



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

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de
Aspergillus niger

João Pessoa - PB
2023

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

**Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de
*Aspergillus niger***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração: Farmacologia

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

**João Pessoa - PB
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

048a Oliveira, Nayana da Rocha.

Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre
cepas de *Aspergillus niger* / Nayana da Rocha Oliveira.

- João Pessoa, 2023.

96 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antifúngica - Mirtenol. 2. Monoterpeno.
3. Fitoconstituente. 4. Atividade antimicrobiana. 5.
Aspergilose. 6. Síndrome do Edifício Doente. I. Lima,
Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

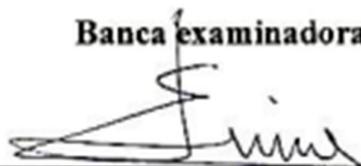
CDU 661.163(043)

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

**Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de
*Aspergillus niger***

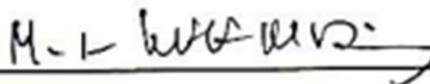
Aprovado em: 25/08/2023

Banca examinadora



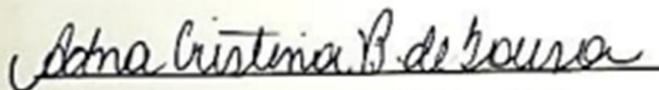
Profª Drª Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora



Profª Drª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Membro interno



Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa

Membro externo

Ao meu filho Cadu. Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente em todos os momentos de minha vida. A crença na sua existência e nos planos que tens para mim, motivam-me e me fazem, mesmo diante de todos os obstáculos, manter-me fiel aos meus sonhos.

Ao meu filho Cadu, pelo seu amor e por ser um grandioso presente de Deus. Que eu consiga ser para você a referência que minha mãe é para mim.

À minha mãe, por ser a minha fonte de inspiração e minha maior incentivadora.

Ao meu companheiro Diogo, pelo incentivo, compreensão e por toda a contribuição no meu desenvolvimento pessoal, profissional e na execução desta pesquisa.

À minha irmã Kelly, meus sobrinhos Misael e Arthur e meu cunhado Dedé, que apesar da distância, fazem-se presentes.

Aos meus amados padrinhos Edite e Dué e prima Carmem, por tudo que representam na minha vida.

À minha estimada orientadora Edeltrudes de Oliveira Lima, a quem ainda na graduação, durante a monitoria de Micologia/PIBIC, almejei ser orientanda. Sou muito grata por todos os ensinamentos, que transcenderam os conhecimentos científicos. És um exemplo de pessoa, professora e orientadora. Agradeço a Deus por nossos caminhos terem se cruzado nesta importante etapa da minha vida. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Egberto Santos Carmo, por ter despertado o meu interesse pela Micologia. Sou grata pela confiança e oportunidade proporcionada, que me direcionou até aqui.

Ao professor Thompson Lopes de Oliveira, pela disponibilidade e importantes contribuições na construção dos artigos.

As minhas queridas amigas da graduação, Ana Clara Rocha, Amanda Araújo e Raqueline Cavalcanti, pela amizade que se fortalece diante do tempo e da distância.

A todos os colegas do mestrado, em especial, meus amigos queridos Brenda Kercya e Emmanuel Melquíades, que Deus uniu desde o primeiro seminário e que a vida se encaminhou de fortalecer esse vínculo. Tenho amizade, admiração e orgulho da história de vida e determinação de ambos. Esse processo foi por diversas vezes difícil, mas possível, em grande parte a vocês.

Aos companheiros de laboratório, Bráulio Teixeira, Rawny Gouveia, André Azevedo e Francisco P. de Andrade Júnior, por sempre se mostrarem dispostos a me ajudar e pelas colaborações durante a execução desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal da Paraíba, sobretudo ao Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela oportunidade de realização deste Mestrado.

OLIVEIRA, N. R. **Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *Aspergillus niger***. 98 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacologia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

RESUMO

Aspergillus niger é uma espécie frequentemente isolada e caracterizada como contaminante ambiental e implicada em uma variedade de infecções, como exemplo a Síndrome do Edifício Doente. Além disso, é a terceira maior causa da aspergilose. O limitado arsenal de antifúngicos disponíveis, assim como a alta resistência fúngica relatada, tem impulsionado a busca por novas substâncias com atividade antifúngica, sendo as plantas medicinais e seus fitoconstituintes amplamente investigadas para essa finalidade. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *Aspergillus niger* de origem ambiental. Para isso, realizou-se os ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); ação sobre o crescimento micelial de *A. niger*; elucidação do seu mecanismo de ação e, por fim, o efeito da associação entre mirtenol e os antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B, através do método *Checkerboard*. O mirtenol apresentou forte atividade antifúngica sobre todas as cepas de *A. niger* testadas, com uma CIM definida em 64 µg/mL e CFM de 256 µg/mL, exibindo ação fungicida. A anfotericina B exibiu uma CIM de 4 µg/mL e CFM de 8 µg/mL. Para o voriconazol foram obtidos valores de CIM de 2 µg/mL e CFM de 4 µg/mL. O efeito antifúngico do sanitizante PAC 200[®] foi constatado apenas na sua maior concentração investigada (10.000 µg/mL). Mirtenol inibiu, significativamente ($p < 0,05$), na CIMx2 (128 µg/mL) e CIMx4 (256 µg/mL), o crescimento micelial da cepa padrão (ATCC-6275) e da cepa de origem ambiental (LM-03) de *A. niger*, com resultados superiores aos obtidos para a anfotericina B, que não apresentou efeito inibitório significativo. O voriconazol, nas três concentrações testadas, apresentou uma inibição significativa ($p < 0,001$) sobre o crescimento micelial de ambas as cepas. O mecanismo de ação antifúngica de mirtenol envolve, possivelmente, a desestabilização da parede celular, assim como, a sua ligação ao ergosterol da membrana citoplasmática fúngica. Um efeito sinérgico foi observado na combinação de mirtenol com o voriconazol, para ambas as cepas. No entanto, a associação entre mirtenol e a anfotericina B, resultou em sinergismo para a cepa ATCC-6245 e em aditividade para a cepa LM-03. Os achados desta pesquisa sugerem que mirtenol representa uma nova e promissora alternativa terapêutica no tratamento de infecções fúngicas causadas por *A. niger*.

Palavras-chave: Monoterpeno, Fitoconstituinte, Atividade antimicrobiana, Aspergilose, Síndrome do Edifício Doente.

OLIVEIRA, N. R. **Evaluation of the antifungal activity of myrtenol on *Aspergillus niger* strains**. 98 p. Dissertation (Master in Natural and Synthetic Bioactive Products – Area of concentration: Pharmacology), Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2023.

ABSTRACT

Aspergillus niger is a frequently isolated species characterized as an environmental contaminant and implicated in a variety of infections, such as Sick Building Syndrome. Furthermore, it is the third leading cause of aspergillosis. The limited arsenal of antifungals available, as well as the reported high fungal resistance, has driven the search for new substances with antifungal activity, with medicinal plants and their phytoconstituents being widely investigated for this purpose. In view of this, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of myrtenol on *A. niger* strains of environmental origin. For this, tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimum Fungicide Concentration (MFC); action on the mycelial growth of *A. niger*; elucidation of its mechanism of action and, finally, the effect of the association between myrtenol and the standard antifungals voriconazole and amphotericin B, through the *Checkerboard* method. Myrtenol showed strong antifungal activity against all strains of *A. niger* tested, with a MIC defined at 64 µg/mL and CFM of 256 µg/mL, showing fungicidal action. Amphotericin B exhibited a MIC of 4 µg/mL and CFM of 8 µg/mL. For voriconazole, MIC values of 2 µg/mL and CFM of 4 µg/mL were obtained. The antifungal effect of the sanitizer PAC 200® was observed only at its highest investigated concentration (10,000 µg/mL). Myrtenol significantly ($p < 0.05$) inhibited, at CIMx2 (128 µg/mL) and CIMx4 (256 µg/mL), the mycelial growth of the standard strain (ATCC-6275) and the strain of environmental origin (LM-03) from *A. niger*, with results superior to those obtained for amphotericin B, which did not show a significant inhibitory effect. Voriconazole, in the three concentrations tested, showed a significant inhibition ($p < 0.001$) on the mycelial growth of both strains. Myrtenol's antifungal mechanism of action possibly involves cell wall destabilization, as well as its binding to ergosterol in the fungal cytoplasmic membrane. A synergistic effect was observed in the combination of myrtenol with voriconazole, for both strains. However, the association between myrtenol and amphotericin B resulted in synergism for the ATCC-6245 strain and in additivity for the LM-03 strain. The findings of this research suggest that myrtenol represents a new and promising therapeutic alternative in the treatment of fungal infections caused by *A. niger*.

Keywords: Monoterpene, Phytoconstituent, Antimicrobial Activity, Aspergillosis, Sick Building Syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos macroscópicos de <i>Aspergillus niger</i>	23
Figura 2	Aspectos microscópicos de <i>Aspergillus niger</i>	23
Figura 3	Alvos de ação dos principais antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose	27
Figura 4	Estrutura química dos antifúngicos triazólicos	28
Figura 5	Relação entre a aplicação de antifúngicos azólicos na agricultura e o surgimento de resistência em <i>Aspergillus</i> (rota ambiental).	30
Figura 6	Estrutura química da anfotericina B desoxicolato	31
Figura 7	Estrutura química das equinocandinas	32
Figura 8	Estrutura química do monoterpene mirtenol	35
5.2. Artigo 2	Avaliação da atividade antifúngica e mecanismo de ação de mirtenol sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	
Figura 1	Estrutura química de mirtenol	67
Figura 2	Crescimento micelial radial (mm) produzido por <i>Aspergillus niger</i> (ATCC-6235) na ausência (controle) e na presença de mirtenol (2A), anfotericina B (2B) e voriconazol (2C)	71
Figura 3	Crescimento micelial radial (mm) produzido por <i>Aspergillus niger</i> (LM-03) na ausência (controle) e na presença de mirtenol (3A), anfotericina B (3B) e voriconazol (3C)	71

LISTA DE TABELAS

5.1. Artigo 1	Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	
Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de mirtenol, voriconazol, anfotericina B e PAC 200 [®] sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	50
Tabela 2	Resultado da razão CFM/CIM de mirtenol, voriconazol e anfotericina B sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	53
Tabela 3	Efeito da combinação de mirtenol com o antifúngico voriconazol sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	54
Tabela 4	Efeito da combinação de mirtenol com o antifúngico anfotericina B sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	55
5.2. Artigo 2	Avaliação da atividade antifúngica e mecanismo de ação de mirtenol sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i>	
Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de mirtenol na ausência e na presença de sorbitol exógeno (0,8 M)	73
Tabela 2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de mirtenol e anfotericina B na ausência e na presença de ergosterol exógeno (400 µg/mL)	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
AI	Aspergilose invasiva
APC	Aspergilose pulmonar crônica
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CAPA	Aspergilose pulmonar associada à COVID-19
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CME	Central de Material e Esterilização
COV	Compostos orgânicos voláteis
COVID-19	Infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DHODH	Enzima dihidroorotato desidrogenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
g/kg	Grama/quilograma
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
K ⁺	Íon potássio
LD50	Dose letal mediana
LIFE	Líder Internacional em Educação Fúngica
LM	Laboratório de Micologia
M	Molaridade
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Na ⁺	Íon Sódio

NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC 200 [®]	Ácido peracético
QAI	Qualidade do Ar Interior
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institut 1640
SARS-CoV-2	Vírus da família dos coronavírus que, ao infectar humanos, causa a Covid-19
spp.	Espécies
SED	Síndrome do Edifício Doente
SIGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
uL	Microlitros
µg/mL	Micrograma/mililitros
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VMR	Valores Máximos Recomendáveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1. Síndrome do edifício doente (SED), <i>Aspergillus niger</i> e aspergilose.....	18
3.2. Aspergilose, tratamento e mecanismos de resistência	24
3.3. Produtos naturais: fitoconstituente mirtenol	33
4. METODOLOGIA	36
4.1. Local de desenvolvimento da pesquisa	36
4.2. Fitoconstituente mirtenol e antifúngicos licenciados.....	36
4.3. Meios de cultura.....	37
4.4. Cepas de <i>Aspergillus niger</i>	37
4.5. Inóculo fúngico	37
4.6. Avaliação da atividade antifúngica	38
4.6.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.6.2. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	39
4.6.3. Determinação da cinética de crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i>	39
4.6.4. Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol.....	40
4.6.5. Ação dos produtos sobre a membrana citoplasmática: interação com ergosterol.....	40
4.6.6. Ensaio de associação através do método <i>Checkerboard</i>	41
4.7. Análises estatísticas.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. ARTIGO 1: Artigo submetido na revista Fitos (Fiocruz).	43
5.2. ARTIGO 2: Artigo a ser submetido nos Anais da Academia Brasileira de Ciências	62
6. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

Fungos anemófilos, que se propagam pelo ar, quando inalados, podem desencadear doenças que compreendem manifestações alérgicas respiratórias (asma e rinite) e infecções graves em indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Entre as espécies fúngicas que mais implicam nestas condições, as do gênero *Aspergillus* causam maior preocupação. Tais espécies podem ocasionar desde quadros clínicos leves, até quadros que podem ser fatais, como a aspergilose (SILVA *et al.*, 2021).

A aspergilose é uma doença caracterizada por comprometimento broncopulmonar, o qual pode se disseminar, comprometendo diversos órgãos. Além disso, quando na sua forma invasiva, é responsável por uma ampla variedade de manifestações clínicas, apresentando uma elevada taxa de mortalidade (SILVA *et al.*, 2021). Através das suas principais formas crônicas, invasivas e alérgicas, tal doença é responsável por cerca de 600.000 mortes anuais (ZENAIDE NETO, 2020).

Aspergillus niger é uma espécie do referido gênero que apresenta uma ampla distribuição na natureza, sendo considerada um importante contaminante ambiental e reconhecida como um fungo prevalente em estudos realizados em ambientes hospitalares, residenciais e escritórios (MOBIN; SALMITO, 2006; TEIXEIRA, 2020; STEMLER; TOBBEN; LASS-FLORL *et al.*, 2023).

É não-patogênica em condições fisiológicas normais, no entanto, em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, pode agir como oportunista, levando a sérias infecções locais e sistêmicas. Essas infecções podem incluir otite externa e interna, bem como aspergilose pulmonar, que é a forma mais grave de infecção causada por espécies de *Aspergillus* (HASHIMOTO *et al.*, 2017; FERREIRA, 2021).

Outro fato preocupante, é a resistência de *A. niger* aos antifúngicos azólicos. Esta espécie pode ser intrinsecamente resistente, como também, desenvolver resistência ao longo do tempo, especialmente como consequência de terapias de longo prazo. Além disso, o uso generalizado de antifúngicos na agricultura pode contribuir para o surgimento de resistência (SHARPE; LAGROU; MEIS *et al.*, 2018; TROVATO, SCALIA, DOMINA *et al.*, 2018).

Atualmente, apenas três classes de antifúngicos (azólicos, poliênicos e equinocandinas) estão disponíveis para o tratamento das infecções causadas por *Aspergillus*, sendo os azóis os mais amplamente utilizados. Entretanto, essas reduzidas opções de tratamento se tornam especialmente preocupantes nos casos de aspergilose resistente a medicamentos. Essa situação coloca em risco a sobrevivência do paciente, exigindo urgentemente o desenvolvimento de

novas estratégias terapêuticas para aprimorar a capacidade de lidar com essa infecção (BALTUSSEN; ZOLL; VERWEIJ *et al.*, 2020).

Neste contexto, as plantas medicinais têm sido amplamente estudadas com vistas à descoberta de novos agentes antimicrobianos. Quando investigadas as propriedades antifúngicas de produtos de origem vegetal, na grande maioria das pesquisas científicas, são utilizados os óleos essenciais, extratos e suas frações, sendo escassas as que abordam estudos com os seus fitoconstituintes. Estes componentes são moléculas orgânicas, com carácter geralmente hidrofóbico, considerados como antimicrobianos naturais. A sua ação biológica é exercida por meio de diversos mecanismos, a exemplos desses, as perturbações ou ruptura da membrana fúngica (SILVA; VIEIRA; GURGEL, 2017).

Entre os fitoconstituintes, os da classe dos monoterpenos vêm ocupando papel de destaque. Esses compostos possuem estruturas terpênicas de menor massa molecular e volatilidade acentuada, sendo os principais constituintes de diversos óleos essenciais (FELIPE; BICAS, 2017). O mirtenol é um monoterpeno majoritário, extraído do óleo essencial de algumas espécies vegetais, a exemplo *Myrthus comunis* L. (Murta). Estudos demonstram que esse fitoconstituente apresenta ampla ação neuroprotetora, neuroléptica, anticonvulsivante, ansiolítica (MOREIRA, 2013), anti-inflamatória e analgésica (OLIVEIRA, 2019). Além dessas, atividade cardioprotetora (BRITTO *et al.*, 2018) e antifúngica (CAVALCANTI *et al.*, 2021).

Portanto, considerando a elevada taxa de isolamento e propagação de *A. niger* em edificações, bem como, sua implicação no surgimento da aspergilose e, sobretudo, a importância clínica dessa infecção fúngica, faz-se importante avaliar a atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger* de origem ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do monoterpene mirtenol sobre cepas de *Aspergillus niger* de origem ambiental.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de mirtenol e dos antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B sobre cepas de *A. niger*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do produto sanitizante ácido peracético (PAC 200[®]);
- Investigar a ação de mirtenol sobre o crescimento micelial de *A. niger*;
- Avaliar a ação de mirtenol sobre a parede celular fúngica;
- Investigar o efeito de mirtenol sobre a membrana citoplasmática fúngica;
- Investigar possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos ou indiferentes de mirtenol isolado e associado aos antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B, pela técnica *Checkerboard*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Síndrome do edifício doente (SED), *Aspergillus niger* e aspergilose

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição do ar em ambientes internos é responsável por aproximadamente 3,8 milhões de mortes a cada ano (TRAN; DUCKSHIN; LEE, 2020). Em vista disso, em 1983, a OMS introduziu o termo “Síndrome do Edifício Doente (SED)” para descrever situações em que os ocupantes de um edifício apresentam efeitos agudos na saúde e no conforto, aparentemente associados ao tempo de permanência nesses ambientes, embora nenhuma doença ou causa específica possa ser identificada. É uma condição que não está restrita a um tipo específico de construção e pode afetar diversos ambientes, incluindo escritórios, residências, hospitais, escolas, entre outros. Além disso, pode ter impactos significativos na produtividade dos indivíduos e no aumento do absenteísmo (AKOVA; KILIÇ; SUMER *et al.*, 2020; FU; NORBACK; YUAN *et al.*, 2021).

As manifestações clínicas que podem surgir nos ocupantes dos edifícios considerados doentes são agrupadas em cinco categoriais: 1) manifestações nasais: congestão nasal, irritação nasal e rinorreia; 2) manifestações oculares: irritação ocular, sensação de ardor e olhos secos; 3) manifestações orofaríngeas: perturbações na garganta e no sistema respiratório; 4) manifestações dérmicas: pele seca e irritada, coceira e erupção cutânea na pele; 5) manifestações gerais: cefaleias, que pode variar de moderadas a graves enxaquecas. Além desses, fadiga, tonturas, dificuldade de concentração e mal-estar geral (BURROUGHS; HANSEN, 2011). A SED pode originar doenças mais graves como hipersensibilidades ou cancro, sendo que 10% dos casos de cancro de pulmão são causados pela qualidade do ar dentro dos edifícios (SILVA, 2017).

Na ausência de diagnóstico de patologias definidas, considera-se estar diante de um caso de SED quando sua prevalência é superior a 20% nos ocupantes, apresentando dois ou mais sintomas que persistem por, no mínimo, duas semanas (FU; NORBACK; YUAN *et al.*, 2021). Em vista disso, a SED não é o diagnóstico individual, mas para a população de ocupantes em relação a esse mesmo edifício (SILVA, 2017).

Os principais fatores relacionados à SED são: contaminantes químicos como compostos orgânicos voláteis (COV) e compostos orgânicos voláteis microbianos; aerodispersóides (poeira, fibras); bioaerossóis (fungos, bactérias, vírus); formaldeído; poluentes nocivos como monóxido de carbono; contaminantes gerados pelo metabolismo humano; ventilação inadequada, temperatura, umidade e ruído. Além desses, os psicossociais e as características pessoais: como genética, gênero, alergia, entre outros (SCHIRMER *et al.*, 2011; FU;

NORBACK; YUAN *et al.*, 2021). Dentre esses, ressalta-se a importância dos fatores biológicos (bioaerossóis).

É amplamente reconhecido que a poluição biológica desempenha um papel fundamental na degradação da QAI, sendo os bioaerossóis identificados como um fator crucial nesse processo, apresentando um papel relevante na ocorrência de várias patologias infecciosas e alérgicas (AL HALLAK; VERDIER; BERTRON *et al.*, 2023).

Os bioaerossóis compreendem um conjunto de partículas de origem biológica (animal, vegetal ou microbiológica) que permanecem suspensas no ar e podem ser transportadas por ele. A via inalatória é a sua principal forma de entrada no corpo humano. Dentre os componentes presentes nos bioaerossóis, destacam-se: microrganismos mortos, como também vivos cultiváveis e não cultiváveis, patogênicos e não patogênicos. Além desses, fragmentos e estruturas de microrganismos (como pedaços de hifas ou esporos fúngicos), micotoxinas, endotoxinas, alérgenos vegetais (pólen) e animais, entre outros (BECERRA; MUNOZ, 2015; CORZO *et al.*, 2022).

Alguns fungos filamentosos, como é o caso do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, são exemplos importantes de bioaerossóis. Esses microrganismos têm a capacidade de se multiplicar em condições propícias de umidade, temperatura, oxigênio e pH. Durante esse processo de multiplicação, eles produzem metabólitos secundários conhecidos como micotoxinas, que podem ocasionar diversos efeitos tóxicos, prejudiciais tanto para humanos quanto para animais (PELUQUE, 2014; SVAJLENKA; KOZLOVSKA; POSIVAKOVA, 2018). Frequentemente, adentram o edifício pelo sistema de aquecimento, ar-condicionado, ventilação, materiais de construção contaminados, como também por portas e janelas (ROGAWANSAMY *et al.*, 2015).

Estudo realizado em edifícios residenciais na cidade de Gondar, no Noroeste da Etiópia, revelou uma prevalência da SED de 21,7%, sendo que 64% dos casos apresentaram sintomas nas mucosas, 54% sintomas gerais e 10% sintomas cutâneos. A ocorrência dessa síndrome foi significativamente associada à infestação de fungos nesses espaços. Os ocupantes que viviam em edifícios onde o crescimento fúngico foi observado relataram mais sintomas quando comparados com os ocupantes de edifícios na ausência desses microrganismos (BELACHEW; ASSEFA; GUYASA *et al.*, 2018).

