reduzir os efeitos tóxicos, vêm sendo testados artifícios, tais como a terapêutica antimicrobiana combinada, que se utiliza de interações medicamentosas benéficas para atingir os objetivos (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005). Nesse sentido, a utilização de antifúngicos em associação vem sendo recomendada para o tratamento de diversas micoses (CUENCA-ESTRELLA, 2004; BADDLEY, PAPPAS, 2007; SEGAL, STEINBACH, 2007). Portanto, tem-se que, ao estudar a associação entre produtos naturais e antifúngicos utilizados na clínica, busca-se diminuir as doses, tanto do antifúngico, quanto do produto natural, seja ele um fitoconstituente isolado, óleo essencial ou extrato.

Laboratorialmente, é possível avaliar a combinação entre agentes antifúngicos, principalmente, através dos métodos *time-kill* e *checkerboard*, sendo este último de mais fácil execução e interpretação de resultados, o que faz dele o método de escolha na maioria dos casos (WHITE; BURGESS;

MADHAMAVIMANDURU, 1996; LEWIS et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2005; HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI, DOBLE, 2008).

O método *time-kill* ou de cinética microbiana avalia as concentrações dos antimicrobianos e a morte do micro-organismo em diferentes intervalos de tempo do ensaio (NCCLS, 1999). Já o método de *checkerboard* é um teste de microdiluição que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas, sendo, a partir do índice de fração inibitória, realizados os cálculos para avaliar se houve sinergismo, aditividade, antagonismo ou indiferença (WHITE; BURGESS; MADHAMAVIMANDURU, 1996).

Muitos estudos realizados, até o momento, já relataram efeito sinérgico entre timol e antimicrobianos, como, por exemplo, um estudo que observou interações sinérgicas na combinação entre timol e fluconazol contra os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*, pelo método *Checkerboard* (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2014). Jesus et al. (2015) também observaram a sinergia entre timol e os compostos itraconazol, claritromicina e minociclina contra *Pythium insidiosum*.

De castro et al. (2015) estudaram o efeito da associação *in vitro* entre timol e nistatina, utilizando o método *Checkerboard*, contra linhagens de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, envolvidas em infecções de cavidade oral, encontrando efeito sinérgico entre as duas substâncias, com índice CIF de 0,25.

Efeito sinérgico também foi verificado em estudo que combinou o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (composição de 78,4% de timol) com enterocina A, contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 (GHRAIRI; HANI, 2015). Um estudo que combinou timol e estreptomicina contra *Listeria monocytogenes*, através da técnica de *Checkerboard*, também encontrou interação sinérgica entre os compostos (LIU et al., 2015).

Kissels, Wu e Santos (2017) estudaram os efeitos *in vitro* da combinação dos antibióticos doxiciclina e tilmicosina com fitoconstituintes, dentre eles, o timol, pelo método de *checkerboard*, contra as bactérias *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*, comumente encontradas no trato respiratório de bezerros, sendo observado efeito aditivo na associação do timol com os antimicrobianos. Já

Ilić et al. (2014) encontraram efeito sinérgico entre timol e clorafenicol contra várias espécies bacterianas.

Na tentativa de reduzir as concentrações de timol e voriconazol necessárias para atingir o efeito antifúngico, avaliou-se o efeito da associação desses compostos contra as linhagens de *P.citrum* estudadas. Para tanto, utilizou-se a técnica de *Checkerboard*, a fim de encontrar o ICIF (Índice da concentração inibitória fracionada), o qual permite a classificação das interações entre os produtos como sendo: sinérgicas ($\leq 0,5$), aditivas ($>0,5$ e <1), indiferentes (≥ 1 e <4) ou antagônicas ($\geq 4,0$) (LEWIS et al., 2002). Os resultados da análise desse ensaio estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8- Efeito da combinação do timol com o antifúngico padrão voriconazol contra linhagens de *P. citrinum*.

Linhagens	Índice CIF* (associação timol/ voriconazol)	Tipo de interação
INCQS-40011	1,500	Indiferença
LM 3	1,500	Indiferença
LM 161	1,125	Indiferença
LM 171	1,250	Indiferença

*CIF, Concentração Inibitória Fracionada.

Pela observação dos resultados, é possível verificar que a combinação timol-voriconazol foi indiferente para todas as linhagens avaliadas, não sendo encontrados aditividade, sinergismo ou antagonismo resultantes da associação dos dois produtos.

Quando se trata dos ensaios de associação entre antimicrobianos, o termo sinergismo retrata uma interação positiva entre dois agentes, de maneira que juntos

eles exercem efeito inibitório maior do que a soma dos efeitos de cada um quando isolados. Enquanto que o termo antagonismo é utilizado para descrever a interação negativa observada quando o efeito das drogas combinadas é inferior ao efeito delas isoladas. A aditividade significa que o efeito dos agentes combinados é igual à soma dos efeitos isolados, já a indiferença expressa que o efeito dos produtos combinados corresponde ao efeito do agente mais ativo (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991; KLEPSE et al., 1998; CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Um dado sobremaneira relevante, no presente estudo, é que não houve antagonismo entre os dois produtos testados. É importante que não haja esse tipo de interação entre dois produtos associados, visto que, mesmo na ausência de efeitos sinérgicos, por vezes, é necessário combinar duas substâncias diferentes, com objetivos diversos, seja para prevenir a emergência de resistência, aumentar o espectro de ação dos produtos ou diminuir os efeitos tóxicos (KEELE et al., 2001).

Há escassez de estudos abordando o efeito da combinação de antimicrobianos, com produtos naturais ou não, sobre linhagens do gênero *Penicillium*. Martin e Maris (2012) investigaram a eficácia fungicida do peróxido de hidrogênio administrado em combinação com 17 ácidos minerais e orgânicos autorizados para uso na indústria de alimentos, verificando que nenhum sinergismo foi detectado para *P. cyclopium*.

Li e Rinaldi (1999) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* da combinação de nicomicina Z com fluconazol e itraconazol, sobre 110 linhagens de fungos diversos. Para as duas linhagens de *Penicillium* testadas, foi observada indiferença para a associação nicomicina Z e fluconazol. Já para a associação nicomicina Z e itraconazol, foram observadas aditividade para uma das linhagens e indiferença para a outra linhagem de *Penicillium* estudada.

Os resultados positivos apresentados, relacionados à atividade do timol sobre linhagens de *Penicillium*, estimularam a realização de estudos envolvendo a toxicidade deste fitoconstituente, visando investigar a segurança do composto em relação à possível aplicação clínica. Os estudos de toxicidade foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley (CEP-HULW), em seu Parecer Consubstanciado de número 2.192.256.

5.6 Estudos *in silico*

Os modelos preditivos assistidos por computador são ferramentas rápidas e reprodutíveis que desempenham importante papel dentre os métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto, existente ou hipotético, ao lado dos modelos *in vitro* (ANGELO; MAX; MARKUS, 2006; SRINIVAS et al., 2014).

Considerando que o timol apresentou boa atividade antimicrobiana e cogitando a capacidade deste fitoconstituente de ser um candidato promissor ao desenvolvimento de novos fármacos, aplicou-se a análise *in silico* para prever o espectro de atividade biológica, a biodisponibilidade oral e os riscos toxicológicos do timol.

A análise das possibilidades de atividades do timol, obtidas pela ferramenta PASS online, revelou que a molécula, como um fármaco, apresentou semelhança com 62 possibilidades de atividade para $P_a > 70\%$ (Quadro 1), incluindo atividade antihelmíntica contra nematoides ($P_a=0,765$ e $P_i=0,003$), anti-infecciosa ($P_a=0,829$ e $P_i=0,005$) e antiséptica ($P_a=0,930$ e $P_i=0,003$); além de 775 propriedades com $P_a > 30\%$, incluindo atividade antibacteriana ($P_a=0,340$ e $P_i=0,046$), antifúngica ($P_a=0,478$ e $P_i=0,034$), anticarcinogênica ($P_a=0,309$ e $P_i=0,055$) e antioxidante ($P_a=0,314$ e $P_i=0,021$).

Tabela 9 - Atividades previstas do timol para Pa > 70% empregando a ferramenta PASS online.

Pa	Pi	Atividade
0,732	0,011	Inibidor da 2-Hidroximuconato-semialdeído hidrolase
0,734	0,017	Inibidor da 5-O-(4-cumaroil)-D-quinato 3'-monoxigenase
0,829	0,003	Intensificador da expressão de APOA1
0,763	0,018	Inibidor da Acilcarnitina hidrolase
0,858	0,004	Inibidor da Alcano 1-monoxigenase
0,863	0,009	Inibidor da Alcenilglicerofosfocolina hidrolase
0,787	0,011	Inibidor da Alcilacetilglicerofosfatase
0,795	0,004	Anestésico geral
0,718	0,014	Antidiscinético
0,788	0,021	Antieczemático
0,765	0,003	Antihelmíntico (Nematódeos)
0,829	0,005	Anti-infeccioso
0,846	0,011	Antiseborreico
0,930	0,003	Antiséptico
0,783	0,002	Inibidor da Arilalcool desidrogenase
0,774	0,009	Inibidor da Arilsulfato sulfotransferase
0,883	0,012	Inibidor da Aspulvinona dimetilaliltransferase
0,888	0,015	Substrato CYP2C12
0,811	0,018	Substrato CYP2J
0,747	0,022	Substrato CYP2J2
0,852	0,003	Carminativo
0,713	0,003	Inibidor da catecol 1,2-dioxigenase
0,784	0,023	Inibidor da Clordecona redutase
0,819	0,007	Inibidor da Dehidro-L-gulonato descarboxilase
0,728	0,008	Inibidor da dextranase
0,791	0,005	Inibidor da Acil-CoA sintase
0,809	0,011	Inibidor da Feruloil esterase
0,858	0,004	Fibrinolítico
0,726	0,009	Inibidor da Glucan endo-1,3-beta-D-glicosidase
0,761	0,012	Inibidor da Glucan endo-1,6-beta-glicosidase
0,851	0,005	Inibidor da Glutamil endopeptidase II
0,783	0,009	Inibidor da Glutationa tiolesterase
0,808	0,011	Inibidor da expressão de HIF1A
0,737	0,014	Inibidor da expressão de JAK2
0,870	0,004	Inibidor da Linoleato diol sintase
0,802	0,036	Agonista da integridade membranas
0,777	0,008	Antagonista de integridade membranas
0,876	0,004	Inibidor da permeabilidade da membrana
0,922	0,004	Protetor mucomembranoso
0,755	0,010	Inibidor da NADPH-citocromo-c2 redutase
0,730	0,011	Inibidor da Nitrato redutase (citocromo)
0,731	0,016	Inibidor da Ompina
0,713	0,070	Tratamento de distúrbios fóbicos
0,716	0,013	Inibidor da fosfatidilcolina-retinol O-acetiltransferase
0,740	0,008	Inibidor da Fosfatidilserina descarboxilase
0,704	0,003	Inibidor da Plastoquinol-plastocianina redutase
0,723	0,034	Inibidor da Poliporoepsina
0,742	0,014	Inibidor da Ribulose-fosfato 3-epimerase
0,742	0,002	Substrato SULT1A1

0,875	0,001	Substrato SULT1A2
0,904	0,001	Substrato SULT1A3
0,712	0,009	Espasmolítico, urinário
0,779	0,020	Inibidor da glicose-fosfatase
0,804	0,004	Substrato da Sulfotransferase
0,729	0,025	Inibidor da Taurina desidrogenase
0,866	0,011	Inibidor da Testosterona 17beta-dehidrogenase (NADP+)
0,714	0,015	Inibidor da UDP-N-acetilglicosamina 4-epimerase
0,710	0,005	Substrato UGT1A6
0,745	0,006	Substrato UGT1A9
0,931	0,004	Inibidor da Ubiquinol-citocromo-c redutase
0,746	0,008	Vasoprotetor
0,729	0,013	Inibidor da Venombina AB

Tais dados corroboram os dados da literatura, que apontam diversas e numerosas atividades biológicas para o timol.

Aproximadamente metade das razões que levam a falhas no desenvolvimento de uma droga pode ser associada ao perfil farmacocinético e parâmetros toxicológicos. Portanto, a determinação do perfil farmacocinético (ADME) juntamente com a toxicidade (ADMET) irá auxiliar na definição da biodisponibilidade e efeitos tóxicos da molécula, de forma a contribuir para a diminuição do tempo e dos custos no desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al., 2004).

Objetivando a análise da biodisponibilidade oral teórica do timol, verificou-se, através do programa *Osiris Property Explorer*, que o fitoconstituente: apresenta o mesmo número de doadores (nDLH) e aceptores (nALH) de ligações de hidrogênio, sendo ambos igual a 1; possui peso molecular (Da) correspondente a 150,22; e coeficiente de partição octonal/água (cLogP) 3,34, conforme mostrado no Quadro 2. Todos esses dados estão dentro do ponto de corte determinado pela regra dos cinco de Lipinski e, portanto, pela avaliação conjunta desses resultados, é possível inferir que o composto teoricamente teria uma boa biodisponibilidade oral e, dessa forma, hipoteticamente, estaria apto a ser um medicamento administrado por esta via (LIPINSKI, 2001).

Para a determinação dos quatro parâmetros, Lipinski (2001) considerou sua relevância e influência para a solubilidade e permeabilidade das substâncias e, conseqüentemente, para a absorção. O coeficiente de partição etanol/água expressa a lipofilicidade da molécula, o que será determinante para a absorção da substância

(TESTA et al., 1996). O peso molecular foi escolhido, como um dos parâmetros, porque se relata na literatura que, quanto maior o peso molecular, menor a permeabilidade no intestino e barreira hematoencefálica, o que dificulta a administração oral (PARDRIDGE, 1995; NAVIA; CHATURVEDI, 1996). Um número excessivo de doadores de ligações de hidrogênio prejudica a permeabilidade através da bicamada lipídica (ABRAHAM et al., 1994; ; PATERSON et al., 1994). Um número elevado de aceptores de ligação de hidrogênio também dificulta a permeabilidade através da bicamada lipídica das membranas (LIPINSKI, 2001).

