



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



CÉSAR AUGUSTO COSTA DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CARVACROL ISOLADO E
ASSOCIADO A ANFOTERICINA B FRENTE A CEPAS DE *ASPERGILLUS*
***FLAVUS* ISOLADO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

João Pessoa – PB

2022

CÉSAR AUGUSTO COSTA DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CARVACROL ISOLADO E
ASSOCIADO A ANFOTERICINA B FRENTE A CEPAS DE *ASPERGILLUS*
FLAVUS ISOLADO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
bioativos do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos. Área de concentração:
Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488a Medeiros, César Augusto Costa de.

Avaliação da atividade antifúngica de carvacrol isolado e associado a anfotericina B frente a cepas de *Aspergillus flavus* isolado de material biológico / César Augusto Costa de Medeiros. - João Pessoa, 2022.
58 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. *Aspergillus*. 3. Infecções.
4. Fitoconstituente. 5. Carvacro. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

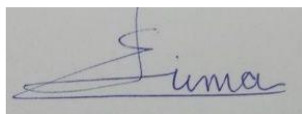
CDU 547.9(043)

César Augusto Costa de Medeiros

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CARVACROL ISOLADO E
ASSOCIADO A ANFOTERICINA B FRENTE A CEPAS DE *ASPERGILLUS
FLAVUS* ISOLADO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Aprovado em 21/02/2022

Banca examinadora



Profª. Drª Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Membro interno



Profª. Drª Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Membro externo

Dedico este trabalho a minha irmã, Bruna Maia,
que estando em processo de conclusão de sua
dissertação, partiu para o reino dos céus.
Contudo, essa conquista é minha e tua!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço àquele que por tudo de bom em minha vida é responsável, Deus! Gratidão pelas diversas boas oportunidades que pude viver até hoje, gratidão por sempre me dar a mão em todos os momentos e por iluminar grandiosamente os meus caminhos!

Aos meus pais, Jorge José e Eva Costa, por batalharem dia após dia para me proporcionar sempre as melhores oportunidades, por sempre me apoiarem em todas as situações impostas pela vida, me guiando sempre para o melhor caminho, e ao meu irmão, Luiz Henrique, por sempre me aconselhar a me manter da melhor forma possível na minha caminhada.

Ao meu cônjuge, Alexandre Brasil, gratidão por conviver comigo dia após dia sempre me apoiando na busca dos meus objetivos e me incentivando na aperfeiçoamento da minha formação, me trazendo tranquilidade em todos os momentos necessários. Obrigado por ser tanto em minha vida e por fazer tanto por mim!

A minha orientadora, Edeltrude de Oliveira, por me receber de braços abertos no laboratório e por manter uma relação tão boa de companheirismo na relação orientador-aluno com seu jeitinho doce de ser. Também agradeço a Francisco Júnior por me receber tão bem no laboratório e por me ajudar em todo o decorrer da minha pesquisa em bancada.

Ao meu irmão, Alison Lucas, por me dar os mais sinceros conselhos, por ser sempre por mim ao querer me ver sempre no melhor caminho, crescendo e sendo feliz! Obrigado por representar tanta coisa na minha vida, seremos para sempre assim, essa conexão inabalável!

A minha eterna e amada turminha de XVI de farmácia da UFCG, que de tanto nos ajudarmos podemos nos tornar bons profissionais, o que reflete em nossas conquistas atuais.

Ao meu grupinho Global que tanto amo, Bruna, Camila, Carol, Iara, Thaynara, Luana, Maria, Lucas e Marcus, por estarmos sempre unidos mesmo distantes, compartilhando todas as vitórias e todos os perrengues da vida, e solucionando-os da melhor e mais extrovertida forma possível.

E por fim, agradecer grandiosamente e imensamente a uma das pessoas mais importantes que já cruzou o meu caminho, minha eterna irmãzinha Bruna Maia. Tenho certeza de que Deus cruzou nossos caminhos para que eu entendesse um pouco do significado de pureza, bondade, humildade, amor e outras centenas de qualidades que poderia escrever aqui ao seu respeito. Certeza eu tenho tanta do ser de luz que tu és que já merecia estar em um lugar muito melhor, lindo, espalhando todo o seu amor e esse seu sorriso incrível, e este lugar é o reino de Deus. Você foi e continuará para sempre sendo um pedaço enorme da minha vida, obrigado por todas as lições e ensinamentos, obrigado pelos momentos. Essa conquista é minha e tua. Te amo, até breve!

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.”

Cora Coralina

RESUMO

Os fungos compreendem um grupo de patógenos que podem causar sérios danos à saúde. *Aspergillus flavus* está entre os principais agentes de comorbidades sérias, dentre elas, as aspergiloses. A terapia antifúngica atual tem se apresentando cada vez mais ineficiente, devido uma série de questões relacionadas a mecanismos adaptativos da própria célula fúngica, bem como da toxicidade associada às altas doses necessárias para o efeito desejado. Diante disto, a pesquisa por novas substâncias com atividade antifúngica por diferentes mecanismos de ação vem se tornando cada vez crescente. Os produtos naturais apresentam-se como um forte aliado para estes achados, visto que são fitoconstituintes que apresentam diversas atividades biológicas. Dentre estes, destaca-se o carvacrol, um monoterpene encontrado principalmente em plantas como *Origanum vulgare* (orégano). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a ação antifúngica do carvacrol comparado a antifúngicos padrões anfotericina B, fluconazol e voriconazol frente a isolados clínicos de *A. flavus*. Os ensaios para avaliar as atividades biológicas foram realizadas pela técnica de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), estudos de associação e estudo dos possíveis mecanismos de ação. Nos resultados de atividade biológica foi observado que o carvacrol na concentração de 16 µg/ml inibiu o crescimento da maioria das cepas fúngicas, seguido da anfotericina B, com valores de CIM de 32 µg/mL fluconazol com 512 µg/mL e voriconazol com 1 µg/mL. Quanto aos ensaios de CFM, valores de 32 µg/mL para o carvacrol foram observados, representando efeito fungicida para a substância em questão. A associação de carvacrol com anfotericina B representou valores de ICIF de 0,875, considerada de aditividade. O mecanismo de ação proposto para o carvacrol frente aos isolados de *A. flavus* foi obtido a partir dos ensaios de sorbitol e ergosterol, onde foi observada ação frente ao ergosterol da membrana celular fúngica. Dessa forma, carvacrol apresenta-se como bom candidato na busca do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que venham a suprir as necessidades atuais frente as patologias fúngicas em questão.

Palavra-chave: *Aspergillus*, Infecções, Fitoconstituinte, Carvacrol

ABSTRACT

Fungi comprise a group of pathogens that can cause serious health damage. *Aspergillus flavus* is among the main causes of serious comorbidities, among them, aspergillosis. Current antifungal therapy has been increasingly inefficient, due to a series of issues related to adaptive mechanisms of the fungal cell itself or even due to toxicity associated with the high doses necessary for them to have the desired effect. In view of this, the search for new substances that may have antifungal effects through different mechanisms of action has been increasing. Natural products are a strong ally for these findings, since they are phytoconstituents of plant origin that have different biological activities. Among these, carvacrol stands out, a monoterpene found mainly in plants such as *Origanum vulgare* (oregano). Therefore, the objective of this work was to investigate the antifungal action of carvacrol and the licensed antifungals amphotericin B, fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *A. flavus*. Assays to evaluate the biological activities were performed using the microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (CFM), association studies and study of possible mechanisms of action. In the results of biological activity, it was observed that carvacrol at a concentration of 16 µg/ml inhibited the growth of most fungal strains, followed by amphotericin B, with MIC values of 32 µg/mL, fluconazole with 512 µg/mL and voriconazole with 1 µg/mL. As for the CFM assays, values of 32 µg/mL for carvacrol were observed, representing a fungicidal effect for the substance in question. Drug association assays are currently very well seen, because in addition to reducing the effective concentration of each substance, thus reducing the risk of toxicity, the use of more than one mechanism of action can be a very viable alternative in the fight against serious fungal pathologies. , thus, the association of carvacrol with amphotericin B represented ICIF values of 0.875, being considered an association of additivity. The proposed mechanism of action for carvacrol against *A. flavus* isolates was obtained from the sorbitol and ergosterol assays, where we can observe an action of the substance against the ergosterol of the fungal cell membrane, causing its imbalance and leading to cell death. fungal. Thus, carvacrol presents itself as a good candidate in the search for the development of new therapeutic alternatives that will meet the current needs in the face of the fungal pathologies in question.

Keywords: *Aspergillus*, Infections, Phytoconstituent, Carvacrol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem de Macromorfologia de células de <i>Aspergillus flavus</i>	16
Figura 2: Imagem de Micromorfologia de células de <i>Aspergillus flavus</i>	16
Figura 3: Mecanismo de ação das drogas antifúngicas.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da avaliação de CIM (n=3) de carvacrol, afotericina B, fluconazol e voriconazol frente a cepas de <i>Aspergillus flavus</i> – Técnica de microdiluição.....	39
Tabela 2 - Resultados da avaliação de CFM (n=3) do carvacrol frente a diferentes linhagens do gênero <i>Aspergillus</i>	41
Tabela 3 - Concentração inibitória fracionária e o índice da concentração inibitória fracionária de Carvacrol e Anfotericina B frente a cepas do gênero <i>Aspergillus</i>	43
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima de carvacrol na ausência e presença de sorbitol frente a linhagens do gênero <i>Aspergillus</i>	44
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima de carvacrol e anfotericina B, na ausência e presença de ergosterol frente a linhagens do gênero <i>Aspergillus</i> ...	45
Tabela 6 - Biodisponibilidade oral <i>in silico</i> do carvacrol.....	45
Tabela 7 - Toxicidade oral <i>In silico</i> do carvacrol.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estrutura química dos principais derivados azólicos.....	25
Quadro 2 - Estrutura química do principal polieno.....	26
Quadro 3 - Estrutura química do carvacrol.....	28
Quadro 4 - Linhagens de <i>Aspergillus flavus</i> e seus respectivos locais de origem.....	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA – Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

AI – Aspergilose Invasiva

APC – Aspergilose Pulmonar Crônica

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIF – Concentração Inibitória Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DCF – Departamento de Ciências Farmacêuticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA – Food and Drug America

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LM – Laboratório de microbiologia

PAMP – Padrão Molecular Associado a Patógeno

SIGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TLRs – Receptores Toll-like

UFC – Universidade Formadora de Colônias

UFPB – Universidade Federal de Campina Grande

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1. Local de trabalho	32
3.2. Espécies fúngicas	32
3.3. Meios de cultura	33
3.4. Carvacrol e antifúngicos padrão	33
3.5. Inóculo fúngico	33
3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	33
3.7. Estudos de associação – Técnica de Checkerboard	35
3.8. Estudos de possíveis mecanismos de ação antifúngico	36
3.8.1. Ação dos produtos na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol	36
3.8.2. Ação dos produtos sobre a membrana celular: Ensaio com ergosterol	36
3.9. Ensaio <i>In silico</i>	37
3.9.1. Avaliação da biodisponibilidade oral <i>In silico</i>	37
3.9.2. Análise toxicológica oral <i>In silico</i>	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Atividade antifúngica	Erro! Indicador não definido.
4.2. Determinação da CIM e CFM	38
4.3. Ensaio de associação	42
4.4. Mecanismo de ação do carvacrol	43
4.5. Ensaio <i>In silico</i>	45
5. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo formado por leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, que atuam como sapróbrios, parasitas e com menor frequência, como simbioses, vivendo em associação com outros organismos. Os fungos são seres estudados como agentes causadores de profundo impacto na saúde humana, animais e plantas, assim como na segurança alimentar e biodiversidade bem como quanto ao seu papel na indústria de alimentos e medicamentos (REVIE et al., 2018; VIEGAS et al., 2019; ODEBODE e NIMAWANYA, 2020).