A associação entre a presença de fungos em edifícios residenciais e os sintomas da SED pode ser atribuída ao fato de que os fungos são contaminantes comuns em ambientes internos e pela sua implicação no surgimento de doenças. Eles têm a capacidade de crescer em diversos materiais de construção, liberando partículas biológicas no ar. A aerossolização de compostos

alergênicos ou micotoxinas, transportados por partículas fúngicas ou poeira, pode afetar diretamente a saúde dos ocupantes, tornando-se uma causa importante de morbidade e mortalidade. Atividades diárias como varrer, aspirar ou caminhar, são consideradas mecanismos passivos para a liberação de partículas fúngicas. Essas atividades podem aumentar as concentrações de partículas fúngicas no ar interno e essa transferência é influenciada pela forma e organização dos conídios nas estruturas fúngicas. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, por exemplo, são caracterizados por esporos organizados em longas cadeias, o que facilita sua liberação. Portanto, os processos e mecanismos de aerossolização são afetados pela natureza do microrganismo envolvido, sendo alguns deles projetados para se disseminar mais facilmente no ar (AL HALLAK; VERDIER; BERTRON *et al.*, 2023).

Becerra e Munoz (2015), ao analisar amostras de bioaerossóis de três edifícios administrativos na cidade de Bogotá, Colômbia, observou que os maiores percentuais de fungos nas amostras colhidas compreendiam os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* demandam maior atenção em detrimento da possibilidade de ocasionarem infecções graves, como a aspergilose. Essa infecção fúngica apresenta uma diversidade de cenários clínicos, com comprometimento local ou sistêmico e uma alta taxa de mortalidade nas suas formas invasivas (HAWKSWORTH, 2011).

As estimativas globais da LIFE (líder internacional em educação fúngica) sobre as doenças causadas pelo gênero *Aspergillus*, indicam que exista cerca de 10 milhões de casos de asma causada por este gênero, 5 milhões de casos de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), 3 milhões de casos de aspergilose pulmonar crônica (APC) e 1 milhão de casos de ceratite fúngica. Como também, todos os anos, como consequência do aumento da imunossupressão e dos procedimentos de transplante de células-tronco e órgãos sólidos, cerca de 30 milhões de pessoas vivem sob o risco de aspergilose invasiva (AI). Anualmente, cerca de 300.000 delas desenvolvem a AI (PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022).

O gênero *Aspergillus* é composto por fungos filamentosos que pertencem à família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomyces* e filo *Ascomycota*. Esses fungos são saprófitos e possuem um habitat ubíquo, sendo amplamente distribuídos em todo o mundo. São frequentemente encontrados em ambientes úmidos e em solos férteis, bem como em outras fontes, como poeira, água e em ambientes internos, incluindo superfícies de edifícios e eletrodomésticos. A capacidade de prosperar em uma variedade de ambientes contribui para sua ocorrência generalizada. Esses fungos não demonstram predileção por faixa etária, etnia, sexo ou zonas climáticas específicas (AMORIM *et al.*, 2004; FERREIRA, 2021).

Este gênero foi nomeado pela primeira vez em 1729, pelo Padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli, sendo a escolha do seu nome baseada na semelhança da sua estrutura microscópica e reprodutiva com um instrumento chamado aspersório, do latim *Aspergillum*, muito utilizado em cerimônias religiosas para aspergir os fiéis com água benta. Os primeiros casos de infecções fúngicas ocasionadas por *Aspergillus* foram relatadas por Bennet, Sluyter e Rayer, em 1840, identificadas em pessoas que tinham contato com solo, adubo e vegetais. O termo aspergilose foi empregado pela primeira vez dez anos depois, em 1850, por Fresenius, ao descrever essa infecção em pássaros (AMORIM *et al.*, 2004).

A exposição humana aos conídios de *Aspergillus* é expressiva, com estimativas indicando que os humanos inalam de 100 a 1.000 conídios de *Aspergillus* todos os dias. Em detrimento do pequeno tamanho dessas estruturas (2 a 3 µm), após a sua inalação, podem atingir as vias aéreas terminais ou se acomodar em grandes grupos no sistema ventilatório superior, causando sensibilização. Portanto, o crescimento dessas estruturas dentro dos pulmões humanos representa o primeiro passo da infecção (SEN; VIJAY; SINGH *et al.*, 2022).

O gênero *Aspergillus* apresenta aproximadamente 340 espécies encontradas no ambiente, mas somente cerca de 40 foram identificadas como patógenos em humanos. Em detrimento da sua importância médica, industrial e agrícola, as suas espécies mais estudadas são *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. oryzae* e *A. niger* (FERREIRA, 2021; PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022). Entre essas, destaca-se *A. niger*, frequentemente isolada, caracterizada como contaminante ambiental e capaz de produzir micotoxinas cancerígenas, como a ocratoxina-A (AL HALLAK; VERDIER; BERTRON *et al.*, 2023).

Teixeira (2020), avaliou a presença de fungos patogênicos em bioaerossóis de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e uma Central de Material e Esterilização (CME) de um Hospital de médio porte no Noroeste Paulista, em São Paulo e confirmou a presença de inúmeras Unidades Formadoras de Colônias (UFC), estando às cepas de *A. niger* entre as mais prevalentes.

Estudo recente realizado por Al Hallak *et al.* (2023), discutiu a produção científica acerca da contaminação fúngica de materiais de construção e do ar de diferentes tipos de edifícios na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA), entre os anos de 2001 e 2022. Com base nos resultados discutidos nessa revisão, *A. versicolor* (74%), *A. niger* (68%) e *A. fumigatus* (53%) foram as três principais espécies mais identificadas nas superfícies dos materiais e nas amostras de ar, nos estudos selecionados (n=34).

A. niger foi descrita pela primeira vez 1867, por Van Tieghen, sendo encontrado disperso no ar, solo, na superfície dos animais e vegetais, bem como na água. Exerce importante participação na decomposição de vários compostos, o que inclui madeira, papel e derivados naturais. Do ponto de vista clínico, *A. niger* é a terceira espécie do gênero *Aspergillus* mais comumente associada a casos de infecções, sendo especialmente reconhecida como causa de otites externas e na aspergilose pulmonar invasiva (FERREIRA, 2021).

Esta espécie ainda tem sido identificada como um colonizador frequente do nariz e da garganta em pacientes imunocomprometidos, sobretudo em indivíduos com outras condições predisponentes, como doença pulmonar crônica. Ademais, ocupa a segunda posição entre as espécies do gênero *Aspergillus* encontradas em casos de peritonite fúngica, em pacientes que realizam diálise peritoneal. Outro cenário que merece atenção, é nas enfermarias de pacientes queimados, onde foi relatada como um importante contaminante (STEMLER; TOBBEN; LASS-FLORL *et al.*, 2023).

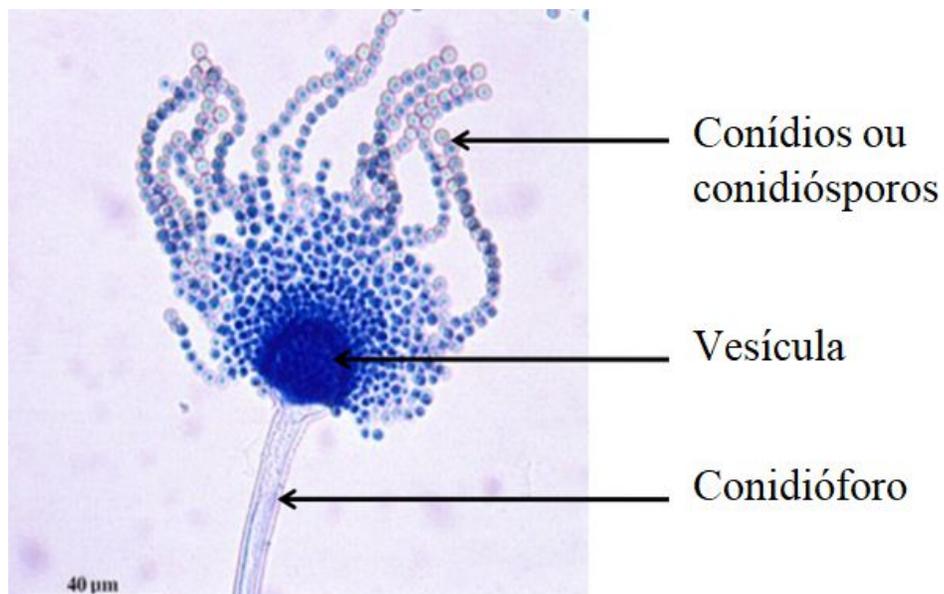
Apresenta uma ampla faixa de temperatura de crescimento, variando de 6°C a 47°C, o que contribui para sua ocorrência ubíqua em diversos ambientes. Sua temperatura ótima de crescimento é relativamente alta, situando-se em torno de 35°C a 37°C. Além disso, é um fungo que cresce rapidamente em todos os meios micológicos e seu crescimento pode ser observado dentro de 1 a 2 dias. A maturação de suas colônias ocorre em um período de 3-4 dias, apresentando-se, inicialmente, com textura algodonosa e de coloração branca ou amarela, mas que, rapidamente, após a formação das cabeças aspergilaes radiadas, exibem uma coloração preta (Figura 1), com textura arenosa de grânulos grandes. Seus conidióforos são longos, de paredes lisas e hialinas, mas apresentam uma coloração escura na região próxima à vesícula. Microscopicamente as cabeças dos conídios são radiadas, as vesículas subesféricas e as células conidiogênicas bisseriadas (Figura 2) (SIDRIM; ROCHA, 2004; MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005; STEMLER; TOBBEN; LASS-FLORL *et al.*, 2023).

Figura 1. Aspectos macroscópicos de *Aspergillus niger*.



Fonte: Stemler, Tobben, Lass-florl *et al.* (2023).

Figura 2. Aspectos microscópicos de *Aspergillus niger*.



Fonte: Cavaco (2015).

Portanto, *A. niger* é uma espécie de grande importância clínica, capaz de causar uma variedade de infecções e colonizar ambientes diversos e seu impacto na saúde merece atenção e estudos contínuos.

3.2. Aspergilose, tratamento e mecanismos de resistência

A inalação dos conídios de *Aspergillus* pode levar ao desenvolvimento de aspergilose, que engloba um amplo espectro de manifestações clínicas. A gravidade da doença pode variar de acordo com fatores como o estado imunológico e/ou anatômico do indivíduo afetado, o nível de alergenicidade dos conídios e a frequência de exposição (SHIBUYA *et al.*, 2004).

Os grupos de risco são principalmente compostos por indivíduos com o sistema imunológico comprometido, o que os torna mais susceptíveis a infecções por este gênero, o que incluem: pacientes em terapia prolongada com corticosteroides em altas doses; com malignidades hematológicas; neutropenia prolongada ou distúrbios neutrófilos; doenças pulmonares; transplante de órgãos sólidos ou células tronco hematopoiéticas e pacientes gravemente enfermos em UTI (TROVATO; SCALIA; DOMINA *et al.*, 2018).

As formas não invasivas da aspergilose incluem aspergiloma, aspergilose broncopulmonar alérgica, rinosinusite fúngica alérgica, aspergilose cutânea e otomicose aspergilar, enquanto as invasivas, compreendem aspergilose pulmonar crônica e aspergilose pulmonar invasiva (SHIBUYA *et al.*, 2004; CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021).

O aspergiloma, também conhecido como bola fúngica, é um crescimento de massa fúngica dentro de uma cavidade pulmonar. Essa massa é composta por micélios de *Aspergillus* (parte vegetativa do fungo) vivos e mortos, fibrina, muco, células inflamatórias, epitélio e componentes sanguíneos em decomposição. Essa condição é frequentemente associada à tuberculose pulmonar e ocorre quando o fungo coloniza uma cavidade pulmonar preexistente, formada devido à tuberculose. Pode ser assintomático em algumas pessoas, mas também pode causar sintomas como tosse crônica, hemoptise (tosse com sangue), dor torácica e febre (PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022).

A aspergilose pulmonar e a aspergilose broncopulmonar alérgica são duas manifestações clínicas importantes da infecção por *Aspergillus*. Essas condições têm características distintas e podem ser graves, podendo levar a complicações potencialmente fatais se não forem diagnosticadas e tratadas adequadamente. A aspergilose pulmonar é considerada uma infecção oportunista e pode se espalhar para outras partes do corpo, resultando em complicações sistêmicas graves. Já a aspergilose broncopulmonar alérgica é uma resposta imunológica exagerada do tipo TH2 (uma resposta imune mediada por células T auxiliares tipo 2) ao *Aspergillus*. Essa condição é caracterizada por inflamação crônica e infiltrados pulmonares transitórios, geralmente em pacientes com asma ou fibrose cística (TAKEDA; SUZUKI; WATANABE *et al.*, 2019; CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021).

Diversos vírus respiratórios têm sido relacionados a casos de aspergilose pulmonar invasiva, incluindo a influenza aviária H7N9, influenza A, influenza B, vírus sincicial respiratório e, mais recentemente, o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), responsável pela pandemia da COVID-19. A aspergilose pulmonar invasiva após infecções virais respiratórias é considerada secundária à lesão do epitélio das vias aéreas. Essa lesão proporciona uma oportunidade para a invasão e colonização por fungos do gênero *Aspergillus*. Pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2, podem desenvolver aspergilose pulmonar invasiva como uma complicação adicional. Essa condição específica é denominada aspergilose pulmonar associada à COVID-19 (CAPA) (CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021) e pode agravar a infecção por COVID-19 e, conseqüentemente, o aumento das taxas de mortalidade em pacientes afetados. A infecção por *Aspergillus* resistente a azóis tem sido relatada como a causa da maioria dos casos associados à CAPA, o que pode dificultar ainda mais o tratamento e aumentar os desafios clínicos (PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022).

Na aspergilose cutânea, existe mais de uma forma de infecção por *Aspergillus* pela pele. Na forma primária, pode ser consequência de um trauma cutâneo, como no caso dos pacientes gravemente queimados, e, ainda, frequentemente, sendo a manifestação de uma disseminação hematogênica, resultando de um foco primário, geralmente pulmonar, em pacientes imunossuprimidos. Tratando-se da otomicose arpergilar, essa condição clínica é comumente observada em pacientes que apresentam lesão eczematosa e que fizeram uso local de antimicrobianos e corticoides. Pode ser observado sintoma como prurido, desconforto, e às vezes, um corrimento. Nessa condição, *A. niger* é a espécie mais envolvida, seguida de *A. fumigatus* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A aspergilose pulmonar cavitária crônica é uma forma grave de aspergilose pulmonar, que se caracteriza por sintomas subagudos, incluindo tosse, dor torácica e hemoptise escassa. Esses sintomas podem ser confundidos com os da tuberculose, que também pode causar febre, calafrios, suores noturnos e perda de peso. Radiograficamente, apresenta lesões pulmonares cavitárias com inflamação ao redor. Com o tempo, essas lesões podem progredir e levar à destruição contínua do tecido pulmonar circundante, resultando em uma piora progressiva da função respiratória do paciente (CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021).

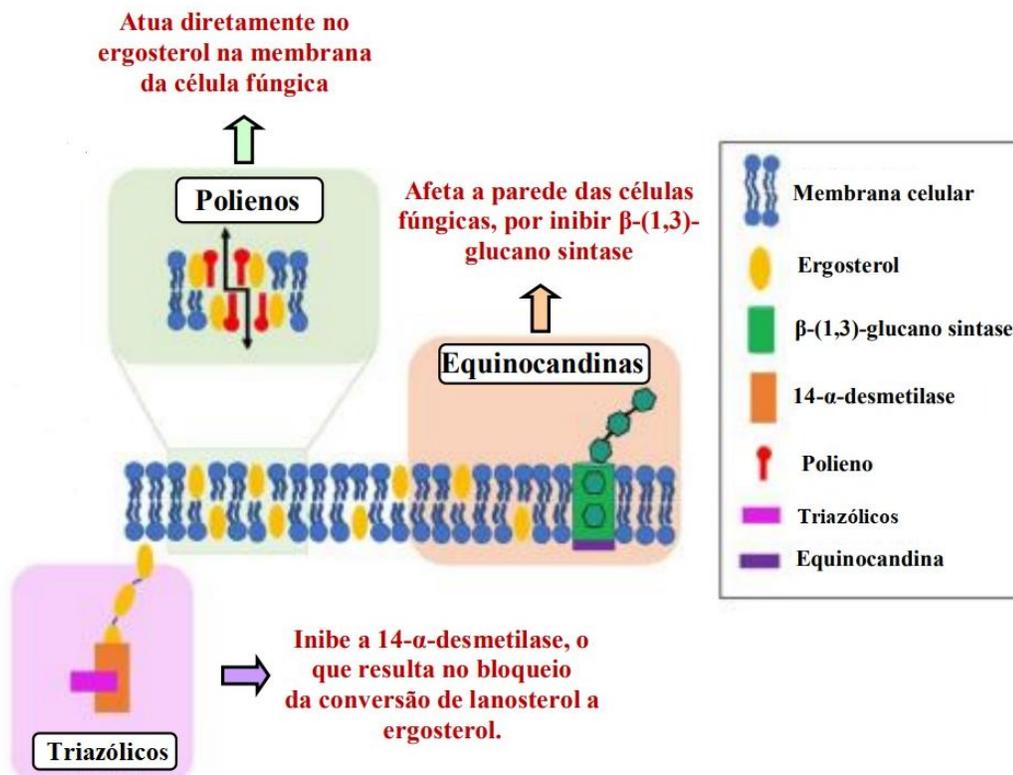
A aspergilose invasiva (AI) compreende uma família de condições graves e com risco de vida, estreitamente relacionadas, que ocorrem em pacientes com o sistema imunológico comprometido. Essas condições apresentam altas taxas de mortalidade e os piores prognósticos entre as infecções fúngicas invasivas. O seu diagnóstico é desafiador devido à natureza

inespecífica dos sintomas. Esse tipo de infecção ocorre com maior frequência em pacientes com neutropenia prolongada, leucemia aguda, uso de glicocorticoides ou outras drogas imunossupressoras, em receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas ou transplante de órgãos sólidos e em pacientes com distúrbios imunológicos hereditários. Seus sintomas incluem febre, tosse, dor torácica ou pleurítica (dor ao respirar profundamente) e hemoptise. O tratamento geralmente envolve o uso de antifúngicos potentes e outras medidas de suporte para controlar a infecção e melhorar a resposta imunológica do paciente (CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021; CHEN; QIAN; YANG *et al.*, 2023; STEMLER; TOBBEN; LASS-FLORL *et al.*, 2023).

O diagnóstico da aspergilose envolve uma abordagem clínica, laboratorial e de imagem para identificar o agente causador e confirmar a presença da infecção. Independentemente da espécie causadora, os métodos diagnósticos são geralmente semelhantes e incluem: diagnóstico clínico, que se baseia na apresentação dos sintomas do paciente e que pode variar dependendo da forma da aspergilose; exame microscópico direto: amostras clínicas podem revelar a presença de hifas septadas, hialinas e ramificadas em ângulo agudo, características típicas de *Aspergillus spp.*; histopatologia e citopatologia: amostras de tecido ou células obtidas por biópsia ou punção pode mostrar evidências de destruição tecidual e a presença de hifas fúngicas; cultura do fungo: o isolamento do fungo em cultura é uma etapa importante para identificar a espécie causadora e determinar sua susceptibilidade a antifúngicos específicos; técnicas de biologia molecular: o uso de PCR e sequenciamento do DNA fúngico pode ser útil para identificar a espécie com maior precisão; detecção de antígenos fúngicos: a presença de antígenos específicos de *Aspergillus* em amostras clínicas pode ser detectada usando ensaios imunológicos, o que pode ajudar no diagnóstico rápido e específico; imagens de tomografia computadorizada de alta resolução: essas técnicas são valiosas para diagnosticar as formas pulmonares de aspergilose, permitindo a visualização das lesões pulmonares e sua extensão. Portanto, o diagnóstico preciso da aspergilose é essencial para garantir o tratamento adequado e para a melhora dos resultados clínicos (CARVALHO *et al.*, 2013; FERREIRA, 2021).

No tratamento da aspergilose, os triazólicos (voriconazol), poliênicos (anfotericina B) e as equinocandinas (caspofungina) são as três principais classes de antifúngicos utilizadas (Figura 3) (SEM; VIJAY; SINGH *et al.*, 2022).

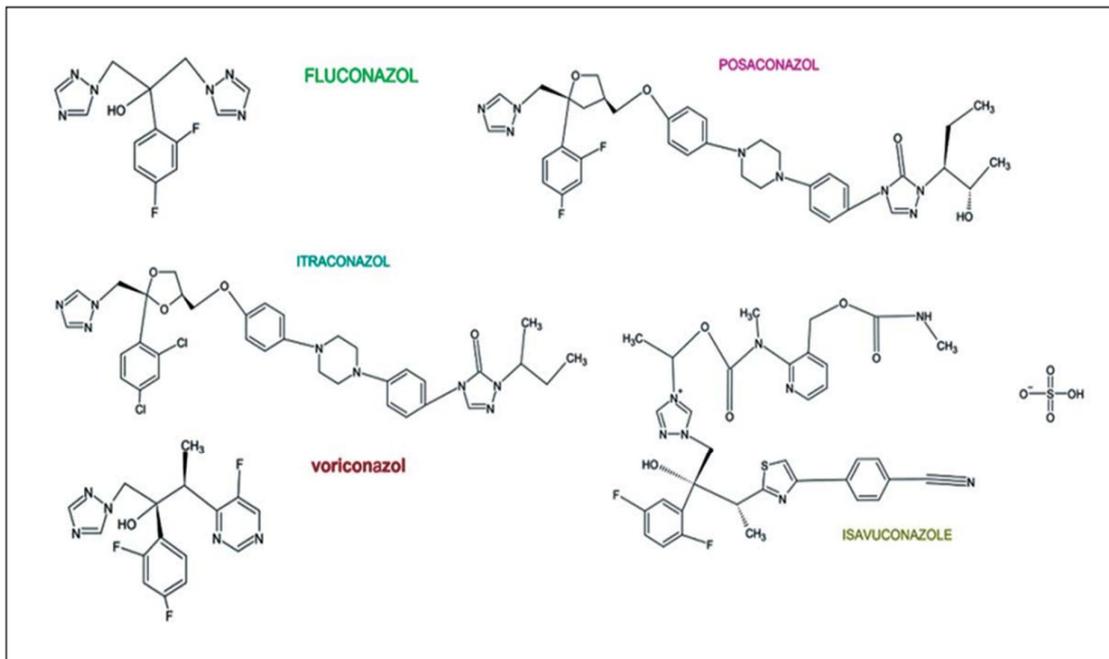
Figura 3. Alvos de ação dos principais antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose.