A denominação “regra dos cinco” deve-se a fato de que todos os quatro parâmetros possuem ponto de corte em valores próximos a 5 ou múltiplos dele (LIPINSKI, 2001). Os valores limites para cada parâmetro foram determinados com base nos valores apresentados para a maioria das substâncias presentes no banco de dados USAN (*United States adopted name*). Nesta biblioteca, apenas 11% dos compostos possuem peso molecular maior do que 500 Da; 10% possuem cLogP maior do que 5; 8% possuem mais do que 5 doadores de ligação de hidrogênio; e 12% possuem mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio (LIPINSKI, 2001).

Tabela 10- Análise teórica das propriedades físico-químicas do timol envolvidas na biodisponibilidade oral da droga após a "regra dos cinco de Lipinski".

Substância	nDLH	nALH	Peso molecular	cLogP
Timol	1	1	150,22	3,34
Padrão				
“Regra dos cinco”Lipinski	<5	<10	<500	<5

nDLH: número de doadores de ligações de hidrogênio; nALH: número de aceptores de ligações de hidrogênio; cLogP: coeficiente de partição octonal/água

Para avaliação da toxicidade teórica do timol foram determinados, empregando a ferramenta OSIRIS, os efeitos mutagênico, tumorigênico e irritante, além de danos ao sistema reprodutor. Os resultados (Quadro 1) mostraram que o timol não apresentou efeito mutagênico, tumorigênico ou reprodutivo, assim como o

voriconazol, apresentando, porém efeito irritante, o qual não foi observado para o antifúngico padrão. Já o ácido peracético mostrou-se altamente tóxico em relação aos efeitos tumorigênico, irritante e reprodutivo, além de ligeiramente tóxico em relação à mutagenicidade.

Quadro 1- Risco de toxicidade teórica de timol, voriconazol e ácido peracético, pela ferramenta OSIRIS.

Composto	Risco de toxicidade			
	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito Reprodutivo
Timol				
Voriconazol				
Ácido peracético				

(): não tóxico; (): ligeiramente tóxico; (): altamente tóxico

É importante destacar a relevância da abordagem *in silico* como ferramenta para condução de investigações farmacológicas, farmacocinéticas e toxicológicas, por viabilizar o desenvolvimento de pesquisas menos dispendiosas, no tocante ao tempo e ao financeiro (HANSCH et al., 2004).

A estrutura cromossômica possui alta sensibilidade, sendo, portanto, suscetível à ação dos agentes clastogênicos (rompem a estrutura dos cromossomos) e/ou aneugênicos (interferem no fuso durante a mitose), gerando aberrações cromossômicas que podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasia (CARRARD et al., 2007). Os micronúcleos são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA) originários dessas aberrações cromossômicas, apresentando-se como estruturas esféricas resultantes de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula-filha durante o processo de divisão celular, localizando-se, portanto, no citoplasma e sugerindo a ocorrência de efeitos mutagênicos (DIETZ et al., 2000; CARRARD et al., 2007; FAO et al., 2012; PINTO et al., 2015).

Observa-se que, das substâncias avaliadas, apenas o ácido peracético apresentou potencial mutagênico, estando o timol livre dos efeitos de mutagenicidade, o que corrobora os estudos de outros autores, como Aydin e Türkeş (2014), que avaliaram a mutagenicidade do timol e observaram que o timol não apresentou efeitos mutagênicos em linfócitos humanos. Horvathova et al. (2007) atribuíram ao timol um efeito protetor de DNA, provavelmente pela redução do estresse oxidativo. Azizan e Blevins (1995) também verificaram a inexistência de efeito mutagênico do timol sobre linhagens de *Salmonella typhimurium*. Verificou-se, ainda, que o timol apresentou efeito protetor contra o dano às células da pele provocado pela radiação ultravioleta, possivelmente pela inibição da proliferação, citotoxicidade e genotoxicidade nas células da pele (CORNAGHI et al., 2016). LLana-Ruiz-Cabello et al. (2014) igualmente não encontraram efeito mutagênico ou genotóxico para o timol. Mapelli, Calo e Marabini (2016) também verificaram que o timol reduziu o dano ao DNA provocado pelas radiações UVA e UVB em queratinócitos.

Dados revelam que, a cada ano, mais de 12 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer e mais de 7 milhões de pessoas morrem vítimas dessa doença (INCA, 2015). Considerando a gravidade dos dados que envolvem os mais variados tipos de câncer, é de fundamental importância evitar a utilização de fármacos que possuam potencial cancerígeno. Uma barreira importante consiste no fato de que a formação tumoral envolve mecanismos biológicos complexos e ainda desconhecidos, dificultando a identificação de marcadores que determinem quais células realmente apresentam potencial tumorigênico (VALEJO, 2010).

É importante destacar que o timol não apresentou, no estudo *in silico*, potencial tumorigênico, o que corrobora dados experimentais de autores diversos, os quais atribuem atividade antitumorigênica a este fitoconstituente, como, por exemplo: Kang et al. (2016), que atribuíram efeito anticâncer ao timol sobre células cancerosas gástricas; Deb et al. (2011), que demonstraram a atividade citotóxica do timol frente a células de leucemia mieloide aguda; e Aydin et al. (2017), os quais atribuíram ao timol potencial antiproliferativo contra células de tumor cerebral, envolvendo alteração oxidativa.

Ainda em relação ao estudo *in silico* das substâncias, verificou-se que timol e ácido peracético apresentaram efeito irritante severo. Tal irritação pode ser definida como intolerância local, a qual pode corresponder a reações de desconforto que possuem uma variação de intensidade que contempla desde ardor, coceira, até corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações são restritas à área em contato direto com a substância (BRASIL, 2012).

Demirci et al. (2004) atribuíram ao timol, presente no óleo essencial de *Origanum onites* L., atividade fortemente irritante dependente da dose, em consonância com os dados do presente estudo. Já Andersen (2006) verificou que o timol não causou irritação de pele quando nas concentrações comumente utilizadas para preservação de produtos cosméticos. Essa duplicidade de resultados atenta para o fato de que a possível irritação causada por uma determinada substância irá depender de fatores como frequência, concentração e quantidade de administração, além de questões como a sensibilidade do indivíduo (BRASIL, 2012).

A exposição a agentes tóxicos pode causar distúrbios ao sistema reprodutor, masculino e feminino, prejudicando a capacidade de reprodução do indivíduo (BOROVSKAYA et al., 2004; REBOREDO et al., 2007; FOSTER; BRICENO; CYR, 2011). Esta ação pode interferir na maturação sexual, na produção e transporte de gametas, no ciclo espermatogênico, no comportamento sexual e/ou na fertilidade (KIMMEL et al., 1995).

O presente estudo *in silico* verificou ausência de efeito tóxico reprodutivo para timol e voriconazol, em consonância com estudos como o de Johnson et al. (2013), o qual determinou que o tratamento com timol não afetou a viabilidade do esperma de zangões.

Todavia, em contraste, estudo realizado por Chikhoun et al. (2015) verificou que o timol teria prejudicado tanto a motilidade do espermatozóide humano, quanto a hiperfosforilação das proteínas e reação acrossômica, processos fundamentais para funcionalidade do espermatozoide e capacidade de fertilização. Ainda, Ferreira et al. (2009) estudaram a influência de timol na reprodução do molusco terrestre *Subulina octona*, atribuindo ao fitoconstituente atividade ovicida. Bovornnanthadej et

al. (2013) observaram que o timol afetou o desenvolvimento do ovo e a ovoposição na larva de *Helicoverpa armigera*.

Nessa perspectiva, considerou-se necessária a realização de mais estudos direcionados à investigação dos efeitos tóxicos reprodutivos do timol.

5.7 Efeito em eritrócitos humanos

5.7.1 Potencial hemolítico

Neste ensaio, verificou-se a citotoxicidade do timol sobre células sanguíneas humanas, a partir da sua capacidade de induzir hemólise.

A partir da realização do ensaio para os tipos sanguíneos classificados segundo o sistema ABO, verificou-se que o timol: não induziu hemólise nas concentrações testadas (10, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), para os tipos de sangue A e B, em comparação ao controle negativo, conforme expresso nos Gráficos 1a e 1b; e induziu baixíssimo grau de hemólise, para o tipo sanguíneo O, nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, em comparação ao controle negativo, conforme expresso no Gráfico 1c.

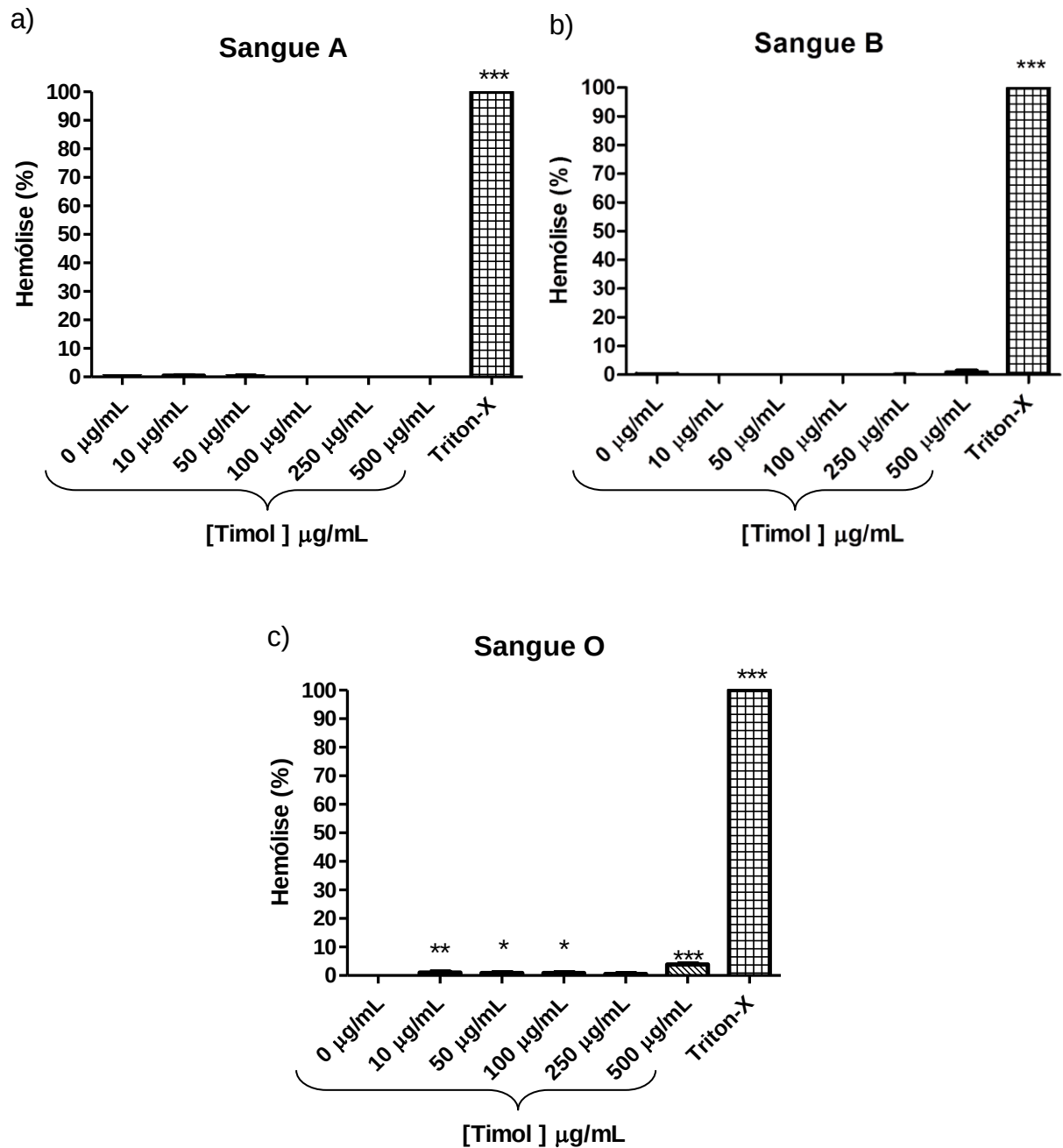


Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade do timol nas concentrações 0, 10, 50, 100, 250 e 500 µg/ mL em eritrócitos humanos dos tipos A (a), B (b) e O (c). Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=3$).

De acordo com os parâmetros estabelecidos por Rangel et al. (1997), o percentual de hemólise será considerado como baixo quando estiver situado entre 0

e 40%, moderado quando entre 40 e 80% e alto quando estiver acima de 80%. Nessa perspectiva, enfatiza-se a ausência de citotoxicidade do fitoconstituente timol, que exibiu valores de percentual de hemólise significantes apenas para o tipo sanguíneo O, apresentando, contudo, valores bem pequenos (abaixo dos 5%).

5.7.2 Fragilidade osmótica

O ensaio da fragilidade osmótica investiga a propriedade anti-hemolítica dos compostos por meio da avaliação da capacidade de proteger os eritrócitos da hemólise induzida pela entrada de água decorrente da exposição ao meio hipotônico, o que, por fim, determinaria o papel da substância em estudo na fisiologia ou funcionabilidade membranar eritrocitária.