Cerca de 100 mil espécies de fungos foram identificadas até hoje, aos quais cerca de 300 são consideradas patogênicas. A maioria destes seres são oportunistas, necessitando de um hospedeiro susceptível para que causem a infecção e entre os micro-organismos que merecem destaque por tais infecções invasivas, observa-se o gênero *Aspergillus* (BROWN et al., 2012; WALL e LOPEZ-RIBOT, 2020).

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 250 espécies, amplamente distribuídas no ambiente. O gênero foi catalogado em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli. O vocábulo *Aspergillus* tem origem do latim *aspergillum*, pois a estrutura microscópica e reprodutiva do fungo é similar ao instrumento usado para aspergir água benta em cerimônias religiosas (BENNETT, 2007; SHETH et al., 2020; PAULUSSEN et al., 2017; SUGUI et al., 2014; DEMUYSER, DE COCK e SERMIJN, 2019).

As espécies de *Aspergillus* pertencem à família Aspergillaceae e classe Ascomycetes. São fungos que crescem sobre plantas, materiais orgânicos, solos, ar, organismos vivos e em habitats de água doce e marinha e devido a grande capacidade de esporulação que estes apresentam em água, podem formar micronichos ambientais em um curto espaço de tempo, dificultando a desinfecção dos ambientes. Quanto a macroscopia (Figura 1), as colônias podem apresentar-se, inicialmente, com uma cor esbranquiçada em sua superfície e com textura cotonosa na fase inicial. Posteriormente, alterações na sua coloração podem ser observadas, evoluindo para verde, amarelo, castanho

ou preto conforme cada espécie do gênero *Aspergillus* (LARONE, 2002; POSTER et al., 2015).

Figura 1. Macromorfologia de *Aspergillus flavus* em Ágar Sabouraud Dextrose



Fonte: Acervo do laboratório de pesquisa da atividade antibacteriana e antifúngica (reprodução autorizada).

Nas características microscópicas (Figura 2), suas espécies possuem hifas ramificadas, septadas, incolores e refringentes, conidióforo com haste simples. Da superfície da vesícula erguem-se fiálides com aspecto de garrafas e disposição radiada no seu conjunto, já na extremidade de cada uma, conídios basipetos, globosos, secos e de cor variável são formados (MURRAY; ROSSENTHAL; PFALLER, 2006). Os conídios são espalhados livremente pelo ar e podem facilmente adentrar seres vivos, chegando até os pulmões através do trato respiratório (HASANAH, 2017).

Figura 2. Micromorfologia de *Aspergillus flavus* (aumento de 10 vezes)



Fonte: Acervo do laboratório de pesquisa da atividade antibacteriana e antifúngica (reprodução autorizada).

Embora exista uma grande diversidade dentro do gênero *Aspergillus*, algumas espécies são agentes etiológicos de maiores impactos na saúde humana, animal e vegetal. Entre estas, destacam-se *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*. Estas espécies apresentando alta capacidade de sobrevivência em condições climáticas quentes e áridas, estas espécies estão entre as células microbianas com maior longevidade, tolerâncias mais altas ao calor, pressão e capacidade de germinar nas condições de menor atividade de água (PAULUSSEN et al., 2017; RUDRAMURTHY et al., 2019).

Dentre as principais espécies já citadas, *Aspergillus flavus* foi primeiramente descrito em 1809 por Link. Dentre suas características destaca-se o conidióforo com haste longa, grossa, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios em cadeia, que formam cabeças com 300 µm a 400 µm de diâmetro e as fiálides são unisseriadas ou bisseriadas (MARTINS et al., 2005; CARVALHO, 2013).

A espécie é difundida por todo o mundo e bilhões de esporos transportados pelo ar são constantemente produzidos e inalados diariamente por humanos e animais, podendo causar uma grande variedade de condições patológicas crônicas e alérgicas. O processo infeccioso gerado a partir deste patógeno ocorre principalmente por via respiratória, porém a contaminação cutânea também se apresenta bastante recorrente, podendo se manifestar em várias formas, incluindo síndromes alérgicas e colonização saprofítica de cavidades e seios da face (LESTRADE et al., 2019).

A contaminação de culturas vegetais também é levada bastante em consideração, pois além da sua virulência em humanos, *A. flavus* foi colocado na quinta posição entre os dez maiores causadores de deterioramento e doenças pré e pós-colheita em diversas culturas. A toxicidade relacionada à aflatoxinas são uma consequência, pois são introduzidas na cadeia trófica humana e animal, causando prejuízos graves à saúde (LI et al., 2019; HYDE et al., 2018).

Diante dos problemas já citados, as infecções respiratórias causadas por *Aspergillus* spp. são aquelas que mais causam maior repercussão. *A. flavus* é o segundo agente etiológico mais comum causador de aspergilose invasiva (AI) depois de *A. fumigatus*, geralmente encontrada em pacientes

imunocomprometidos com tratamento com esteroides, quimioterapia resultando em neutropenia grave, células-tronco hematopoéticas e transplante de órgãos sólidos. Já em pacientes imunocompetentes, os esporos podem atingir os alvéolos, mas são eliminados pelo sistema imunológico (RUDRAMURTHY et al., 2019).

O potencial protetor do epitélio pulmonar é responsável pelas respostas iniciais aos fragmentos fúngicos. Nas vias respiratórias superiores, uma camada de muco nas células epiteliais ciliadas reverte a direção das estruturas fúngicas inaladas. O reconhecimento das células fúngicas por meio de receptores de padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) e receptores *Toll-like* (TLRs), levando a ativação do sistema complemento, seguido assim de fagocitose e destruição das células fúngicas em indivíduos imunocompetentes, sendo responsáveis por eliminar tais estruturas patogênicas de *Aspergillus* quando inalados. A patologia relacionada a inalação dos fragmentos fúngicos não é inevitável, mas quando se trata de situações em que há o funcionamento anormal das defesas pulmonares, a persistência do patógeno será facilitada, junto da colonização e desenvolvimento da doença (GAGO, DENNING e BOWYER, 2019; PAULUSSEN et al., 2017; SOLANO e VÁZQUEZ, 2018).

É por isso então que o estado imunológico geral do hospedeiro se torna uma característica unificadora frente aos quadros clínicos de aspergilose, visto que hospedeiros imunocomprometidos se caracterizam por um sistema imunológico debilitado e, conseqüentemente são mais susceptíveis a tais infecções. Sendo assim, dependendo da virulência da cepa do fungo, do estado imunológico e / ou da estrutura e função pulmonar do hospedeiro, *Aspergillus* pode levar a uma variedade tão ampla de reações alérgicas e doenças infecciosas (BERTUZZI et al., 2018; TETZ et al., 2017; PAULUSSEN et al., 2017).

Além do próprio estado de saúde do paciente, o ambiente ao qual o fungo ocorre é bastante relevante para este tipo de infecção. Neste contexto, o ambiente hospitalar é ressaltado uma vez que nele se encontram os mais diferentes tipos de espécies e cepas resistentes de patógenos importantes do ponto de vista médico, passando a ser um grande desafio para a terapêutica quando entram em contato com pacientes ali presente (TROIANO et al., 2019).

Nas últimas décadas, a taxa de mortalidade e morbidade causada por infecções fúngicas invasivas aumentou significativamente, em especial por meio da inalação de conídios de *Aspergillus* transportados pelo ar dentro destes ambientes. As incidências destas infecções dependem muito dos procedimentos de esterilização, sistemas de ventilação e filtros de absorção, por exemplo, já que se trata de um público com alguma comorbidade que já os leva a um estado de debilidade (WIRMANN et al., 2018; DEMUYSER, DE COCK e EVELIEN, 2019; SHAJAHAN, CULP e WILLIAMSON, 2019; ODEBODE e NIMAWANYA, 2020).

Tem sido observado que, um número significativo de pacientes apresenta infecções invasivas com risco de morte frente a este patógeno em questão. A aspergilose afeta mais de 14 milhões de pessoas em todo o mundo, representada por aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA > 4 milhões), aspergilose pulmonar crônica (APC ~3 milhões) e a aspergilose invasiva (AI > 300.000). Além destes, outros quadros clínicos também são observados em humanos, como aspergilose cutânea, otomicose aspergilar, onicomicose aspergilar, sinusite aspergilar e aspergiloma ou bola fúngica (KE SCHWEER et al., 2016; GARCIA-VIDAL et al., 2015; GAGO, DENNING e BOWYER, 2019; SIDRIM; ROCHA, 2004; AMORIM et al., 2004).

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) representa a patologia mais comum dentre as principais, sendo uma doença pulmonar inflamatória secundária a uma reação de hipersensibilidade ao *Aspergillus* spp. É uma inflamação pulmonar caracterizada por infiltrados pulmonares e bronquiectasias, que se pode observar mais constantemente em pacientes asmáticos ou que apresentem algum tipo de fibrose cística (LI et al., 2017; SHAH e PANJABI, 2016).

Em casos como este, o gênero *Aspergillus* acaba colonizando as vias aéreas, invadindo os pulmões e desencadeando uma resposta linfocitária, com ativação da cascata de citocinas inflamatórias resultando em sensibilização. Os sintomas de ABPA normalmente são inespecíficos, e os mais comuns podem ser tosse produtiva crônica, hemoptise, perda de peso e febre (SHAH e PANJABI, 2014; RUSSO et al., 2020).

Torna-se necessário o diagnóstico clínico-laboratorial para que se possa iniciar uma abordagem terapêutica adequada. O diagnóstico clínico é baseado na análise de sinais e sintomas, enquanto o diagnóstico laboratorial é fundamentado em testes de rotina, exames radiológicos, histopatológicos, crescimento em cultura e a detecção de DNA fúngico e devem ser principalmente mais suspeitos em pacientes com asma mal controlada, bem como portadores de fibrose cística. Os testes de triagem são realizados com o teste cutâneo para *Aspergillus* ou o teste de sangue IgE específico (RUSSO et al., 2020).

Quando se refere a aspergilose pulmonar crônica, envolve-se um espectro de doença peculiar causada por *Aspergillus* caracterizada por invasão pulmonar local observada principalmente em pacientes imunocompetentes com alterações pulmonar estrutural pré-existente (SCHWEER et al., 2014).

As apresentações clínicas que envolvem este tipo de patologia são desde perda de peso até mesmo o aparecimento de tosse produtiva crônica, hemoptise e comparação de nódulos e cavidades na imagem do tórax. O aspergiloma representa a forma mais branda da forma crônica desta doença, consistindo em hifas de *Aspergillus* com fibrina contida no interior cavitário pulmonar previamente formado, e já o progresso mais importante da doença é representado pelo quadro de aspergilose pulmonar fibrosante crônica (DENNING et al., 2016).

O diagnóstico da aspergilose pulmonar crônica se baseia basicamente na presença de sinais e sintomas característicos da enfermidade e nas características radiológicas, persistentes por pelo menos 3 meses, com evidências microbiológicas de cepas de *Aspergillus* para ter o diagnóstico confirmado. Neste caso, existe uma forte recomendação de realização de ressecção cirúrgica de um aspergiloma simples em pacientes que estejam apresentando sintomas, caso esses sintomas sejam importantes como hemoptise persistente e caso apresentem baixo risco cirúrgico (PATTERSON et al., 2016).

A aspergilose pulmonar invasiva é considerada uma doença aguda/subaguda grave e pode ser identificada não somente em pacientes que estejam imunocomprometidos gravemente, mas também em pacientes não

neutropênicos. A preocupação sobre essa infecção aumentou significativamente nos últimos anos devido ao alto índice de paciente com estado imunológico debilitado, associado ao manejo e tratamento de neoplasias, transplantes sólidos ou hematológicos, doenças autoimunes e estados inflamatórios. (RUSSO et al., 2020).