Fonte: Adaptado de Silva (2020).

Os antifúngicos triazóis, incluindo o itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, são considerados os principais compostos utilizados no tratamento e profilaxia da aspergilose. Cada um desses antifúngicos tem suas indicações específicas, dependendo da forma clínica da aspergilose e das condições do paciente. O itraconazol, é frequentemente utilizado no tratamento de aspergilose pulmonar crônica e condições alérgicas, como a aspergilose broncopulmonar alérgica; o voriconazol, é considerado a terapia de primeira escolha para a aspergilose invasiva, disponível tanto na forma oral como intravenosa, permitindo uma abordagem versátil no tratamento dessa infecção grave; o posaconazol, é indicado como profilaxia da aspergilose invasiva em pacientes com leucemia ou que passaram por transplante de medula óssea e o isavuconazol é uma opção mais recente, aprovada para o tratamento da aspergilose invasiva (Figura 4) (TROVATO; SCALIA; DOMINA *et al.*, 2018).

Figura 4. Estrutura química dos antifúngicos triazólicos.



Fonte: Nocua-Baez *et al.* (2020).

Os azóis atuam inibindo a síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana citoplasmática fúngica, equivalente ao colesterol encontrado nas células humanas. Estes antifúngicos inibem, de forma não competitiva e reversível, enzimas que participam das etapas finais da biossíntese do ergosterol. A principal enzima inibida é a lanosterol-14- α -desmetilase, enzima microssômica associada ao citocromo P-450 e codificada pelo gene ERG11. Ao inibir essa enzima, os azóis impedem a conversão do lanosterol em ergosterol, diminuindo a síntese desse lipídeo e resultando em um acúmulo de 14- α -metilesterol. A 14- α -desmetilase possui forma e propriedades físicas diferentes do ergosterol e quando presente em grandes quantidades na membrana fúngica leva a alterações significativas em sua estrutura e função (BERTO *et al.*, 2018).

Ainda que essa classe tenha se mostrado eficaz na redução da carga fúngica, relatos de resistência de *Aspergillus* spp. aos azólicos têm ocorrido desde a década de 1990, tornando-se um problema generalizado e frequentemente associado a uma elevada taxa de falha no tratamento, sendo necessário o ajuste terapêutico no tratamento da aspergilose (MONPIERRE; DESBOIS-NOGARD; VALSECCHI *et al.*, 2021).

Atualmente, existem duas possíveis vias de seleção de resistência: azol-resistência, podendo ser selecionada nos pacientes durante a terapia de longo prazo em ambientes clínicos,

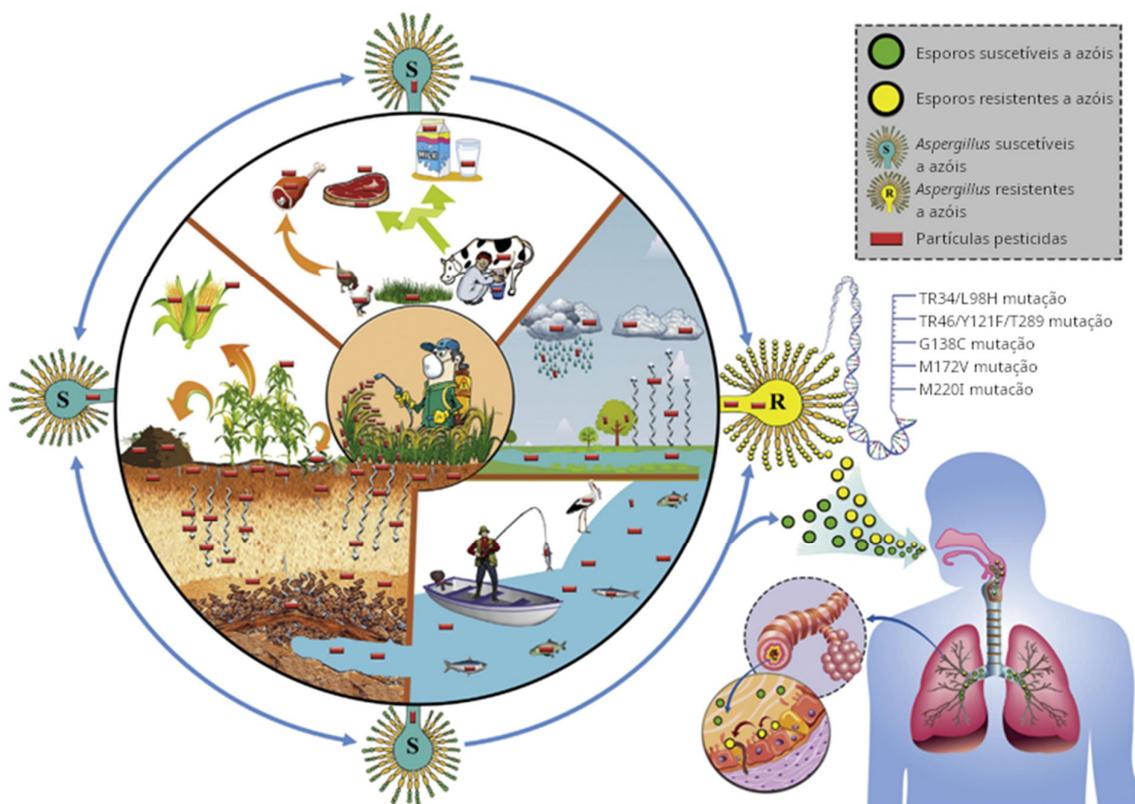
como também, uma via de seleção ambiental, após a aplicação de azólicos na agricultura (TROVATO; SCALIA; DOMINA *et al.*, 2018).

Nos antifúngicos azólicos, uma das principais causas de resistência é a ocorrência de mutações genéticas na enzima lanosterol-14- α -desmetilase (CYP51A). Essas mutações podem levar a mudanças estruturais e funcionais na enzima, resultando em uma menor afinidade de ligação aos azóis e, conseqüentemente, tornando o fungo resistente ao tratamento. Essas mutações têm sido observadas em espécies de *Aspergillus* resistentes ao voriconazol, como *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*. Além disso, outros mecanismos de resistência também podem estar envolvidos, tais como a superexpressão de bombas de efluxo, reduzindo sua concentração intracelular. Outras formas incluem a superexpressão do próprio alvo (CYP51A), o que requer uma concentração mais elevada do antifúngico para saturar todas as moléculas-alvo e alcançar o efeito terapêutico desejado. Ademais, alguns fungos podem formar biofilmes, que são comunidades organizadas de células fúngicas em uma matriz extracelular, proporcionando proteção contra os antifúngicos e dificultando o acesso dos medicamentos ao fungo, tornando-os menos eficazes. A resistência aos antifúngicos é uma preocupação crescente, pois pode limitar as opções de tratamento para infecções fúngicas e levar a desafios clínicos significativos (FERREIRA, 2021).

A ocorrência da resistência aos azóis em *Aspergillus* spp. também tem sido amplamente associada à rota ambiental (Figura 5), especialmente em ambientes agrícolas onde fungicidas da classe dos triazóis são usados para proteção de cultivos. Algumas observações sustentam essa associação: dominância de mutações específicas (TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A) em mais de 80% dos isolados clínicos de pacientes não relacionados epidemiologicamente de diferentes centros, o que indica que essas mutações estão amplamente disseminadas; presença de múltiplas alterações genômicas: o que sugere um método reprodutivo mais complexo, como a reprodução sexual, que é mais provável de ocorrer no meio ambiente, onde diferentes cepas podem se misturar e trocar material genético; uso de fungicidas com resistência cruzada: a introdução de fungicidas inibidores da biossíntese de esteróis da classe dos triazóis, que são estruturalmente semelhantes aos triazóis médicos, ocorreu coincidentemente com o primeiro relato de resistência aos azóis em *Aspergillus* spp. Essa similaridade estrutural pode levar a resistência cruzada entre os fungicidas agrícolas e os antifúngicos azóis utilizados na prática clínica, favorecendo o desenvolvimento de resistência (SHARPE; LAGROU; MEIS *et al.*, 2018). Atualmente, existem 32 fungicidas azólicos disponíveis comercialmente para proteção de cultivos agrícolas, a exemplo: hexaconazol, propiconazol, triadimefon, bitertanol, flusilazol, tebuconazol e triciclazol. Esses fungicidas são utilizados no combate de doenças em plantas

causadas por *Aspergillus*, tais como ferrugem, podridão da fruta, oídio, entre outras. Como consequência desse uso, muitos alimentos apresentam resíduos destas substâncias, como a uva e o morango (SEN; VIJAY; SINGH *et al.*, 2022).

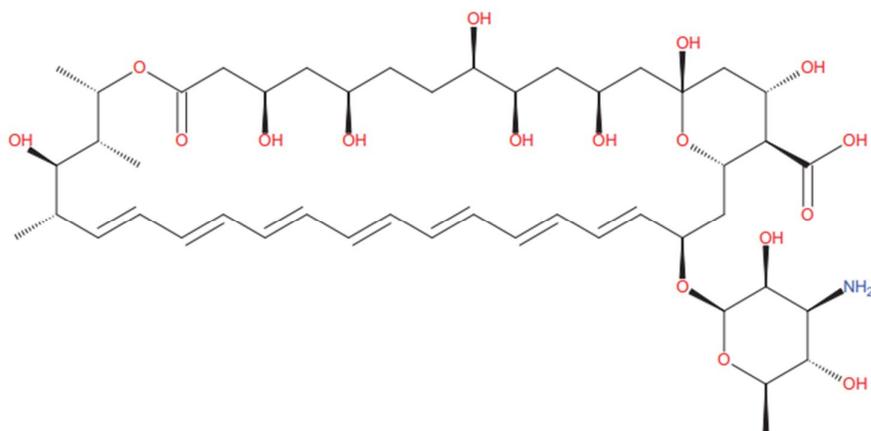
Figura 5. Relação entre a aplicação de antifúngicos azólicos na agricultura e o surgimento de resistência em *Aspergillus* (rota ambiental).



Fonte: Vaezi, Fakhim, Javidnia *et al.* (2018).

Os poliênicos, como a anfotericina B desoxicolato e suas formulações lipofílicas (Figura 6), são drogas fungicidas, que atuam diretamente no ergosterol da membrana citoplasmática fúngica. Ao se ligarem a este lipídeo, provocam desestruturação da membrana, formação de poros e aumento da sua permeabilidade, com consequente perda de cátions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), resultando em um estresse oxidativo intracelular. O aumento da permeabilidade e o desequilíbrio iônico levam à morte celular do fungo, tornando os poliênicos eficazes no tratamento de infecções fúngicas graves (PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022).

Figura 6. Estrutura química da anfotericina B desoxicolato.



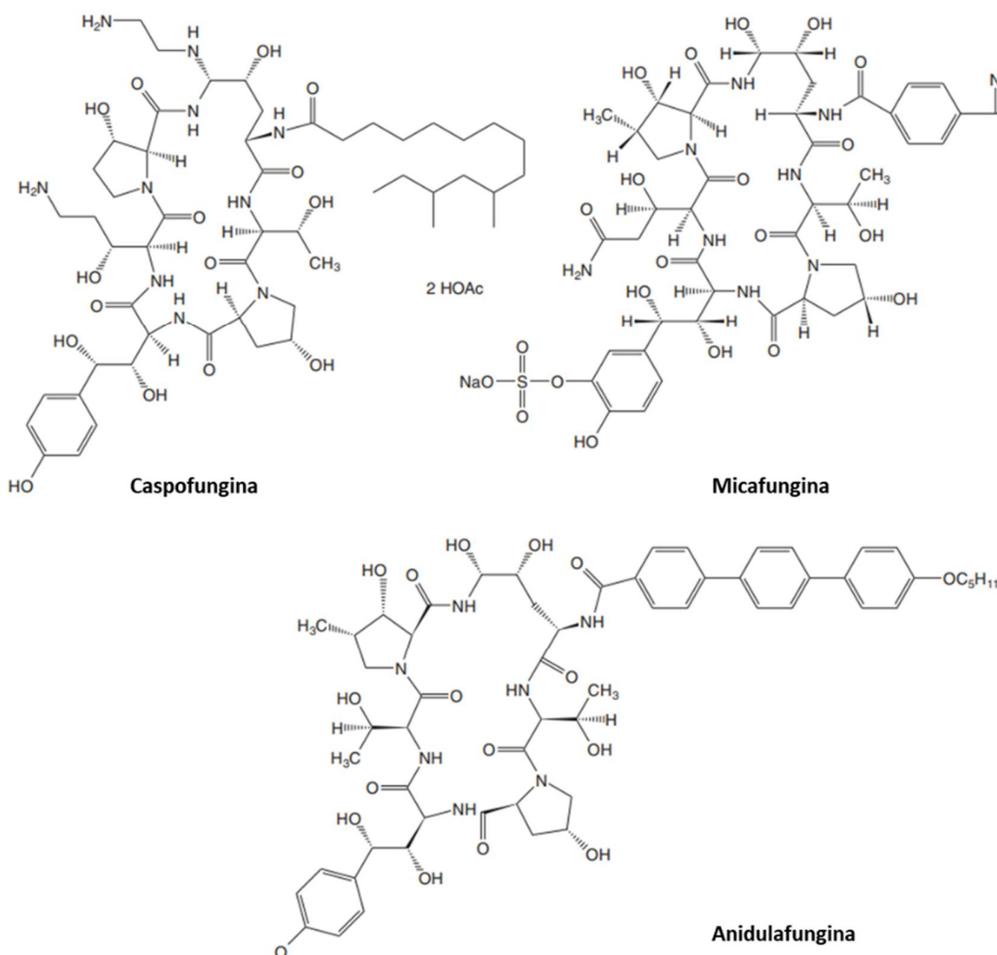
Fonte: Punia, Choudhary, Sharma *et al.* (2022).

Apesar da eficácia da anfotericina B desoxicolato, sua formulação apresenta limitações importantes, como baixa biodisponibilidade e solubilidade, como também uma alta toxicidade. Para superar essas limitações, foram desenvolvidas as formulações lipofílicas, que apresentam um melhor perfil farmacocinético, reduzindo a toxicidade e permitindo uma administração mais segura e eficaz. Os poliênicos são especialmente úteis em casos de pacientes com intolerância a outras classes de antifúngicos, como azólicos e equinocandinas (SILVA, 2020).

Apesar de ser incomum, a literatura científica apresenta relatos de resistência de *Aspergillus* spp. a anfotericina B. Essa resistência pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a capacidade do fungo de produzir altos níveis de enzimas neutralizantes, como catalases e superóxido dismutases, que têm a função de neutralizar os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio geradas pela ação oxidativa da anfotericina B. Ademais, outras alterações genéticas e mecanismos de resistência incluem mutações em genes relacionados ao transporte de membrana e à regulação da expressão gênica. A resistência intrínseca a esse antifúngico, da grande maioria das cepas de *A. terreus*, tem sido demonstrada em estudos *in vivo* e *in vitro* (ZAKARIA; OSMAN; DABBOUSSI *et al.*, 2020).

As equinocandinas (micafungina, caspofungina e anidulafungina), são inibidores da enzima β -(1,3)-glucano sintase, codificada pelos genes FKS1 e FKS2, que é essencial para a síntese do β -(1,3)-D-glucano, um componente fundamental da parede celular dos fungos. Ao inibir essa enzima, impedem a formação adequada da parede celular do fungo, tornando as células fúngicas suscetíveis a fatores externos que levam à sua destruição (Figura 7) (CAMPOY; ADRIANO, 2017; REVIE *et al.*, 2018).

Figura 7. Estrutura química das equinocandinas.



Fonte: Ferreira (2021).

Estes antifúngicos estão disponíveis apenas em formulações intravenosas (FERREIRA, 2021) e seu espectro de ação é restrito aos gêneros *Aspergillus* e *Candida* (CAMPOY; ADRIO, 2017). No tratamento da aspergilose pulmonar invasiva, tem sido considerada terapia de resgate, pois sua eficácia como tratamento de primeira linha é limitada (CADENA; THOMPSON III; CADENA, 2021).

Uma desvantagem significativa das equinocandinas é que possuem apenas atividade fungistática sobre *Aspergillus*, permitindo que sobreviventes sejam selecionados, o que favorece o surgimento de resistência. Tal fato tem sido observado nesse gênero por meio da identificação de mutações nos genes FKS1, que codificam a enzima β -(1,3)-glucano sintase, alvo da classe, conferindo resistência de espécies de *Aspergillus* as equinocandinas (ZAKARIA; OSMAN; DABBOUSSI *et al.*, 2020).

Novos antifúngicos para o tratamento da aspergilose invasiva estão em desenvolvimento e sendo investigados através de ensaios clínicos. Alguns desses novos compostos incluem o fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim e opelconazol. O fosmanogepix atua inibindo uma enzima chamada Gwt1, que é essencial para a formação de glicosilfosfatidilinositol (GPI), um componente importante da membrana citoplasmática fúngica. Ao inibir a síntese de GPI, o fosmanogepix interrompe a integridade da membrana citoplasmática fúngica e leva à morte do fungo. O ibrexafungerp é um novo inibidor da enzima β -(1,3)-glucano sintase, semelhante às equinocandinas, mas com uma formulação oral, o que o torna mais conveniente para o tratamento ambulatorial. O olorofim atua como um inibidor reversível da enzima dihidroorotato desidrogenase (DHODH), que está envolvida na síntese de pirimidinas, o que afeta diretamente a parede celular fúngica e resulta na morte da célula fúngica. O opelconazol é um novo antifúngico da classe dos triazóis (PUNIA; CHOUDHARY; SHARMA *et al.*, 2022; STEMLER; TOBBEN; LASS-FLORL *et al.*, 2023). Esses novos antifúngicos têm o potencial de oferecer novas opções terapêuticas para o tratamento da aspergilose invasiva, especialmente em casos de resistência aos antifúngicos atualmente disponíveis ou quando a terapia oral e ambulatorial é preferível.

A disponibilidade limitada de classes de medicamentos para o tratamento de doenças causadas por *Aspergillus*, especialmente a predominância do uso de azóis, cria um desafio significativo no tratamento das aspergiloses. A resistência aos azóis, tanto adquirida como intrínseca, é uma preocupação crescente, e isso pode restringir ainda mais as opções terapêuticas disponíveis. A prevenção de infecções por *Aspergillus* tem mostrado ser uma abordagem viável, principalmente na aspergilose invasiva, por meio do uso de medicamentos azólicos como profilaxia em pacientes de alto risco. No entanto, o uso generalizado de azóis para a prevenção também pode levar ao surgimento de cepas resistentes (BALTUSSEN; ZOLL; VERWEIJ *et al.*, 2020).

Nesse contexto, é essencial explorar estratégias alternativas para o tratamento das diversas manifestações clínicas da aspergilose, especialmente em populações de alto risco, como pacientes imunocomprometidos. Além disso, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, com mecanismos de ação diferentes dos azóis, é crucial para fornecer opções adicionais de tratamento, especialmente em casos de resistência.

3.3. Produtos naturais: fitoconstituente mirtenol

Apesar de existirem, atualmente, inúmeras estratégias e metodologias utilizadas na descoberta, síntese e desenvolvimento de novos fármacos, a química de produtos naturais se

constitui como uma das mais promissoras alternativas terapêuticas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Por meio do metabolismo secundário das plantas medicinais, é possível isolar moléculas biologicamente ativas, utilizadas como protótipos para o delineamento e planejamento de novos fármacos. Além disso, possuem menor custo quando comparado às pesquisas com moléculas sintéticas (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Acredita-se que exista uma infinidade de compostos de origem natural, com elevado potencial terapêutico, que ainda não foram avaliados. Dessa forma, necessita-se investigar esses produtos a fim de proporcionar um melhor manejo terapêutico (OLIVEIRA, 2019) das patologias causados por fungos.

O reino vegetal representa a principal fonte de interessantes compostos biologicamente ativos, que têm sido utilizados no combate a diversas doenças, tanto em humanos quanto em animais. Nas últimas décadas, o interesse no uso de compostos naturais experimentou um renascimento significativo, principalmente devido aos efeitos colaterais associados ao uso extensivo de drogas sintéticas (MRABI; JAOUADI; ZEOUK *et al.*, 2023).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis obtidas de todas as partes das plantas e se apresentam imiscíveis ou muito pouco miscíveis em água. Há séculos são utilizados no tratamento de infecções e outras doenças em humanos. São odoríferos e atuam em funções importantes à sobrevivência das plantas, estando relacionadas aos mecanismos de defesa, como a proteção contra excesso de radiação ultravioleta, microrganismos, insetos e outros animais (REIS *et al.*, 2020).

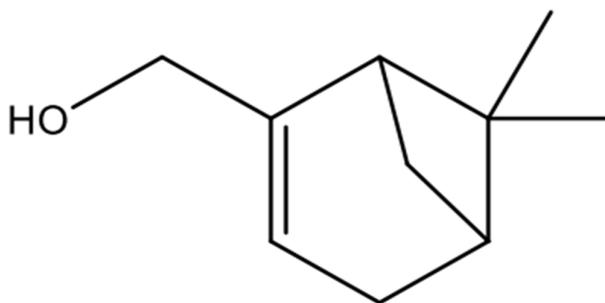
A capacidade dos óleos essenciais de interagir com a membrana citoplasmática fúngica e outras estruturas lipídicas se deve à sua característica lipofílica. Essas substâncias podem exercer seu efeito biológico por meio da inibição de enzimas envolvidas na síntese do ergosterol; pela formação de complexos com este lipídeo; interferindo na síntese de proteínas, na divisão celular ou na biossíntese da parede celular fúngica. Esses efeitos podem resultar na inibição ou morte celular (FERREIRA *et al.*, 2021b).

As atividades biológicas dos óleos essenciais são determinadas pela sua composição química e concentração dos seus constituintes individuais (fitoconstituintes). A diversidade desses compostos contribui para as atividades específicas de cada óleo. Esses fitoconstituintes são compostos naturais produzidos pelas plantas e cada óleo essencial pode conter mais de 60. Os monoterpenos e os sesquiterpenos, são exemplos notáveis desses constituintes (DANTAS, 2017; POWER; OSIER; MCFETERS *et al.*, 2018).

Neste cenário, encontra-se o mirtenol (Figura 8), também conhecido como “cis-mirtenol” ou somente “mirtenol”, com fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ (152,24 g/mol). Um

fitoconstituente da classe dos monoterpenos e representante do grupo químico dos álcoois monocíclicos, sendo suas formas isoméricas (+)-mirtenol e (-)-mirtenol, provavelmente, as mais versáteis (MOREIRA, 2013). Pode ser obtido a partir da oxidação do α -pineno e possui uma ampla utilização como ingrediente de fragrâncias de cosméticos diversos (OLIVEIRA, 2019). Foram elencadas diversas espécies aromáticas onde esse fitoconstituente pode ser encontrado, a exemplo: *Myrtus communis* L., da família *Myrtaceae*, *Tanacetum vulgare* L. (*Magnoliopsida*), *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*) e *Artemisia vulgaris* L. (*Asteraceae*) (MRABI; JAOUADI; ZEOUK *et al.*, 2023).