Observou-se, ao analisar o grau de hemólise em meio hipotônico (solução de NaCl a 0,24%), que o timol conferiu certo grau de proteção aos eritrócitos contra o estresse osmótico, visto que: promoveu redução desse grau nas concentrações de 10, 50, 100 e 250 µg/mL, para os tipos sanguíneos A e B, comparando-se ao grupo controle positivo (solução de NaCl a 0,24%), no qual constata-se o máximo de lise membranar, conforme pode ser observado nos Gráficos 2a e 2b; e promoveu redução desse índice, para o tipo sanguíneo O, nas concentrações de 10, 100 e 250 e 500 µg/mL, também em comparação com o grupo controle positivo, como pode ser visto no Gráfico 2c.

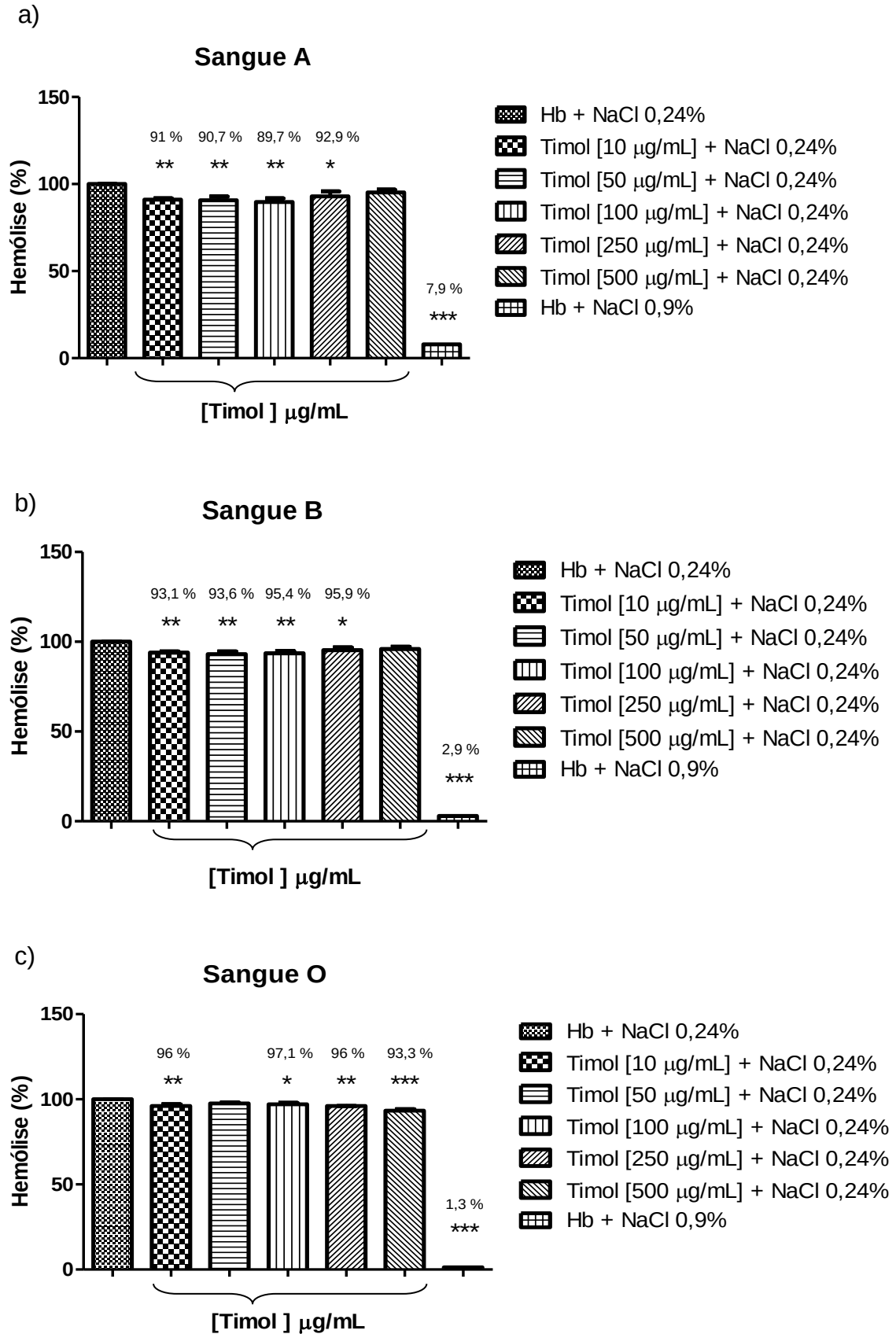


Gráfico 2. Atividade anti-hemolítica do timol nas concentrações 10, 50, 100, 250 e 500 µg/ mL sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl a 0,24%). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. e

foram analisados por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=3$).

A partir desses resultados, pode-se conferir atividade anti-hemolítica ao timol quando incubado com sangue A, B e O, na presença de estresse osmótico ocasionado pelo meio hipotônico. Tais dados corroboram os de Aman et al. (2013), que verificaram que o timol, em concentrações que variaram de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, protegeu eritrócitos de pacientes normais e diabéticos da hemólise induzida por 2,2-azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH). Ainda, Abd-Elhakim e Mohamed (2016) observaram que houve uma redução na hemólise e na desestabilização de eritrócitos expostos ao cromo hexavalente, na presença de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de timol.

Sabe-se que a integridade da membrana celular depende do tônus celular e da presença de substâncias que possam interferir na sua matriz estrutural (MOUSINHO et al., 2008). Portanto, quando uma molécula é candidata a fármaco, considera-se de fundamental importância avaliar o potencial de resistência da membrana dos eritrócitos ao possível dano causado pela substância testada.

Associando-se os dados dos ensaios de fragilidade osmótica aos dados de potencial hemolítico, pode-se considerar como praticamente inexistente a citotoxicidade do timol aos eritrócitos humanos, o que pode contrinuir para uma margem considerável de segurança em um futuro uso farmacológico.

5.7.3 Potencial antioxidante na presença de Espécies Reativas de Oxigênio

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induz alteração no formato das hemácias, caracterizadas por bolhas ou protuberâncias ao longo da membrana celular, indicando dano oxidativo (SROUR; BILTO; JUMA, 2000). Isto porque, agentes oxidantes são capazes de produzir alterações na membrana dos eritrócitos, manifestadas por uma diminuição proteica do conteúdo do citoesqueleto e produção de proteínas de alto peso molecular, podendo originar, por fim, anormalidades no formato dos eritrócitos e distúrbios nas propriedades reológicas (TETKO, 2015).

Além disso, é conhecido que o peróxido de hidrogênio induz peroxidação lipídica, com posterior hemólise (YOUNKIN; OSKI; BARNES, 1971).

Todavia, as células do organismo possuem sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam na prevenção ou retardo da oxidação de lipídios e outras moléculas, pela inibição do início e/ou propagação de reações de oxidação em cadeia (LIMA; FERNANDES-FERREIRA; PEREIRA-WILSON, 2006). Contudo, em condições de estresse oxidativo intenso, tais sistemas endógenos não são suficientes, evidenciando-se a necessidade do suporte fornecido pelo uso de antioxidantes de origem exógena (SRINIVAS et al., 2014).

Singh et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante do timol por meio da medição da quantidade de peróxido, ácido tiobarbitúrico, valores totais de carbonila e p-anisidina no óleo de mostarda, encontrando, para o timol, resultados próximos aos de antioxidantes sintéticos conhecidos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Estudo realizado com concentrações não tóxicas de timol, sobre células de epitélio alveolar, encontrou atividade protetora do fitoconstituente contra a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (COCCIMIGLIO et al., 2016). Outros estudos também atribuíram atividade antioxidante ao timol (JIA et al., 2010; AMAN et al., 2013; ABD-ELHAKIM; MOHAMED, 2016; YU et al., 2016; SOBRINHO et al., 2016; LUNA et al., 2017; WANG T.T. et al., 2017) e ao extrato da planta *Thymus vulgaris* (DURGADEVI; KALAVA, 2013), por meio de técnicas diversas.

Nesse contexto, avaliou-se a atividade antioxidante do timol nas concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500 µg/mL, para os tipos sanguíneos A, B e O, por meio da verificação da redução da hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) quando comparado ao grupo controle positivo (Hb + H₂O₂). Verificou-se que o fitoconstituente não apresentou atividade antioxidante significativa para o tipo sanguíneo A, nas concentrações utilizadas (Gráfico 3a); apresentou atividade significativa nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µg/mL para o tipo sanguíneo B (Gráfico 3b); apresentou, ainda, atividade antioxidante bastante pronunciada nas concentrações 10, 50, 100 e 250 µg/mL, para o tipo sanguíneo O (Gráfico 3c), podendo a atividade do timol, na concentração de 100 µg/mL, ser comparada à ação da vitamina C, agente conhecidamente antioxidante.

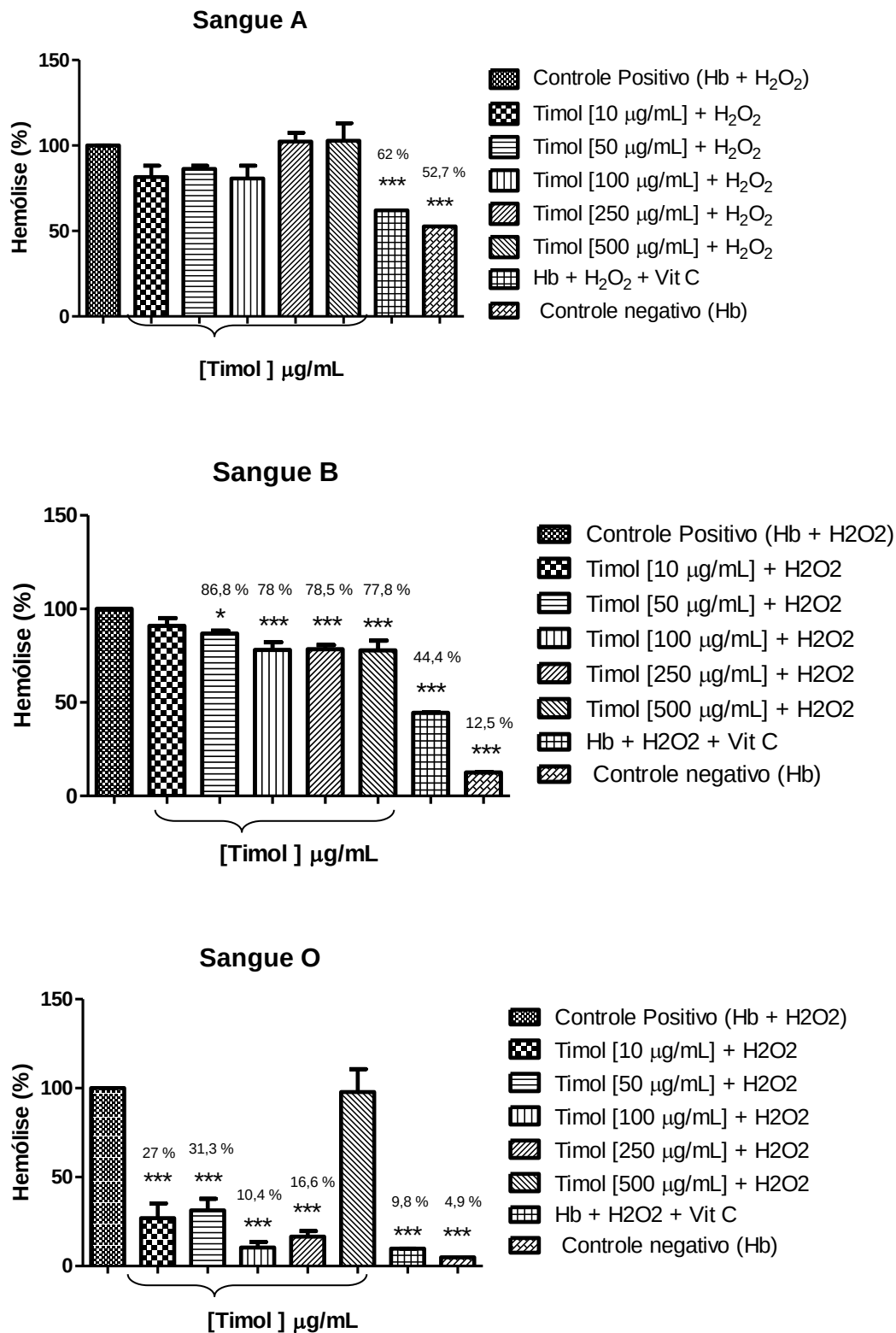


Gráfico 3. Atividade antioxidante do timol nas concentrações 10, 50, 100, 250 e 500 µg/ mL frente à hemólise induzida por peróxido de hidrogênio nos tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. e foram analisados por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (n=3).

5.8 Efeito sobre a embriogênese de ouriço-do-mar

O desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar tem sido amplamente utilizado como modelo para investigar novos medicamentos com atividade antimitótica, isto porque apresenta várias semelhanças com o ciclo celular humano (LEITE et al., 2012). Sabe-se que agentes como o 5-fluorouracil, actinomicina, vimblastina, colchicina, doxorubicina, entre outros, foram estudados em células embrionárias de ouriço-do-mar (MONTENEGRO et al., 2004).

O modelo que investiga a atividade antimitótica de novos compostos utilizando tais células embrionárias permite a identificação de compostos que bloqueiam a síntese de DNA, a tradução do RNA e a reorganização dos microtúbulos, abrangendo, assim, uma gama de propriedades farmacológicas antimitóticas, o que auxilia, por fim, na elucidação do modo de ação das drogas antimitóticas, bem como na identificação de novos agentes (LEITE et al., 2012).