A aspergilose pulmonar invasiva é encontrada principalmente nos pulmões, mas pode se disseminar para outros órgãos. Caracterizada pela invasão do tecido pulmonar por hifas de *Aspergillus*, apresenta-se com sintomas muito inespecíficos, incluindo tosse seca, falta de ar, dor torácica pleurítica e hemoptise. As condições do paciente podem piorar em alguns dias com insuficiência respiratória aguda (EL-BABA, GAO e SOUBANI, 2020).

O resultado bastante disseminador da AI é associado a incapacidade de diagnósticos rápidos e precisos, juntamente com as condições comórbidas dos pacientes, falta de conhecimento dentre as várias especialidades da classe médica e baixo desempenho dos testes microbiológicos. O tratamento é imensamente crucial para a sobrevida, e altas taxas de mortalidade também se tornam comuns em pacientes não neutropênicos, principalmente devido a diagnóstico tardio (CHOWDHARY, SHARMA E MEIS, 2017).

Quanto aos casos de aspergilose não invasiva, a aspergilose cutânea apresenta-se como uma implantação do *Aspergillus* spp. na pele, podendo ser evidenciado pápulas e até mesmo abscessos, diferente da otomicose aspergilar, que se trata de uma infecção secundária do conduto auditivo externo podendo apresentar prurido e corrimento intenso. A onicomiose aspergilar é recorrente em unhas traumatismos, tornando-a hiperkeratósica, de coloração verde-amarelada ou acastanhada. E por fim, a sinusite aspergilar, em que *Aspergillus* spp. podem causar lesão clínica nos seios paranasais, levando a quadros de sinusite crônica até destruição óssea e extensão da infecção (SIDRIM; ROCHA, 2004; TATARA et al., 2016; DARR-FOIT et al., 2017).

As modalidades de diagnóstico estão cada vez mais evoluindo, mas as infecções causadas por *Aspergillus* são normalmente confirmadas pela avaliação do quadro clínico do paciente e pelos exames laboratoriais. No diagnóstico clínico, é feito a avaliação com base nos sinais e sintomas conforme

o quadro clínico do paciente como também a coleta do material biológico para os exames de Laboratório.

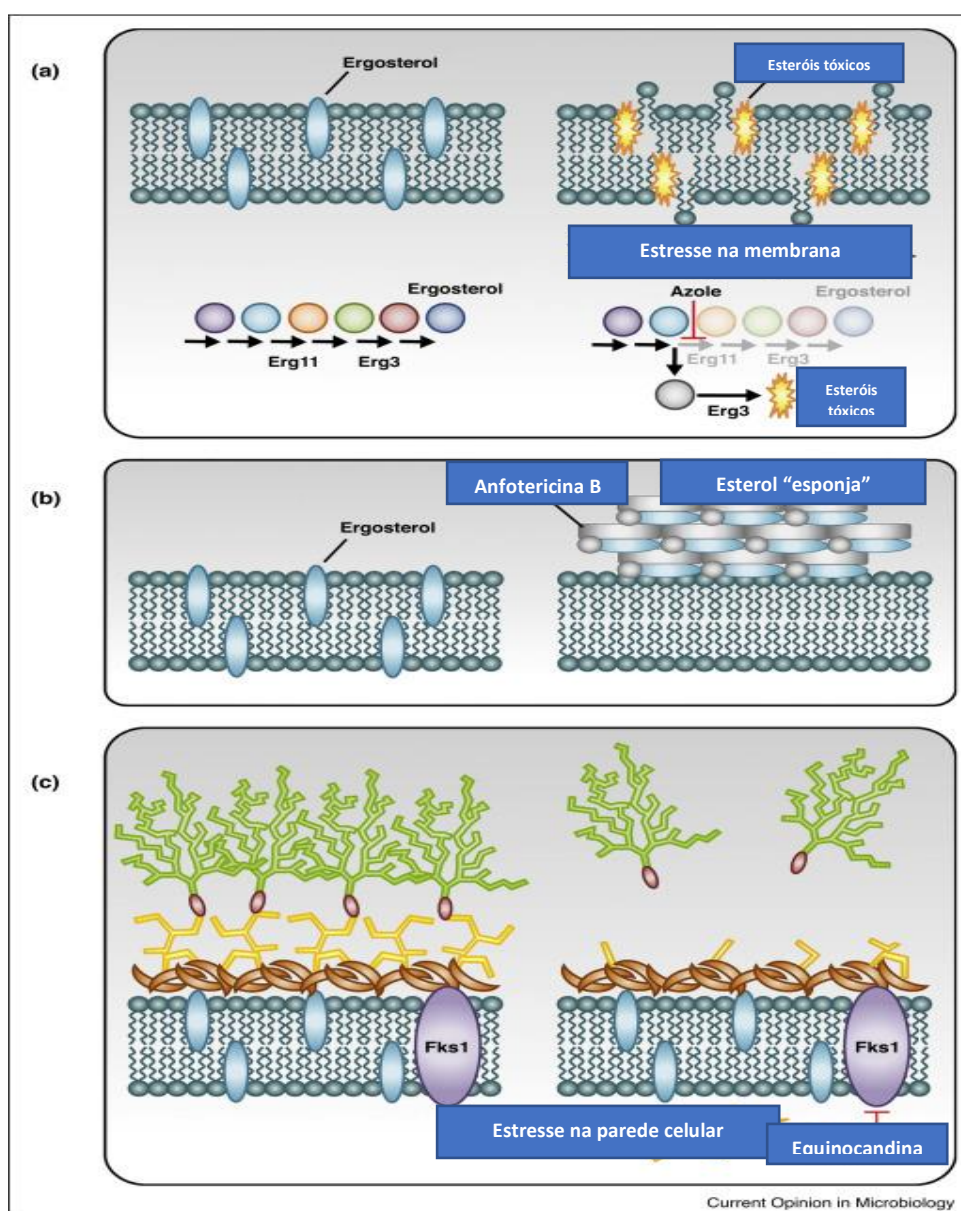
Para o diagnóstico micológico, é importante a realização de uma colheita de material biológico para os exames diretos, cultura e histopatológico. Inicialmente, se faz o exame direto com Hidróxido de Potássio (KOH/10-40 %), para a observação das estruturas características do gênero *Aspergillus* como as hifas regulares, septadas, ramificadas em ângulo agudo septadas, cabeças aspergilaes e hialinas. Seguida ao exame direto, o material biológico é inoculado em meios de cultura da rotina em Micologia, incluindo Ágar Sabouraud dextrose, Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida. A incubação é feita à Temperatura Ambiente/TA (28-30°C) durante 3-5 ou até 7 dias. Após o período de incubação é feito a avaliação da macromorfologia característica do gênero *Aspergillus*, o qual produz colônia de crescimento rápido, cotonosa, sulcos radiais ou superfície cerebriforme, coloração amarela/verde. E o microcultivo da colônia é feito pela Técnica de Riddel (Riddel, 1950), onde se observa a micromorfologia como hifas vegetativas ramificadas, septadas e conidióforos (hifas reprodutivas) contendo vesículas com uma coroa birradiada formada de métulas e fiáides que sustentam os conídios globosos, lisos ou rugosos e hialinos. Também, podem ser realizados os exames de Histopatologia usando as Técnicas de coloração HE, GMS, PAS, Gridley e/ou de Sorologia (SIDRIM e ROCHA, 2004; JEENKS, JEFFREY e HOENIGL, 2018; RUDRAMURTUY et al., 2019).

O manejo ideal das infecções por *Aspergillus* inclui prevenção, diagnóstico precoce, início precoce da terapia antifúngica, redução da terapia imunossupressora, se possível e em alguns casos, cirurgia. O tratamento antifúngico sistêmico precoce é de importância primária para a sobrevivência contra aspergilose, enquanto a cirurgia desempenha um papel importante principalmente em manifestações de doença mais raras (JEENKS, JEFFREY e HOENIGL, 2018; ULLMANN et al., 2018).

O impacto dos fungos frente a saúde humana é bastante amplificado devido ao arsenal terapêutico para o tratamento da aspergilose é bastante limitado, composto de apenas três classes de drogas antifúngicas, a saber: i) azóis, que têm como alvo a biossíntese do ergosterol (fluconazol, voriconazol,

isavuconazol); ii) polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular do fungo levando a lise da célula. A Anfotericina B é bastante usada em diversas formulações, representando os tratamentos de primeira escolha; e iii) equinocandinas, que inibem a biossíntese da parede celular fúngica (caspofungina, micafungina). Os mecanismos de ação das três classes estão sumarizados na Figura 3 (ARUANNO, GLAMPEDAKIS e LAMOTH, 2019; SEHGAL et al., 2019).

Figura 3. Mecanismo de ação das drogas antifúngicas. (a) Representação do mecanismo de ação dos azóis; (b) Representação do mecanismo de ação dos polienos; (c) Representação do mecanismo de ação das equinocandinas.



Os azóis e a anfotericina B foram estudados como terapia primária das doenças causadas por *Aspergillus*, porém, com o aumento da resistência aos azóis associados aos efeitos adversos causados pelo uso da Anfotericina B, que vão desde efeitos neurotóxicos até mesmo efeitos nefrotóxicos, fizeram com que as equinocandinas se tornassem terapia de resgate. Na maioria desses estudos, as equinocandinas foram administradas em pacientes que apresentavam leucemia mieloide aguda e receptores de transplante de células-tronco, embora o grupo de pacientes em risco de aspergilose se estende bem mais além disto (SLAVIN et al., 2021).

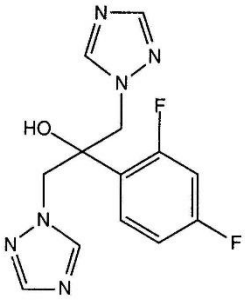
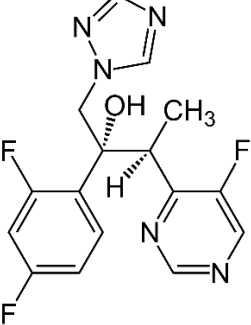
Os antifúngicos azólicos foram descobertos em 1944, mas só foram aprovados para uso em humanos até o final dos anos 1950 para inícios de 1960. A classe dos azóis se subdividem em duas: imidazólicos e os triazólicos, ambos compartilhando do mesmo mecanismo de ação. Os imidazólicos possuem dois átomos de nitrogênio no anel azólico, enquanto os triazólicos possuem três. Os triazóis, além de não apresentarem relatos de serem mutagênicos, são metabolizados lentamente e exercem menos efeitos sobre a síntese de esteróis humanos, sendo estes mais escolhidos atualmente para as terapias antifúngicas (LESTRADE et al., 2019; JENKS et al., 2018; SOLANO e VÁZQUEZ, 2018).

O principal mecanismo de ação apresentado pelos azóis é a inibição da enzima 14- α -desmetilase do lanosterol, uma enzima ligada ao citocromo p450, interrompendo a biossíntese do ergosterol a partir do lanosterol, acarretando no acúmulo de 14 α -metil esteróis, levando a alterações na permeabilidade e estabilidade da membrana celular, e consequentemente prejudicando o desenvolvimento da célula fúngica. Este mecanismo é mais específico à ação fungicida ou fungistática pelo fato de que estas substâncias têm maior afinidade pelas enzimas das células fúngicas do que pelas enzimas do citocromo p450 humano (CHOWDHARY, SHARMA E MEIS, 2017; WHALEY, et al., 2017).

Para o tratamento de tais infecções, dentre os triazóis, o voriconazol demonstrou maior eficiência contra espécies de *Aspergillus*. A droga possui efeito tóxico reduzido quando em comparação com a anfotericina B, tornando-se o antifúngico de primeira escolha em casos de aspergilose grave. O composto apresenta estrutura química semelhante com fluconazol, porém exibe espectro ampliado e hidrossolubilidade baixa (CHOWDHARY, SHARMA E MEIS, 2017).