Figura 8. Estrutura química do monoterpeno mirtenol.



Fonte: Mrabi, Jaouadi, Zeouk *et al.* (2023).

Este monoterpeno apresenta importantes propriedades biológicas relatadas. Tendo a sua atividade sido constatada sobre o Sistema Nervoso Central, com uma potente propriedade neuroléptica, anticonvulsivante e ansiolítica. Além dessas, efeito antioxidante em testes *in vivo* e *in vitro*, sendo considerada uma substância neuroprotetora contra possíveis danos degenerativos celulares, ocasionados por doenças neurodegenerativas (MOREIRA, 2013). Outra importante propriedade reconhecida foi a de cardioproteção, via atenuação do estresse oxidativo e inibição da via pró-apoptótica (BRITTO *et al.*, 2018). Ademais, apresenta atividade anti-inflamatória e analgésica (DE OLIVEIRA, 2019). E, ainda, propriedades antidiabéticas, anti-hipertensivas, anticancerígenas, antifúngicas e antibacterianas (MRABI; JAOUADI; ZEOUK *et al.*, 2023).

A segurança da ingestão de mirtenol, nos níveis atuais considerados, foi avaliada pela International Joint/WHO Expert Comitê de Aditivos Alimentares, que não constatou problemas na sua utilização. Na análise toxicológica feita em modelo animal (rato), a dose oral mediana letal (LD50) de 1,4 g/kg apresentou baixa toxicidade (MRABI; JAOUADI; ZEOUK *et al.*, 2023). Este resultado é corroborado por estudo realizado por Maione *et al.* (2022), onde o

mirtenol não apresentou toxicidade em ensaios envolvendo o invertebrado *Galleria mellonella* e em células de queratinócitos humanos. Além disso, apresentou características de um agente profilático, sendo capaz de prolongar a sobrevivência das larvas após a infecção com *Candida auris*/*Klebsiella pneumoniae*.

O potencial teórico de mirtenol como candidato a uma nova droga foi avaliado por meio de parâmetros *in silico* por Cordeiro *et al.* (2020). Os resultados obtidos demonstram que esse fitoconstituente possui um perfil farmacocinético favorável, expressando características sugestivas de um bom candidato a fármaco, com perspectiva de uso por via oral. A excelente biodisponibilidade oral teórica e boa solubilidade demonstrada, pode garantir uma adequada absorção e distribuição *in vivo*. Dessa forma, mirtenol se apresenta como uma substância promissora.

4. METODOLOGIA

4.1. Local de desenvolvimento da pesquisa

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba.

4.2. Fitoconstituente mirtenol e antifúngicos licenciados

O monoterpeno selecionado para esta pesquisa foi obtido da Sigma-Aldrich® e fornecido pelo pesquisador Dr. José Maria Barbosa Filho do DCF/CCS/UFPB. Os antifúngicos sintéticos anfotericina B e voriconazol (Sigma-Aldrich®) foram utilizados como controle, sendo selecionados para a execução dos ensaios por se tratar de antifúngicos utilizados na condição clínica em estudo.

As substâncias foram preparadas no momento da execução dos ensaios, sendo pesadas na concentração inicial de 1.024 µg/mL, devidamente solubilizados em 150 µL (3%) de Dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80. O volume final foi obtido por meio da adição de água destilada estéril q.s.p. 5 mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

O desinfetante e sanitizante de uso ambiental, composto por ácido peracético em pó (PAC 200®), também foi utilizado neste estudo. O produto foi preparado nas concentrações

estabelecidas pelos fabricantes (500 µg/mL, 1.000 µg/mL e 10.000 µg/mL), para obtenção de desinfecção nos diversos níveis/aplicações.

4.3. Meios de cultura

Para a manutenção das cepas de *A. niger* e realização dos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados os meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) da *Difco Laboratories Ltd USA* e o *Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)*, com glutamina e sem bicarbonato, da *Sigma Aldrich*[®]. Os meios foram preparados e mantidos conforme recomendações dos fabricantes.

4.4. Cepas de *Aspergillus niger*

Para a realização dos ensaios microbiológicos foram utilizadas 15 cepas de *A. niger*, sendo 01 da linhagem padrão *American Type Culture Collection (ATCC*[®]*-6275)* e 14 de origem ambiental (LM-03, LM-18, LM-30, LM-36, LM-53, LM-72, LM-100, LM-120, LM-135, LM-178, LM-214, LM-345, LM-410 e LM-510). As cepas foram mantidas em tubos de ensaio (15x150 milímetros) contendo ASD inclinado (*Difco*[®]), sob refrigeração (8° C) até o momento da execução do ensaio.

As linhagens de *A. niger* utilizadas foram obtidas da coleção da Micoteca do Laboratório de Pesquisa em Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos do DCF/CCS/UFPB. Estão cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN) sob o número A359BED.

Para os ensaios de investigação do mecanismo de ação antifúngica de mirtenol e cinética de crescimento micelial, duas cepas representativas de *A. niger* foram selecionadas, aleatoriamente, entre as cepas que exibiram as menores CIM's, sendo 01 cepa padrão (ATCC-6235) e 01 cepa de origem ambiental (LM-03).

4.5. Inóculo fúngico

Para o preparo do inóculo dos fungos, antes da realização dos ensaios microbiológicos, colônias de *A. niger* foram semeadas em ASD e incubadas a 35±2°C por 3-5 dias, para otimização do crescimento fúngico. Após esse período, colônias dessas culturas fúngicas foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e por meio de leves agitações, obteve-se as suspensões. As misturas resultantes de conídios e fragmentos de hifas foram

retiradas e transferidas para tubos de ensaio esterilizados. Seguidamente, foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vórtex. Após agitação, a sua turbidez foi comparada e ajustada a apresentada pela suspensão padrão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala *McFarland*, a qual corresponde a um inóculo com aproximadamente 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN *et al.*, 2004; CLSI, 2008).

4.6. Avaliação da atividade antifúngica

4.6.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de determinação da CIM de mirtenol, voriconazol, anfotericina B e PAC 200[®] sobre cepas de *A. niger* foram realizados conforme os protocolos de Cleenland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008), em triplicata, pela técnica de microdiluição em caldo, em placa contendo 96 poços e com fundo em “U” (INLAB, São Paulo). Para essa finalidade, inicialmente, em todos os poços da placa foram adicionados 100 µL do meio de cultura líquido RPMI 1640. Logo após, 100 µL do produto investigado foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa, na concentração inicial de 1.024 µg/mL. Seguidamente, através de uma diluição seriada em uma razão de dois (2:1), obteve-se concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL das suspensões fúngicas nas cavidades da placa, onde cada coluna corresponde, especificamente, a uma cepa fúngica de *A. niger*.

Simultaneamente, objetivando garantir a esterilidade do meio de cultura, realizou-se um controle no qual foram adicionados 200 µL do caldo RPMI 1640 nas cavidades da placa destinadas a essa finalidade, na ausência da suspensão fúngica. A viabilidade das cepas foi verificada por meio da adição de 100µL de RPMI 1640; 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada cepa fúngica.

As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 por 3-5 dias. Após esse período, foi realizada a leitura do ensaio. O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% do crescimento das cepas de *A. niger* utilizadas nos ensaios.

O valor da CIM foi considerado como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível de *A. niger*, quando comparado ao controle de crescimento sem a presença dos produtos testados. A CIM obtida nos três ensaios foi interpretada e considerada de acordo com os critérios estabelecidos por Sartoratto *et al.* (2004). Segundo os autores, uma substância apresenta forte atividade antifúngica sobre os microrganismos testados quando exibe uma CIM

de até 500 µg/mL, moderada atividade de 600-1500 µg/mL e fraca atividade ou produto inativo, quando são obtidos valores superiores a 1500 µg/mL.

4.6.2. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CFM foi realizada após a obtenção e interpretação dos valores da CIM dos produtos investigados pelo ensaio descrito no item 4.6.1. A princípio, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades da placa onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico visível (CIM, CIMx2 e CIMx4), foram transferidas para uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de caldo RPMI 1640. Finalmente, o sistema foi incubado a 35±2°C por 3-5 dias. A CFM foi considerada como a menor concentração de mirtenol, voriconazol e anfotericina B, onde não foi observado crescimento fúngico visível. Este ensaio foi realizado em triplicata e o seu resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os controles de esterilidade do meio de cultura e da viabilidade das suspensões fúngicas foram realizados neste ensaio, semelhante ao descrito no item 4.6.1.

A investigação do modo de ação do produto teste, a partir da razão CFM/CIM, considerou a metodologia utilizada por Santos *et al.* (2014), para especificar a natureza do efeito antimicrobiano. Dessa forma, substâncias com a razão CFM/CIM ≤ 4, são consideradas fungicidas; e quando obtida uma razão CFM/CIM > 4, fungistática.

4.6.3. Determinação da cinética de crescimento micelial de *Aspergillus niger*

Este ensaio consistiu na avaliação do efeito de mirtenol e dos antifúngicos padrões sobre o crescimento micelial radial de *A. niger*, através da técnica de diluição em meio sólido, descrita por Thyagaraja e Hosono (1996), Adan (1998) e por Daferera, Ziogas, Polission (2003), com algumas modificações.

Para sua execução, inicialmente, uma porção de 2 mm de diâmetro foi obtida de uma cultura com crescimento de 3-5 dias, em ASD a 35±2 °C e adicionada no centro de uma placa de Petri estéril contendo o meio ASD acrescido do produto investigado nas concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4. O sistema foi incubado a 35±2 °C, em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4 dias). Com o auxílio de um paquímetro, o crescimento micelial radial das cepas fúngicas foi medido diariamente e o resultado expresso em milímetros (mm).

Os controles foram realizados por meio da medida do crescimento micelial fúngico em ASD na ausência do produto investigado. Os experimentos foram realizados em triplicata, de

forma independente e seus resultados expressos a partir da média \pm erro padrão dos três experimentos.

4.6.4. Ação dos produtos na parede celular fúngica: ensaio com sorbitol

Os possíveis danos provocados pelo monoterpene aos componentes da parede celular fúngica foram investigados neste ensaio, que comparou o valor da CIM obtida na presença de sorbitol adicionado ao meio de cultura a 0,8 M, com a CIM obtida na sua ausência. O sorbitol é um protetor osmótico, empregado na estabilização dos protoplastos fúngicos. Caso o efeito de mirtenol ocorra pela sua ação nessa estrutura, ele provocará o rompimento de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico; no entanto, permitirá seu crescimento na presença desse suporte, como consequência disso, o valor da CIM aumenta (SILVA, 2020).

O ensaio foi realizado pelo método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (INLAB, SP) e em triplicata, semelhante ao item 4.6.1. Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de RPMI 1640, previamente acrescido de sorbitol (PM: 182,17) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Em seguida, 100 μ L de mirtenol foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de 1024 μ g/mL até 0,5 μ g/mL de mirtenol. Tratando-se do sorbitol, uma concentração final de 0,8 M foi obtida em cada cavidade. Por fim, 10 μ L da suspensão de *A. niger* foi adicionada nas cavidades, onde cada coluna da placa se refere a uma cepa fúngica, especificamente. Os controles de esterilidade do meio (RPMI 1640) e de viabilidade das cepas (RPMI + água destilada estéril + suspensão de cada espécie) foram realizados conforme descrito no item 4.6.1. As placas foram incubadas a 35 ± 2 por 3-5 dias. Após esse período, realizou-se a leitura do ensaio (FROST *et al.*, 1995; ZACCHINO, 2001).

4.6.5. Ação dos produtos sobre a membrana citoplasmática: interação com ergosterol

Este ensaio permitiu avaliar o efeito de mirtenol sobre a membrana citoplasmática de *A. niger* através da técnica de microdiluição, em placas de microtitulação de 96 poços com fundo “U”, em triplicata, semelhante ao descrito no item 4.6.1. Essa avaliação foi realizada por meio da comparação da CIM obtida na ausência de ergosterol, com a CIM obtida na presença de 400 μ g/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®), adicionado ao meio líquido RPMI 1640. O ergosterol é um componente essencial da membrana citoplasmática fúngica, dessa forma, o efeito antifúngico do fitoconstituente pode ocorrer por meio da sua ligação direta a esse lipídeo ou por

meio da inativação de enzimas implicadas na sua síntese. Para fins de comparação, o mesmo procedimento foi executado com o antifúngico sintético anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve sua ligação ao ergosterol presente na membrana citoplasmática fúngica. As placas foram incubadas a 35 ± 2 por 3-5 dias para realização da leitura. Um controle de esterilidade do meio (RPMI 1640) e de viabilidade das cepas de *A. niger* (RPMI + água destilada estéril + suspensão de cada espécie) foi realizado conforme descrito no item 4.6.1. (ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.6.6. Ensaio de associação através do método *Checkerboard*.

O efeito da combinação de mirtenol com os antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B foi determinado através da técnica *Checkerboard* utilizando uma placa de microtitulação com 96 poços com fundo em forma de “U”. Para a realização desse ensaio, 100 μ L de caldo RPMI 1640 foram distribuídos nas cavidades da placa. Posteriormente, 50 μ L de mirtenol em diversas concentrações (CIM \times 8, CIM \times 4, CIM \times 2, CIM, CIM \div 2, CIM \div 4, CIM \div 8) foram distribuídos no sentido vertical e 50 μ L do antifúngico (voriconazol/anfotericina B), nas mesmas concentrações, foram adicionados no sentido horizontal da placa. Como última etapa, 20 μ L das suspensões de *A. niger* foram acrescentados em todas as cavidades da placa. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3-5 dias. Após esse período, foi feita a leitura das placas e a interpretação dos valores das CIM's obtidas nas combinações (LEWIS *et al.*, 2002). Os controles de esterilidade do meio e viabilidade das cepas foram realizados de forma semelhante ao descrito no item 4.6.1.

A concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, onde o A representa o mirtenol e B o voriconazol ou anfotericina B, conforme as equações apresentadas:

$$\text{CIF}^{\text{A}} = \frac{\text{CIM do produto A na combinação}}{\text{CIM do produto A individual}}$$

e

$$\text{CIF}^{\text{B}} = \frac{\text{CIM do produto B na combinação}}{\text{CIM do produto B individual}}$$

Após a obtenção da CIF, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado por meio da equação: $\text{ICIF} = \text{CIF}^{\text{A}} + \text{CIF}^{\text{B}}$. O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo ($\text{ICIF} \leq 0,5$); aditividade ($\text{ICIF} > 0,5$ e < 1); indiferença ($\text{ICIF} \geq 1$ e < 4) ou antagonismo ($\text{ICIF} \geq 4,0$) (LEWIS *et al.*, 2002; CORREA-ROYERO *et al.*, 2010).

4.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas neste estudo foram definidas conforme as especificidades de cada ensaio microbiológico realizado. Para isso, foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias, considerando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ARTIGO 1: Artigo submetido na revista Fitos (Fiocruz).

Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos sobre cepas de *Aspergillus niger*

Evaluation of the antifungal activity of myrtenol and the effect of its association with antifungals on strains of *Aspergillus niger*

Nayana da Rocha Oliveira¹

Brenda Kercya da Silva Ferreira¹

Thompson Lopes de Oliveira³

André Azevedo dos Santos²

Emmanuel Melquíades Araújo¹

Edeltrudes de Oliveira Lima³

1. Mestranda em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba.

2. Doutorando em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba.

3. Docente. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba.

ARTIGO DE PESQUISA

Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos sobre cepas de *Aspergillus niger*

Evaluation of the antifungal activity of myrtenol and the effect of its association with antifungals on strains of *Aspergillus niger*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do fitoconstituente mirtenol isolado e associado com os antifúngicos padrões anfotericina B e voriconazol sobre cepas de *Aspergillus niger*. Para isto, foram realizados os ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); e de associação, através do método *Checkerboard*. O mirtenol apresentou forte atividade antifúngica sobre todas as cepas de *A. niger* testadas, com um valor de CIM de 64 µg/mL e CFM de 256 µg/mL; exibindo ação fungicida. A associação de mirtenol com a anfotericina B resultou em sinergismo e aditividade e quando associado com o voriconazol, o sinergismo ocorreu sobre a cepa teste. Os resultados obtidos evidenciam a capacidade antifúngica de mirtenol nos diferentes testes aplicados, sendo uma alternativa para o desenvolvimento de fármaco com potencial atividade e controle da aspergilose.

Palavras-chave: Síndrome do edifício doente. Arpergilose. Atividade antimicrobiana. Fitoconstituente. Monoterpeno.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the phytoconstituent myrtenol isolated and associated with the standard antifungals amphotericin B and voriconazole on strains of *Aspergillus niger*. For this, tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimum Fungicide Concentration (MFC); and association, through the *Checkerboard* Method.

Myrtenol showed strong antifungal activity against all *A. niger* strains tested, with a MIC value of 64 µg/mL and CFM of 256 µg/mL; exhibiting fungicidal action. The association of myrtenol with amphotericin B resulted in synergism and additivity and when associated with voriconazole, synergism occurred on the test strains. The results obtained show the antifungal capacity of myrtenol in the different tests applied, being an alternative for the development of a drug with potential activity and control of aspergillosis.

Keywords: Sick building syndrome. Arpergillosis. Antimicrobial activity. Phytoconstituent. Monoterpene.

1. Introdução

Os relatos iniciais de como o ambiente construído, a exemplo dos edifícios, poderia representar uma fonte de transmissão de agentes infecciosos, resultaram da contaminação do ar por esporos de *Aspergillus* ^[1]. A Síndrome do Edifício Doente (SED) é um exemplo clássico do efeito de um ambiente contaminado na saúde humana ^[2].

A ocorrência da SED é evidenciada em situações nas quais as pessoas experimentam mal-estar e sensação de desconforto relacionados com o tempo que permanecem em uma determinada edificação, sem que haja, necessariamente, uma doença ou causa específica identificada. Seus sintomas característicos, que podem ocorrer isoladamente ou em combinação, incluem dor de cabeça, irritação nos olhos, nariz ou garganta, tosse seca, pele seca ou com coceira, tontura e náusea, dificuldade de concentração, fadiga e sensibilidade a odores. A SED pode afetar os ocupantes de praticamente qualquer edificação, seja um escritório, uma escola, um museu, um complexo de apartamentos ou um hospital ^[2].

Há muitos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos pelo ar, a exemplo os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* e bactérias como *Staphylococcus aureus* ^[3]. Dentre as espécies do gênero *Aspergillus*, tem se destacado *Aspergillus niger*, reconhecida como um dos principais patógenos ambientais ^[4], consistindo em um fungo filamentosos capaz de se propagar pelo ar e que, quando inalado, pode desencadear desde quadros alérgicos leves, até complicações mais severas e fatais, como a aspergilose ^[5].

Apesar da aspergilose ser caracterizada inicialmente pelo comprometimento broncopulmonar, há a possibilidade de se disseminar e comprometer diversos órgãos, de modo que em suas formas crônicas, invasivas e alérgicas é responsável por cerca de 600.000 mortes anualmente [5].

Nas últimas décadas, a incidência da aspergilose invasiva aumentou consideravelmente. Dentre os fatores associados à progressão dessa doença estão os pacientes com comorbidades, especialmente do trato respiratório; transplantados; em uso contínuo de drogas, como os corticosteroides; e com insuficiência respiratória aguda devido à disseminação da COVID-19 [6].

Atualmente, o tratamento da aspergilose se baseia em três principais classes de antifúngicos, sendo elas: triazólicos (voriconazol e itraconazol); poliênico (anfotericina B) e equinocandinas (caspofungina e micafungina) [7]. Todavia, a resistência aos antifúngicos utilizados nas terapias atuais, bem como, os seus níveis de toxicidade elevada, evidenciam a urgente necessidade da descoberta de novas fontes de substâncias antifúngicas. Como alternativa a esses tratamentos, o uso das plantas medicinais, seus óleos essenciais e os seus fitoconstituintes têm sido amplamente estudados.

Nesse contexto, destaca-se o mirtenol, um álcool bicíclico da classe dos monoterpenos, extraído do óleo essencial de algumas espécies vegetais aromáticas, a exemplo *Tanacetum vulgare* L., *Myrthus comunis* L e *Paeonia Lactiflora* Pall. Esse fitoconstituente apresenta registros de propriedades biológicas diversas, como a ação neuroprotetora, neuroléptica, anticonvulsivante e ansiolítica [8]. Outras atividades foram constatadas em estudos a partir do mirtenol, como: analgésica, anti-inflamatória [9] e antifúngica [10] frente *Candida* spp., apresentando-se, desse modo, como uma substância promissora.

Considerando a importância clínica da aspergilose e o elevado potencial biológico apresentado pelos monoterpenos, esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger*.

2. Materiais e métodos

2.1. Local de desenvolvimento do estudo

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos

do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba.

2.2. Produto mirtenol e antifúngicos licenciados

O fitoconstituente mirtenol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) foi fornecido pelo pesquisador Dr. José Maria Barbosa Filho do CCS/DCF/UFPB, João Pessoa, Brasil. Os antifúngicos padrões utilizados foram: anfotericina B e voriconazol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.).

Para a realização dos ensaios de atividade antifúngica, as referidas substâncias foram pesadas na concentração inicial de 1.024 µg/mL, solubilizadas em 150 µL (3%) de Dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80. O volume final foi obtido com o acréscimo de água destilada estéril q.s.p. 5 mL ^[11].

Ademais, este estudo também permitiu a avaliação do efeito antifúngico de uma substância sanitizante de uso ambiental, o ácido peracético em pó (PAC 200[®]), sobre cepas de *A. niger*. Este produto foi obtido da Adhetech Química Indústria e Comércio Ltda., com registro na ANVISA sob o nº 317140074. O sanitizante foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante (500 µg/mL, 1.000 µg/mL e 10.000 µg/mL), que corresponde as concentrações necessárias para desinfecção nos diferentes níveis/aplicações.

2.3. Cepas de *Aspergillus niger*

Para este estudo foram utilizadas 15 cepas de *A. niger*, sendo 14 dessas provenientes de isolado ambiental (LM-03, LM-18, LM-30, LM-36, LM-53, LM-72, LM-100, LM-120, LM-135, LM-178, LM-214, LM-345, LM-410, LM-510) e 01 da linhagem padrão - American Type Culture Collection - ATCC[®] (ATCC-6275). As cepas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Pesquisa em Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, da UFPB e estão cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN), sob o número A359BED.

No preparo dos inóculos, as colônias obtidas de culturas das cepas fúngicas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de McFarland para obtenção de 10⁶ UFC/mL ^[11, 12].