De acordo com Leite et al. (2012), substâncias que afetam o desenvolvimento embrionário inicial dos ouriços-do-mar usualmente atuam inibindo a reorganização dos microtúbulos ou a síntese de proteínas ou DNA. O presente estudo avaliou a atividade antimitótica do timol a partir da análise de sua influência sobre a embriogênese das células de ouriço-do-mar, no tocante à interferência sobre a primeira e segunda clivagens. Observou-se que o tratamento com todas as concentrações de timol utilizadas não alterou de forma significativa a divisão das células embrionárias de ouriço-do-mar, conforme apresentado no Gráfico 4, sendo as divisões ocorridas nas células expostas ao fitoconstituente comparáveis às do controle (não expostas).

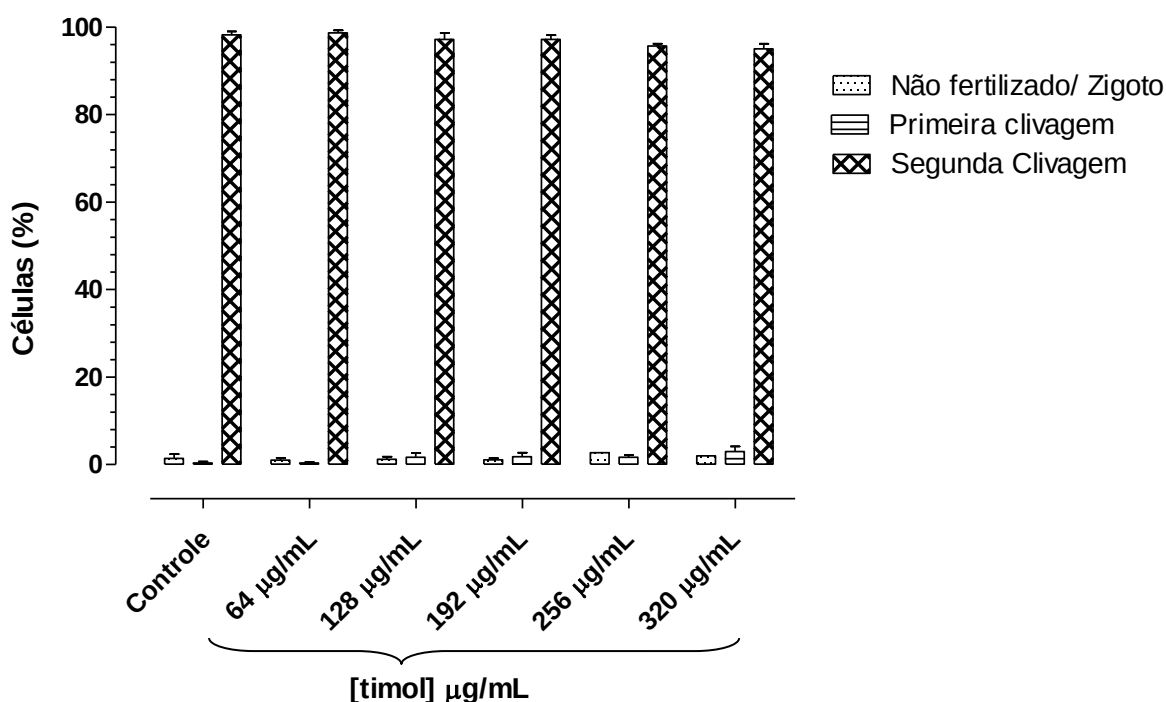


Gráfico 4. Efeito do timol nas concentrações 64, 128, 192, 256 e 320 µg/ mL sobre a primeira e segunda clivagens de células embrionárias de ouriço-do-mar. Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados por ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=3$).

Os resultados deste ensaio demonstram a ausência de atividade antimitótica do timol em células embrionárias de ouriço-do-mar, confirmando os dados do estudo *in silico*, os quais atribuem ausência de toxicidade reprodutiva teórica ao timol.

Não foram encontrados dados relacionados à embriotoxicidade do timol, sendo descritos, todavia, estudos que atribuíram ao fitoconstituente efeitos como diminuição no peso dos testículos, contagem e motilidade de espermatozoides, bem como aumento da quantidade de espermatozoides anormais em testículos de ratos (SURENDRA KUMAR et al., 2011). Já Chikhoun et al. (2015) revelaram o efeito antifertilidade do timol em espermatozóides humanos, associando ao fitoconstituente efeitos como diminuição na contagem, motilidade e vitalidade dos espermatozóides humanos.

É importante destacar que o timol na concentração de 64 µg/mL, maior valor de Concentração Inibitória Mínima encontrado para esta substância no presente

estudo, não apresentou atividade hemolítica ou embriotóxica e, ainda, apresentou atividade anti-hemolítica e antioxidante. Esses dados corroboram os revelados pelo estudo *in silico* realizado no presente estudo, reforçando a importância do aprofundamento de estudos relacionados ao timol.

Diante do exposto, os resultados obtidos ao longo do presente estudo revelaram que o timol apresenta uma gama de possíveis atividades farmacológicas, baixa toxicidade, boa disponibilidade oral teórica *in silico*, discreta citotoxicidade em eritrócitos humanos, atividade antioxidante relevante, ausência de embriotoxicidade em células de ouriço-do-mar e ótima atividade antifúngica contra linhagens de *Penicillium citrinum*, o que reforça o seu potencial para um promissor candidato a protótipo de fármaco de origem natural e impulsiona a realização de ensaios complementares *in vitro*, além estudos *in vivo*.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que: o timol apresentou a melhor atividade biológica dentre os fitoconstituintes testados, a qual pode ser classificada como ótima e considerada fungicida para 50% das cepas; o timol não atua pela desestabilização da parede celular ou pela interação (complexação) com o ergosterol da membrana, mas possivelmente afetando outro alvo; a combinação timol-voriconazol foi indiferente para todas as linhagens avaliadas, não sendo encontrados aditividade, sinergismo ou antagonismo resultantes da associação dos dois produtos; o timol, por meio da análise *in silico*, apresentou semelhança com 62 possibilidades de atividade para $Pa > 70\%$ e 775 propriedades com $Pa > 30\%$, apresentou boa biodisponibilidade oral teórica de acordo com a “Regra dos cinco de Lipinski” e, ainda, não apresentou efeito mutagênico, tumorigênico ou reprodutivo; o timol não induziu hemólise nas concentrações testadas para os tipos sanguíneos A e B, apresentando apenas baixíssimo grau de hemólise para o tipo sanguíneo O, além disso, conferiu certo grau de proteção aos eritrócitos contra o estresse osmótico induzido por meio hipotônico para os três tipos sanguíneos, bem como apresentou atividade antioxidante significativa para os tipos sanguíneos B e O; houve ausência de atividade antimetabólica do timol em células embrionárias de ouriço-do-mar.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.; ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, p. 51-56, 2014.
- ABD-ELHAKIM, Y.M.; MOHAMED, W.A.M. Assessment of the role of thymol in combating chromium (VI)-induced oxidative stress in isolated rat erythrocytes *in vitro*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 98, n. 10, 2016.
- ABRAHAM, M.H.; CHADHA, S.H. WH ITING, G.S.; MITCHELL, R.C. Hydrogen bonding. 32. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the delta log P parameter of Seiler. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 1085-1100, 1994.
- ABREU, P.A. **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas**. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008.
- AGUIAR, R.W.S.; OOTANI, M.A.; ASCENCIO, S.D.; FERREIRA, T.P.S.; DOS SANTOS, M.M.; DOS SANTOS, G.R. Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n.1, p. 41-50, 2011.
- AKATA, K.; YATERA, K.; AOKI, T.; FUJII, M.; KINOSHITA, S.; KAWANAMI, T.; ISHIMOTO, H.; HISAOKA, M.; KOROGLI, Y.; MUKAE, H. Disseminated pulmonary penicilliosis in a rheumatoid arthritis patient. **Journal of Thoracic Imaging**, v. 29, n. 2, p. 14-16, 2014.
- AKIMPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Bark. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 286-287, Mar. 2001.
- ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v.26, p. 179 – 182, 2006.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 2008.

AMAN, S.; MOIN, S.; OWAIS, M.; SIDDIQUI, M.U. Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 2, n. 3, p. 55-60, 2013.

ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International Journal of Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 29-127, 2006. Suppl. 1.

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547–556, 2005.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16., 2001. Suppl.

ANGELO, V.; MAX, D.; MARKUS, A.L. The challenge of predicting drug toxicity in silico. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 99, p. 195-208, 2006.

ANJORIN, T. S.; SALAKO, E. A.; MAKUN, H. A. Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. **InTech**, 2013. Disponível em: Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges. Acesso em: 5 jul. 2013.

ANTUNES, R.M.P. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.517-24, 2006.

ANVISA. **Manual de Microbiologia clínica para o controle de infecções em serviços de saúde**. Brasília, 1Ed., 2004

AQUINO, P. L. P.; LIMA, E. O.; FARIAS, M. P.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; ANDRICOPULO, A. Atividade antifúngica de maleimidazóis contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v, 35, n. 4, p.191-194, 2003.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v.33, n.1, p.55-64, jan./jun. 2004.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; SATOH, K.; SAKAGAMI, H.; IWAKURA, I.; UEHA, T.; SUGITA, Y.; YOKOE, I. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. **Anticancer Research**, v. 20, n. 4, p. 2519-2524, 2000.

AVILÉS-ROBLES, M.; GÓMEZ-PONCE, C.; RESÉNDIZ-SÁNCHEZ, J.; RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; CEBALLOS-BOCANEGRA, A.; MARTÍNEZ-RIVERA, Á. Disseminated penicilliosis due to *Penicillium chrysogenum* in a pediatric patient with Henoch-Schönlein syndrome. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 78-80, 2016.

AZIZAN, A.; BLEVINS, R.D. Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as revealed by the Ames Salmonella/microsomal assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 248-258, 1995.

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H. *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant potentials of thymol on human blood cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 2, 2014.

AYDIN, E.; TURKEZ, H.; TASDEMIR, S.; HACIMUFTUOGLU, F. Anticancer, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Thymol in vitro Brain Tumor Cell Model. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n.2, p. 116-122, 2017.

AYOUB, F.; BEN OUJJI, N.; CHEBLI, B.; AYOUB, M.; HAFIDI, A.; SALGHI, R.; JODEH, S. Antifungal effectiveness of fungicide and peroxyacetic acid mixture on the growth of *Botrytis cinerea*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 74-80, 2017.

BABUKUMAR, S.; VINOTHKUMAR, V.; SANKARANARAYANAN, C.; SRINIVASAN, S. Geraniol, a natural monoterpene, ameliorates hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1442-1449, 2017.

BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Combination antifungal therapy for the treatment of invasive yeast and mold infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, p. 448–456, 2007.

BADER, G.; PLOHMANN, B.; HILLER, K.; FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, p. 414-417, 1996.

BALDRY, M.G.C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of applied bacteriology**, v. 54, p. 417-423, 1983.

BALDRY, M.G.C.; FRASER, J.A.L. Disinfection with peroxygens. Critical Reports on Applied **Chemistry**, v. 22, p. 91-116, 1988.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARALDI, E.; MARI, M.; CHIERICI, E.; PONDRELLI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of

pears, pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, v. 52, p. 362–370, 2003.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARIS, O.; GULLUCE, M.; SAHIN, F.; OZER, H.; KILIC, H.; OZKAN, H. et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan (Asteraceae). **Turkish Journal Biology**, v. 30, n. 2, p. 65–73, 2006.

BARROS, L.A.; YAMANAKA, A.R.; SILVA, L.E.; VANZELER, M.L.A.; BRAUM, D.T.; BONALDO, J. *In vitro* larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecum sp* (Nematoda: Anisakidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 918-920, 2009.

BATUBARA, I.; SUPARTO, I.H.; AS'DIAH, S.; MATUOKA, R.; MITSUNAGA, T. Effects of Inhaled Citronella Oil and Related Compounds on Rat Body Weight and Brown Adipose Tissue Sympathetic Nerve. **Nutrients**, v. 7, n.3, p. 1859-1870, 2015.

BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: Agentes antifúngicos. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 1103-1118.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2010.

BERNET, C.; GARCIA, V.; BIMAR, M.C.; COLOMBINI, N.; DENIS, M.A.; ELIE, C.; FORISSIER, M.F.; PINEAU, L.; PROGNON, P.; RAUWEL, G.; VINCENT, A.; VOLCKMANN, C. **Acide peracetique**: activit es et usages en etablissements de Sant e, Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'inter-r egion Sud-Est. (C.CLIN Sud-Est), 2005. 72p.

BILTON, Y. Y.; SUBOH, S.; ABURJAI, T.; ABDALLA, S. Structure-activity relationships regarding the antioxidant effects of the flavonoids on human erythrocytes. **Natural Science**, 4, 740-747, 2012.

BIZARRO, A.; DINIS, A.P. Tratamento de infecções fúngicas sistêmicas: novas perspectivas farmacológicas. **Revista Ibero-Americana de Estudos em Educação**, v. 13, p. 23-31, 2003.

BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: Block, S.S, editor. **Disinfection, sterilization, and preservation**. 4. ed. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger; 1991. pp. 167–181.

BOROVSKAYA, T.G.; GOLDBERG, V.E.; FOMINA, T.I.; PAKHOMOVA, A.V.; KSENEVA, S.I.; M.E. POLUEKTOVA, M.E.; GOLDBERG, E.D. Morphological and Functional State of Rat Ovaries in Early and Late Periods after Administration of Platinum Cytostatics. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137, n. 4, p. 331-335, 2004.

BOUDDINE, L.; LOUASTE, B.; ACHAHBAR, S.; CHAMI, N.; CHAMI, F.; REMMAL, A. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n. 76, p. 14083-14087, 2012.

BOVORNNANTHADEJ, T.; BOONSOONG, B.; TAYLOR, D.; KAINOH, Y.; KOUL, O.; BULLANGPOTI, V. Effect of thymol on reproductive biology of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Communications in Agricultural and Applied Biological**, v. 78, n.2, p. 311-315, 2013.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2006.