Devido a sua natureza, o voriconazol também fungistático. O desenvolvimento de resistência é uma ocorrência bastante comum durante o tratamento com azóis, principalmente devido a mutação no gene alvo ERG11, mas também devido aos próprios componentes de resistência da própria célula fúngica, como a superexpressão das bombas de efluxo que realizam o transporte da molécula azólica para fora da célula. Pacientes na qual a aspergilose é resistente ao voriconazol, realiza-se a inclusão de formulações compostas com anfotericina B ou uma equinocandina (COWEN et al., 2014).

Quadro 1. Estrutura química dos principais derivados azólicos.

Estrutura química	Nomenclatura
	Fluconazol
	Voriconazol

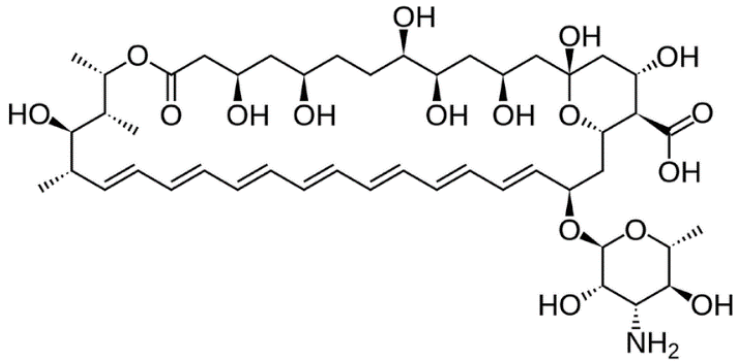
Fonte: Disponível em https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estrutura-quimica-dos-triazois-fluconazol-itraconazol-voriconazol-posaconazol_fig1_279510009, acesso em 30/11/2021

Os polienos foram propostos na terapia antifúngica em meados de 1950, tornando-se os primeiros antifúngicos de amplo espectro disponíveis para uso em terapia humana. A anfotericina B foi a primeira droga da classe, aprovada pela FDA (*Food and Drug America*) para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. A droga contém sete ligações duplas conjugadas na posição trans e uma 3-amino-3, 6-didesoximanose ligada ao anel principal (WALL e LOPEZ-RIBOT, 2020).

Seu mecanismo de ação antifúngico está relacionado com sua ligação ao ergosterol. A molécula anfipática de anfotericina B se liga ao ergosterol e atua como uma esponja que extrai esteroides das membranas celulares dos fungos, ou seja, quando o fármaco se liga ao ergosterol, formam-se canais iônicos na membrana celular, e conseqüentemente ocorre o extravasamento do interstício da célula fúngica, destruindo sua integridade osmótica e a morte celular (ANDERSON et al., 2014).

Dessa forma, a anfotericina B é considerada fungicida e apresenta alta eficiência frente a diversos patógenos fúngicos. Sua principal desvantagem está condicionada a sua alta toxicidade, particularmente a nível renal. Com isso, uma série de formulações lipídicas de anfotericina B foi desenvolvida com o objetivo de reduzir sua toxicidade, entre elas a anfotericina B convencional (C-AMB), anfotericina B lipossomal (L-AMB), complexo lipídico de anfotericina B (ABLC) e dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD) (WALL e LOPEZ-RIBOT, 2020).

Quadro 2. Estrutura química do principal polieno.

Estrutura química	Nomenclatura
	Anfotericina B

Fonte: Disponível em https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estrutura-molecular-da-anfotericina-B_fig1_282512388; acesso em 30/11/2021.

Por fim, as equinocandinas, obtidas a partir da procura por produtos naturais advindos da fermentação fúngica por volta da década de 1970, são a classe mais recente de antifúngicos aprovados pela FDA. As equinocandinas são caracterizadas como lipopeptídeos cíclicos com um núcleo hexapeptídico, que inibem a síntese de B-1,3-glucana na parede celular de fungos, necessária para manter sua estrutura. Na ausência deste polímero, há o comprometimento

da integridade celular, ocorrendo assim a lise (WHALEY et al., 2017; JENKS et al., 2018).

O principal mecanismo de resistência contra as equinocandinas são as mutações no FKS1 e no FKS2 que codificam a enzima alvo. Considerando isto mais o aumento de cepas resistentes às drogas azólicas e até mesmo aos vários efeitos adversos associados ao uso da anfotericina B, além dos registros de aumento de número de pacientes imunocomprometidos nas populações pediátricas e adultas, a epidemiologia das micoses invasivas se mostra cada vez mais alarmante. Diversas evidências também mostram a ocorrência de falhas frente a estas forma de tratamento em questão, causando grande preocupação aos profissionais da saúde (COWEN et al., 2015; ZAINI et al., 2020).

Sendo assim, diante do constante aumento de relatos de resistência do gênero *Aspergillus* aos antifúngicos mais o aumento de infecções fúngicas na população em risco, tornam cada vez mais preocupantes as ameaças causadas por estes patógenos. Um pequeno número de classe de drogas antifúngicas aprovadas e disponíveis é a realidade atual nos anos 2020, em termos do tratamento das infecções invasivas causadas por fungos patogênicos. Isto é um problema dado a aplicação constante, evolução das cepas, bem como das interações medicamentosas e efeitos colaterais correlacionado as altas doses necessárias (PFALLER et al., 2019 e FISHER et al., 2018).

Toda essa problemática, demanda ações urgentes na busca de novas terapêuticas antifúngicas com uma diversidade de mecanismos de ação. Com isto, surgiram grandes incentivos na busca de novas possibilidades terapêuticas que supram as necessidades de tratamento frente as patologias encontradas e resistência associada as diversas espécies de *Aspergillus*. Dentre as principais fontes alternativas para descoberta de novas substâncias antifúngicas destacam-se os produtos naturais obtidos a partir de espécies vegetais e/ou sintéticas, onde muitos vêm cada vez mais recebendo destaque por suas atividades antimicrobianas (ZAINI et al., 2020; VIJ, HUBE e BRUNKE, 2021).

O uso de produtos naturais obtidos de espécies de plantas consideradas medicinais com fins terapêuticos é um estágio científico de uma antiguidade

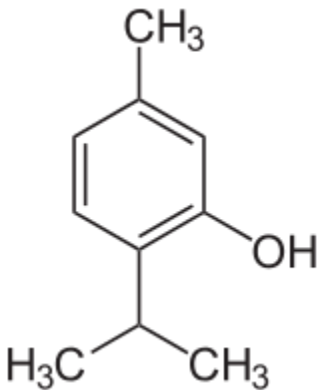
renovada. E não é só um resgate dos conhecimentos advindos dos primórdios da civilização, mas também um caminho real, favorecendo o uso potencial da biodiversidade existente dos nossos múltiplos biomas. Os estudos sobre produtos naturais de origem vegetal com propriedades antimicrobianas têm apresentado amplas e seguras perspectivas, levando em consideração, os crescentes problemas associados ao uso indiscriminado dos antifúngicos, ineficácia, efeitos adversos, resistência e outros. As atividades biológicas com atividade antimicrobiana estão associadas a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos e os óleos essenciais, esses últimos incluídos em extratos, frações, óleos fixos e voláteis, compostos isolados ou sintéticos têm sido comprovados através de pesquisas no mundo inteiro (MAIA, DONATO, FRAGA, 2015; MOREIRA et al., 2015; OLVEIRA FILHO et al., 2015).

O termo fitoconstituente refere-se a compostos químicos não nutritivos que apresentam alguma atividade biológica à planta. Possuem desde atividades protetoras, obtidos a partir de óleos essenciais. O carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) -fenol), um monoterpenóide fenólico encontrado em óleos de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lepidium flavum* (pimenta), *Citrus aurantium bergamia* (bergamota selvagem) e outras plantas, vem atraindo a atenção dos pesquisadores devido suas vastas propriedades biológicas (NÓBREGA et al., 2016).

A presença do grupamento hidroxila e de um sistema de elétrons deslocalizados na molécula de carvacrol parecem ser cruciais na atividade antimicrobiana intrínseca. Além disso, a redução do gradiente de pH da célula através da troca de prótons (H^+) da hidroxila pelo íon K^+ , agindo como um trocador de cátions, causando um colapso na força próton-motriz, são característicos de seu mecanismo antimicrobiano (SHARIFI-RAD et al., 2018).

Além disso, propriedades hidrofóbicas associadas ao anel aromático substituído, ressaltam outra ampla gama de atividades como anti-inflamatória, antiprotozoária, anticarcinogênica, antidiabética e antinociceptiva, tornando-a uma substância de alto potencial para avaliação de atividades antimicrobiana frente a outras espécies ainda inéditas na literatura (SHARIFI-RAD et al., 2018; FRIEDMAN, 2014; SHARIFI-RAD et al., 2018).

Quadro 3. Estrutura química do carvacrol.

Estrutura química	Nomenclatura
	Carvacrol

Fonte: Disponível em <http://quintaisimortais.blogspot.com/2017/03/tomilho-composicao-quimica-do-oleo.html>, acesso em 30/11/2021.

O presente trabalho tem como intuito avaliar o potencial antifúngico do Carvacrol frente a amostras de *Aspergillus flavus* oriundos de infecções superficiais e sistêmica, registrando dados não só apenas para mais um achado descrito na literatura, mas também contribuindo para o aumento de alternativas terapêuticas viáveis para o tratamento de aspergilose, principalmente, quando causada por espécies de *Aspergillus* resistentes aos fármacos disponíveis na farmacoterapia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a atividade antifúngica do carvacrol isolado e associado com antifúngicos anfotericina B, fluconazol e voriconazol frente a isolados de *Aspergillus flavus*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do carvacrol
- ✓ Investigar possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos ou indiferente do carvacrol associado a antifúngico padrão pela Técnica de *Checkboard*;
- ✓ Avaliar o possível mecanismo de atividade dos produtos sobre a célula fúngica;
- ✓ Avaliar biodisponibilidade e toxicidade do carvacrol frente a estudos *In silico*.

3. METODOLOGIA

3.1. Local de trabalho

Os ensaios de atividade antifúngica para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados no Laboratório de Pesquisa da Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Período de trabalho: março 2020/fevereiro 2022.

3.2. Espécies fúngicas

As cepas de origem clínica de *Aspergillus flavus* pertencem à coleção do Laboratório de Micologia/DCF/CCS/UFPB, e a cepa ATCC-9643 foi adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Rio de Janeiro) e Laboratório de Patologia Clínica- HEMATO/ João Pessoa - Paraíba, sumarizadas no Quadro 4. As amostras de *A. flavus* foram mantidas em tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose inclinado (Difco®) sob refrigeração (8° C) até o momento da realização do ensaio. As linhagens de *Aspergillus flavus* que foram utilizadas no desenvolvimento da pesquisa estão registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN) sob o número A359BED.

Quadro 4. Linhagens de *Aspergillus flavus* e seus respectivos locais de origem.

Cepas <i>A. flavus</i>	Origem das linhagens
<i>A. flavus</i> ATCC – 9643	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>A. flavus</i> LM – 02	Ouvidos
<i>A. flavus</i> LM – 18	Ouvidos
<i>A. flavus</i> LM – 19	Pulmão
<i>A. flavus</i> LM – 26	Pele-pés
<i>A. flavus</i> LM – 55	Ouvidos
<i>A. flavus</i> LM – 171	Pulmão
<i>A. flavus</i> LM – 206	Pele-mão direita
<i>A. flavus</i> LM – 225	Pulmão
<i>A. flavus</i> LM – 248	Unha-mão
<i>A. flavus</i> LM – 256	Ouvidos

<i>A. flavus</i> LM – 295	Ouvidos
---------------------------	---------

3.3. Meios de cultura

Os meios de cultura que foram utilizados para a manutenção das amostras de *Aspergillus* e realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica são Ágar Sabouraud dextrose- ASD e o meio de cultivo líquido RPMI 1640 sem bicarbonato, adicionado com glutamina (HIMEDIA®), preparados de acordo com informações do fabricante.