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

A determinação da CIM de mirtenol, voriconazol, anfotericina B e PAC 200[®] sobre cepas de *A. niger* foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, com placa de microtitulação contendo 96 poços, com fundo em “U” (INLAB, São Paulo). Para isso, inicialmente, 100 µL do caldo RPMI-1640 com L-glutamina e sem bicarbonato foram adicionados em todas as cavidades da placa. Seguidamente, 100 µL dos produtos testados foram adicionados nas cavidades da primeira linha, na concentração inicial de 1.024 µg/mL. Posteriormente, através de uma diluição seriada em uma razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo de *A. niger*, correspondendo a aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Deste modo, cada coluna da placa corresponde a uma cepa fúngica. As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação em temperatura de 35 ± 2°C por 3-5 dias. Após o período, realizou-se a leitura do ensaio. A CIM dos produtos avaliados foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visível, quando comparado com o controle de crescimento sem o produto testado. Considerou-se o produto ativo quando inibiu, pelo menos, o crescimento de 50% das cepas fúngicas investigadas^[11,12,13].

Na interpretação dos valores das CIM's obtidas foram considerados os critérios estabelecidos por Sartoratto *et al.*^[14], que considera uma substância com uma forte atividade sobre os microrganismos testados quando apresenta uma CIM de até 500 µg/mL; atividade moderada (600-1500 µg/mL) e fraca atividade ou produto inativo, quando superior a 1500 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos valores das CIM's obtidas. Além desse, realizou-se, simultaneamente, os controles de viabilidade das cepas (RPMI + suspensão fúngica) e da esterilidade do meio de cultura (RPMI).

A determinação da CFM foi realizada após a obtenção e interpretação dos valores das CIM's obtidas. Com esse objetivo, 10 µL da menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento fúngico visível, bem como das duas concentrações superiores (CIMx2) e (CIMx4), foram transferidas para as cavidades estéreis de uma nova placa de microdiluição de 96 poços contendo 100 µL de RPMI-1640. O sistema foi incubado a 35 ± 2°C por 3-5 dias. A CFM foi considerada como a menor concentração dos produtos onde não houve crescimento fúngico visível^[15,16].

Avaliou-se, ainda, o modo de ação da substância teste a partir da razão CFM/CIM, baseando-se na metodologia utilizada por Santos *et al.* (2014) [17] para especificar a natureza do efeito antimicrobiano. Segundo os autores, substâncias que apresentam na sua razão CFM/CIM valores inferiores a 04 são consideradas fungicidas, e quando obtidos valores superiores a 04, fungistática.

2.5. Ensaio *Checkerboard* – Estudo de associação entre mirtenol, anfotericina B e voriconazol

O efeito da associação de mirtenol com os antifúngicos padrões anfotericina B e voriconazol foi determinado através da técnica de *Checkerboard* para derivação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). No ensaio, 100 µL de RPMI-1640 foram distribuídos nas cavidades da placa de microtitulação de 96 poços com fundo em forma de “U”. Em seguida, 50 µL de mirtenol em concentrações estabelecidas (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4, CIM÷8) foram adicionados no sentido vertical e 50 µL do antifúngico padrão, também, em diferentes concentrações, foram adicionados no sentido horizontal nos poços da placa. A última etapa consistiu na adição de 20 µL da suspensão fúngica, previamente ajustada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland. O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3-5 dias, e após esse período, realizou-se a sua leitura objetivando averiguar se houve inibição ou crescimento fúngico visível [18].

Na avaliação do grau de eficiência da forma combinada do fitoconstituente com o antifúngico padrão, a concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada produto utilizado na associação, onde $CIF_A = \text{CIM do produto A na combinação} \div \text{CIM do produto A individual}$ e $CIF_B = \text{CIM do produto B na combinação} \div \text{CIM do produto B individual}$. Posteriormente, o ICIF foi calculado através da equação: $ICIF = CIF_A + CIF_B$. E a partir do efeito produzido no teste o valor obtido foi interpretado da seguinte forma: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$); aditividade ($ICIF > 0,5$ e < 1); indiferença ($ICIF \geq 1$ e < 4) ou antagonismo ($ICIF \geq 4,0$) [19,20].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A avaliação da CIM é um parâmetro determinante na análise da suscetibilidade de um microrganismo em testes com substâncias específicas. O método de diluição em caldo é considerado um dos mais adequados para essa determinação, pois permite obter uma avaliação quantitativa e qualitativa confiável. A validação desse método é confirmada pela ausência de crescimento fúngico no controle de esterilidade e pela presença de crescimento no controle de viabilidade do microrganismo [16].

Os resultados da média aritmética (n=3) das CIM's e das CFM's obtidas estão apresentados na **TABELA 1**.

TABELA 1. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de mirtenol, voriconazol, anfotericina B e PAC 200® sobre cepas de *Aspergillus niger*.

Cepas de <i>A. niger</i>	mirtenol (µg/mL)		voriconazol (µg/mL)		anfotericina B (µg/mL)		PAC 200® (µg/mL)	Controle da cepa	Controle do meio
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM		
ATCC-6275	64	128	1	4	4	4	10.000	+	-
LM-03	64	128	2	4	4	16	10.000	+	-
LM-18	64	512	2	4	4	4	10.000	+	-
LM-30	64	512	1	4	2	8	10.000	+	-
LM-36	64	512	1	4	2	8	10.000	+	-
LM-53	64	512	1	4	2	4	10.000	+	-
LM-72	64	256	2	4	2	8	10.000	+	-
LM-100	256	256	2	4	4	8	10.000	+	-
LM-120	64	256	2	4	4	4	10.000	+	-
LM-135	64	512	1	4	4	4	10.000	+	-
LM-178	64	256	1	4	4	8	10.000	+	-
LM-214	64	256	2	4	4	4	10.000	+	-
LM-345	64	256	2	4	4	8	10.000	+	-
LM-410	64	256	2	4	4	8	10.000	+	-
LM-510	128	256	2	4	4	8	10.000	+	-

Fonte: Elaboração própria (2023).

Através da análise dos resultados obtidos, pode-se observar que o mirtenol apresentou uma CIM₈₀ de 64 µg/mL, concentração que inibiu 13 (86,7%) das 15 cepas de *A. niger* investigadas. Este resultado é promissor, visto que, segundo Sartoratto *et al.* [14], substâncias com valores da CIM variando de 50 a 500 µg/mL, apresentam uma atividade antifúngica considerada forte/ótima.

Os resultados apresentados estão em convergência com os obtidos em estudo realizado por Nikitina *et al.* [21], que avaliou a atividade biológica de 16 álcoois monoterpenos sobre fungos filamentosos e leveduras. Entre as substâncias estudadas, a atividade antifúngica mais significativa foi observada para o mirtenol, que apresentou uma forte atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, com uma CIM de 23,5 µg/mL contra *Candida albicans*; 47,0 µg/ml sobre *Rhizopus nigricans* 600 e *A. fumigatus* A-1320-13 e de 23,5 µg/mL sobre *Fusarium solani* F-417. Além disso, exibiu resultados superiores aos obtidos para o antifúngico fluconazol, com uma CIM 06 vezes menor sobre fungos filamentosos [21]. Cavalcanti *et al.* [10] obteve resultado semelhante, com a CIM de mirtenol variando de 256-512 µg/mL sobre *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com inibição de 100% das cepas e com uma CFM de 512 µg/mL, apresentando carácter fungicida.

O sanitizante utilizado nesse estudo, é um produto a base de ácido peracético em pó (PAC 200®). Essa substância é biodegradável, e apresenta um alto poder biocida, apresentando diversas aplicações. Além disso, ainda que em baixas concentrações (<0,3%), apresenta uma notável atividade na eliminação de esporos, bactérias, vírus e fungos [22]. No entanto, na presente pesquisa, a inibição do crescimento fúngico apenas foi observada na sua maior concentração recomendada para obtenção de efeito antifúngico (10.000 µg/mL), inibindo 100% das cepas. Esse dado é semelhante ao encontrado por Dantas [22], ao avaliar sua atividade antifúngica sobre cepas de *Penicillium citrinum*. Deste modo, o efeito antifúngico de PAC 200® se mostrou inferior ao obtido para o mirtenol sobre cepas de *A. niger* de origem ambiental.

Tratando-se do voriconazol, antifúngico azólico, considerado primeira escolha no tratamento da aspergilose, sua CIM₆₀ foi definida em 2,0 µg/mL e nesta concentração, a droga foi capaz de inibir 09 (60%) das 15 cepas de *A. niger*. A anfotericina B, antifúngico da classe dos poliênicos e segunda escolha nas infecções por *Aspergillus*, apresentou uma CIM₈₀ de 4,0 µg/mL, com inibição do crescimento de 12 das 15 cepas (80%). Valores definidos conforme inibição de pelo menos 50% das cepas avaliadas.

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade antimicrobiana de leveduras e fungos filamentosos de importância clínica a agentes antifúngicos, o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) e o Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), propuseram "valores de corte" ou *breakpoints* na interpretação dos resultados da CIM dos antifúngicos testados [6]. Esses valores são

utilizados como preditores do sucesso clínico da terapia, no entanto, não devem ser considerados de forma isolada, mas sim, associados a outros fatores prognósticos relevantes em cada caso.

De acordo com o documento M38-A do CLSI^[12], a CIM da anfotericina B contra a maioria dos fungos filamentosos, comumente, varia de 0,5 a 2,0 µg/mL. Embora haja poucos dados disponíveis sobre a relação entre a CIM e o resultado do tratamento com anfotericina B, valores da CIM acima de 2,0 µg/mL foram associadas a um resultado insatisfatório da terapia antifúngica, enquanto CIM's abaixo de 2,0 µg/mL, com uma cura clínica. Esse resultado foi observado em 28 pacientes submetidos ao tratamento com anfotericina B para aspergilose invasiva causada por *A. fumigatus* (08 casos), *A. flavus* (12 casos) e *A. terreus* (09 casos). O documento não fornece dados sobre a correlação entre a CIM e o resultado do tratamento com voriconazol.

O EUCAST^[23] definiu que valores da CIM $\leq 1,0$ µg/mL de anfotericina B sobre cepas de *A. niger* indicam sensibilidade e valores superiores a 1 µg/mL, resistência. Para o voriconazol, relatam evidência insuficiente de que essa espécie seja um bom alvo para o referido fármaco. Isto posto, analisando comparativamente os valores da CIM da anfotericina B, com os valores de corte supracitados, as cepas de *A. niger* avaliadas se apresentaram resistentes à anfotericina B. Esse resultado converge com a literatura científica que apresenta relatos de resistência de *Aspergillus* spp. a anfotericina B.

A resistência de *Aspergillus* spp. à anfotericina B ainda não é completamente compreendida. No entanto, existem dois mecanismos que parecem estar envolvidos: o aumento da produção de catalases, que protegem a célula fúngica do estresse oxidativo causado pelo antifúngico e a diminuição da concentração de ergosterol na membrana celular, como uma consequência de mutações na via de síntese^[24].

A partir do resultado da CIM, foi realizado o ensaio de determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) para em seguida determinar a natureza fungicida/fungistática de mirtenol (**TABELA 2**). O valor da CFM de mirtenol foi estabelecido em 256 µg/mL, concentração na qual inibiu 08 (53,3%) das 15 cepas de *A. niger*. Desse modo, fundamentando-se nos critérios utilizados por Santos *et al.*^[17], o mirtenol apresentou, no presente estudo, natureza fungicida para 10 (CFM/CIM ≤ 4) das 15 cepas testadas (66,7%).

TABELA 2. Resultado da razão CFM/CIM de mirtenol, voriconazol e anfotericina B sobre cepas de *Aspergillus niger*.

Cepas de <i>A. niger</i>	mirtenol ($\mu\text{g/mL}$)		voriconazol ($\mu\text{g/mL}$)		anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)	
	CFM/CIM	Efeito	CFM/CIM	Efeito	CFM/CIM	Efeito
ATCC-6275	128/64=2	Fungicida	4/1=4	Fungicida	4/4=1	Fungicida
LM-03	128/64=2	Fungicida	4/2=2	Fungicida	16/4=4	Fungicida
LM-18	512/64=8	Fungistático	4/2=2	Fungicida	4/4=1	Fungicida
LM-30	512/64=8	Fungistático	4/1=4	Fungicida	8/2=4	Fungicida
LM-36	512/64=8	Fungistático	4/1=4	Fungicida	8/2=4	Fungicida
LM-53	512/64=8	Fungistático	4/1=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida
LM-72	256/64=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida	8/2=4	Fungicida
LM-100	256/256=1	Fungicida	4/2=2	Fungicida	8/4=2	Fungicida
LM-120	256/64=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida	4/4=1	Fungicida
LM-135	512/64=8	Fungistático	4/1=4	Fungicida	4/4=1	Fungicida
LM-178	256/64=4	Fungicida	4/1=4	Fungicida	8/4=2	Fungicida
LM-214	256/64=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida	4/4=1	Fungicida
LM-345	256/64=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida	8/4=2	Fungicida
LM-410	256/64=4	Fungicida	4/2=2	Fungicida	8/4=2	Fungicida
LM-510	256/128=2	Fungicida	4/2=2	Fungicida	8/4=2	Fungicida

Legenda: Classificado de acordo com o critério utilizado na análise em Fungicida/Fungistática.

Fonte: Elaboração própria (2023).

O resultado apresentado possui grande relevância, visto que no efeito fungicida as células são mortas e não demonstram risco de desenvolvimento de resistência microbiana, sendo a substância considerada como uma opção terapêutica no tratamento de pacientes imunodeprimidos. Acima de tudo importante no tratamento da aspergilose, que acomete principalmente indivíduos nessa condição. Substâncias fungistática apenas impedem a célula fúngica de se desenvolverem, apresentando maiores riscos de surgimento de mecanismos de resistência [25].

O antifúngico anfotericina B apresentou um valor da CFM de 8,0 $\mu\text{g/mL}$, e o voriconazol de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Ambos apresentaram natureza fungicida para 100% das cepas de *A. niger*, conforme critério discutido anteriormente. A determinação da CFM do sanitizante PAC 200® não foi realizada em detrimento da alta concentração necessária para obtenção de seu efeito antifúngico, não sendo viável realizá-la.

Nos controles realizados, a esterilidade do meio de cultura (RPMI-1640) foi atestada pela ausência de crescimento do microrganismo nas cavidades onde foram adicionados apenas o RPMI-1640, bem como crescimento das cepas fúngicas

cultivadas na ausência do fitoconstituente e dos antifúngicos padrões, confirmando a sua viabilidade.

3.2 Estudo de associação entre mirtenol e os antifúngicos padrões

A terapia combinada é uma estratégia promissora no combate a resistência apresentada pelos microrganismos, bem como no aumento do espectro de ação e eficácia dos antifúngicos utilizados na prática clínica. Essa combinação representa a possibilidade de redução da concentração utilizada dos antifúngicos isolados, com consequente redução da toxicidade e diminuição dos altos custos implicados na pesquisa, desenvolvimento e produção de novas substâncias antifúngicas [26].

Com o objetivo de reduzir as doses necessárias de mirtenol e dos antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B, na obtenção do efeito antifúngico eficaz sobre cepas de *A. niger*, realizou-se o ensaio de associação utilizando a técnica *Checkerboard*. Esse teste comparou a CIM das drogas isoladas, com a CIM combinada (TABELAS 3 e 4).

TABELA 3. Efeito da combinação de mirtenol com o antifúngico voriconazol sobre cepas de *Aspergillus niger*.

<i>A. niger</i>	mirtenol CIF	voriconazol CIF	mirtenol + voriconazol ICIF	Resultado
ATCC-6275	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	0,125+0,125 = 0,25 µg/mL	Sinergismo
LM-03	0,5 µg/mL	0,125 µg/mL	0,5+0,125 = 0,625 µg/mL	Aditividade

Legenda: CIF - Concentração Inibitória Fracionada; ICIF - Índice da Concentração Inibitória Fracionada.

Fonte: Elaboração própria (2023).

TABELA 4. Efeito da combinação de mirtenol com o antifúngico anfotericina B sobre cepas de *Aspergillus niger*.

<i>A. niger</i>	mirtenol CIF	anfotericina B CIF	mirtenol + anfotericina B ICIF	Resultado
ATCC-6275	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	0,125+0,125=0,25 µg/mL	Sinergismo
LM-03	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	0,125+0,125=0,25 µg/mL	Sinergismo

Legenda: CIF - Concentração Inibitória Fracionada; ICIF - Índice da Concentração Inibitória Fracionada.

Fonte: Elaboração própria (2023).

Diante dos valores apresentados, observa-se que o mirtenol foi capaz de reduzir todas as CIM's obtidas do voriconazol e da anfotericina B na combinação, quando comparados aos valores da CIM individual. O resultado da associação de mirtenol e voriconazol divergiu entre a cepa padrão de *A. niger* (ATCC-6247) e a cepa de origem ambiental (LM-03). Na primeira, a combinação resultou em um efeito sinérgico; e na segunda, em aditividade. Essa diferença pode estar relacionada com as diferenças fisiológicas e genéticas entre cepa padrão e cepa de origem ambiental (**TABELA 3**).

A **TABELA 4** apresenta os valores da associação entre o mirtenol e a anfotericina B, que nesta combinação, exibiu os mesmos valores (ICIF: 0,25 µg/mL), para ambas as cepas. Valores de ICIF $\leq 0,5$ caracterizam um efeito sinérgico entre as substâncias associadas. Este resultado condiz com o apresentado em estudo realizado por Cavalcanti *et al.* [10], no qual essa combinação também apresentou efeito sinérgico contra *Candida albicans* ATCC-76485 e *C. parapsilosis* ATCC-22019. Do mesmo modo, efeito sinérgico foi observado na combinação de mirtenol e fluconazol contra *C. parapsilosis* ATCC-22019.

Em estudo realizado por Maione *et al.* [27], o mirtenol apresentou efeito sinérgico quando combinado com o antifúngico caspofungina, como também, com o antimicrobiano meropeném, na inibição da formação de biofilmes mistos por *C. auris* e *Klebsiella pneumoniae* em baixas doses. Quando combinado com a caspofungina, a CIM obtida foi de 2,5 µg/mL de mirtenol e 0,01 µg/mL de caspofungina, com uma inibição do biofilme de 80%. Esse dado é sobremaneira relevante, visto que os biofilmes são reservatórios de microrganismos, que apresentam uma elevada resistência a um grande número de antimicrobianos e causam impactos negativos à saúde dos acometidos.

Tratando-se dos ensaios de associação entre antimicrobianos, o termo sinergismo retrata uma interação positiva entre dois agentes, de maneira que juntos eles exercem efeito inibitório maior do que a soma dos efeitos dos antifúngicos isolados [22]. Enquanto 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. Outra vantagem deste efeito, é a diminuição da toxicidade devido a redução das concentrações administradas [25].

A importância desta pesquisa reside na contribuição acerca do conhecimento sobre as propriedades antimicrobianas de mirtenol, bem como da classe dos monoterpenos. Ressalta-se o caráter inovador do estudo com relação a atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger*, assim como, a sua associação com antifúngicos padrões.

Compreender as possíveis relações entre fungos, homem e meio ambiente, salienta a possibilidade da criação de fluxos que minimizem os agravos à saúde. Isso pode ocorrer tanto à nível de prevenção, como à nível terapêutico, a partir do estudo de novas drogas antifúngicas.

4 Conclusão

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciam a notável atividade antifúngica apresentada pelo mirtenol. Esse fitoconstituente exibiu uma atividade inibitória sobre o crescimento de todas as cepas de *A. niger* avaliadas, com um valor de CIM de 64 µg/mL e de CFM de 256 µg/mL, bem como uma potencial atividade fungicida para a maioria das cepas testadas.

A associação entre o mirtenol e a anfotericina B resultou em sinergismo em ambas as cepas. Um efeito sinérgico foi observado na combinação do fitoconstituente com o voriconazol para a cepa padrão. Porém, para a cepa de origem ambiental, observou-se um efeito aditivo. Nas situações descritas, houve reduções significativas das CIM's dos produtos combinados, quando comparada com o valor da CIM isolada. Essa redução representa a possibilidade da utilização de menores concentrações desses produtos para a obtenção de efeito antifúngico sobre cepas de *A. niger*.

Estudos adicionais, que avaliem o mecanismo de ação de mirtenol, como também sua toxicidade, fazem-se necessários e são indispensáveis para a garantia da sua eficácia, aplicação clínica e segurança do seu uso *in vivo* como antifúngico.

5. Fonte de financiamento

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Concessão de Bolsa de Pesquisa.

6. Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesses.

7. Colaboradores

Concepção do estudo: NRO; EOL.

Curadoria dos dados: NRO; EOL.

Coleta de dados: NRO; EOL; BKSF.

Análise dos dados: NRO; EOL; BKSF.

Redação do manuscrito original: NRO; EOL; TLO, AAS.

Redação da revisão e edição: NRO; EOL; TLO, AAS, EMA.

Referências

1. Pannuti CS. A importância do meio ambiente hospitalar. In: Rodrigues EAC *et al.* Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle. São Paulo: Savier; 1997. p. 449-54.
2. Kalender SS, Kukec A, Dovjak M. Association between Sick Building Syndrome and Indoor Environmental Quality in Slovenian Hospitals: A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16 (17): 3224. [<https://doi.org/10.3390/ijerph16173224>].
3. Portela PO, kozusny-Andreani DI. Caracterização microbiológica em ambiente específico de uma biblioteca universitária em sua composição e qualidade. *EQ*. 2019; 25 (3): 373-89. [<http://dx.doi.org/10.19132/1808-5245253.373-389>]
4. Teixeira BP. Avaliação de fungos em bioaerossóis em ambiente de um hospital de médio porte do noroeste paulista. Ferdinópolis; 2020. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais] – Universidade Brasil. Disponível em: [https://ub.edu.br/portal/_biblioteca/uploads/20210416153718.pdf].
5. Zenaide Neto, H. Qualidade do Ar e Controle Microbiológico em Hospital na Paraíba. João Pessoa; 2020. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente] – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em:

[https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/20229/1/HermanoZenaideNeto_Dissert.pdf].

6. Melhem MSC, Coelho VC, Fonseca CA, Oliveira L, Bonfietti LX, Szeszs MW *et al.* Evaluation of the Sensititre YeastOne and Etest in Comparison with CLSI M38-A2 for Antifungal Susceptibility Testing of Three Azoles, Amphotericin B, Caspofungin, and Anidulafungin, against *Aspergillus fumigatus* and Other Species, Using New Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values. *Pharmaceutics*. 2022; 14 (2161): 1-15. [<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102161>].

7. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(4):e1–e60. [<https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>].