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397-407, 2005.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 408-420, jul./set. 2006.

BRASIL. **Lei nº 11.794**. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e identificação de fungos de importância médica**. Módulo VII, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2012. Brasília, DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 de abril de 2017.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415-421, 2004.

BURKE, Y.D.; STARK, M.J.; ROACH, S.L.; SEN, S.E.; CROWELL, P.L. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**, v. 38, n. 2, p. 151-156, 1997.

BURKE, Y.D.; AYOUBI, A.S.; WERNER, S.R.; MCFARLAND, B.C.; HEILMAN, D.K.; RUGGERI, B.A.; CROWELL, P.L. Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. **Anticancer Research**, v. 22, n. 6A, p. 3127-3134, 2002.

CAMPANA, E. H.; CARVALHAES, C. G.; BARBOSA, P. P.; MACHADO, A.M.O.; PAULA, A.M.; GALES, A.C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 157-164, 2011.

CAMPOS, J.M.S.; MENEZES, L.F.; PONE, M.V.S. **O recém-nascido de alto risco: teorias e prática do cuidar** [online] Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564p. Disponível em: <[HTTP://books.scielo.org](http://books.scielo.org)>. Acesso em: 13 abr. 2013.

CANNON, R.D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R.; NIIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M.V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B.C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Medica**, v. 67, p. 685-694, 2001.

CARMO, S. E.; BELÉM, L. F.; CATÃO, R. M.; LIMA, E. O.; SILVEIRA, I. L.; SOARES, L. H. M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 213-216, 2007.

CARRARD, V.C.; COSTA, C.H.; FERREIRA, L.A.; LAUXEN, I.S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v.48, n.1/3, p.77-81, 2007.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. R. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1333-1338, 2006.

CHAIWARITH, R.; CHAROENYOS, N.; SIRISANTHANA, T.; SUPPARATPINYO, K. Discontinuation of secondary prophylaxis against *penicilliosis marneffei* in AIDS patients after HAART. **AIDS**, v. 21, n. 3, p. 365-367, 2007.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011.

CHAUHAN, A.K.; BAHUGUNA, A.; PAUL, S.; KANG, S.C. Thymol elicits HCT-116 colorectal carcinoma cell death through induction of oxidative stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, 2017.

CHAVAN, P.S.; TUPE, S.H.G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CHEN, W.; VILJOEN, A.M. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, 2010.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; CHANG, E.H.; CHANG, S.T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11 p. 5145-5149, 2008.

CHIKHOUNE, A.; STOUVENEL, L.; IGUER-OUADA, M.; HAZZIT, M.; SCHMITT, A.; LORÈS, P.; WOLF, J.P.; AISSAT, K.; AUGER, J.; VAIMAN, D.; TOURÉ, A. *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, n.3, p. 411-420, 2015.

CHOI, H.S.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n., p. 4156-4161, 2000.

CHOI, D. W. ; KIM, J.H. ; CHO, S.Y.; KIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal frugs in Korea. **Toxicology**, v. 181-182, p. 581-586, 2002.

CHOI, I.H.; KIM, J.; SHIN, S.C.; PARK, II.K. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Russian Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 35-40, 2007.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; XU, J.; JACQUES, F. M. Emergence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS Pathogens**, v. 9, n.10, 2013.

CHRISTENSEN, M.; FRISVAD, J.C.; TUTHILL, D.E. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. eds. **Integration of modern taxonomic for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p 309–320.

CIEGLER, A.; VESONDER, R.F.; JACKSON, L.K. Production and Biological Activity of Patulin and Citrinin from *Penicillium expansum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 1004-6, 1977.

CIHLAR, R. L.; KELLOGG, C.; BROEDEL-JR, S. Antifungal drugs targets: discovery and selection. In: CALDERONE, R. A.; CIHLAR, R. L. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. Nova York (EUA): Marcel Deckker, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, 1991. p. 739-787.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**, CLSI document M07-A8. 8th. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M.; JIANG, Z.H.; GOTTARDO, C.; SUNTRES, Z. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272- 278, 2005.

CORNAGHI, L.; ARNABOLDI, F.; CALÒ, R.; LANDONI, F.; BARUFFALDI PREIS, W.F.; MARABINI, L.; DONETTI, E. Effects of UV Rays and Thymol/*Thymus vulgaris* L. Extract in an ex vivo Human Skin Model: Morphological and Genotoxicological Assessment. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 3, p. 180-192, 2016.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAESA, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 139–165, 2002.

CRESPO, R.; WEI, K.; RODENAK-KLADNIEW, B.; MERCOLA, M.; RUIZ-LOZANO, P.; HURTADO, C. Effect of geraniol on rat cardiomyocytes and its potential use as a cardioprotective natural compound. **Life Sciences**, v. 172, p. 8-12, 2017.

CROW, S. Peracetic acid sterilization: a timely development for a busy healthcare industry. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 13, p. 11-113, 1992.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy - what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854–860, 2004.

CZUB, J.; BAGINSKI, M. Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 7, p. 2368–2382, 2006.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. London: Churchill Livingstone, 2001.

DAGHER, D.; UNGAR, K.; ROBISON, R.; DAGHER, F. The wide spectrum high biocidal potency of Bioxy formulation when dissolved in water at different concentrations. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGÈS, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p.572-576, 2008.

DE CASTRO, R.D.; DE SOUZA, T.M.; BEZERRA, L.M.; FERREIRA, G.L.; COSTA, E.M.; CAVALCANTI, A.L. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 417, 2015.

DE LIRA, M.K.S.; DE OLIVEIRA PEREIRA, F.; DE OLIVEIRA, W.A.; LIMA, I.O.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14418-14433, 2012.

DE SMET, P.A.G.M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 76, p. 1–17, 2004.

DEACON, J. **Fungal Biology**. 4a ed. Inglaterra: Blackwell Publishing, 2006.

DEB, D.D.; PARIMALA, G.; DEVI, S.S.; CHAKRABORTY, T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 97-106, 2011.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

DELGADO-MARÍN, L.; SÁNCHEZ-BORZONE, M.; GARCÍA, D.A. Neuroprotective effects of gabaergic phenols correlated with their pharmacological and antioxidant properties. **Life Sciences**, v. 175, p. 11-15, 2017.

DEMIRCI, F.; PAPER, D.H.; FRANZ, G.; BAŞER, H.C. Investigation of the *Origanum onites* L. Essential Oil Using the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 251-254, 2004.

DERESINSKI, S.C.; STEVENS, D.A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.11, p.1445-57, 2003.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623-3626, 2003.

DIETZ, J.; DIEHL, A.S.; PROLLA, J.C.; FURTADO, D.C.; FURTADO, A.D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.3, p. 207-211, 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, Supl. 1, p. 6-8, 2004.

DUONG, T.A. Infection due to *Penicillium marneffe* an emerging pathogen: review of 155 reported cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 125-130, 1996.

DURGADEVI, P.; KALAVA, S.V. Investigation on the *in vitro* antioxidant, antimutagenic and cytotoxic potential of *Thymus vulgaris* L. Hydroalcoholic extract. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 8, p. 3157-3164, 2013.

EL-BASSOSSY, H.M.; GHALEB, H.; ELBERRY, A.A.; BALAMASH, K.S.; GHAREIB, S.A.; AZHAR, A.; BANJAR, Z. Geraniol alleviates diabetic cardiac complications: Effect on cardiac ischemia and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1025-1030, 2017.

ELBOUCHTAOUI, M.C.; CHEBLI, B.; ERRAMI, M.; SALGHI, R.; JODEH, S.; WARAD, I.; HAMED, O.; EL YAMLAHI, A. Efficiency anti-fungal of perydroxan for *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum*. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 6, n. 7, p. 1938-1943, 2015.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations, In: Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wikins, 1991, p. 434–441.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, dez. 1998.

ELSAYED, W.; EL-SHAFIE, L.; HASSAN, M.K.; FARAG, M.A.; EL-KHAMISY, S.F. Isoleugenol is a selective potentiator of camptothecin cytotoxicity in vertebrate cells lacking TDP1. **Scientific Reports**, v. 6, n. 26626, 2016.

ENGEL, J.B.; HECKLER, C.; TONDO, E.C.; DAROIT, D.J.; DA SILVA MALHEIROS, P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 18-23, 2017.

ERLAND, L.A.; BITCON, C.R.; LEMKE, A.D.; MAHMOUD, S.S. Antifungal Screening of Lavender Essential oils and Essential Oil Constituents on three Post-harvest Fungal Pathogens. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 4, p. 523-527, 2016.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

FAITH, N.G.; YOUSEF A.E.; LUCHANSKY, J.B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. **Journal of food safety**, v. 12, n. 4, p. 303-314, 1992.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.91-98, 2012.

FARSHORIA, N. N.; BANDAYA, M. R.; AHMADB, A.; KHANB, A. U.; RAUF, A. Synthesis, characterization, and in vitro antimicrobial activities of 5 alkenyl/hydroxyalkenyl-2 phenylamine-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 6, p. 1933–1938, 2010.

FENNER, R.; BETTI, A. H; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.3, 2006.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Química nova**, v. 33, n.9, p. 1829, 2010.

FERREIRA, P.; SOARES, G.L.G.; D'AVILA, S.; BESSA, E.C.A. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, 2009.

FLORES, L. H.; ONOFRE, S. B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em Unidade de Saúde da cidade de Francisco Beltrão–PR. **Revista Saúde e Biologia**, v. 5, n. 2, p. 22-26, 2010.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência** (UNICAMP), v. 7, out. 2006.

FOSTER, W.G.; BRICEÑO, S.M.; CYR, D.G. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 6, p. 2893-2905, 2011.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. (eds.) **Introduction to food and airborne fungi**. 6a ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. p. 321–330.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A.; PITT, J.I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. **Advances in Food Mycology**. New York: Springer, 2006.

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. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; ISHIHARA, M.; KADOMA, Y. Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. **Anticancer Research**, v. 24, n. 2, p. 563-570, 2004.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FURTADO, M. S. S.; FERRARONI, J. J. Fungos anemófilos em ambientes hospitalares da cidade de Manaus. **Revista Amazonas Ciência e Cultura**. Manaus, n. 34, p. 42-47, set. 1998.

GAIRE, S.; O'CONNELL, M.; HOLGUIN, F.O.; AMATYA, A.; BUNDY, S.; ROMERO, A. Insecticidal Properties of Essential Oils and Some of Their Constituents on the Turkestan Cockroach (Blattodea: Blattidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n.2, p. 584-592, 2017.

GALLIS, H.A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.308-29, 1990.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.4, p. 501–517, 1999.

GHRAIRI, T.; HANI, K. Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2148-2156, 2015.

GILL, T.A.; LI, J.; SAENGER, M.; SCOFIELD, S.R. Thymol-based submicron emulsions exhibit antifungal activity against *Fusarium graminearum* and inhibit Fusarium head blight in wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1103-1116, 2016.

GIMENO, R.B.; MARTÍNEZ, M.J.M. Respuesta terapéutica prolongada a voriconazol en un caso de broncoaspergilosis alérgica. **Archivos de Bronconeumología**, v. 43, n. 1, p. 49-51, 2007.

GIWELI, A.; DŽAMIĆ, A. M.; SOKOVIĆ, M.; RISTIĆ, M.S.; MARIN, P.D. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. **Molecules**, v.17, p. 4836-4850, 2012.

GÓES, V. F. F. **Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp.** 2009. 141 f. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental), UNICAMP, Piracicaba, SP, 2009.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CÔRREA, B. **Microbiologia**. 4ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L.Y.; MUÑOZ OCOTERO, V.; DORAZCO-GONZÁLEZ, A.; GUEVARA FEFER, P.; AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1569-1576, 2017.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. (eds.) **As bases farmacológicas da terapêutica** 12a ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill, 2012. 2112p.

GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; ZAITLIN, M. **The Biochemistry and Physiology of Infectious Plant Diseases**. Editora D Van Nostrand Company Inc: New Jersey, 1967. p. 354.

GREGIO, A.M.T.; Fortes, E.S.M.; ROSA, E.A.R.; SIMEONI, R.B.; ROSA, R.T. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Estudos de Biologia**, v.28, n.62, p.61-66, 2006.

GRINBERG, L.N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

GROPPO, F. C.; RAMACCIATO, J. C.; SIMÕES, R. P.; FLÓRIO, F. M.; SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**, v. 52, n. 6, p. 433-437, 2002.

GRUMACH, A. S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2001, p. 16-21.

GUARDA, A.; RUBILAR, J.F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M.J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

GULLO, F.P.; ROSSI, S.A.; SARDI, J.C.; TEODORO, V.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377–1391, 2013.

GULLO, V.; HUGHES, D.E. Exploiting new approaches for natural drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today**, v. 2, n.3, 2005.

GUTIÉRREZ, S.; MORÁN, A.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; FERRERO, M.A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B. The Usefulness of Non-Toxic Plant Metabolites in the Control of Bacterial Proliferation. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. Março, 2017. Doi: 10.1007/s12602-017-9259-9 [Epub antes da impressão].

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, n. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R.R.; ABDULAMIR, A.S.; VERN, L. S.; BAKAR, F.A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96–106. 2011.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**, v.38. p.3-20, 1997.

HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S.B.; KURUP, A. Bioorg. QSAR an ADME. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3391-3400, 2004.

HASAN, S.K.; SULTANA, S. Geraniol attenuates 2-acetylaminofluorene induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in the liver of wistar rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 7, p. 559-573, 2015.

HAYES, A.J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 535-543, 2002.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S37–S41, 1998.