3.4. Carvacrol e antifúngicos padrão

Carvacrol e os antifúngicos padrão anfotericina B, fluconazol e voriconazol (Sigma Aldrich®) foram submetidas aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antifúngica sobre linhagens de *A. flavus*. Os produtos foram pesados na concentração inicial de 1.024 µg/mL e devidamente solubilizados em 150 µL (3%) de dimetil-sulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80, completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL. A partir da concentração inicial do carvacrol e dos antifúngicos padrão, de 1.024 µg/mL, foi feita uma diluição em série até 4 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK e GREGER, 2000; PEREIRA et al., 2014).

3.5. Inóculo fúngico

Para a preparação do inóculo, foi realizado repique das cepas em ASD e incubação a 28-30° C por 7-14 dias, para atingirem um bom crescimento. As suspensões dos repiques foram preparadas cobrindo-as com 5 mL de solução salina estéril NaCl 0,85% m/v (Labsynth®). As misturas resultantes de conídios e fragmentos de hifas foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho vórtex. Após agitação, cada suspensão apresentou turbidez que foi comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. A quantificação dos inóculos foi confirmada por meio da contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões 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; CLSI, 2008).

3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleenland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI 1640 duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL das moléculas solubilizadas foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa, e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1.024 até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismo (RPMI + fungos filamentosos), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI), para comprovação da esterilidade e controles com anfotericina B, fluconazol e voriconazol para inibição dos fungos. As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 +/- 2° C por 72 horas.

O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% dos micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade biológica (CLEELAND E SQUIRES, 1991; HAFIDH et al., 2011). A Concentração Inibitória Mínima / CIM, foi considerada e interpretada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 µg/mL = forte atividade; 600 – 1500 µg/mL = moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

Foi realizado o ensaio para determinação da CFM. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico foram adicionadas a 100 µL de caldo RPMI contidos em novas placas de microdiluição/96poços e incubadas por 24-48 horas a 35 +/- 2°C/leveduras e TA (28-30° C) / 5-7 dias para fungos filamentosos. A CFM foi

considerada como sendo a menor concentração do produto teste que inibiu o crescimento dos micro-organismos. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética das CFM obtidas nos três ensaios (BALOUIRI, SADIKI, IBNSOUDA, 2016; NCUBE, AFOLAYAN, OKOH, 2008; SALIE, ESGLES, LENG, 1996) Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade (caldo RPMI 1640) e de viabilidade das espécies fúngicas (RPMI 1640 mais inóculo de cada micro-organismo).

Também foi avaliado o modo de ação das substâncias teste através da razão CFM/CIM, metodologia esta utilizada por Hafidh e colaboradores (2011) para especificar a natureza do efeito antimicrobiano, considerada como fungicida quando a razão CFM/CIM está entre 1:1 a 2:1, por outro lado, se a proporção for maior que 2:1, o modo de ação tem maior probabilidade de ser fungistático.

3.7. Estudos de associação – Técnica de *Checkerboard*

O efeito da associação das drogas-teste foi determinado pela técnica de *checkerboard*, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades com fundo chato. Diluições das soluções dos produtos naturais (1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) foram realizadas em RPMI 1640. Após isto, uma alíquota de 50 µL de cada um dos diferentes produtos naturais foi adicionada nos poços da placa tanto no sentido vertical como no sentido horizontal. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo diluído em RPMI 1640 (1:50). Desta maneira, foram obtidas misturas de diversas concentrações de ambas as drogas. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 72 horas para a realização da leitura das CIMs. Na perspectiva de avaliar a atividade das associações de drogas, o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado através da soma: CIFA + CIFB, onde A representa o primeiro produto natural e B o segundo produto natural. O CIFA = CIMA combinado/CIMA sozinho, enquanto o CIFB = CIMB combinado/CIMB sozinho. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo (< 0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferença (> 1,0 e < 4,0) ou antagonismo (> 4,0) (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

3.8. Estudos de possíveis mecanismos de ação antifúngico

3.8.1. Ação dos produtos na parede celular fúngica: Ensaio com sorbitol

A determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, foi realizada pelo microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 μ L do meio líquido CSD previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Posteriormente, 100 μ L da solução dos produtos, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 μ g/mL até 5 μ g/mL dos produtos e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8 M em cada cavidade. Por fim, foram adicionados 10 μ L do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 μ L do meio CSD e sorbitol (0,8 M), 100 μ L de água destilada estéril e 10 μ L do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 μ L do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico padrão (anfotericina B). As placas foram seladas e incubadas a 35° C por até 48 horas para ser realizada a leitura (FROST et al., 1995; ZACCHINO, 2001).

3.8.2. Ação dos produtos sobre a membrana celular: Ensaio com ergosterol

A determinação da CIM dos produtos contra cepas fungicas foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR®) e em duplicata semelhante ao protocolo exposto na determinação da CIM. O meio de cultura (CSD) foi utilizado na ausência e na presença de 400 μ g/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®). Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 μ L do mesmo CSD e ergosterol nas mesmas concentrações e 10 μ L do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 μ L do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. Por último,

foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B visto que possui mecanismo de ação conhecido, no qual ocorre interação com ergosterol da membrana e outro (fluconazol) que atua por mecanismo de ação diferente, para servir de controles positivos dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 8 dias para ser realizada a leitura (ESCALANTE et al., 2008).

3.9. Ensaios *In silico*

3.9.1. Avaliação da biodisponibilidade oral *In silico*

Para a análise da biodisponibilidade oral teórica do produto foi utilizada a “Regra dos Cinco” de Lipinski (2001), que estabelece que ao menos quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos sejam absorvidos, devem possuir miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a 500 g/mol; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula.

Para que pudesse ser realizada esta análise, se fez necessários uso de ferramentas como o programa *Molinspirations*, um *software online* gratuito disponível no endereço: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> e acessado em outubro de 2021.

3.9.2. Análise toxicológica oral *in silico*

Para a análise da toxicidade oral, foi utilizado o *software* gratuito admetSAR, que verifica, a partir de predições, o potencial Toxicidade AMES, Agentes Cancerígenos, Toxicidade Oral Aguda e Carcinogenicidade, dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade). O *software* era disponível no endereço eletrônico <https://immd.edu.cn:8000/>, acessado em outubro de 2021.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da CIM e CFM

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) representa um parâmetro essencial na análise de susceptibilidade de um micro-organismo a determinadas substâncias, onde o método de diluição em caldo torna-se um dos mais adequados para determinar tal concentração, de forma quantitativa e qualitativa, validada pela ausência de crescimento fúngico no controle de esterilidade e presença de crescimento no controle de crescimento (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os ensaios para avaliar o potencial antifúngico do fitoconstituente carvacrol sobre linhagens de *A. flavus* estão expressos na Tabela 1, juntamente com os resultados frente a atividade dos antifúngicos licenciados anfotericina B, fluconazol e voriconazol, utilizados como padrão.

Tabela 1. Resultados da avaliação de CIM (n=3) de carvacrol, anfotericina B, fluconazol e voriconazol frente a cepas de *Aspergillus flavus* – Técnica de microdiluição

Micro-organismo	Moléculas (µg/mL)				Controles	
	<u>Carvacrol</u>	<u>Anfotericina B</u>	<u>Fluconazol</u>	<u>Voriconazol</u>	<u>A. flavus</u>	<u>RPMI</u>
ATCC – 9643	32	4	64	1	+	-
LM – 02	16	8	256	1	+	-
LM – 18	32	32	256	2	+	-
LM – 19	16	32	256	2	+	-
LM – 26	16	32	256	2	+	-
LM – 55	16	32	256	1	+	-
LM – 171	16	64	1024	2	+	-
LM – 206	16	32	512	1	+	-
LM – 225	32	32	512	1	+	-
LM – 248	16	64	512	1	+	-
LM – 256	32	64	512	2	+	-
LM – 298	32	64	512	2	+	-

(+): Crescimento do micro-organismo; (-): Não houve crescimento do micro-organismo

O carvacrol na concentração de 16 µg/mL apresentou atividade biológica sobre o crescimento de *A. flavus*, inibindo o crescimento de 7 (58,3%) das 12 linhagens testadas. Já na concentração de 32 µg/mL, produziu inibição sobre o crescimento das 12 (100%) linhagens de *A. flavus*. Estes resultados podem ser comparados com os achados de Abbaszadeh et al. (2014), que observaram a atividade do carvacrol frente a algumas espécies fúngicas, e dentre estas, a melhor atividade encontrada para a molécula em questão está relacionada a inibição do crescimento de *Aspergillus*, com CIM variando de 50 a 100 µg/mL. Por outro lado, para demais espécies fúngicas testadas, a CIM do carvacrol variou de 100 a 350 µg/mL. Schlemmer et al. (2019), testaram carvacrol contra 30 cepas de *Malassezia pachydermatis*, observando uma média de CIM de 64 µg/mL.

Quanto aos resultados relacionados a anfotericina B, observou-se que a molécula na concentração de 32 µg/mL produziu inibição do crescimento fúngico sobre oito (67%) das 12 linhagens de *A. flavus*, referindo-se então a uma

molécula promissora no controle do crescimento de *A. flavus*, como antifúngico padrão.

Estes achados corroboram com estudos que apontam para o amplo espectro da anfotericina B, sendo um dos antifúngicos considerados padrão ouro no tratamento de infecções invasivas com risco de vida, devido a sua alta permeabilidade na membrana e grande afeição pelo ergosterol (FAUSTINO e PINHEIRO, 2020).

Nos ensaios da avaliação antifúngica com fluconazol, conforme os dados registrados na Tabela 1, foi observado que a CIM ficou definida na concentração de 512 µg/mL. Nesta concentração, o antifúngico inibiu o crescimento de 11 (92%) das linhagens. Contudo não havendo atividade antifúngica satisfatória levando em consideração o alto valor da CIM em comparação com os demais antifúngicos testados.

Os resultados para o fluconazol corroboram com estudos anteriores, com relação a resistência de fungos do gênero *Fusarium* frente a esta substância. A CIM da molécula foi superior a 1.024 µg/mL (VIVIANA, 2013). Sarrafha et al. (2018) relatam em seus estudos que geralmente os fungos filamentosos não são tão susceptíveis ao fluconazol, visto que o composto é um antifúngico fraco devido as suas ligações diretas com os ligantes dos componentes do CYP51.

Dentre os controles com antifúngicos usados nos ensaios de atividade antifúngica, o voriconazol foi a molécula que apresentou melhor atividade sobre as linhagens de *A. flavus* com relação a CIM, pois na concentração de 1 µg/mL e 2 µg/mL, inibiu, respectivamente, 50 % e 100% das linhagens da espécie fúngica.

Xu et al. (2016) relataram sobre a importância do voriconazol na terapêutica de doenças causadas por fungos oportunistas, ressaltando que seu amplo espectro de atividade tem encorajado sua recomendação nas diretrizes internacionais como terapia primária para aspergilose invasiva aguda. Em experimentos, os autores observaram que apenas 1,78% dos pacientes tratados profilaticamente com voriconazol apresentaram infecções invasivas, quando comparado com pacientes tratados com fluconazol ou itraconazol, que chegaram a 3,45%, concluindo que pacientes tratados com voriconazol apresentam

menores riscos de adquirirem infecções fúngicas invasivas. Em complemento, Veloso et al. (2018) verificou resultado semelhante com a droga contra *A. flavus*, variando de 0,5 a 1 µg/mL.

A CFM apresenta-se como um ensaio complementar ao da CIM, visto que um agente antifúngico pode apresentar atividade fungicida ou fungistática. Uma forma de se conseguir analisar se a substância apresenta seu efeito fungicida ou fungistático é através do cálculo da razão entre valores de CIM e CFM, onde valores de razão 1 e 2 representam atividade fungicida e valores de razão superiores a 2 representam atividade fungistática (SIDDIQUI et al., 2013).