8. Moreira MRC. Efeitos do monoterpreno (-)-mirtenol sobre o Sistema Nervoso Central: estudos *in vitro* e *in vivo*. João pessoa; 2013. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Biotecnologia] – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em:
[<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/343/1/arquivototal.pdf>].

9. De Oliveira JP. Evidências científicas sobre o efeito antinociceptivo de produtos naturais e (-)- mirtenol em modelos de dor orofacial. São Cristóvão; 2019. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas] – Universidade Federal de Sergipe. Disponível em:
[https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/12594/2/JANAINE_PRATA_OLIVEIRA.pdf].

10. Cavalcanti BB, Diniz neto H, Rocha WPS, Lima EO, Barbosa Filho JM, Castro RD *et al.* Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. *RSD*. 2021; 10(15): e35101522434. Disponível em:
[<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22434>].

11. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: Lorrian VMD. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3th ed. Baltimore: Willians & Wilkins; 1991. p. 739-788. ISBN: 9780683051681.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; 2nd ed, CSLI document M38, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
13. Eloff JN. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 1998; 64 (8): 711-3. [<https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>].
14. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004; 35 (4): 275-80. [<https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>].
15. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7 (12): 1797-806. [<https://doi.org/10.5897/AJB07.613>].
16. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharma Anal.* 2016; 6 (2): 71-9. [<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>].
17. Santos AF, Brotto DF, Favarin LRV, Cabeza NA, Andrade GR, Batistone M *et al.* Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. *Rev Bras Farmacogn.* 2014; 24 (3): 309-15. [<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.008>].
18. White RL, Burgess DS, Mandruru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, *checkerboard* and E-test. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 40 (8):1914-18. [<https://doi.org/10.1128/aac.40.8.1914>].
19. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49: 345-51. [<https://doi.org/10.1093/jac/49.2.345>].

20. 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*. *Rev Bras Farmacogn*. 2010; 20 (5): 734-41. [<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000021>].
21. Nikitina LE, Lisovskaya SA, Startseva VA, Frolova LL, Kutchin AV, Shevchenko OG *et al*. Biological Activity of Bicyclic Monoterpene Alcohols. *BioNanoScience*. 2021; 1: 970-6. [<https://doi.org/10.1007/S12668-021-00912-8>].
22. Dantas TB. Avaliação da Toxicidade e Atividade Antifúngica *In Vitro* do Timol sobre Linhagens de *Penicillium citrinum*. João Pessoa; 2017. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos] – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: [<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/12807/1/Arquivototal.pdf>].
23. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.1, 2020. Disponível em: [<https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals>].
24. Reichert-Lima F, Lyra L, Pontes L, Moretti ML, Pham CD, Lockhart SR *et al*. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. *Mycoses*. 2018; 61 (6): 360-5. [<https://doi.org/10.1111/myc.12759>].
25. Nóbrega JR. Avaliação da atividade antifúngica in vitro do α -pineno sobre *Candida* spp. isoladas de pacientes com otomicose. João Pessoa; 2019. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos] – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: [<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/18784>].
26. Medeiros CAC. Avaliação da atividade antifúngica de carvacrol isolado e associado a Anfotericina B frente a cepas de *Aspergillus flavus* isolado de material biológico. João Pessoa; 2022. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos] – Universidade Federal da

Paraíba. Disponível em:

[https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/23017?locale=pt_BR].

27. Maione A, La Pietra A, De Alteriis E, Mileo A, De Falco M, Guida M *et al*. Effect of Myrtenol and Its Synergistic Interactions with Antimicrobial Drugs in the Inhibition of Single and Mixed Biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*.

Microorganisms. 2022; 10: 1-15. [<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091773>].

5.2. ARTIGO 2: Artigo a ser submetido nos Anais da Academia Brasileira de Ciências

Atividade antifúngica e mecanismo de ação de mirtenol sobre cepas de *Aspergillus niger* de origem ambiental

Antifungal activity and mechanism of action of myrtenol on *Aspergillus niger* strains of environmental origin

Nayana da Rocha Oliveira¹

Brenda Kercya da Silva Ferreira¹

Thompson Lopes de Oliveira⁴

Diogo Gomes Pereira Batista²

André Azevedo dos Santos³

Emmanuel Melquíades Araújo¹

Bráulio de Almeida Teixeira¹

Francisco Patricio de Andrade Júnior³

Edeltrudes de Oliveira Lima⁴

1. Mestrando (a) em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba.

2. Doutorando em Arquitetura e Urbanismo. Programa de Pós-Graduação em Arquitetura e Urbanismo (PPGAU). Universidade Federal da Paraíba.

3. Doutorando em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba.

4. Docente. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba.

Atividade antifúngica e mecanismo de ação de mirtenol sobre cepas de *Aspergillus niger* de origem ambiental

Antifungal activity and mechanism of action of myrtenol on *Aspergillus niger* strains of environmental origin

RESUMO

Introdução: *Aspergillus niger* é uma espécie fúngica considerada contaminante ambiental, com alta taxa de isolamento em ambientes construídos. Frequentemente, está envolvida em casos de aspergilose, doença de difícil tratamento e prognóstico. A elevada resistência fúngica e a toxicidade dos antifúngicos atuais, evidenciam a urgente necessidade da descoberta de novos agentes com propriedades antifúngicas. Para tanto, plantas medicinais, seus óleos essenciais e constituintes individuais vêm sendo amplamente investigadas. O fitoconstituente mirtenol apresenta importantes propriedades farmacológicas conhecidas, incluindo atividade antimicrobiana. **Objetivo:** Investigar o efeito de mirtenol sobre o crescimento micelial de cepas de *A. niger*, bem como elucidar o seu mecanismo de ação. **Métodos:** A ação de mirtenol, em diferentes concentrações, sobre o crescimento micelial radial de *A. niger* foi avaliado pela técnica de difusão em meio sólido. Os possíveis efeitos desse monoterpene sobre a parede celular (sorbitol 0,8 M) e a membrana citoplasmática fúngica (ligação do fitoconstituente ao ergosterol) também foram investigados. **Resultados:** O fitoconstituente inibiu, significativamente ($p < 0,05$), o crescimento micelial das cepas ATCC-6275 e LM-03 de *A. niger* na Concentração Inibitória Mínima (CIMx2) - 128 µg/mL e CIMx4 (256 µg/mL), com resultados superiores aos da anfotericina B, nas suas respectivas concentrações. O voriconazol apresentou uma inibição marginalmente significativa ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas, em ambas as cepas. O mecanismo de ação antifúngica de mirtenol, provavelmente, envolve a sua atuação sobre a parede celular dos fungos, como também, a sua ligação ao ergosterol da membrana citoplasmática fúngica. **Conclusão:** Os achados deste estudo reafirmam as propriedades antifúngicas de mirtenol sobre cepas de *A. niger*.

Palavras-chave: Monoterpene, Fitoconstituente. Atividade antimicrobiana, Aspergilose.

ABSTRACT

Introduction: *Aspergillus niger* is a fungal species considered an environmental contaminant, with a high rate of isolation in built environments. It is frequently involved in cases of aspergillosis, a disease that is difficult to treat and prognose. The high fungal resistance and the toxicity of current antifungals, highlight the urgent need to discover new agents with antifungal properties. Therefore, medicinal plants, their essential oils and individual constituents have been widely investigated. The phytoconstituent myrtenol has important known pharmacological properties, including antimicrobial activity. **Objective:** To investigate the effect of myrtenol on the mycelial growth of *A. niger* strains, as well as to elucidate its mechanism of action. **Methods:** The action of myrtenol, at different concentrations, on the radial mycelial growth of *A. niger* was evaluated by the technique of diffusion in solid medium. The possible effects of this monoterpene on the cell wall (0.8 M sorbitol) and the fungal cytoplasmic membrane (binding of the phytoconstituent to ergosterol) were also investigated. **Results:** The phytoconstituent significantly inhibited ($p < 0.05$) the mycelial growth of the ATCC-6275 and LM-03 strains of *A. niger* at the Minimum Inhibitory Concentration (MIC_{x2}) - 128 $\mu\text{g/mL}$ and MIC_{x4} (256 $\mu\text{g/mL}$), with results superior to those of amphotericin B, in their respective concentrations. Voriconazole showed marginally significant inhibition ($p < 0.001$) at all concentrations tested, in both strains. Myrtenol's antifungal mechanism of action probably involves its action on the fungal cell wall, as well as its binding to ergosterol in the fungal plasma membrane. **Conclusion:** The findings of this study reaffirm the antifungal properties of myrtenol against *A. niger* strains.

Keywords: Monoterpene, Phytoconstituent. Antimicrobial activity, Aspergillosis.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do ar de ambientes internos (QAI) é reconhecida como um problema de saúde pública. Um dos principais desafios associados a essa questão é a presença de fungos patogênicos em ambientes como escritórios, hospitais e residências. Essa presença tem sido associada a um maior risco de efeitos adversos à saúde, sendo os problemas respiratórios os mais comuns. Além disso, esses microrganismos têm sido apontados como contribuintes para o surgimento da Síndrome do Edifício Doente (SED) e outras doenças relacionadas a edificações (ROGAWANSAMY *et al.*, 2015; WHILEY *et al.*, 2018).

O gênero *Aspergillus* é reconhecido como um dos alergênicos mais prevalentes em ambientes internos (ROGAWANSAMY *et al.*, 2015), sendo um dos maiores gêneros de fungos filamentosos que podem causar doenças em humanos, englobando aproximadamente 340 espécies (FERREIRA, 2021). Entre elas, merece destaque *Aspergillus niger*, que é a segunda mais identificada no ar e em materiais de construções internas, sendo citada em aproximadamente 68% dos estudos avaliados pelos autores (AL HALLAK *et al.*, 2023). Essa alta ocorrência em ambientes construídos ressalta a importância de monitorar e controlar a exposição a esse fungo, visando à prevenção de problemas de saúde associados.

A. niger está implicada em uma variedade de condições clínicas, incluindo rinossinusite, infecções pulmonares, cardíacas, otomicoses e aspergilose, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2021a). A aspergilose é considerada como uma das doenças fúngicas oportunistas mais comuns. Estima-se que cerca de 30 milhões de pessoas estejam em risco de desenvolverem aspergilose invasiva a cada ano, especialmente aqueles com comprometimento da função imunológica, baixa contagem de neutrófilos, receptores de transplante de órgãos sólidos e pacientes em terapias imunossupressoras (LIMA *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas da aspergilose incluem desde reações alérgicas leves, como rinite e sinusite, até formas mais graves e potencialmente letais, como a aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose pulmonar crônica e fibrótica, aspergiloma e aspergilose pulmonar invasiva. Cada uma dessas manifestações apresenta características específicas e requerem abordagens de tratamento adequadas (OLIBONI, 2022).

Apesar disso, o uso de antifúngicos tem sido uma conduta comum e necessária no manejo dessa doença, sendo os azólicos (voriconazol e o isavuconazol) e os poliênicos (anfotericina B), os mais preconizados. O voriconazol é considerado a primeira escolha no tratamento da aspergilose invasiva (RABAGLIATI, 2018). Nos casos em que os azóis não são

tolerados ou estão contraindicados, as formulações lipídicas da anfotericina B são recomendadas (CADENA *et al.*, 2021).

No entanto, existem limitações importantes no uso desses medicamentos na prática clínica, tais como: a alta resistência de *Aspergillus* spp. aos antifúngicos azólicos, e em menor medida, à anfotericina B; e a nefrotoxicidade causada por esse poliênico, mesmo em suas formulações lipídicas (FERREIRA *et al.*, 2021a). Essa problemática limita as opções de tratamento para a aspergilose e destaca a necessidade de abordagens terapêuticas alternativas. Diante disso, tornou-se urgente a realização de estudos objetivando a descoberta de novas substâncias com aplicação no tratamento dessa doença.

Os produtos naturais e seus derivados têm se mostrado uma fonte de compostos bioativos, incluindo aqueles com atividade antifúngica, baixa toxicidade e custo reduzido. Entre os compostos naturais mais promissores estão os monoterpenos (BONFIM DE BARROS *et al.*, 2023), que são descritos como os componentes mais significativos dos óleos essenciais, correspondendo a aproximadamente 90% de todos os compostos presentes (GOMES *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o mirtenol (C₁₀H₁₆O), um composto volátil da classe dos monoterpenos, tem despertado grande interesse nos últimos anos. Trata-se de um álcool bicíclico de origem vegetal, conhecido por seu aroma agradável e com uma ampla utilização em uma variedade de produtos cosméticos e não cosméticos. Pode ser encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, incluindo *Rhodiola rosea* L e *Myrtus communis* L. Esse composto, em particular, pode ser obtido através da oxidação do α -pineno (MRABTI *et al.*, 2023).

Além de suas propriedades aromáticas, o mirtenol tem sido amplamente estudado por suas atividades e efeitos terapêuticos. Entre as principais propriedades farmacológicas relatadas, encontram-se: efeito anti-inflamatório, antinociceptivo, antioxidante (GOMES *et al.*, 2017; NIKITITA *et al.*, 2021), antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* (CORDEIRO *et al.*, 2020) e antifúngico contra *Candida albicans* (NIKITITA *et al.*, 2021), *C. parapsilosis* (CAVALCANTI *et al.*, 2021), *Rhizopus nigricans*-600, *A. fumigatus* A-1320-13 e *Fusarium solani* F-417 (NIKITITA *et al.*, 2021).

Apesar da notável atividade antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger* já ter sido relatada, tanto isoladamente quanto em associação com os antifúngicos sintéticos voriconazol e anfotericina B (OLIVEIRA *et al.*, 2023), o seu efeito sobre estruturas fúngicas essenciais para a propagação e virulência de *A. niger*, bem como o seu mecanismo de ação contra fungos filamentosos ainda é desconhecido. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito

antifúngico de mirtenol sobre o crescimento micelial e elucidar o seu possível mecanismo de ação contra cepas de *A. niger* de origem ambiental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

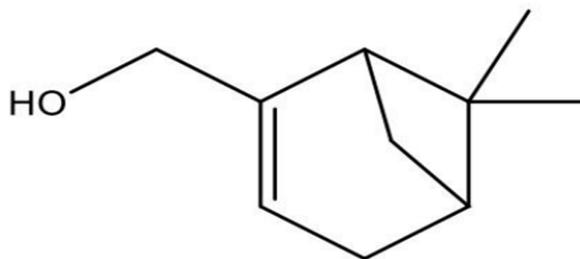
Os ensaios de atividade antifúngica de mirtenol foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisa em Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brasil.

2.2 Fitoconstituente e antifúngicos sintéticos

O mirtenol (Figura 1), foi obtido da Sigma-Aldrich® Ltda. (São Paulo, SP, Brasil) e fornecido pelo pesquisador Dr. José Maria Barbosa Filho, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil. Para fins de controle, foram utilizados os antifúngicos sintéticos: anfotericina B e voriconazol (Sigma-Aldrich® Ltda). A escolha desses antifúngicos se deve a sua ampla utilização no tratamento da arpergilose.

As substâncias foram preparadas no momento da execução dos ensaios com vistas a obtenção das concentrações necessárias. Para isso, inicialmente, foram pesadas na concentração de 1.024 µg/mL, solubilizadas em 150 µL (3%) de Dimetil-sulfóxido (DMSO) (MERK®) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80 (INLAB®). O volume final foi atingido pela adição de água destilada estéril q.s.p 5 mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Figura 1. Estrutura química de mirtenol.



Fonte: Mrabti *et al.* (2023).

2.3 Cepas de *Aspergillus niger*

Para a realização dos ensaios de atividade antifúngica *in vitro* foram selecionadas, aleatoriamente, uma cepa de *A. niger* da linhagem padrão - *American Type Culture Collection*

(ATCC-6275) e uma cepa de origem ambiental (LM-03). Estas cepas fúngicas foram cedidas pela Micoteca do laboratório de Pesquisa em atividade antibacteriana e antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos, da UFPB. Cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do conhecimento Tradicional Associado (SIGEN), sob o número A359BED.

No preparo dos inóculos, as colônias das cepas fúngicas cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), foram suspensas em solução fisiológica estéril a 0,9% e ajustadas conforme o tubo 0,5 da escala padrão de McFarland, resultando em uma concentração de 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; CLSI, 2008).

2.4 Efeito de mirtenol sobre o crescimento micelial de *Aspergillus niger*

As análises da interferência de mirtenol, voriconazol e anfotericina B sobre o crescimento micelial radial de *A. niger* foram determinadas pela técnica de diluição em meio sólido, descrita por Thyagara e Hosono (1996); Adan (1998) e por Daferera, Ziogas, Polission (2003), com algumas modificações.

Para a execução da técnica, inicialmente, foram preparadas placas de Petri estéreis com 8 ml de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). Em seguida, uma porção de 2 mm de diâmetro foi obtida de uma cultura com 3-5 dias de crescimento em ASD a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e adicionada no centro de cada placa de Petri contendo o meio ASD acrescido de mirtenol, nas concentrações CIM (64 $\mu\text{g/mL}$), CIMx2 (128 $\mu\text{g/mL}$) e CIMx4 (256 $\mu\text{g/mL}$). Essas concentrações foram definidas com base em resultados obtidos em estudo anterior (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

O sistema foi então incubado a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por períodos variados (0, 1, 2, 3, 4 dias). Em cada intervalo de tempo, o crescimento micelial radial da colônia fúngica foi medido e registrado em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro. Os resultados apresentados são a média \pm erro padrão de três experimentos realizados de forma independente.

Ensaio semelhante foi realizado com os antifúngicos padrões voriconazol e anfotericina B. O voriconazol foi testado nas concentrações CIM (2 $\mu\text{g/mL}$), CIMx2 (4 $\mu\text{g/mL}$) e CIMx4 (8 $\mu\text{g/mL}$) e a anfotericina B – CIM (4 $\mu\text{g/mL}$), CIMx2 (8 $\mu\text{g/mL}$) e CIMx4 (16 $\mu\text{g/mL}$). Concentrações definidas conforme estudo realizado por Oliveira *et al.* 2023. Esses antifúngicos são considerados como primeira e segunda escolha, respectivamente, no tratamento da aspergilose.

Para fins de comparação, foram realizadas as medidas do crescimento micelial de *A. niger* em ASD sem a presença do fitoconstituente, assim como na presença de voriconazol e anfotericina B.

2.5 Ensaios de atividade antifúngica *in vitro* com alvos específicos

2.5.1 Ação de mirtenol na parede celular fúngica

Para avaliar se a atividade antifúngica de mirtenol ocorre pela sua atuação na parede celular fúngica, realizou-se o ensaio com sorbitol, um protetor osmótico utilizado para estabilizar os protoplastos fúngicos. Considerando essa característica, a CIM do produto investigado na presença de sorbitol exógeno (0,8 M) foi comparada com a CIM obtida na sua ausência (controle). Um aumento no valor da CIM, na presença do protetor osmótico, sugere que a parede celular pode ser um possível alvo de ação para o produto em questão.

A determinação da CIM de mirtenol na presença do sorbitol foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades (INLAB, São Paulo), com fundo em forma de “U” e em triplicata. Em cada cavidade da placa foram adicionados 100 μ L do meio líquido Sabourand Dextrose (CSD), ao qual foi adicionado previamente sorbitol (PM = 182,17) (Sigma-Aldrich® Brasil Ltda). Em seguida, 100 μ L do fitoconstituente foram adicionadas às cavidades da primeira linha da placa. Utilizando uma diluição seriada em uma razão de dois (2:1), foram obtidas concentrações de mirtenol de 1024 μ g/mL até 0,5 μ g/mL e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8 M em cada cavidade. Por fim, 10 μ L do inóculo fúngico foram adicionados às cavidades, sendo que cada coluna da placa corresponde a uma cepa fúngica específica.

Um procedimento semelhante foi realizado com a anfotericina B, antifúngico com mecanismo de ação conhecido, que neste ensaio foi utilizado como controle. Além disso, o controle de viabilidade das cepas de *A. niger* foi feito utilizando 100 μ L de CSD e sorbitol (0,8 M) e 10 μ L do inóculo de cada espécie. A esterilidade do meio foi verificada por meio da adição de 100 μ L do CSD, na ausência da suspensão fúngica. As placas foram seladas e incubadas a 35 ± 2 °C por 3-5 dias, seguindo os protocolos descritos por Frost *et al.* (1995) e Zacchino (2001).

2.5.2 Ação de mirtenol na membrana citoplasmática fúngica – interação com o ergosterol

Este ensaio avalia a ação de mirtenol na membrana citoplasmática fúngica por meio da comparação dos valores da sua CIM obtida na ausência e na presença de ergosterol exógeno. Se a atividade desse fitoconstituente estiver relacionada a sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica, o ergosterol exógeno adicionado ao meio, impedirá sua ligação. Logo, ocorrerá um aumento da CIM de mirtenol na sua presença, pois serão necessárias maiores

concentrações do monoterpene para que sua ligação ao ergosterol ocorra (FERREIRA *et al.*, 2021a).

Para esse propósito, a determinação da CIM de mirtenol sobre cepas de *A. niger* foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (INLAB, SP). O meio de cultura (CSD) foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich® Brasil Ltda.) (ESCALANTE *et al.*, 2008).

Foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico sintético anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve sua interação com o ergosterol da membrana citoplasmática fúngica. A anfotericina B foi utilizada como controle neste estudo. As placas foram seladas e incubadas a uma temperatura de 35±2°C por um período de 3-5 dias.

Por fim, foi realizado o controle de viabilidade das cepas de *A. niger*, adicionando 200 µL do mesmo meio de cultura (CSD) contendo ergosterol e 10 µL do inóculo de cada cepa. Ademais, também foi feito um controle de esterilidade do meio, adicionando 200 µL do CSD, sem a suspensão fúngica, nas cavidades da placa destinadas a esta finalidade. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média ± D.P.