HEE, C.H.; PIL, C.Y.; CHO, K.J. *Penicillium marneffe* infection in a HIV-Positive patient: A comparison of bronchial washing cytology and biopsy. **Journal of Cytology**, v. 34, n.1, p. 45-48, 2017.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HEO, G. J.; KIM, C. H.; PARK, S. C.; De Zoysa, M.; Shin, G. W. Antimicrobial Activity of Thymol against Pathogenic Gram-negative Bacteria of Fishes. **Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.2, p. 103-106, 2012.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L. SANCHES, D.A.G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLAND, R.D.; WILKES, J.G.; COOPER, W.M.; ALUSTA, P.; WILLIAMS, A.; PEARCE, B.; BEAUDOIN, M.; BUZATU, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, p. 2617–2626, 2014.

HOLMES, G.J.; ECKERT, J.W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology**, v.89, p.717–721, 1999

HORVATHOVA, E.; TURCANIOVA, V.; SLAMENOVA, D. Comparative study of DNA damaging and DNA protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. **Neoplasma**, v. 54, n. 6, p. 478-483, 2007.

HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 5, p. 403-412, 2002.

HWANG, L.S.; WANG, C.K.; SHEU, M.J.; KAO, L.S. Phenolic Compounds of Piper betle Flower as Flavoring and Neuronal Activity Modulating Agents. **ACS Symposium Series**, v. 506, p. 200-213, 1992.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; PIOTROWSKA, R.; FOSS, M.; MEYER, R.L. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 754, 2015.

IGNARO, L.J.; CIRINO, G. CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p.879-886, 1999.

ILIĆ, B.S.; KOCIĆ, B.D.; CIRIĆ, V.M.; ČVETKOVIĆ, O.G.; MILADINOVIĆ, D.L. An in vitro synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol. **Scientific World Journal**. Janeiro, 2014. Doi: 10.1155/2014/826219.

INCA. **Declaração mundial contra o câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/internacional/declaracao_mundial_contra_cancer>. Acesso em: 13 de agosto de 2017.

JAGER, A.K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, v. 16, p. 1471-1485, 2011.

JEON, H.J.; KANG, H.J.; JUNG, H.J.; KANG, Y.S.; LIM, C.J.; KIM, Y.M.; PARK, E.H. Antiinflammatory activity of *Taraxacum officinale*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 82-88, 2008.

JESUS, F.P.; FERREIRO, L.; BIZZI, K.S.; LORETO, É.S.; PILOTTO, M.B.; LUDWIG, A.; ALVES, S.H.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical Mycology**, v. 25, n.2, p. 89-93, 2015.

JIA, H.L.; JI, Q.L.; XING, S.L.; ZHANG, P.H.; ZHU, G.L.; WANG, X.H. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. **Journal of food science**, v. 75, n.1, 2010.

JOHNSON, R.M.; DAHLGREN, L.; SIEGFRIED, B.D.; ELLIS, M.D. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 2, 2013.

KANG, S.H.; KIM, Y.S.; KIM, E.K.; HWANG, J.W.; JEONG, J.H.; DONG, X.; LEE, J.W.; MOON, S.H.; JEON, B.T.; PARK, P.J. Anticancer Effect of Thymol on AGS Human Gastric Carcinoma Cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 28-37, 2016.

KAPLAN, J.E.; BENSON, C.; HOLMES, K.H. BROOKS, J.T.; PAU, A.; MASUR, H.; Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 58, p. 1-207, 2009.

KAUR, G.; SULTANA, S. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2689-2695, 2012.

KEBLYS, M.; BERNHOFT, A.; HÖFER, C.C. et al. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. **Mycopathologia**, v. 158, n. 3, p. 317-24, 2004.

KEELE, D.J.; DELALLO, V.C.; LEWIS, R.E.; ERNST, E.J.; KLEPSE, M.E. Evaluation of anphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 41, p. 121-126, 2001.

KEREKES, E.B.; VIDÁCS, A.; TÖRÖK, J.J.; GÖMÖRI, C.; PETKOVITS, T.; CHANDRASEKARAN, M.; KADAIKUNNAN, S.; ALHARBI, N.S.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J. Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 3, p. 333-343, 2016.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.

KHAN, S.T.; KHAN, M.; AHMAD, J.; WAHAB, R.; ABD-ELKADER, O.H.; MUSARRAT, J.; ALKHATHLAN, H.Z.; AL-KEDHAIRY, A.A. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 49, 2017.

KHAN, M.S.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S.S. *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus spp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 523-531, 2014.

KIFER, D.; MUŽINIĆ, V.; KLARIĆ, M.Š. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against

Staphylococcus aureus planktonic and biofilm growth. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 9, p. 689-696, 2016.

KIM, Y.G.; LEE, J.H.; GWON, G.; KIM, S.I.; PARK, J.G.; LEE, J. Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, n. 36377, 2016.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; AHN, Y.J. Acaricidal Activity of Clove Bud Oil Compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 885-889, 2003.

KIMMEL, G.L.; CLEGG, E.D.; CRISP, T.M.; Reproductive toxicity testing: A risk assessment perspective. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reproductive Toxicology**. New York: Raven Press. p. 75-98, 1995.

KISSELS, W.; WU, X.; SANTOS, R.R. Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 970-974, 2017.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.

KLEPSE, M.E.; ERNST, E.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1387-1391, 1998.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206–220, 2005.

KOENRAADT, H.; SOMERVILLE, S.C.; JONES, A.L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 82, p. 1348–1354, 1992.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JÚNIOR-WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 6. Ed. São Paulo: Editora Médica e Científica Ltda, 2008. 1565p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCAU, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier., 2002.

LAFAYETTE, S. L.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. PKC Signaling Regulates Drug Resistance of the Fungal Pathogen *Candida albicans* via Circuitry Comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, 2010.

LAI, C. C.; TAN, C. K.; HUANG, Y. T.; PEI-LAN, S.; HSUEH, P. R. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, n. 2, p. 77–85, 2008.

LEITE, J.C.A.; JUNIOR, C.G.L.; SILVA, F.P.L.; SOUSA, S.C.O.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. & SANTOS, L.F.M. Antimitotic Activity on Sea Urchin Embryonic Cells of Seven Antiparasitic *Morita-Baylis-Hillman* Adducts: A Potential New Class of Anticancer Drugs. **Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1003-1011, 2012.

LEITE, J.C.A. **Efeito de bloqueadores de transportadores ABC e derivados cumarínicos sobre gametas e embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Echinodermata: echinoidea) expostos à radiação ultravioleta.** 2015. 197f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LENSING, H.H.; OEI, H.L. Study of the efficiency of disinfectants against antrax spores. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 109, p. 557-563, 1984.

LESGARDS, J.F.; BALDOVINI, N.; VIDAL, N.; PIETRI, S. Anticancer Activities of Essential Oils Constituents and Synergy with Conventional Therapies: A Review phytotherapy research. **Phytotherapy research**, v. 28, p. 1423-1446, 2014.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LI, R.K.; RINALDI, M.G. *In vitro* antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1401-1405, 1999.

LI, Y.; CUI, F.; LIU, Z.; XU, Y.; ZHAO, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1381–1388, 2007.

LI, X.; YANG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LU, S.; MA, L.; LU, C.; XI, L. Isolation of *Penicillium marneffe* from soil and wild rodents in Guangdong, SE China. **Mycopathologia**, v. 172, n.6, p. 447-451, 2011.

LI, Y.; WEN, J.M.; DU, C.J.; HU, S.M.; CHEN, J.X.; ZHANG, S.G.; ZHANG, N.; GAO, F.; LI, S.J.; MAO, X.W.; MIYAMOTO, H.; DING, K.F. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Abril, 2017. Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.009 [Epub antes da impressão].

LIMA, C.F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C.; Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. **Life Sciences**, v. 79, p. 2056-2068, 2006.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; FARIAS, N.P.; NAVARRO, D.F. Inhibitory action of some phytochemicals on yeasts potentially causing of opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n. 2, p.199-203, 2005.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANTANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, B.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; LI, S.Y.; SU, M.C.; WANG, M.C.; SHIH, S.M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.191, n. 3, p. 255-63, 2003.

LIU, Q.; NIU, H.; ZHANG, W.; UM, H.; SUN, C.; DUAN, J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**. V. 60, n. 5, p. 421-430, 2015.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; MAISANA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames *Salmonella* test and alkaline, Endo III- and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 122-128, 2014.

LUNA, A.; LEMA-ALBA, R.C.; DAMBOLENA, J.S.; ZYGADLO, J.A.; LABAQUE, M.C.; MARIN, R.H. Thymol as natural antioxidant additive for poultry feed: oxidative stability improvement. **Poultry Science**, v. 96, n. 9, p. 3214-3220, 2017.

LV, Y.; ZHANG, L.; LI, N.; MAI, N.; ZHANG, Y.; PAN, S. Geraniol promotes functional recovery and attenuates neuropathic pain in rats with spinal cord injury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. Março, 2017. Doi: 10.1139/cjpp-2016-0528 [Epub antes da impressão].

MA, Z., MICHAILIDES, T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853-863, 2005.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A.M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M.C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MADANKUMAR, A.; TAMILARASI, S.; PREMKUMAR, T.; GOPIKRISHNAN, M.; NAGABHISHEK, N.; DEVAKI, T. Geraniol attenuates 4NQO-induced tongue carcinogenesis through downregulating the activation of NF- κ B in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. Abril, 2017. Doi: 10.1007/s11010-017-3030-0 [Epub antes da impressão].

MALCHESKY, P.S. Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. **Artificial Organs**, v. 17, p. 147-152, 1993.

MANSOUR, N.; YOUSEF A.E.; KIM, J.G. Inhibition of surface growth of toxigenic and nontoxigenic aspergilli and penicillia by eugenol, isoeugenol and monolaurin. **Journal of food safety**, v. 16, n. 3, p. 219-229, 1996.

MAPELLI, M.; CALO, R.; MARABINI, L. Thymol and *Thymus vulgaris* extract protects human keratinocyte cell line (HaCaT) from UVA and UVB damage. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, v. 5, n.2, p. 39-48, 2016.

MARCHANT, C.A. Computacional toxicology: a tool for all industries. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 2, p. 424-434, 2012.

MAREI, G.I.KH.; RASOUL, M.A.A.; ABDELGALEI, S.A.M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61, 2012.

MARI, M.; GREGORI, R.; DONATI, I. Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in the fruit by peracetic acid. **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, p. 319-325, 2004.

MARTIN, H.; MARIS, P. Synergism between hydrogen peroxide and seventeen acids against five agri-food-borne fungi and one yeast strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 6, p. 1451-1460, 2012.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MARTINS, H.B.; SELIS, N.D.; SOUZA, C.L.; NASCIMENTO, F.S.; DE CARVALHO, S.P.; GUSMÃO, L.D.; NASCIMENTO, J.D.; BRITO, A.K.; DE SOUZA, S.I.; DE OLIVEIRA, M.V.; TIMENETSKY, J.; YATSUDA, R.; UETANABARO, A.P.; MARQUES, L.M. Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil Citral in Experimental

Infection with *Staphylococcus aureus* in a Model Air Pouch. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017 , 2017.

MARUI, J.; YOSHIMI, A.; HAGIWARA, D.; FUJII-WATANABE, Y.; ODA, K.; KOIKE, H.; TAMANO, K.; ISHII, T.; SANO, M.; MACHIDA, M.; ABE, K. Use of the *Aspergillus oryzae* actin gene promoter in a novel reporter system for exploring antifungal compounds and their target genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1829-1840, 2010.

MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; ISHIBASHI, H.; HISAJIMA, T.; INOUE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

MATASYOH, J. C.; MAIYO, Z. C.; NGURE, R. M.; CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 526–529, 2009.

MEDEIROS, C.I.S. **Atividade antifúngica e toxicológica *in silico* dos enantiômeros ®-(+)- e (S)-(-)- citronelal. 2016.** 129f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

MELETIADIS, J.; ANTACHOPOULOS, C.; STERGIOPOULOU, T.; POURNARAS, S.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Differential Fungicidal Activities of Amphotericin B and Voriconazole against *Aspergillus* Species Determined by Microbroth Methodology. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 9, 2007.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of *Colombian Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p.878, 2009.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, S. A. S.; BERN, L. A. G.; GESU, G. D. Os Fungos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Associação Médica**, v. 49, n. 3, 2003.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B.; CHAABOUNI, Y.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A.; CHAIEB, K. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 56-63, 2017.

MILITAO, G.C.; PINHEIRO, S.M.; DANTAS, I.N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.C.; LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R. Bioassay-guided fractionation of pterocarpanes from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6687-6691, 2007.

MINNEBRUGGEN, G. V.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGENS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, p. 22-32, 2010.

MONK, B. C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 367-369, 2008.

MONTENEGRO, R. C.; JIMENEZ, P. C.; FEIO FARIAS, R.A.; ANDRADE-NETO, M.; SILVA BEZERRA, F.; MORAES, M.E.; DE MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Michx.: Pers.) Coker & Couch, 1928. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, p. 519-522, 2004.

MOON, H.; KIM, N.H.; KIM, S.H.; KIM, Y.; RYU, J.H.; RHEE, M.S. Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and indigenous flora in marinated beef and marinade. **Meat Science**, v. 129, p. 147-152, 2017.

MOORE, A.; NANNAPANENI, R.; KIESS, A.; SHARMA, C.S. Evaluation of USDA approved antimicrobials on the reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* in ground chicken frames and their effect on meat quality. **Poultry Science**. Março, 2017. Doi: 10.3382/ps/pew497. [Epub antes da impressão].

MORALES, H.; MARIN, S.; ROVIRA, A.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.30–35, 2007.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VAN DINGENEN, M. A.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential Oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2007.

MOTA, K. S. L.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A. et al. Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules**, v. 17, p. 14418-14433, 2012.