Por sua vez, a CFM do carvacrol ficou estabelecida em 32 µg/mL, inibindo crescimento de 92% (11 das 12 linhagens) da espécie fúngica (Tabela 2). Para anfotericina B, sua CFM ficou definida na concentração de 64 µg/mL, seguida do voriconazol que ocorreu num percentual de 100% na concentração de 4 µg/mL. Para o fluconazol, não foram realizados os testes de CFM uma vez que a sua CIM apresentou valores relativamente altos, não sendo interessante realizá-los.

Tabela 2. Resultados da avaliação de CFM (n=3) do carvacrol frente a diferentes linhagens do gênero *Aspergillus flavus*.

Micro- organismo	Carvacrol (ug/mL)		
<u>A. flavus</u>	CFM	CFM/CIM	Atividade
ATCC – 9643	32	1	Fungicida
LM – 02	32	2	Fungicida
LM – 18	32	1	Fungicida
LM – 19	16	1	Fungicida
LM – 26	32	2	Fungicida
LM – 55	32	2	Fungicida
LM – 171	32	2	Fungicida
LM – 206	32	2	Fungicida
LM – 225	32	1	Fungicida
LM – 248	32	2	Fungicida
LM – 256	32	1	Fungicida
LM – 298	32	1	Fungicida

Diante dos resultados obtidos, foi visto que o carvacrol apresentou uma atividade fungicida para todas as cepas testadas, pois a razão CFM/CIM ficou entre 1 e 2. Estes achados corroboram com os de Anvar et al. (2020), ao relatarem os resultados de CIM e CFM demonstraram que o carvacrol apresenta ambas as atividades preventivas para inibir o crescimento de *A. flavus*.

As células fúngicas apenas impedidas de se desenvolverem tornam-se propícias para o desenvolvimento de mecanismos de resistência, tornando seu desenvolvimento cada vez mais favorável. No efeito fungicida da substância, as células fúngicas são mortas e não demonstram tal risco para surgimento de mecanismos de resistência, sendo neste caso, as moléculas mais desejadas para o tratamento de pessoas imunossuprimidas (PAI, GANAVALLI, KIKKERI, 2018).

4.2. Ensaios de associação

A eficácia limitada da monoterapia torna a combinação de drogas um alvo para desenvolvimento de novas alternativas, no intuito de obter estratégias promissoras que viabilizem o combate a micro-organismos resistentes, aumentando a eficácia dos medicamentos atualmente utilizados. A associação de uma determinada molécula com fármacos já utilizados na terapêutica pode apresentar-se bastante interessante no ponto de vista de efetividade.

Além do aumento potencial do efeito de ambas as substâncias associadas, a terapia combinada pode retardar a evolução do surgimento de mecanismos de resistência e também minimizar os efeitos colaterais, visto que há a diminuição nas concentrações de cada fármaco isolado, resultando em maior interesse por estudos que abrangem tal tipo de combinação terapêutica (HILL, COWEN, 2015; BAYM, STONE, KISHONY, 2016).

Na Tabela 3 estão representados os valores da associação entre o carvacrol e a anfotericina B frente as cepas de *A. flavus*. Pode-se observar valores com uma redução nos valores de CIM de ambas as substâncias quando associadas comparando-as isoladamente. O carvacrol, com CIM de 16 µg/mL

para a cepa LM 02 e 32 µg/mL para a cepa ATCC 9643, apresentou redução nos valores de CIM pela metade CIM/2) em ambas as cepas testadas quando associado a anfotericina B, que também demonstrou uma queda de nos valores de sua CIM de 8 µg/mL para 1 µg/mL (CIM/8) quando se trata da cepa clínica e queda de 4 µg/mL para 1 µg/mL (CIM/4) para a cepa ATCC.

O cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) torna-se necessário para avaliação do grau de eficiência da associação de duas substâncias, neste sentido, como podemos observar na tabela 3, a CIF do carvacrol totalizou 0,5 para ambas as cepas testadas, já para a anfotericina B, a CIF totalizou em 0,25 para a cepa ATCC 9643 e 0,125 para a cepa LM 02. O resultado dos valores de ICIF representaram para ambas as cepas um efeito de aditividade, quando $p > 0,5$.

A aditividade representa a capacidade de duas ou mais substâncias, quando combinadas, atuarem por uma mesma via biológica, porém de formas diferentes, aumentando a eficácia da atividade terapêutica. Além do mais, outra vantagem advinda do efeito aditivo é a diminuição da toxicidade devido a redução nas concentrações administradas e o aumento na capacidade efetiva da droga de gerar uma resposta promissora (SPITZER, ROBBINS, WRIGHT, 2017).

Tabela 3. Concentração inibitória fracionária e o índice da concentração inibitória fracionária de Carvacrol e Anfotericina B frente a cepas do gênero *Aspergillus flavus*.

Gênero	CIF		ICIF	Resultado
<i>A. flavus</i>	Carvacrol	Anfotericina B	Carvacrol + Anfotericina B	
ATCC – 9643	0,5	0,25	0,75	Aditividade
LM – 02	0,5	0,125	0,125	Aditividade

CIF – Concentração Inibitória Fracionária; ICIF - Índice da Concentração Inibitória Fracionária.

4.3. Mecanismo de ação do carvacrol

Toda substância que se apresenta farmacologicamente ativa apresenta sua efetividade através de um determinado mecanismo de ação. Substâncias com potencial antifúngico apresentam mecanismos de ação que podem ser classificados de várias formas, como por exemplos inibidores de enzimas importantes para a biossíntese do ergosterol assim como através da complexação com o ergosterol presente na membrana plasmática ou podem agir também por meio da inibição de enzimas necessárias para manutenção da parede fúngica (NETT, ANDES, 2016; CAMPOY, SDRIO, 2017; REZENDE et al., 2017).

Os valores apresentados na Tabela 4 demonstram que as propriedades antifúngicas do carvacrol não estão relacionadas com as vias de biossíntese de parede celular fúngica, uma vez que o carvacrol, na presença de sorbitol exógeno, não apresentou aumento no valor de CIM para ambas as cepas de *A. flavus* testadas.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima de carvacrol na ausência e presença de sorbitol frente a linhagens do gênero *Aspergillus flavus*.

Gênero	Carvacrol	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
<i>A.flavus</i>		
ATCC – 9643	32	32
LM – 02	16	16

Este método é baseado nos danos que a substância teste com atividade antifúngica irá causar aos componentes da parede celular fúngica. Caso o produto viesse a atuar de alguma forma sobre a mesma, provocaria a lise das células fúngicas quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitiria seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos (MIRON et al., 2014).

Na Tabela 5 então notificados os resultados do mecanismo de ação de carvacrol e anfotericina B na presença e na ausência de ergosterol. Para *A. flavus*, o carvacrol atua na permeabilidade iônica da membrana celular, visto que quando há relação da substância testada com tal mecanismo, rapidamente se forma um complexo entre a substância e o ergosterol exógeno, necessitando então de maiores concentrações de ergosterol para que provoque efeito sobre a membrana celular. O controle anfotericina B confirma o mecanismo de ação conhecido.

O ergosterol é o esterol mais abundante nas membranas celulares dos fungos, que apresenta dentre suas principais funções o mantimento da estrutura celular (RODRIGUES, 2018). Visto que a atuação dos fármacos via ergosterol se dá através da complexação com o mesmo ou por meio da interferência da sua biossíntese, podemos notar que o carvacrol apresenta seu mecanismo por uma dessas vias (OLIVEIRA et al., 2019).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima de carvacrol e anfotericina B, na ausência e presença de ergosterol frente a linhagens do gênero *Aspergillus flavus*.

Gênero <i>Aspergillus</i>	Carvacrol			Anfotericina B		
	Sem ergosterol	Com ergosterol	Razão*	Sem ergosterol	Com ergosterol	Razão*
<i>A. flavus</i>						
ATCC – 9643	32	256	8	4	32	8
LM – 02	16	512	32	8	32	4

* Razão entre a presença e ausência de ergosterol.

4.4. Ensaios *In silico*

Para os resultados da biodisponibilidade oral do carvacrol, através do Molinspiration, uma base que fornece um conjunto de contribuições baseadas na estrutura molecular do carvacrol, é possível observar uma ampla capacidade

do mesmo no processamento de moléculas orgânicas deste tipo. Sendo assim, esse conjunto de contribuições deve respeitar a “regra dos cinco” proposta por Lipinsk, onde se diz que dos cinco pontos importantes para que haja biodisponibilidade do fármaco pelo organismo, é necessário que pelo menos quatro deles se cumpram diante a regra frente a molécula analisada. Os resultados de predição para o composto carvacrol são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Biodisponibilidade oral *in silico* do carvacrol

Composto	Propriedades Moleculares								
	miLogP	TPSA	natoms	MW	nON	nOMNH	nV	nrotb	vol
Carvacrol	3,81	2,23	11	150,22	1	1	0	1	158,57

miLogP: lipofilicidade; TPSA: área de superfície polar total; natoms: número de átomo com excessão do hidrogênio; MW: peso molecular; nON: número de aceptadores de hidrogênio; nOMNH: número de doadores de hidrogênio; nV: número de violações; nrotb: número de rotações; vol: volume da molécula.

Dentre os cinco pontos que se referem a regra dos cinco de Lipink, para o carvacrol, todos estão dentro da faixa de aptidão para uma boa biodisponibilidade oral que a regra avalia. Além disso, o carvacrol apresenta, de forma satisfatória, boa disponibilidade oral teórica, principalmente nos critérios metodológicos, os valores de miLogP, TPSA, MW, nON e nOMNH estão dentro dos padrões.

Quanto a análise toxicológica do carvacrol (Tabela 7), pode-se observar a ausência de toxicidade referente a análise ADMET (Toxicidade AMES), sendo obtido um valor de 0,92 (92%). Em complemento, para os Agentes Carcinogênicos (*Carcinogens*), também não foram detectados quaisquer efeitos deste tipo para a molécula em questão, com valores de 0,71 (71%).

Tabela 7. Toxicidade oral *In silico* do carvacrol

Carvacrol	Toxicidade	Valor (%)
ADMET (Toxicidade AMES)	Não tóxico	0,92 (92%)
Agentes cancerígenos	Não cancerígeno	0,71 (71%)
Toxicidade Oral Aguda	Categoria III	0,83 (83%)
Carcinogenicidade (Three-Class)	Não carcinogênico	0,71 (71%)

ADMET: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção, Toxicidade.

Para Toxicidade Oral Aguda, a análise classificou o composto em questão como categoria III, 0,83 (83%), representada em composto com DL₅₀ superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg. Isto significa que para tal substâncias, doses elevadas se fazem necessárias para exibirem efeitos tóxicos ao organismo.

A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que divide os compostos de acordo com seu valor de DL₅₀ (conhecida como dose letal mediana). Na categoria I estão representados os compostos cujo valores de DL₅₀ são superiores a 50 mg/kg, na categoria II estão representados os compostos com valores de DL₅₀ superiores a 500 mg/kg, na categoria III consiste em compostos com valores de DL₅₀ superiores a 500mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg e a categoria IV inclui compostos com valores de DL₅₀ superiores a 5000 mg/kg (PALMEIRA et al., 2019).

Ao observar a carcinogenicidade (*Carcinogenicity – Three Class*), obtiveram-se resultados de “Não carcinogênico” com valores referentes a possíveis possibilidades de haver perigo ao organismo de 0,71 (71%). Visto a probabilidade carcinogênica relativamente alta aliada ao resultado negativo do carvacrol, pode-se observar neste caso a relação dose-efeito, isto é, doses que sejam inferiores a 10 mg/kg podem apresentar-se apenas como “alerta” de produto não carcinogênico e doses superiores a 50 mg/kg podem ser representadas como perigosas.