2.6 Análises estatísticas

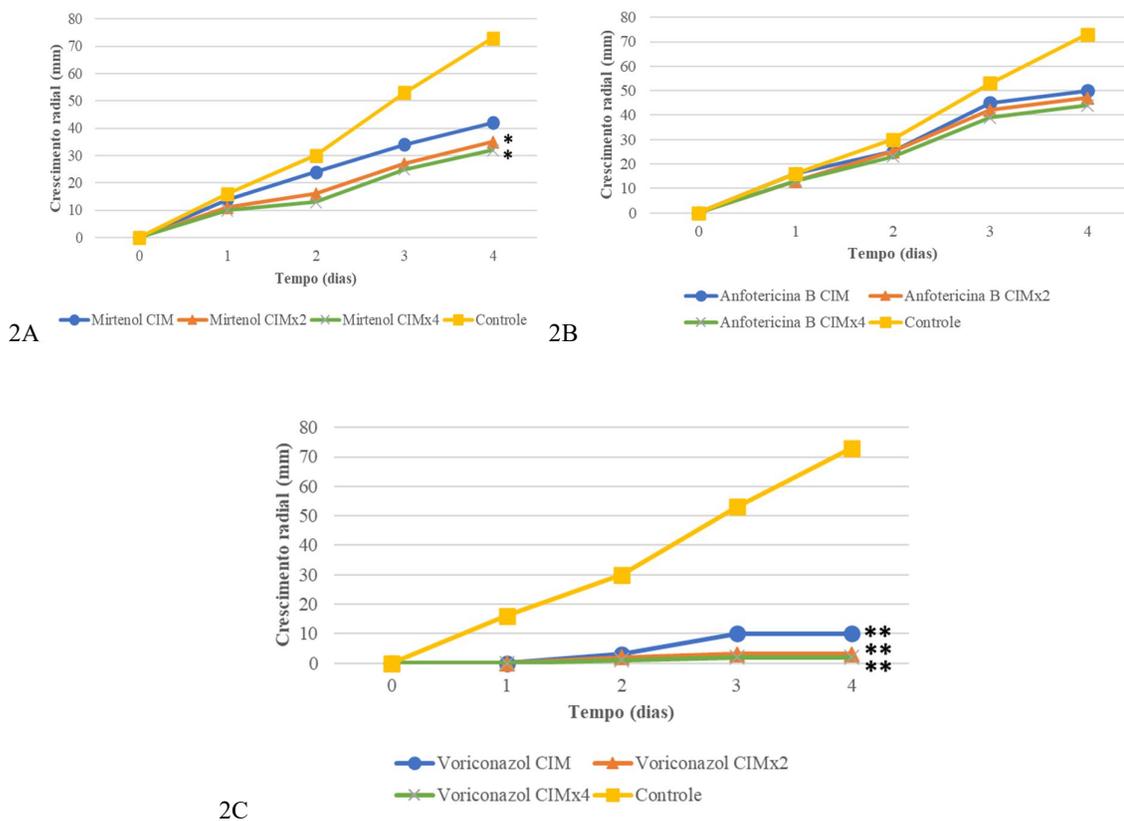
O teste t de Student foi realizado com o objetivo de investigar em que medida houve diferenças significativas entre a inibição do crescimento micelial radial das cepas ATCC e LM-03 de *A. niger*, quando comparadas com o controle (crescimento fúngico na ausência do fitoconstituente). Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias, considerando o valor de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de hifas e a subsequente formação de micélios desempenham um papel crucial na virulência das espécies de *Aspergillus*. Durante uma infecção, o crescimento longitudinal das hifas facilita a penetração nas camadas mais profundas da pele, enquanto o crescimento lateral agrava os danos causados. Além disso, as hifas são mais resistentes à fagocitose e têm a capacidade de induzir apoptose em macrófagos, muitas vezes se formando dentro dessas células após a fagocitose (GUERRA *et al.*, 2015; MENEZES *et al.*, 2022).

Tendo em vista o exposto, a ação de mirtenol, voriconazol e anfotericina B foi investigada sobre o crescimento micelial das cepas ATCC-6275 e LM-03 de *A. niger*. Os resultados deste ensaio estão registrados nas Figuras 2 e 3.

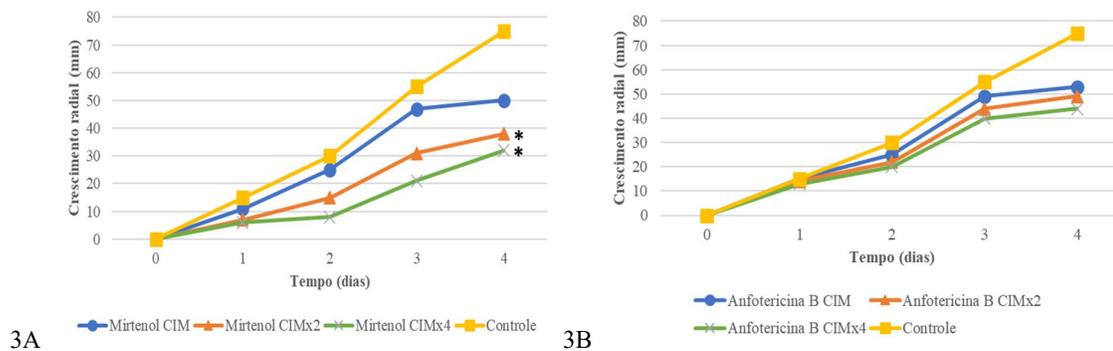
Figura 2. Crescimento micelial radial (mm) produzido por *Aspergillus niger* (ATCC-6235) na ausência (controle) e na presença de mirtenol (2A), anfotericina B (2B) e voriconazol (2C).

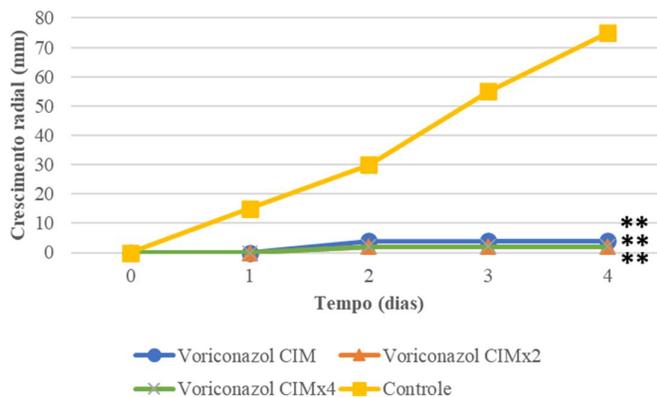


Nota: Valores estatisticamente significativos para * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria (2023).

Figura 3. Crescimento micelial radial (mm) produzido por *Aspergillus niger* (LM-03) na ausência (controle) e na presença de mirtenol (3A), anfotericina B (3B) e voriconazol (3C).





3C

Nota: Valores estatisticamente significativos para $*p < 0,05$, $**p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria (2023).

Conforme observado, nas concentrações CIMx2 (128 $\mu\text{g/mL}$) e CIMx4 (256 $\mu\text{g/mL}$) de mirtenol, o crescimento micelial da cepa padrão ATCC-6275 de *A. niger* foi significativamente reduzido ($*p < 0,05$), quando comparado com o controle (ausência do fitoconstituente). Em se tratando da cepa de origem ambiental LM-03 (Figura 3A), a inibição na concentração CIMx2 (128 $\mu\text{g/mL}$) foi considerada marginalmente significativa ($*p = 0,058$) e na CIMx4, significativa ($*p < 0,05$) em relação ao controle.

As cepas de *A. niger* na ausência do monoterpene, apresentaram uma taxa constante de crescimento no decorrer dos dias, ratificando o efeito antifúngico considerável de mirtenol (Figura 2A e 3A). Além disso, os achados deste estudo sugerem que a ação de mirtenol é dose-dependente, uma vez que não houve inibição significativa na presença de 64 $\mu\text{g/mL}$ (CIM) de mirtenol, sendo esse efeito observado com o aumento da sua concentração.

O antifúngico anfotericina B, nas três concentrações investigadas - CIM (4 $\mu\text{g/mL}$), CIMx2 (8 $\mu\text{g/mL}$) e CIMx4 (16 $\mu\text{g/mL}$) - não apresentou efeito inibitório significativo no crescimento micelial das cepas ATCC-6275 e LM-03 de *A. niger*, quando comparado ao controle (Figura 2B e 3B). Os resultados demonstraram ainda que o mirtenol foi mais potente na inibição do crescimento micelial de *A. niger* ($*p < 0,05$), nas duas cepas testadas, do que a anfotericina B, em todas as concentrações investigadas. Este resultado apresenta grande relevância, uma vez que a anfotericina B, ainda que amplamente utilizada, apresenta importantes limitações de uso, como a resistência fúngica já relatada e a sua elevada nefrotoxicidade, mesmo nas formas lipossomais. Esse último efeito é comum em aproximadamente 65% dos pacientes e pode levar a perda significativa da função renal,

necessitando até mesmo de diálise (FERREIRA *et al.*, 2021a). O que ratifica a urgente necessidade da descoberta de substâncias que possam ser utilizadas como alternativas terapêuticas nesses quadros.

A inibição do micélio de *A. niger* pelo voriconazol, na cepa padrão e na ambiental, foi significativamente mais potente (** $p < 0,001$), do que a observada para o mirtenol e a anfotericina B, em todas as concentrações investigadas. Esse resultado é semelhante aos obtidos em estudo recente (OLIVEIRA *et al.*, 2023), onde todas as cepas de *A. niger* investigadas foram sensíveis ao voriconazol. Esse azólico é considerado padrão-ouro no tratamento da aspergilose.

Um dos principais desafios no desenvolvimento de novos antifúngicos reside na similaridade entre células fúngicas e células humanas. Por esse motivo, os alvos para a ação de um novo antifúngico precisam ser únicos ou pelo menos suficientemente diferentes do hospedeiro. Nesse contexto, duas estruturas fúngicas de grande importância se tornam alvos para a detecção de agentes antifúngicos: a parede celular dos fungos e o ergosterol presente na membrana citoplasmática fúngica (MENEZES *et al.*, 2022). Em vista disso, a possível ação de mirtenol nessas duas estruturas foram investigadas por meio dos ensaios com sorbitol e ergosterol.

A parede celular dos fungos é uma estrutura complexa e vital que fornece suporte, proteção e desempenha papéis essenciais na sobrevivência, patogenicidade e interação dos fungos com o ambiente. Por esse motivo, tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de antifúngicos, uma vez que as alterações na organização ou a sua ruptura funcional estão envolvidas com a morte do fungo.

Dessa forma, o crescimento das cepas ATCC-6235 e LM-03 de *A. niger* foi avaliado na presença e na ausência de sorbitol (0,8 M), objetivando investigar se a ação antifúngica ocorre por meio da desestabilização da parede celular fúngica. Os resultados deste ensaio estão registrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de mirtenol na ausência e na presença de sorbitol exógeno (0,8 M)

<i>A. niger</i>	mirtenol	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
ATCC-6275	64 µg/mL	128 µg/mL
LM-03	64 µg/mL	128 µg/mL

Fonte: Elaboração própria (2023).

Os resultados obtidos no ensaio de investigação do mecanismo de ação de mirtenol sobre cepas de *A. niger* indicam que as suas propriedades antifúngicas, provavelmente, estão relacionadas com sua atuação sobre a parede celular fúngica, uma vez que os valores da CIM do fitoconstituente aumentaram duas vezes na presença de sorbitol exógeno adicionado ao meio de cultura, quando comparado com o controle (ausência de sorbitol), para as duas cepas testadas.

Este é o primeiro estudo a investigar a ação de mirtenol na parede celular de *A. niger* por meio de ensaio com o sorbitol. Portanto, este relato é inédito.

Assim como o colesterol nas células dos mamíferos, o ergosterol é um componente esterol essencial encontrado na membrana citoplasmática fúngica, desempenhando um papel vital na sua estrutura e funções. Quando há uma redução na sua quantidade podem ocorrer desequilíbrios osmóticos que resultam na interrupção do crescimento e da multiplicação celular (MENEZES *et al.*, 2022).

Dessa forma, realizou-se uma investigação sobre o papel dos esteróis de membrana no efeito antifúngico de mirtenol contra cepas de *A. niger* e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de mirtenol e anfotericina B na ausência e na presença de ergosterol exógeno (400 µg/mL).

<i>A. niger</i>	mirtenol		anfotericina B	
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
ATCC-6275	64 µg/mL	128 µg/mL	8 µg/mL	64 µg/mL
LM-03	64 µg/mL	128 µg/mL	8 µg/mL	64 µg/mL

Fonte: Elaboração própria (2023).

Como pode ser observado, o valor da CIM de mirtenol apresentou aumento, em ambas as cepas, com a adição de 400 µg/mL de ergosterol exógeno ao meio de cultura, quando comparado com o controle (ausência de ergosterol). Desse modo, é possível inferir que esse monoterpene, além de atuar na parede celular fúngica, conforme dados apresentados no ensaio com sorbitol, provavelmente, também interfere na viabilidade fúngica por meio da formação de complexos com esse lipídeo.

No teste em questão, um controle foi realizado simultaneamente com a anfotericina B, o qual possui um mecanismo de ação estabelecido. Para esse antifúngico sintético, observou-se um aumento na CIM na presença de ergosterol exógeno, em comparação ao controle (CIM na ausência de ergosterol). Esse resultado era esperado, uma vez que o modo de ação da anfotericina B envolve sua ligação direta ao ergosterol, formando complexos que resultam na

formação de poros. Esses poros desestabilizam a membrana citoplasmática fúngica, levando ao extravasamento de componentes intracelulares e, por fim, a ruptura da célula (LIMA *et al.*, 2018).

Segundo Menezes *et al.* (2022), a capacidade dos terpenoides de penetrar preferencialmente a membrana lipídica, deve-se a sua natureza lipofílica, o que resulta em um aumento da fluidez da membrana e, eventualmente, leva a um aumento na sua permeabilidade.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os relatados por Nikitita *et al.* (2021), que avaliaram a ação antifúngica de 16 monoterpênicos bicíclicos, entre eles o mirtenol, sobre *Candida albicans*, *Rhizopus nigricans*-600, *A. fumigatus* A-1320-13 e *Fusarium solani* F-417. Segundo os autores, a ação antifúngica dos fitoconstituintes ocorre, possivelmente, por meio do dano que causa a membrana fúngica, afetando a alteração do estado funcional de proteínas do tipo integrina, o que pode resultar na interrupção da morfogênese fúngica.

Os achados deste estudo *in vitro* são promissores e fornecem uma base sólida para a realização de ensaios adicionais. Estudos subsequentes podem explorar mais a fundo os efeitos antifúngicos de mirtenol, assim como, outros alvos de ação, e ainda, realizar testes em diferentes cepas e condições ambientais.

Nos controles realizados nos três ensaios, a esterilidade do meio foi constatada pela ausência de crescimento de *A. niger*. Assim como, garantida a viabilidade das cepas (RPMI+Suspensão fúngica), na ausência dos produtos testados.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o presente estudo demonstra que o mirtenol foi capaz de inibir, de forma significativa, o crescimento micelial das cepas ATCC-6275 e LM-03 de *A. niger* nas concentrações 128 µg/mL (CIMx2) e 256 µg/mL (CIMx4) e, portanto, interferir na sua virulência. O efeito constatado foi superior ao observado para a anfotericina B, nas suas respectivas concentrações.

Outro aspecto importante avaliado neste estudo, foi a elucidação do mecanismo de ação antifúngica de mirtenol sobre cepas de *A. niger*. Esse fitoconstituente parece exercer sua ação pela desestabilização da parede celular fúngica. Outro possível mecanismo, envolve a membrana citoplasmática dos fungos. No entanto, outras vias também podem estar implicadas.

Os resultados notórios obtidos *in vitro* para o mirtenol sustentam a continuação de pesquisas, incluindo estudos *in vivo*, a fim de avaliar seu potencial como agente antifúngico em infecções causadas por *A. niger*.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ADAN, K. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula augustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf9708296>
- AL HALLAK, M. *et al.* Fungal Contamination of Building Materials and the Aerosolization of Particles and Toxins in Indoor Air and Their Associated Risks to Health: A Review. **Toxins**, v. 15, n. 3, p.1-24, 2023. doi: 10.3390/toxins15030175
- BOMFIM DE BARROS, D. *et al.* α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. **Antibiotics**, v. 12, n. 480, p. 1-11, 2023. doi: 10.3390/antibiotics12030480
- CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 415-434, 2021. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.008.
- CAVALCANTI, B.B. *et al.* Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. 1-6, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22434>
- 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: Willians & Wilkins, 739-788 p. 1991.
- CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**, 2nd ed, CSLI Standart M38, Wayne, v.37, n.11, 2008.
- CORDEIRO, L. *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Activity of Myrtenol against *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 1-12, 2020. doi: 10.3390/ph13060133
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSION, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michaganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)

- ESCALANTE, A. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1021/np070660i>
- FERREIRA, E. S. *et al.* Antifungal activity and mechanism of action of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with activity against strains of *Aspergillus flavus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1-15, 2021. doi: 10.1590/0001-3765202120200997
- FROST, D. J. *et al.* 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. doi: 10.7164/antibiotics.48.306
- GOMES, B. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress, **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 73-81, 2017. ISSN 0009-2797. doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.019
- GUERRA, F. Q. S. *et al.* Evaluation of Antifungal Activity and Mode of Action of New Coumarin Derivative, 7-Hydroxy-6-nitro-2H-1-benzopyran-2-one, against *Aspergillus* spp. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/925096>
- MAIONE, A. *et al.* Effect of Myrtenol and Its Synergistic Interactions with Antimicrobial Drugs in the Inhibition of Single and Mixed Biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microorganisms**, v. 10, p. 1-15, 2022. doi: 10.3390/microorganisms10091773
- MENEZES, C. P. *et al.* Investigation on mechanism of antifungal activity of citral against *Cladosporium sphaerospermum* Penz. **Anales de Biología**, v. 43, p. 43-53, 2022. doi: 10.6018/analesbio.44.05
- MRABTI, H. N. *et al.* Biological and Pharmacological Properties of Myrtenol: A review. **Current Pharmaceutical design**, v. 29, n. 6, p. 407-414, 2023. doi: 10.2174/1381612829666221222121041
- NIKITINA, L. E. *et al.* Biological Activity of Bicyclic Monoterpene Alcohols. **BioNanoScience**, v. 11, p. 970-976, 2021. doi: 10.1007/s12668-021-00912-8
- OLIBONI, G. M. **Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus* spp. presente no ar atmosférico**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de controle de doenças, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/02/1415349/gabriel-m-oliboni-mestrado-final-16-12-2022-gabriel-manzi-oliboni.pdf>
- OLIVEIRA, N. R. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos contra cepas de *Aspergillus niger*. **Revista Fitos**. 2023. Artigo submetido.
- RABAGLIATI, R. Actualización en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora en pacientes adultos. **Revista Chilena de Infectología**, v. 35, n. 5, p. 531-544, 2018. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000500531>

REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L.; MORETTI, M. L.; PHAM, C. D.; LOCKHART, S. R.; SCHREIBER, A. Z. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 360-365, 2018. doi: 10.1111/myc.12759

ROGAWANSAMY, S. *et al.* An Evaluation of Antifungal Agents for the Treatment of Fungal Contamination in Indoor Air Environments. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 6319-6332, 2015. doi: 10.3390/ijerph120606319

SCHRODER, T. *et al.* Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 23, p. 181-186, 2018. doi: 10.1080/10773525.2018.1447320

THYAGARAJA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Food Science and Technology**, v.29, n.3, p. 286-288, 1996. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0042>

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- O mirtenol apresenta uma significativa atividade antifúngica sobre todas as cepas de *Aspergillus niger* de origem ambiental testadas, sendo fungicida para a maioria das cepas (66,7%), nas concentrações utilizadas;
- O sanitizante de uso ambiental PAC 200[®], demonstrou efeito antifúngico apenas na sua maior concentração utilizada (10.000 µg/mL);
- O notável efeito antifúngico de mirtenol sobre o crescimento micelial de *A. niger* ocorreu de forma dose dependente. Além disso, apresentou efeito superior aos observados para o antifúngico sintético anfotericina B, em todas as concentrações testadas;
- O mecanismo de ação antifúngica de mirtenol envolve, provavelmente, sua atuação sobre o ergosterol presente na membrana citoplasmática fúngica, assim como a desestabilização da parede celular dos fungos;
- A associação entre o mirtenol e o antifúngico sintético voriconazol resultou em sinergismo para a cepa padrão (ATCC-6275) e em um efeito aditivo para a cepa de origem ambiental (LM-03). No entanto, na associação entre o monoterpene e a anfotericina B, constatou-se um efeito sinérgico para ambas as cepas. Nas duas situações, ocorreu redução da CIM dos produtos combinados, quando comparada a CIM obtida para os produtos isolados.

Portanto, esta pesquisa contribui para o aumento do conhecimento das atividades biológicas de mirtenol, como também pode despertar o interesse de outros pesquisadores na realização de estudos adicionais, e, sobretudo, representa a possibilidade da descoberta de um novo agente antifúngico no tratamento da aspergilose.

REFERÊNCIAS

- ADAN, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKNI, S.; LNARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. Hirtum, *Mentha spicata*, *lavandula augustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf9708296>
- AKOVA, I.; KILIÇ, E.; SUMER, H.; KEKLIKÇI, T. Prevalence of sick building syndrome in hospital staff and its relationship with indoor environmental quality. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 32, p. 1-17, 2020. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1862067>
- AL HALLAK, M.; VERDIER, T.; BERTRON, A.; ROQUES, C.; BAILLY, J. D. Fungal Contamination of Building Materials and the Aerosolization of Particles and Toxins in Indoor Air and Their Associated Risks to Health: A Review. **Toxins**, v. 15, n. 3, p.1-24, 2023. <https://doi.org/10.3390/toxins15030175>
- AMORIM, D. S.; MOREIRA, N. L. M.; AMORIM, C. D. R.; SANTOS, S. S.; OLIVEIRA, J. M.; NUNES, C. P.; OLIVEIRA, P. C.; GOMES, A. P. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **Pulmão RJ**, v. 13, n. 2, p. 111-118, 2004. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2004/n_02/08.pdf. Acesso em: 29 abr. 2022.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p.71-79, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- BALTUSSEN, T. J. H.; ZOLL, J.; VERWEIJ, P. E.; MELCHERS, W. J. G. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018. doi:10.1016/j.mib.2018.02.005
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>.
- BELACHEW, H.; ASSEFA, Y.; GUYASA, G.; AZANAW, J.; ADANE, T.; DAGNE, H.; GIZAW, Z. Sick building syndrome and associated risk factors among the population of Gondar town, northwest Ethiopia. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 54, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0745-9>
- BERTO, C.; WIRTH, F.; BARTH, N.; HERMES, D. M. BASES DA RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA: UMA REVISÃO COMENTADA. **Revista UNINGÁ**, v. 55, n. 3, p. 52-71, 2018. <https://doi.org/10.46311/2318-0579.55.eUJ773>
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003**. Determina a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2003. 14 p. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_09_2003_.pdf/8ccafc91-1437-4695-8e3a-2a97deca4e10. Acesso em: 15 abr. 2022.

BRITTO, R. M.; DA SILVA-NETO, J. A.; MESQUITA, T. R. R.; DE VASCONCELOS, C. M. L.; DE ALMEIDA, G. K. M.; DE JESUS, I. C. G.; DOS SANTOS, P. H.; SOUZA, D. S.; DOS SANTOS, R. M.; DE SÁ, L. A.; DOS SANTOS, F. S. M.; PEREIRA-FILHO, R. N.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis and Treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 415-434, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.008>.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e Aspergilose – DESAFIOS NO COMBATE DA DOENÇA**. 2013. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4166/1/Aspergillus%20e%20aspergilose%20final.pdf>. Acesso em 25 abr. 2022.