MOUSINHO, K.C.; CORREIA, M.B.L.; SILVA, J.O.; MAGNATA, S.S.L.P.; SOUZA, I.A.; CATANHO, M.T.J.A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1139-1146, 2008.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163 – 194, 2005.

MURRAY, P. R.; **Manual of Clinical Microbiology**, 7a ed., Washington: ASM Press, 1999.

MURRAY, P. R. Agentes Antifúngicos. In: MURRAY. **Microbiologia Médica**. Editores: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Tradução da 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2014. Cap. 69, p. 631-642.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; DE SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 579–586, 2004.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n. 4, p.65-72, 2000.

NAVIA, M.A.; CHATUVERDI, P.R. Design principles for orally bioavailable drugs. **Drug Discovery Today**, v. 1, p. 179-189, 1996.

NCCLS- Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. Approved guideline M26-A, v. 19, Wayne, 1999.

NCUBE, N.S.; AFOLAYAN, A.J.; OKOH, A.I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NG, T.B.; LI, W.W.; YEUNG, H.W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 18, p. 55-61, 1986.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, Supl., p.201-205, 1991.

NISHI, I.; SUNADA, A.; TOYOKAWA, M. et al. *In vitro* antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Infection Chemotherapy**, v.15, p.1-5, 2009.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T.; Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, p. 28-35, 2012.

NOVAIS, T.S. Atividade antibacteriana em alguns extratos vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl., p. 8-11, 2003.

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobial from plants. In: Gould, G. W. **New methods of food preservation**. Londres: CRC Press, 1996. p. 235-258.

OH, S.Y.; BOERMANS, H. J.; SWAMY, H.V.L.N. et al. Immunotoxicity of *Penicillium* Mycotoxins on Viability and Proliferation of Bovine Macrophage Cell Line (BOMACs). **The Open Mycology Journal**, v. 6, p. 11-16, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BISSO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, C. S.; LIRA, B. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **Molecules**, v. 17, p. 5095-5107, 2012.

OLIVEIRA, L.D.C.; BORGES-PALUCH, L.R. Alergias respiratórias: uma revisão dos principais fungos anemófilos e fatores desencadeantes. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 426-441, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, A.A. **avaliação dos efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato etanólico, fase clorofórmica e flavonoide de Praxelis clematidea (griseb.) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae)**. 2015. 176f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, A.A.; OLIVEIRA, H.M.B.F.; MEDEIROS, C.I.S.; PESSÔA, H.L.F.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Antifungal effect of 7-hydroxycitronellal against *C. Tropicalis* strains: an *in vitro* approach. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 1, 2017.

OMAF. **Pesticide storage, handling and application**. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. California, United States, 2004.

ONG, T.P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A.; DAGLI, M.L.; MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1194-1203, 2006.

OSSIA-ONGAGNA, Y.; SABATIER, R. Comparison of *in vitro* activity of six disinfectants on bacteria from contamination in hemodialysis water. **Journal De Pharmacie De Belgique**, v. 48, n. 5, p. 341-351, 1993.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZKAYA, A.; SAHIN, Z.; GORGULU, A.O.; YUCE, A.; CELIK, S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 29-35, 2016.

PADLA, E. P.; SOLIS, L.T.; RAGASA, C. Y. Antibacterial and antifungal properties of *ent*-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 5, p. 408-414, 2012.

PAILARD, F.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J.A. Use of primary cultures of rats hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. **Toxicology In vitro**, v. 13, p. 693-700, 1999.

PANAPRUKSACHAT, S.; IWATANI, S.; OURA, T.; VANITTANAKOM, N.; CHINDAMPORN, A.; NIIMI, K.; NIIMI, M.; LAMPING, E.; CANNON, R.D.; KAJIWARA, S. Identification and functional characterization of *Penicillium marneffe* pleiotropic drug resistance transporters ABC1 and ABC2. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 478-491, 2016.

PANTÓN, J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, p. 78-82, 2008.

PARDRIDGE, W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 15, p. 5-36, 1995.

PARK, I.K.; KIM, J.; LEE, S.G.; SHIN, S.C. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components From Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) Essential Oils Against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of nematology**, v. 39, n. 3, 2007.

PARK, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, C.H.; CHUNG, N.; LEE, H.S. Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40902, 2017.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451 - 4533, 2005.

PATERSON, D.A.; CONRADI, R.A.; HILGERS, A.R.; VIDMAR, T.J.; BURTON, P.S. A non-aqueous partitioning system for predicting the oral absorption potential of peptides. **Quantitative Structure-Activity Relationships Journal**, v.13, p. 4-10, 1994.

PAVELA, R. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. **Parasitology Research**, V. 114, n. 10, p. 3835-3853, 2015.

PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. London: Plenum Press, 1987. v.1.

PEDERSEN, L.F.; JOKUMSEN, A.; LARSEN, V.J.; HENRIKSEN, N.H. Peracetic acid products expand sanitizing, organic water treatment options. **Global aquaculture advocate**, p.66-67, 2015.

PEREIRA, V. R. **Variação sazonal nas concentrações de aeroalérgenos em diferentes níveis de poluição ambiental**. São Paulo: USP, 2007. 137f. Tese (Doutorado em medicina) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PERFECT, J.R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2017. Disponível em: <www.nature.com/nrd>. Acesso em: 10 de junho de 2017.

PERRY, G.; PERRY, A.K.; RAINA, A.; NUNOMURA, T.; WATAYA, L.M. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p.831-834, 2000.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, Supl. 1, p. 21-24, 2003.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M.J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1367-1373, 2006.

PINTO, E.B.; NERI, C.M.M.; OLIVEIRA-FILHO, A.A.; PINTO, N.B. Avaliação do potencial tóxico dos monoterpenos carvacrol, linalol e p-cimeno: uma abordagem *in silico*. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v.2, n. 2, p. 210-224, 2015.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press Inc., 1979. 634 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

POLO, M.P.; DE BRAVO, M.G. Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 1, p. 102-111, 2006.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. Cap. 4, p. 75-89.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 39, p. 1-8, 2006.

PRASAD, S.N.; MURALIDHARA. Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 2, p. 330-345, 2013.

PYBUS, D.; SELL, C. **The chemistry of fragrances**. Crambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.

QIU, Y.; ZHANG, J.; LIU, G.; ZHONG, X.; DENG, J.; HE, Z.; JING, B. Retrospective analysis of 14 cases of disseminated *Penicillium marneffe* infection with osteolytic lesions. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n.47, 2015.

QUADROS, M. E.; LISBOA, E. M.; OLIVEIRA, V. L.; SCHIRMER, W. N. Qualidade do ar interno em ambientes Hospitalares. **Revista Tecnologia**, Fortaleza, v. 30, n.1, p. 38-52, jun. 2009.

QUALLS, W.A.; XUE, R.D. Field evaluation of three botanical repellents against *Psorophora ferox*, *Aedes atlanticus*, and *Aedes mitchellae*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 3, p. 379-381, 2009.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUIMARÃES, A.G.; ARAÚJO, B.E.S.; OLIVEIRA, G.F.; SANTANA, M.T.; MOREIRA, F.V.; SANTOS, M.R.V.; CAVALCANTI, S.C.H.; LUCCA JÚNIOR, W.D.; BOTELHO, M.A.; RIBEIRO, L.A.A.; NÓBREGA, F.F.; ALMEIDA, R.N. Carvacrol, (-)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, an Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 630-639, 2011.

RAJAKUMAR, D.V.; RAO, M.N.A. Biochemical Pharmacology Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 11, p. 2067-2072, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. M. (eds.) **Farmacologia**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

REBOREDO, M.M.; LUCINDA, L.M.F.; ROCHA, C.B.; QUEIROZ, G.T.; FARIA, V.C.; VIEIRA, V.A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.26, p.11-17, 2007.

REDDY, C.S.S.S.; SUBRAMANYAM, M.V.V.; VANI, R.; DEVI, S.A. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. **Toxicology in Vitro**, v.21, p. 1355–1364, 2007.

REGINATO, C.F.; BANDEIRA, L.A.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; DANESI, C.C. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after in vitro fluconazole exposure. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 75-79, 2017.

RODRIGUES, H.G.; BATISTA, M.T.A.; FONSECA, L.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Revista Biotemas**, v.22, n. 1, 2009.

RODRIGUEZ, R.J.; LOW, C.; BOTTEMA, C.D.; PARKS, L.W. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 837, p. 336–343, 1985.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 275-288, 2011.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66–76, 2017.

ROTH, E. Oxygen free radicals and their clinical implications. **Acta Chirurgica Hungarica**, v. 36, p. 302-305, 1997.

RUNDBERGET, T.; WILKINS, A. L. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 964, p. 189–197, 2002.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057–1060, 2010.

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in antifungal therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 361–79, 2008.

SABO, J.A.; ABDEL-RAHMAN, S.M. Voriconazole: a new triazole antifungal. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, p. 1032-1043, 2000.

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 445-452, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; VAN OORSCHOT, C.A.N. **Introduction to food-borne fungi**. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1984.

SANCHES, L.J.; MARINELLO, P.C.; PANIS, C.; FAGUNDES, T.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE-FREITAS-JUNIOR, J.C.,; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L.; LUIZ, R.C. Cytotoxicity of **citral** against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, 2017.

SANTIN, M.R.; DOS SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; FERREIRA, I.C.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1489-1496, 2009.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SATO, K.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Antimicrobial Effect of trans-Cinnamaldehyde, (-)-Perillaldehyde, (-)-Citronellal, Citral, Eugenol and Carvacrol on Airborne Microbes Using an Airwasher. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2292-2294, 2006.

SCHIAR, V.P.P.; SANTOS, D.B.; LUDTKE, D.S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M.W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, B.T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 139-145, 2007.

SCORTICHINI, M.; ROSSI, M.P. *In vitro* susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. to geraniol and citronellol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 71, p. 113-118, 2008.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F. et al. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.391-397, 2007.

SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J. Combination antifungals: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, p. 883–892, 2007.

SEIDIL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74, n.1 p.145-150, 2002.

SEMENOVA, M.N.; KISELYOV, A.; SEMENOV, V.V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. **Biotechniques**, v. 6, p. 765-774, 2006.

SENEVIRATNE, G.; JAYASINGHEARACHCHI, H.S. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p.1975–1978, 2005.

SHANMUGAPRIYA, S.; SUBRAMANIAN, P.; KANIMOZHI, S. Geraniol Inhibits Endometrial Carcinoma via Downregulating Oncogenes and Upregulating Tumour Suppressor Genes. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 214-219, 2017.

SHARMA, Y.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal of Medical Mycology**, v. 26, n. 3, p. 244-254, 2016.

SHI, X.Y.; YANG, Y.P.; ZHANG, Y.; LI, W.; WANG, J.D.; HUANG, W.M.; FAN, Y.M. Molecular identification and antifungal susceptibility of 186 *Candida* isolates from vulvovaginal candidiasis in southern China. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 390-393, 2015.

SHIRRON, N.; KISLUK, G.; ZELIKOVICH, Y.; EIVIN, I.; SHIMONI, E.; YARON, S. A comparative study assaying commonly used sanitizers for antimicrobial activity against indicator bacteria and a *Salmonella Typhimurium* strain on fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 11, p. 2413-2417, 2009.

SI, W.; GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R.; DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 296-305, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201–222, 1995.

SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida spp.* **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 63–66, 2008.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; DE HELUANI, C.; CATALAN, C.A.N. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and their Selected Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, 2006.

SINGH, H.P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**, v. 114, n.2, p. 642-645, 2009.

SIRISANTHANA, T.; SUPPARATPINYO, K.; PERRIENS, J. NELSON, K.E. Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffe* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n.5, p. 1107–1110, 1998.

SMITH, M. J.; ARNDT, A.; GORSKI, S.; FAJBER, E. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 6, p. 545-554, 1993.

SNELDERS, E.; VAN DER LEE, H.A.; KUIJPERS, J.; RIJS, A.J.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; MELLADO, E.; DONDEERS, A.R.; MELCHERS, W.J.; VERWEIJ, P.E. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Medicine**, v. 5, n.11, p. 1629–1637, 2008.

SOBRINHO, A.C.N.; SOUZA, E.B.; ROCHA, M.F.G.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDERA, P.N.; SANTOS, H.S.; PEREIRA, R.; MORAIS, S.M.; FONTENELLE, R.O.S.; CAVALCANTE, C.S.P. Cytotoxicity, antifungal and antioxidant activities of the essential oil from *Eupatorium ballotifolium* Kunth (Asteraceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 16, pp. 346-355, 2016.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n. 2, p.245-250, 2005.

SOUZA, A. E. F.; SOUZA, E. F.; COSTA, H. A.; BARBOSA, Y. W.F.; JUNIOR, U. P.S.; VIEIRA, K. V. M. Microbiota fúngica anemófila de hospitais da rede pública da cidade de Campina Grande -PB. **BioFar -Revista de Biologia e Farmácia**, v. 4, p. 102-116, 2010.

SRINIVAS, N.; SANDEEP, K.S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B.N. In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: na in silico approach. **International Invention Journal of Biochemistry And Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 20-29, 2014.

SROUR, M.A.; BILTO, Y.Y.; JUMA, M. Evaluation of different methods used to measure malonyldialdehyde in human erythrocytes. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 23, p. 23-30, 2000.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.

STONE, S.C.; VASCONCELLOS, F.A.; LENARDÃO, E.J.; DO AMARAL, R.C.; JACOB, R.G.; LEIVAS LEITE, F.P. Evaluation of potential use of *Cymbopogon sp.* Essential oils, (R)-citronellal and N-citronellylamine in cancer chemotherapy. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 6, n. 4, p. 11-15, 2013.

SULLIVAN, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D. Fungal Diseases of Humans. In: Kavanagh, K. **Fungi – Biology and Applications**. Irlanda: John Wiley & Sons Ltda, 2005.