O número de pesquisas com produtos naturais tem sido crescente nos últimos anos, motivados na busca por novas alternativas terapêuticas com maior eficácia, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade. Diante disto, o uso de

modelos *in silico* ganha destaque, visto que demonstram, teoricamente, com maior rapidez, modelos farmacológicos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, diante da grande demanda gerada na triagem em larga escala de novas moléculas (PALMEIRA et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana para o carvacrol, podemos concluir que o mesmo se mostrou eficaz no controle de *A. flavus*, visto que concentrações relativamente pequenas, de 16 µg/mL, foram eficientes para impedir o desenvolvimento da célula fúngica, assim como na concentração de 32 µg/mL, onde já podemos observar sua ação fungicida.

O estudo demonstrou ainda que a aplicação de tecnologias que venham a reduzir os valores de CIM tornam-se benéficas ao tratarmos de terapias antifúngicas, principalmente em relação a redução de altas doses necessárias para surtir efeitos antifúngico desejado. Sendo assim, a associação de carvacrol com anfotericina B apresentou efeito de aditividade tanto para a linhagem clínica quanto para a linhagem ATCC, onde podemos observar uma redução nos valores de CIM em duas vezes (CIM/2) para o carvacrol e em oito vezes (CIM/8) para a anfotericina B quando tratamos das concentrações capazes de impedir o desenvolvimento fúngico.

Os estudos do mecanismo de ação do produto natural apontando para ação na membrana celular fúngica juntamente aos resultados obtidos nos ensaios *In sílico*, onde estes demonstraram que o carvacrol apresenta bom perfil de biodisponibilidade e atoxicidade, demonstram o potencial que o carvacrol apresenta a ser submetido a novos estudos com estratégias, abordagens e tecnologias inovadoras que venham a elucidar e detalhar novas vias metabólicas, tornando-o um candidato frente as novas alternativas na farmacoterapia antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R., & ABBASZADEH, A. Eficácia antifúngica do timol, carvacrol, eugenol e mentol como agentes alternativos para controlar o crescimento de fungos relevantes para alimentos. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.
- ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula augustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Ag. and Food Chemistry*, v. 46, n. 5, p. 1739- 1745, 1998.
- 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.
- AGARWAL, R., DHOORIA, S., SEHGAL, I. S, AGGARWAL, A. N, GARG, M., SAIKIA, B., CHAKRABARTI, A. Um ensaio randomizado de itraconazol vs prednisolona na aspergilose broncopulmonar alérgica em estágio agudo que complica asma. **Baú**, v. 153, n. 3, p. 656-664, 2018.
- ALI, J.; CAMILLERI, P.; BROWN, M. B.; HUTT, A. J.; KIRTON, S. B.; Predição in silico da solubilidade aquosa usando modelos simples de QSPR: a importância do fenol e das porções fenol-like. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 2950-2957, 2012.
- ANDERSON, T. M., CLAY, M. C., CIOFFI, A. G., DIAZ, K. A., HISAO, G. S., TUTTLE, M. D., & BURKE, M. D. Anfotericina forma uma esponja de esterol extramembranosa e fungicida. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400-406, 2014.
- ANVAR, S. A. A., AHARI, H., MOJARRAD, N. Efeito antimicrobiano do carvacrol sobre *Aspergillus flavus* e redução da expressão do gene aflR na via biossintética da aflatoxina. **Alimentação & Saúde**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2020
- ARUANNO, M., GLAMPEDAKIS, E., LAMOTH, F. Equinocandinas para o tratamento da aspergilose invasiva: do laboratório à beira do leito. **Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia**, v. 63, n. 8, p. 19-399, 2019.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., & IBNSOUDA, S. K. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana: Uma revisão. **Jornal de Análise Farmacêutica**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, 2016.
- BENNETT, S. E. B., JOAN W. Uma visão geral do gênero *Aspergillus*. O *Aspergilli*, p. 23-34, 2007.

BERTUZZI, M., HAYES, G. E., ICHEOKU, U. J., VAN RHIJN, N., DENNING, D. W., OSHEROV, N., BIGNELL, E. M. Atividades anti-Aspergillus do epitélio respiratório na saúde e na doença. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 8, 2018.

BILLERBECK, V. G.; DE ROQUES, C. G.; BESSIERE, J- M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effect of Cymbopogon nardus (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of Aspergillus niger. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 9- 17, 2001.

BONA, E. A. M. D., PINTO, F. G. D. S., FRUET, T. K., JORGE, T. C. M., & MOURA, A. C. D. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. 2014.

BROWN, G. D; DENNING, D. W; GOW, N. A; LEVITZ, S. M; NETEA, M. G; WHITE, T. C; HIDDEN K. Assassinos ocultos: infecções fúngicas humanas. **Medicina Translacional da Ciência**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CARVALHO, L. I. C. Aspergillus e aspergilose – desafios no combate da doença. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de Candida. **Revista Odontológica do Brasil Central**. 20(52), 2011.

CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Aspergillus, Candida and other opportunistic mold infections of the lung. **Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders**, 4th ed. New York: McGraw Hill, p. 2291-2325, 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: LORRIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 739-788 p. 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against Candida krusei and Aspergillus fumigatus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010

COWEN, L. E., SANGLARD, D., HOWARD, S. J., ROGERS, P. D., & PERLIN, D. S. Mecanismos de resistência aos antifúngicos. **Perspectivas de Cold Spring Harbor na Medicina**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSOU, M. G. The effectiveness of plants essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. v. 22, n. 1, p. 39- 44, 2003.

DARR-FOIT S, SCHLIEMANN S, SCHOLL S, HIPLER UC, ELSNER P. Aspergilose cutânea primária - uma revisão de infecção oportunista incomum da literatura e apresentação de caso. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft** , v. 15, n. 8, p. 839-841, 2017.

DEMUYSER, T., DE COCK, E., SERMIJN, E. Contaminação aerotransportada por *Aspergillus fumigatus* em unidade de terapia intensiva: detecção, gestão e controle. **Jornal de Infecção e Saúde Pública**, v. 12, n. 6, p. 904-906, 2019.

DENNING, D. W., CADRANEL, J., BEIGELMAN-AUBRY, C., ADER, F., CHAKRABARTI, A., BLOT, S. & LANGE, C. Aspergilose pulmonar crônica: justificativa e diretrizes clínicas para diagnóstico e tratamento. **European Respiratory Journal** , v. 47, n. 1, p. 45-68, 2016.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J.; Prediction of Drug absorption using multivariate Statistics. **Journal of medicinal chemistry**. 43, 3867-3877, 2000.

EL-BABA, F., GAO, Y., SOUBANI, A. O. Pulmonary Aspergillosis: What the Generalist Needs to Know. **The American Journal of medicine**, 2020.

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, 1998

ENGELKIRK, P. G., DUBEN-ENGELKIRK, J. Burton, microbiologia para ciências da saúde. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 388, 2012.

ERNST, E. J., KLEPSE, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. In vitro pharmacodynamic properties of MK- 0991 determined by time- kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PEREZ, 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, n.10, p.1720-1725, 2008.

FAUSTINO, C.; PINHEIRO, L. Sistemas lipídicos para a administração de anfotericina B na terapia antifúngica. **Pharmaceutics** , v. 12, n. 1, p. 29, 2020.

FISHER, M. C., HAWKINS, N. J., SANGLARD, D., GURR, S. J. A emergência mundial de resistência a medicamentos antifúngicos desafia a saúde humana e a segurança alimentar. **Ciência**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018

FRIEDMAN M. Química e bioatividades multibenéficas de carvacrol (4-isopropil-2-metilfenol), um componente de óleos essenciais produzidos por plantas aromáticas e especiarias. **Revista de Química Agrícola e Alimentar**. 2014; 62: 7652–7670

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. J. 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.

GAGO, S., DENNING, D. W., BOWYER, P. Aspectos fisiopatológicos da colonização por *Aspergillus* na doença. **Micologia Médica**, v. 57, n. Suplemento_2, p. S219-S227, 2019.

GARCIA-VIDAL, C., PEGHIN, M., CERVERA, C., GUDIOL, C., RUIZ-CAMPS, I., MORENO, A., CARRATALÀ, J. Causes of death in a contemporary cohort of patients with invasive aspergillosis. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120370, 2015.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J.; A Knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**. v. 1, 55-68, 1999.

GRIPPI, M. A., ELIAS, J. A., FISHMAN, J., A., KOTLOFF, R., M., PACOTE, A., I., SENIOR R., M., Doenças e distúrbios pulmonares de Fishman (5ª ed.) , **McGraw-Hill Education** , **New York**. p. 2039 – 2068, 2015.

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

HASANAH, U. Aspergilose Mergel, infeksi jamur género aspergillus. **Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera** , v. 15, n. 2, p. 76-86, 2017.

HAYDOUR, Q., HAGE, C. A., CARMONA, E. M., EPELBAUM, O., EVANS, S. E., GABE, L. M., MURAD, M. H. Diagnóstico de infecções fúngicas. Uma revisão sistemática e meta-análise que apoia o American Thoracic Society Practice Guideline. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 16, n. 9, p. 1179-1188, 2019.

HILL, J. A.; COWEN, L. E. using combination therapy to thwart drug resistance. **Future Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 1719-1726, 2015.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, p. 391- 400, 2007.

HUSAIN, S., CAMARGO, J. F. Invasive Aspergillosis in solid-organ transplant recipients: guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical Transplantation**, v. 33, n. 9, p. e13544, 2019.

HYDE, K. D; AL-HATMI, A. M. S; ANDERSEN, B.; BOEKHOUT, T .; BUZINA, W .; DAWSON, T. L .; EASTWOOD, D. C; JONES, E. B. G; DE HOOG, S .; KANG, Y .Os dez fungos mais temidos do mundo. **Fungal Divers**. v. 93, n. 1, p. 161-194, 2018.

JENKS, J. D., HOENIGL, M. Tratamento da aspergilose. **Journal of Fungi** , v. 4, n. 3, p. 98, 2018.

JENKS, J. D., SALZER, HJ, PRATTES, J., KRAUSE, R., BUCHHEIDT, D., & HOENIGL, M. Destaque do isavuconazol no tratamento da aspergilose invasiva e mucormicose: desenho, desenvolvimento e aplicação na terapia. **Desenho, Desenvolvimento e Terapia de Drogas** , v. 12, p. 1033, 2018.

KANJ A. N., ABDALLAH, A., SOUBANI, O. O espectro da aspergilose pulmonar. **Medicina respiratória**. 141, p. 121 – 131, 2018.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 42, n. 6, p. 1387-1391, 1998.

LARONE, D. H. Medically Important Fungi: A guide to identification. **Washington: ASM Press**, 2002.

LESTRADE, P. P. A., MEIS, J. F., MELCHERS, W. J. G. E VERWEIJ, P. E Resistência a triazóis em *Aspergillus fumigatus*: descobertas recentes e desafios para o tratamento de pacientes. **Microbiologia Clínica e Infecção** , v. 25, n. 7, p. 799-806, 2019.

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, J. X., FAN, L. C., LI, M. H., CAO, W. J., XU, J. F. Beneficial effects of omalizumab therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis: a synthesis review of published literature. **Respiratory Medicine**, v. 122, p. 33-42, 2017.

LI, Z., TANG, X., SHEN, Z., YANG, K., ZHAO, L., & LI, Y. Comparação abrangente de vários modelos quantitativos de espectroscopia no infravermelho próximo para detecção de contaminação por *Aspergillus flavus* em amendoim. **Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura**, v. 99, n. 13, p. 5671-5679, 2019.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 23, 3-25, 1997.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Média**. São Paulo: Manole, 2005.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRÍA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Atividade antifúngica e mecanismo de ação dos monoterpenos contra dermatófitos e leveduras. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, n.6, 2014.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMA, E. S.; SOUZA, E. S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 28- 33, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 770-773.