SUPPARATPINYO, K.; SCHLAMM, H.T. Voriconazole as therapy for systemic *Penicillium marneffe* infections in AIDS patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n.2, p. 350-353, 2007.

SURENDRA KUMAR, M.; REDDY, R.; MANASA, G.; VANAJA, P.; SIRISHA, G.; ASTALAKSHMI, N. Antifertility effect of *Trachyspermum ammi* (Linn) sprague fruits on male rats. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 2, p. 705–709, 2011.

SVETAZ, L.; AGÜERO, M. B.; ALVAREZ, S.; LUNA, L.; FERESIN, G.; DERITA, M.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. **Planta Medica**, v. 73, n. 10, p. 1074–1080, 2007.

TALMADGE, J.E.; SINGH, R.K.; FIDLER, I.J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and convencional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n.3, p. 793-804, 2007.

TESTA, B.; CARRUPT, P.A.; GAILLARD, P.; BILLOIS, F.; WEBER, P. Lipophilicity in molecular modeling. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 335-343, 1996.

TETKO, I.V. Computing chemistry on the web. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1497-1500, 2005.

THOMAS, M.L.; DE ANTUENO, R.; COYLE, K.M.; SULTAN, M.; CRUICKSHANK, B.M.; GIACOMANTONIO, M.A.; GIACOMANTONIO, C.A.; DUNCAN, R.; MARCATO, P. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1485-1496, 2016.

TIWARI, M.; KAKKAR, P. Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 2, p. 295-301, 2009.

TOMAZ, M.A.; VIDAL COSTA, A.; RODRIGUES, W.N.; PINHEIRO, P.F.; PARREIRA, L.A.; RINALD, D.; QUEIROZ, V.T. Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 475-483, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. B.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VALEJO, F.A.M. **Transição epitélio-mesenquimal e presença de células CD44+ e CD24- como fatores de predição de metástase axilar no câncer de mama inicial**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VANITTANAKOM, N.; COOPER, C.R.; FISHER, M.C.; SIRISANTHANA, T. *Penicillium marneffe* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.1, p. 95-110, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J.P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, n. 3, p. 151-153, 1994.

VISAGIE, C.M.; ROETS, F.; JACOBS, K. A new species of *Penicillium*, *P. ramulosum* sp. nov., from the natural environment. **Mycologia**, v. 101, n.6, p.888-95, 2009.

WADA, H.; SATOH, N. Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossil Record. **Journal of Molecular Evolution**, v. 1, p. 41-49, 1994.

WALKER, G.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. (Editor). **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd., p. 1-10, 2005.

WANG, T.H.; HSIA, S.M.; WU, C.H.; KO, S.Y.; CHEN, M.Y.; SHIH, Y.H.; SHIEH, T.M.; CHUANG, L.C.; WU, C.Y. Evaluation of the Antibacterial Potential of Liquid and Vapor Phase Phenolic Essential Oil Compounds against Oral Microorganisms. **PLoS One**, v. 11, n. 9, 2016.

WANG, Y.; SHAN, T.; YUAN, Y.; YUE, T. Overall Quality Properties of Kiwifruit Treated by Cinnamaldehyde and Citral: Microbial, Antioxidant Capacity during Cold Storage. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 12, p. 3043-3051, 2016.

WANG, P.; CHEN, Y.; XU, H.; DING, L.; WU, Z.; XU, Z.; WANG, K. Acute Disseminated *Talaromyces marneffe* in An Immunocompetent Patient.

Mycopathologia. 2017. Doi: 10.1007/s11046-017-0127-7 [Epub antes da impressão].

WANG, T.T.; SHI, Z.Q.; HU, L.B.; XU, X.F.; HAN, F.X.; ZHOU, L.G.; CHEN, J. Thymol Ameliorates Cadmium-Induced Phytotoxicity in the Root of Rice (*Oryza sativa*) Seedling by Decreasing Endogenous Nitric Oxide Generation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7396-7405, 2017.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, Supl. I, p.153-158, 2000.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent International. **Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 2012.

WHEELDON, L.J.; WORTHINGTON, T.; HILTON, A.C.; LAMBERT, P.A.; ELLIOTT, T.S.J. Sporicidal activity of two disinfectants against *Clostridium difficile* spores. **British Journal of Nursing**, v. 17, n. 5, p. 316-320, 2008.

WHITE, R.; BURGESS, D.S.; MADHAMAVIMANDURU, B.J.A. Comparison of three different in vitro methods of detection synergism: time-kill, checkerboard and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1914-1918, 1996.

WISEMAN, D.A.; WERNER, S.R.; CROWELL, P.L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n.3, p. 1163-1170, 2007.

WONG, S.S.; WONG, K.H.; HUI, W.T. et al. Differences in clinical and laboratory diagnostic characteristics of *penicilliosis marneffei* in human immunodeficiency virus (HIV)- and non-HIV-infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4535-40, 2001.

WONG, S.S.Y. *Penicillium marneffei*. In: **HIV- Manual 2007**. Virtual AIDS Office of Hong Kong, 2007. Disponível em: <<http://www.info.gov.hk/aids/pdf/g190htm/index.htm>>. Acesso em: 15 de Junho de 2013.

WONG, Y.N.S.; WONG, K.F. *Penicillium marneffei* Infection in AIDS. **Pathology Research Internacional**. 2011; 2011: 764293. Doi:10.4061/2011/764293.

YE, F.; LUO, Q.; ZHOU, Y.; XIE, J.; ZENG, Q.; CHEN, G.; SU, D.; CHEN, R. Disseminated *penicilliosis marneffei* in immunocompetent patients: A report of two cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n.1, p. 161-165, 2015.

YEOM, H.J.; KANG, J.K.; KIM, S.W.; PARK, II.K. Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 2, p. 200-206, 2013.

YNOUYE, S.; YAMAGUCHI, H.; TAKIZAWA, T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 7, n. 4, p. 251-254, 2001. ZABKA, M.;

YOUNKIN, S.; OSKI, F.A.; BARNES, L.A. Mechanism of the hydrogen peroxide hemolysis test and its reversal with phenols^{1,2}. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 7-13, 1971.

YU, Y.M.; CHAO, T.Y.; CHANG, W.C.; CHANG, M.J.; LEE, M.F. Thymol reduces oxidative stress, aortic intimal thickening, and inflammation-related gene expression in hyperlipidemic rabbits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n.3, p. 556-563, 2016.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, p. 1051–1056, 2013.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

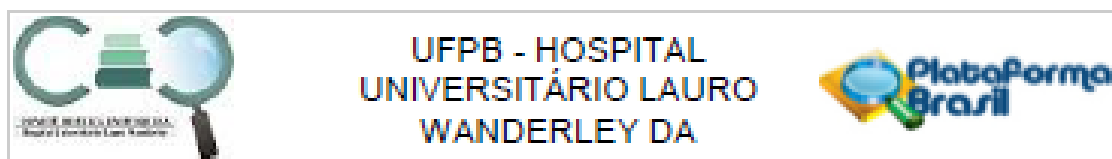
ZHANG, A.; ZHU, Q.Y.; LUK, Y.S.; HO, K.Y.; FUNG, K.P.; CHEN, Z.Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ZHANG, Z.Z.; LI, Y.B.; QI, L.; WAN, X.C. Antifungal activities of major tea leaf volatile constituents toward *Colletorichum camelliae* Masea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3936-3940, 2006.

ZHANG, L.; ZHOU, S.; PAN, A. LI, J.; LIU, B. Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 33, p. 1-4, 2015.

ZHANG, Z.; TAO, F.; LI, Y.; XIAO, Y.; ZHANG, Z.; LIU, J. Disseminated *Penicillium marneffe* infection recurrence in a non-acquired immune deficiency syndrome patient: A case report. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 5, n.6, p. 829-831, 2016.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E TOXICIDADE DE MONOTERPENOS

Pesquisador: TASSIANA BARBOSA DANTAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68345517.1.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.192.256

Apresentação do Projeto:

O projeto em sua segunda versão refere-se a tese de doutorado do programa de pós graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos. O estudo visa avaliar a toxicidade e a atividade antifúngica in vitro de monoterpênos sobre cepas de *Penicillium*, a fim de fornecer informações importantes para a possível síntese de fármacos antifúngicos eficientes e menos tóxicos. Inicialmente, será realizada uma triagem microbiológica com vários fitoconstituintes, sendo selecionados aqueles que apresentarem melhores resultados para a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Depois, será investigada a toxicidade desses compostos, através da ação sobre eritrócitos humanos por meio da avaliação do potencial hemolítico, avaliação da fragilidade osmótica e avaliação do potencial oxidante e antioxidante; além da investigação do potencial mutagênico e antimutagênico em células bacterianas através do teste de Ames.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisadora destacou como objetivo primário:

Avaliar a toxicidade e a atividade antifúngica in vitro de monoterpênos sobre cepas de *Penicillium*;

E como objetivos secundários:

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-000
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3218-7984 **Fax:** (83)3218-7522 **E-mail:** comite.etica@hulw.ufpb.br



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 2.102.256

monoterpenos e dos antifúngicos padrões (anfotericina B e itraconazol);

- Avaliar o efeito dos monoterpenos em eritrócitos humanos, por meio da avaliação do potencial hemolítico, avaliação da fragilidade osmótica e avaliação do potencial oxidante e antioxidante;
- Investigar o potencial mutagênico e antimutagênico em células bacterianas através do teste de Ames.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos, a pesquisadora destaca que serão mínimos, uma vez que todo o trabalho observará as normas de segurança preconizadas para o trabalho com micro-organismos e sangue humano.

Em relação aos benefícios é destacado pelo projeto: Determinação do efeito farmacológico de uma substância isolada frente a células eucarióticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa a ser realizada envolverá alguns ensaios *in vitro* como atividade microbiológica pela técnica da microdiluição para determinar a concentração fungicida mínima dos monoterpenos avaliados. Outro ensaio realizado será a atividade hemolítica utilizando sangue humano oriundo de bolsas de transfusão que não serão mais utilizadas, além de atividade antioxidante dos compostos químicos estudados.

O projeto não contará com a participação direta de indivíduos, sendo utilizado apenas doação de bolsas de sangue que seriam descartadas após o vencimento na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou os termos solicitados pelo comitê de ética como:

- Projeto completo;
- Folha de rosto de cadastro na plataforma Brasil;
- Certidão de aprovação do projeto pela pós graduação em produtos naturais e compostos bioativos;
- Ficha de cadastro na Gerência de Ensino e Pesquisa;

Recomendações:

Recomenda-se que:

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.050-000
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3218-7964 Fax: (83)3218-7522 E-mail: comite.etica@hulw.ufpb.br



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 2.192.258

1. (O)A pesquisador(a) responsável e demais colaboradores, MANTENHAM A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW.
2. Apresente ao CEP/HULW, relatório parcial após a coleta de dados e relatório final ao término do estudo, e;
3. Informe ao CEP/HULW, por meio de Emenda/Notificação a Inclusão de novos membros/equipe de pesquisa, via plataforma Brasil.
4. Caso ocorram Intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o(a) pesquisador(a) responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora realizou alterações solicitadas referentes ao protocolo de pesquisa, por não tratar-se de área temática especial, onde houve alteração referente a Informação de "estudo de área temática especial" para estudo "de área de ciências biológicas".

Considerando que o(a) pesquisador(a) atendeu adequadamente às recomendações feitas por este Colegiado em parecer anterior a este, e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, estando em consonância com as diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS, somos favoráveis ao desenvolvimento da Investigação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 25 de julho de 2017.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

- . O participante da pesquisa deverá receber uma via do Termo de Consentimento na íntegra, com assinaturas do pesquisador responsável e do participante e/ou do responsável legal. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.
- . Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e apor assinatura na última folha.
- . O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer dano ou prejuízo à assistência que

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comite.etica@hulw.ufpb.br



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 2-192-256

esteja recebendo.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

Eventuais modificações – EMENDAS - ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

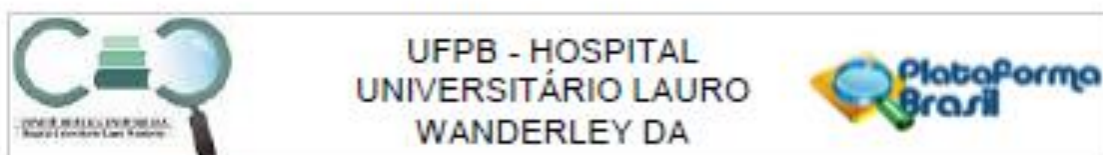
O protocolo de pesquisa, segundo cronograma apresentado pela pesquisadora responsável, terá vigência até 31/10/2017.

Ao término do estudo, o pesquisador deverá apresentar , online via Plataforma Brasil, através de Notificação, o Relatório final ao CEP/HULW para emissão da Certidão Definitiva por este CEP.. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_892143.pdf	14/06/2017 12:53:43		Aceito
Outros	resposta.docx	14/06/2017 12:52:40	TASSIANA BARBOSA DANTAS	Aceito
Outros	micologia.pdf	15/05/2017 11:10:09	TASSIANA BARBOSA DANTAS	Aceito
Outros	ficha.pdf	27/04/2017 22:26:37	TASSIANA BARBOSA DANTAS	Aceito
Outros	declaracao.pdf	27/04/2017 22:20:29	TASSIANA BARBOSA DANTAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	27/04/2017 22:04:40	TASSIANA BARBOSA DANTAS	Aceito

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-000
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comite-etica@hulw.ufpb.br



Continuação do Parecer 2.192.256

Folha de Rosto	folha.pdf	27/04/2017 22:04:16	TASSIANA BARBOGA DANTAS	Aceito
----------------	-----------	------------------------	----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 29 de Julho de 2017

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador)

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.050-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comite.etica@hulw.ufpb.br