NETT, J. E., & ANDES, D. R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

NÓBREGA, R. D. O., TEIXEIRA, A. P. D. C., OLIVEIRA, W. A. D, LIMA, E. D. O., & LIMA, I. Investigação da atividade antifúngica do carvacrol contra cepas de *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2591-2596, 2016

ODEBODE, A., NIMAWANYA, G. Caracterização de fungos transportados pelo ar presentes em dois hospitais no distrito de Kabale - Uganda. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 392-393, 2020.

OLIVEIRA, A. J. M. S.; CASTRO, R. D.; PESSÔA, H. L. F.; WADOOD, A.; SOUSA, D. P. Amides derived from vanillic acid: coupling reactions, antimicrobial evaluation, and molecular docking. **BioMed Research International**, v.2019, 2019.

PAI, V.; GANAVALLI, A.; KIKKERI, N.N. Antifungal resistance in dermatology. **Jornal Indiano de Dermatologia**, v. 63, n. 5, p. 361, 2018

PALMEIRA, J. T., DE ARAÚJO CRUZ, J. H., DE OLIVEIRA, H. M. B. F., GUÊNES, G. M. T., MEDEIROS, C. I. S., & DE OLIVEIRA FILHO, A. A. Análise farmacológica e toxicológica in silico do ácido undecilênico aplicada a odontologia. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 4, n. 3, 2019.

PATTERSON, T. F., THOMPSON III, G. R., DENNING, D. W., FISHMAN, J. A., HADLEY, S., HERBRECHT, R., BENNETT, J. E. Diretrizes práticas para o diagnóstico e tratamento da aspergilose: atualização de 2016 pela Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.

PAULUSSEN, C., HALLSWORTH, J. E, ÁLVAREZ - PÉREZ, S., NIERMAN, W. C., HAMILL, P. G., BLAIN, D., & LIEVENS, B. Ecologia da aspergilose: insights sobre a potência patogênica de *Aspergillus fumigatus* e algumas outras espécies de *Aspergillus*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Thichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 233- 242, 2011.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., TURNIDGE, J. D., CASTANHEIRA, M., & JONES, R. N. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, p. S79-S94, 2019.

POSTER, V. R.; KLAFKE, G. B.; CABANA, A. L.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P.; XAVIER, M. O. Isolamento e identificação de fungos do gênero *aspergillus* spp. de água utilizada na reabilitação de pinguins-demagalhões. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 567-573, 2015.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegles marmelos*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 29-34, 1997.

REVIE, N. M., IYER, K. R., ROBBINS, N., & COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

REZENDE, C., SEGURA, R., RIVA, S. B. M., & CASTRO, V. D. C. O. Mecanismos de ação dos antifúngicos. **Revista UNIFEV: Ciências e Tecnologia**, v.2, n.2, p. 222-236, 2017.

RODRIGUES, M. L. The multifunctional fungal ergosterol. **American Society of Microbiology**, v. 9, n.5, 2018.

RUDRAMURTHY, S. M, PAUL, R. A, CHAKRABARTI, A., MOUTON, J. W E MEIS, J. F. Aspergilose invasiva por *Aspergillus flavus*: epidemiologia, diagnóstico, resistência antifúngica e gestão. **Journal of Fungi** , v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

RUSSO, A., TISEO, G., FALCONE, M., & MENICHETTI, F. Aspergilose pulmonar: um desafio em evolução para diagnóstico e tratamento. **Infectious Diseases and Therapy** , p. 1-14, 2020.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SKMEN, A.; POLISSOU, M.; SOKMEN, M.; SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275- 280, 2004.

SALIE, F. EAGLES, P. F. K. LENG, H. M. J. Preliminary anti icrobial screening of four South African *Asteraceae* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.52, n. 1, p. 27 – 33, 1996.

SARRAFHA, M. R., HASHEMI, S. J., REZAEI, S., & BAYAT, M. Avaliação in vitro dos efeitos do fluconazol e do nano-fluconazol em isolados de *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*. **Jundishapur Journal of Microbiology** , v. 11, n. 6, 2018.

SCHLEMMER, K. B., JESUS, F. P. K., TONDOLO, J. S. M., WEIBLEN, C., AZEVEDO, M. I., MACHADO, V. S., ... & SANTURIO, J. M. In vitro activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 4, p. 375-377, 2019.

SCHWEER, K. E., BANGARD, C., HEKMAT, K., & CORNELLY, A. O. Aspergilose pulmonar crônica. **Mycoses** , v. 57, n. 5, p. 257-270, 2014.

SCHWEER, K. E., JAKOB, B., LISS, B., CHRIST, H., FISCHER, G., VEHRESCHILD, M. J. G. T., VEHRESCHILD, J. J. Exposição a fungos domésticos e aspergilose invasiva - Amostragem de ar de *aspergillus* spp. Esporos em casas de pacientes hematológicos, um estudo piloto. **Sabouraudia** , v. 54, n. 6, p. 576-583, 2016.

SEHGAL, I. S., DHOORIA, S., CHOUDHARY, H., AGGARWAL, A. N., GARG, M., CHAKRABARTI, A., & AGARWAL, R. Monitoring treatment response in chronic pulmonary aspergillosis: role of clinical, spirometric and immunological markers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 9, p. 1157. e1-1157. e7, 2019.

SHAH A., PANJABI C. Aspergilose broncopulmonar alérgica: uma entidade clínica desconcertante. **Allergy Asthma Immunol Res**, 8 (4). p. 282 – 29, 2016.

SHAH, A.; PANJABI, C. Aspergilose alérgica do trato respiratório. **European Respiratory Review** , v. 23, n. 131, p. 8-29, 2014.

SHAJAHAN, A., CULP, C. H., WILLIAMSON, B. Efeitos dos parâmetros ambientais internos relacionados ao aquecimento, ventilação e sistemas de ar condicionado nos resultados médicos dos pacientes: Uma revisão da pesquisa científica em edifícios hospitalares. **Ar Interno**, v. 29, n. 2, p. 161-176, 2019.

SHARIFI - RAD, M., VARONI, E. M., IRITI, M., MARTORELL, M., SETZER, W. N., DEL MAR CONTRERAS, M., & SHARIFI - RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 2018.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghen. **Microbiology Research**. v. 163, n. 3, p. 337- 344, 2008.

SHETH, M. C., PAUL, R. R., MATHEWS, S. S., & ALBERT, R. R. Isolated *Aspergillus* Laryngitis: Spectrum, Management, and Review of Literature. **Journal of Voice**, 2020.

SIDDIQUI, Z. N., FAROOQ, F., MUSTHAFA, T. M., AHMAD, A., & KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SLAVIN, M. A., CHEN, Y. C., CORDONNIER, C., CORNELLY, O. A., CUENCA-ESTRELLA, M., DONNELLY, J. P., & MAERTENS, J. Á. Quando mudar o tratamento da aspergilose invasiva aguda: o ponto de vista de um especialista. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , 2021.

SMITH, N. L.; DENNING, D. W. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. **European Respiratory Journal**, v. 37, n. 4, p. 865-872, 2011.

SOLANO, C.; VÁZQUEZ, L. Aspergilosis invasora en el paciente con enfermedad oncohematológica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 4, p. 198-205, 2018.

SPITZER, M., ROBBINS, N., & WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

SUGUI, J. A., KWON-CHUNG, K. J., JuvvADI, P. R., LATGÉ, J. P., & STEINBACH, W. J. *Aspergillus fumigatus* e espécies relacionadas. **Cold Spring Harbor Perspectives on Medicine**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2015.

SURENDER, P.; JANALAH, C.; REDDY, V. K.; REDDY, S. M. Antifungal activity of secretions of scent glands from Heteropteram bugs. **Indian Journal of Experimental Biology**. V. 25, p. 233- 234, 1987.

TATARA A. M, MIKOS A. G, KONTOYIANNIS D. P. Factors affecting patient outcome in primary cutaneous aspergillosis. **Medicine (Baltimore)**. 2016;95(26):e3747.

TETZ, G., CYNAMON, M., HENDRICKS, G., VIKINA, D., TETZ, V. In vitro activity of a novel compound, Mul-1867, against clinically significant fungi *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 1, p. 47-54, 2017.

THYAGARAJA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Food, Science and Technology**., v. 29, n. 3, p. 286- 288, 1996.

TROIANO, G. SACCO, C., DONATO, R., PINI, G., NICCOLINI, F., & NANTE, N. Demolition activities in a healthcare facility: results from a fungal surveillance after extraordinary preventive measures. **Public health**, v. 175, p. 145-147, 2019.

ULLMANN, A. J; AGUADO, J. M; ARIKAN-AKDAGLI, S .; DENNING, D. W; GROLL, A. H; LAGROU, K .; LASS-FLÖRL, C .; LEWIS, R. E; MUNOZ, P .; VERWEIJ, P. E. Diagnóstico e gestão de doenças por *Aspergillus*: resumo executivo da diretriz ESCMID-ECMM-ERS de 2017. **Clinical Microbiology and Infection** , v. 24, p. e1-e38, 2018.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. U.; SMITH, B. R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral Bioavailability of Drug candidates. **Journal of Medical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VELOSO, D. F., BENEDETTI, N. I., ÁVILA, R. I., BASTOS, T. S., SILVA, T. C., SILVA, M. R. & LIMA, E. M. A administração intravenosa de uma formulação lipossomal de voriconazol melhora a farmacocinética do medicamento, a distribuição nos tecidos e aumenta a atividade antifúngica. **Entrega de Drogas**, v. 25, n. 1, p. 1585-1594, 2018.

VIANA, W. P. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* Linneus (Orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium*. 2013.

VIEGAS, C., ALMEIDA, B., GOMES, A. Q., CAROLINO, E., CAETANO, L. A. *Aspergillus* spp. prevalence in Primary Health Care Centres: Assessment by a

novel multi-approach sampling protocol. **Environmental Research**, v. 175, p. 133-141, 2019.

VIJ, R., HUBE, B., BRUNKE, S. Territórios desconhecidos na descoberta de produtos naturais antifúngicos e antivirulentos de bactérias. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2021.

WALL, G., & LOPEZ-RIBOT, J. L. Antimicóticos atuais, novas perspectivas e abordagens futuras à terapia antifúngica. **Antibióticos**, v. 9, n. 8, p. 445, 2020.

WHALEY, S. G., BERKOW, E. L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A. T., BARKER, K. S., & ROGERS, P. D. Resistência a antifúngicos azólicos em *Candida albicans* e espécies emergentes de *Candida* não-*albicans*. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 7, p. 2173, 2017.

WIRMANN, L., ROSS, B., REIMANN, O., STEINMANN, J., & RATH, P. M. Airborne *Aspergillus fumigatus* spore concentration during demolition of a building on a hospital site, and patient risk determination for invasive aspergillosis including azole resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. e91-e97, 2018.

XU, J., LIU, R., SUN, F., AN, L., SHANG, Z., KONG, L., & YANG, M. O eucalipto D aumenta o efeito antifúngico do fluconazol em *Candida albicans* resistente ao fluconazol ao inibir competitivamente a bomba de efluxo. **Fronteiras em Microbiologia Celular e de Infecção**, v. 9, p. 211, 2019.

ZAINI, F., LOTFALI, E., FATTAHI, A., SIDDIG, E., FARAHYAR, S., KOUHSARI, E., SAFFARI, M. Voriconazole resistance genes in *Aspergillus flavus* clinical isolates. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 2, p. 100953, 2020.

ZHANG, M., GAO, J. Clinical Analysis of 77 Patients with Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Peking Union Medical College Hospital. **Zhongguo yi xue ke xue Yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 39, n. 3, p. 352-357, 2017.