CAVACO, T. **Isolamento e Observação Microscópica de Fungos**. Aula Prática 13 – Isolamento e Observação Microscópica de Fungos. 2015. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/2756376/>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

CAVALCANTI, B.B.; DINIZ-NETO, H.; ROCHA, W. P. S.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; CASTRO, R. D.; SAMPAIO, F. C.; GUERRA, F. Q. S. Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. 1-6, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22434>

CHEN, B.; QIAN, G.; YANG, Z.; ZHANG, N.; JIANG, Y.; DONGMEI, L.; LI, R.; SHI, D. Virulence capacity of different *Aspergillus* species from invasive pulmonary aspergillosis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1-11, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1155184>

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**, 2nd ed, CSLI Standart M38, Wayne, v.37, n.11, 2008.

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

CORDEIRO, L.; FIGUEIREDO, P.; SOUZA, H.; SOUSA, A.; ANDRADE-JÚNIOR, F.; BARBOSA-FILHO, J.; LIMA, E. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Myrtenol against *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.3390/ph13060133>

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. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000021>

CORZO, E. C. A.; MORAN, R. C. D.; PAREDES, NIZAMA, J. L. R.; DAVILA, L. V.; DIAZ, D. Z.; QUISPE, J. F. P. Prevalencia del síndrome del edificio enfermo en trabajadores de la industria manufacturera. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 62, n. 1, p. 55-62, 2022. ISSN:1690-4648.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSION, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michaganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n.1, p. 39-44, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)

DANTAS, T. B. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DO TIMOL SOBRE LINHAGENS DE *Penicillium citrinum***. 2017. 136 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017. Disponível em <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/12807/1/Arquivototal.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2022.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**.1998; v. 64, n. 8, p. 711-3. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PEREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal Phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetrâmera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008. doi: 10.1021/np070660i

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>.

FERREIRA, E. S. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *Aspergillus E* CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DA AMIDA SINTÉTICA 2- CLORO-N-FENILACETAMIDA**. 2021. 157 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/22826/1/ElbaDosSantosFerreira_Tese.pdf. Acesso em 20 jul. 2023.

FERREIRA, E. S.; CORDEIRO, L.V.; SILVA, D. F.; SOUZA, H. D. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SCOTTI, L.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D. Antifungal activity and mechanism of action of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with activity against strains of *Aspergillus flavus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1-15, 2021a. doi: 10.1590/0001-3765202120200997

FERREIRA, E. S.; ROSALEN, P. L.; BENSO, B.; SARDI, J. C. O.; DENNY, C.; SOUSA, S. A.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. O.; FREIRES, I. A.; CASTRO, R. D. The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: A Literature Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-16, 2021b. doi: 10.1155/2021/1059274

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. doi: 10.7164/antibiotics.48.306

FU, X.; NORBACK, D.; YUAN, Q.; LI, Y.; ZHU, X.; HASSHIM, J. H.; HASHIM, Z.; ALI, F.; HU, Q.; DENG, Y.; SUN, Y. Association between indoor microbiome exposure and sick building syndrome (SBS) in junior high schools of Johor Bahru, Malaysia. **Science of The Total Environment**, v. 753, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141904>

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 137-147, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137:AID-PCA514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137:AID-PCA514>3.0.CO;2-I)

HAWKSWORTH, D. L. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. **Journal of Medical Mycology**, v. 49, p. 70-76, 2011. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.504753>.

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. <https://doi.org/10.1093/jac/49.2.345>

MAIONE, A.; LA PIETRA, A.; DE ALTERIIS, E.; MILEO, A.; DE FALCO, M.; GUIDA, M.; GALDIERO, E. Effect of Myrtenol and Its Synergistic Interactions with Antimicrobial Drugs in the Inhibition of Single and Mixed Biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microorganisms**, v. 10, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091773>

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Médica**, Copyright: Manole Ltda, 2005. p. 39-45.

MOBIN, M.; SALMITO, M. A. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p.556-559, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000600009>

MONPIERRE, L.; DESBOIS-NOGARD, N.; VALSECCHI, I.; BAJAL, M.; ANGEBAULT, C.; MIOSSEC, C.; BOTTEREL, F.; DANNAOUI, E. Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus* Isolates from the French West Indies (Martinique), **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7050355>

MOREIRA, M. R. C. **Efeitos do monoterpeno (-)-mirtenol sobre o Sistema Nervoso Central: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/343/1/arquivototal.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2022.

MRABTI, H. N.; JAOUADI, I.; ZEOUK, I.; GHCHIME, R.; EL MENYIY, N.; EL OMARI, N.; BALAHBIB, A.; AL-MIJALLI, S. H.; ABDALLAH, E. M.; EL-SHAZLY, M.; ZENGIN, G.; BOUYAHYA, A. Biological and Pharmacological Properties of Myrtenol: A Review.

Current Pharmaceutical Design, v. 29, n. 6, p. 407-414, 2023. doi: 10.2174/138161282966622122212104

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008. <https://doi.org/10.5897/AJB07.613>

OLIVEIRA, J. P. **Evidências científicas sobre o efeito antinociceptivo de produtos naturais e (-)-mirtenol em modelos de dor orofacial**. 157 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2019. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/12594/2/JANAINNE_PRATA_OLIVEIRA.pdf Acesso em: 09 jun. 2022.

PEDROSO, S. A.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, p. 1-19, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>

PELUQUE, E. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxicogênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializados no Brasil**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-05052014-154206/publico/ME7903239COR.pdf>. Acesso em 20 mai. 2022.

POWERS, C. N.; OSIER, J. L.; MCFEETERS, R. L.; BRAZELL, C. B.; OLSEN, E. L.; MORIARITY, D. M.; SATYAL, P.; SETZER, W. N. Antifungal and Cytotoxic Activities of Sixty Commercially-Available Essential Oils. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071549>

PUNIA, A.; CHOUDHARY, P.; SHARMA, N.; DAHIYA, S.; GULIA, P.; CHHILLAR, A. K. Therapeutic Approaches for Combating Aspergillus Associated Infection. **Current Drug Targets**, v. 23, n. 16, p. 1465-1488, 2022. doi: 10.2174/1389450123666220623164548.

R. L. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUATIMOSIM, S.; LAUTON-SANTOS, S. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms, **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 557-566, 2018. doi: 10.1016/j.fct.2017.12.003.

REIS, J. B.; DE FIGUEIREDO, L. M.; CASTORANI, G.M.; VEIGA, S. M. O. M. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020. doi: 10.34119/bjhrv3n1-025

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. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SKMEN, A.; POLISSOU, M.; SOKMEN, M.; SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential

oils from aromatic plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

SANTOS, A. F.; BROTTTO, D. F.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; ANDRADE, G. R.; BATISTONE, M.; CAVALHEIRO, A. A.; NEVES, A.; RODRIGUES, D. C. M.; DOS ANJOS, A. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 309-15, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.008>.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

SEN, P.; VIJAY, M.; SINGH, S.; HAMEED, S.; VIJAYARAGHAVAN, P. Understanding the environmental drivers of clinical azole resistance in *Aspergillus* species. **Drug Target Insights**, v. 16, n. 1, p. 25-35, 2022. <https://doi.org/10.33393/dti.2022.2476>

SHARPE, A. R.; LAGROU, K.; MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A.; LOCKHART, S. R.; VERWEIJ, P. E. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 56, p. 83-92, 2018. doi: 10.1093/mmy/myx144

SHIBUYA, K.; ANDO, T.; HASEGAWA, C.; WAKAYAMA, M.; HAMATANI, S.; HATORI, T.; NAGAYAMA, T.; NONAKA, H. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 3, p. 38-45, 2004. doi: 10.1007/s10156-004-0315-5

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p. ISBN 8527708663

SILVA, D. F. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DOS MONOTERPENOS R - (+)- β -CITRONELOL e S - (-) β -CITRONELOL**. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2020. Acesso em 29 jul. 2023.

SILVA, D. P.; CALUMBY, R. J. N.; SILVA, L. N. R.; OLIVEIRA, J. O.; SOUSA J. R. G.; SILVA, D. C.; OLIVEIRA, J. O.; SOUSA, J. R. G.; SILVA, D. C.; MOREIRA, R. T. F.; ARAÚJO, M. A. S. Fungos anemófilos isolados de bibliotecas de instituições de ensino da Região Nordeste do Brasil. **Revista Pan Amazônica de Saúde**, v. 12, p. 1-8, 2021. doi: 10.5123/S2176-6223202100769.

SILVA, E. F.; VIEIRA, T. J. N.; LUNA, G. ATIVIDADE BIOLÓGICA “*in vitro*” DO FITOCONSTITUINTE TIMOL SOBRE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*. **Revista de Pesquisa Interdisciplinar**, n. 2, p. 677-685, 2017. doi:<http://dx.doi.org/10.24219/rpi.v2i2.0.396>.

STEMLER, J.; TOBBEN, C.; LASS-FLORL.; STEINMANN, J.; ACKERMANN, K.; RATH, P. M, SIMON, M.; CORNELY, O. A.; KOEHLER, P. Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis Caused by Non-fumigatus *Aspergillus* spp. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 1-20, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9040500>

SVAJLENKA, J.; KOZLOVSKA, M.; POSIVAKOVA, T. Biomonitoring the indoor environment of agricultural buildings. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 25, n. 2, p. 292-295, 2018. doi: 10.26444/aaem/81314.

TAKEDA, K.; SUZUKI, J.; WATANABE, A.; MATSUKI, M.; HIGA, K.; INOUE, E.; AKASHI, S.; SHIMADA, M.; KAWASHIMA, M.; OHSHIMA, N.; FUKAMI, T.; MASUDA, K.; YAMANE, A.; TAMURA, A.; NAGAI, H.; MATSUI, H.; TOHMA, S.; KAMEI, K. Species identification, antifungal susceptibility, and clinical feature association of *Aspergillus* section Nigri isolates from the lower respiratory tract. **Medical Mycology**, v. 58, p. 310-314, 2019. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz072>

TEIXEIRA, B. P. **AVALIAÇÃO DE FUNGOS EM BIOAEROSSOIS EM AMBIENTE DE UM HOSPITAL DE MÉDIO PORTE DO NOROESTE PAULISTA**. 2020. 91 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Ambientais) – Universidade Brasil. Fernandópolis, SP, 2020. Disponível em: https://ub.edu.br/portal/_biblioteca/uploads/20210416153718.pdf. Acesso em: 08 abr. 2022.

THYAGARAJA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Food Science and Technology**, v.29, n.3, p. 286-288, 1996. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0042>

TROVATO, L.; SCALIA, G.; DOMINA, M.; OLIVERI, S. Environmental Isolates of Multi-Azole-Resistant *Aspergillus* spp. in Southern Italy. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 1-8, 2018. doi:10.3390/jof4040131

VAEZI, A.; FAKHIM, H.; JAVIDNIA, J.; KHODAVAISY, S.; ABTAHIAN, Z.; VOJOODI, M.; NOURBAKHS, F.; BADALI, H. Pesticide behavior in paddy fields and development of azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: Should we be concerned?. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, p. 59-64, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.007>

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ZAKARIA, A.; OSMAN, M.; DABBOUSSI, F.; RAFEL, R.; MALLAT, H.; PAPON, N.; BOUCHARA, J.P.; HAMZE, M. Recent trends in the epidemiology, diagnosis, treatment, and mechanisms of resistance in clinical *Aspergillus* species: A general review with a special focus on the Middle Eastern and North African region. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.007>

ZENAIDE NETO, H. **Qualidade do Ar e Controle Microbiológico em Hospital na Paraíba**. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2022. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/20229/1/HermanoZenaideNeto_Dissert.pdf. Acesso em: 16 ago. 2022.

ANEXOS

Anexo 1: Artigo, produto da dissertação, submetido na Revista Fitos (Fiocruz)



revistafitos@far.fiocruz.br

Para: Você



Seg, 24/07/2023 07:26

Nayana da Rocha Oliveira,

Agradecemos a submissão do trabalho "Avaliação da atividade antifúngica de mirtenol e o efeito da sua associação com antifúngicos frente cepas de *Aspergillus niger*" para a revista Revista Fitos.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/authorDashboard/submission/1626>

Login: noliveira

Em caso de dúvidas, veja nossa página de ajuda (<http://redesfito.far.fiocruz.br/index.php/revistas/revista-fitos>) ou entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Equipe Editorial

Artigo 2: Coautoria em artigo publicado durante o período do mestrado - Qualis (Farmácia) A3.

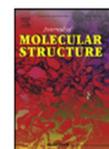
Journal of Molecular Structure 1273 (2023) 134323



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstr



Deep eutectic solvent co-catalyzed synthesis and antimicrobial activity of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives



Sandro-Dutra de-Andrade^a, Isadora-Maria-Gouveia Andrade^a, Aleff Castro^a, Yohana-Maria-Rodrigues Montenegro^a, Dayse das-Neves-Moreira^a, Rachel-Azevedo Maia^b, Felipe-Terra Martins^c, Boniek-Gontijo Vaz^c, Gabriel Franco-dos-Santos^c, Edeltrudes-de-Oliveira Lima^d, Nayana-da-Rocha Oliveira^d, Brenda-Kercya-da-Silva Farias^d, Claudio-Gabriel Lima-Junior^{a,*}

^aLaboratory of Medicinal Organic Synthesis of Paraíba (LASOM-PB), Department of Chemistry, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa-PB 58, 051-900, Brazil

^bDepartment of Chemistry, State University of Paraíba, Campina Grande-PB, 58429-500, Brazil

^cInstitute of Chemistry, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia-GO 74, 690-900, Brazil

^dDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, (UFPB), João Pessoa-PB 58, 051-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2022

Revised 7 October 2022

Accepted 10 October 2022

Available online 12 October 2022

Keywords:

3-Substituted-3-hydroxy-2-oxindoles
MBHA

ABSTRACT

A series of fourteen Morita-Baylis-Hillman adducts has been synthesized from isatin derivatives using deep eutectic solvents containing choline chloride (ChCl). Research results showed that the solvent based on ChCl/ethylene glycol (1:2) is a very effective alternative for the synthesis of adducts derived from acrylonitrile, resulting in compounds with excellent yields and short reaction times, after optimization of the catalyst (DABCO). Regarding the synthesis of adducts derived from methyl acrylate, the system ChCl/Urea (1:2) was the most effective, since it suppresses the formation of transesterification co-products between the adducts and the solvent. The use of these systems reduced the amount of catalyst required compared to literature data, acting as co-catalyst. The structure of a transesterification by-product was estab-

Artigo 3: Coautoria em artigo publicado durante o período do mestrado - Qualis (Farmácia) A3.



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

Original Article

Antifungal effect of (*R*) and (*S*)-citronellal enantiomers and their predictive mechanism of action on *Candida albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses

Efeito antifúngico dos enantiômeros (*R*) e (*S*)-citronelal e seu mecanismo de ação preditivo sobre *Candida albicans* de onicomicoses resistentes ao voriconazol

R. G. Gouveia^a, N. R. Oliveira^a, F.P. Andrade-Júnior^a, R. C. Ferreira^a, G. M. W. Amorim^b, D. K. F. Silva^a, S. S. Duarte^a, C. I. S. Medeiros^{a*}, A. A. Oliveira-Filho^c and E. O. Lima^{a,b}

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Departamento de Ciências Farmacêuticas – DCF, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CTSR, Patos, Paraíba, Brasil

Abstract

Onychomycosis is the most common disease affecting the nail unit and accounts for at least 50% of all nail diseases. In addition, *Candida albicans* is responsible for approximately 70% of onychomycoses caused by yeasts. This study investigated the antifungal effect of (*R*) and (*S*)-citronellal enantiomers, as well as its predictive mechanism of action on *C. albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses. For this purpose, *in vitro* broth microdilution and molecular docking techniques were applied in a predictive and complementary manner to the mechanisms of action. The main results of this study indicate that *C. albicans* was resistant to voriconazole and sensitive to the enantiomers (*R*) and (*S*)-citronellal at a dose of 256 and 32 µg/mL respectively. In addition, there was an increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the enantiomers in the presence of sorbitol and ergosterol, indicating that these molecules possibly affect the integrity of the cell wall and cell membrane of *C. albicans*. Molecular docking with key biosynthesis proteins and maintenance of the fungal cell wall and plasma membrane demonstrated the possibility of (*R*) and (*S*)-citronellal interacting with two important enzymes: 1,3-β-glucan synthase and lanosterol 14α-demethylase. Therefore, the findings of this study indicate that the (*R*) and (*S*)-citronellal enantiomers are fungicidal on *C. albicans* from onychomycoses and probably these substances cause damage to the cell wall and cell membrane of these micro-organisms possibly by interacting with enzymes in the biosynthesis of these fungal structures.

Keywords: (*R*) and (*S*)-citronellal, voriconazole, onychomycosis, mechanism of action.

Artigo 4: Coautoria em artigo publicado durante o período do mestrado - Qualis (Farmácia) B2.



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)
Lat. Am. J. Pharm. 42 (8): 1565-9 (2023)

Received: April 13, 2023
Accepted: May 5, 2023

Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation from Onychomycosis by (R) and (S)-Citronellal and Association Effects with Fluconazole and Voriconazole

Rawny G. GOUVEIA¹, Nayana R. OLIVEIRA¹, Victor T. GOMES², Daiana K.F. SILVA¹,
Cássio I.S. MEDEIROS^{1*}, Ulrich VASCONCELOS^{1,3},
Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO⁴ & Edeltrudes. O. LIMA^{1,5}

¹ Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, s/n, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

² Laboratório de Microbiologia Ambiental, Centro de Biotecnologia, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, s/n, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

³ Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, s/n, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

⁴ Rural Health and Technology Center (CTSR), Federal University of Campina Grande (UFCG), Jatobá, s/n, 58700-970, Patos, Paraíba, Brazil.

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences (DCF), Federal University of Paraíba (UFPB), Castelo Branco III, s/n, 58059-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

SUMMARY. *Candida albicans* is a commensal yeast in humans that can cause different infections. Onychomycosis is a common asymptomatic infection affecting the nail bed. The inhibitory effect of (R) and (S)-citronellal enantiomers on biofilm formation and their association with fluconazole and voriconazole in *C. albicans* strains causing onychomycosis were investigated. Violet crystal tests were performed to evaluate biofilm formation, and the checkerboard assay was applied for association effects. The enantiomers (R)-CIT and (S)-CIT inhibited biofilm formation of the tested strains, with (R)-CIT showing strong antibiofilm activity and (S)-CIT showing moderate to strong activity. Additionally, the combination of the enantiomers with antifungal drugs showed synergism for both strains, with additivity and antagonism for (S)-CIT and fluconazole in ATCC 76645 strains. Therefore, these results suggest that (R) and (S)-citronellal enantiomers can be potential treatments for fungal nail infections.

RESUMEN. *Candida albicans* es una levadura comensal en humanos que puede causar diferentes infecciones. La onicomicosis es una infección asintomática común que afecta el lecho ungueal. Se investigó el efecto inhibitorio de los enantiómeros (R) y (S)-citronelal sobre la formación de biopelículas y su asociación con fluconazol y voriconazol en cepas de *C. albicans* que causan onicomicosis. Se realizaron pruebas de cristal violeta para evaluar la formación de biopelículas y se aplicó el ensayo de tablero de ajedrez para efectos de asociación. Los enantiómeros (R)-CIT y (S)-CIT inhibieron la formación de biopelículas de las cepas analizadas, mostrando (R)-CIT una fuerte actividad antibiopelícula y (S)-CIT mostrando una actividad de moderada a fuerte. Además, la combinación de los enantiómeros con fármacos antifúngicos mostró sinergismo para ambas cepas, con aditividad y antagonismo para (S)-CIT y

Artigo 5: Coautoria em artigo publicado durante o período do mestrado - Qualis (Farmácia) A2



Anais da Academia Brasileira de Ciências | *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

Antifungal activity of 7-hydroxycitronellal: an *in vitro* and computational approach

RAWNY G. GOUVEIA, NAYANA R. OLIVEIRA, VICTOR T. GOMES, DAIANA K. F. SILVA, CÁSSIO I. S. MEDEIROS, ULRICH VASCONCELOS, ABRAHÃO A. OLIVEIRA-FILHO & EDELTRUDES. O. LIMA.

Abstract: Onychomycosis is a chronic nail infection caused by *C. albicans* yeasts that sometimes provoke a disease of great complexity and challenging treatment. This study evaluated the antifungal activity of 7-hydroxycitronellal (7-OH) against *C. albicans* strains from nail infections, as well as its interactions with the cell wall and membrane of this microorganism. The *in vitro* tests of inhibitory concentration and minimum fungicide (MIC and MFC) as well as sorbitol, ergosterol, biofilm and association were carried out using the microdilution technique in 96-well plates. Molecular docking was carried out based on redocking with rigid protein and flexible linkers in AutoDock4.2.6. 7-OH presented MIC of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for about 63% of fungal strains and MFC of 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 87% of the yeasts. Furthermore, 7-OH was active on the cell wall and membrane of *C. albicans*, predictively impairing cell viability by interacting with the enzymes 1,3- β -glucan synthase (1,3- β -GS) and lanosterol 14 α -demethylase (CYP51). 7-OH inhibits the formation of *C. albicans* biofilm, with a reduction in cell adhesion from 80% to 83.9%, and its association with voriconazole had a synergistic effect. Therefore, 7-OH is bioactive against *C. albicans* of onychomycosis with significant therapeutic potential in these infections.

Key words: 7-hydroxycitronellal, antifungal activity, voriconazole.

**Capítulo de Livro 1: Autoria de Capítulo de livro publicado no período do mestrado -
Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências – julho de 2022.**

Área Temática
Ciências da Saúde: abordagens na Pesquisa e no Ensino



 10.46943/VII.CONAPESC.2022.01.051

LUDICIDADE NA PROMOÇÃO DO USO RACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

Mestranda em Farmacologia na Universidade Federal da Paraíba - UFPB, nayrochy@hotmail.com;

TÁSSIO MACEDO SILVA

Residente em Saúde Mental na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, tassio_silva30@hotmail.com;

ANA CLARA DA ROCHA SOUSA

Residente em Saúde Mental na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, annaclara04@hotmail.com.

RESUMO

As Plantas Medicinais (PM) são reconhecidas como uma importante alternativa terapêutica, desde que conhecida a sua indicação, riscos, benefícios e que seu uso seja feito de forma racional. O farmacêutico tem papel fundamental nesse processo, promovendo educação em saúde sobre esse e outros temas. Esta pesquisa objetiva descrever a vivência e as impressões de uma Farmacêutica na realização de uma oficina para promoção do Uso Racional de PM em um grupo de Hipertensos e Diabéticos. Trata-se de um estudo descritivo com abordagem qualitativa de tipo relato de experiência. A oficina

Capítulo de Livro 2: Autoria de Capítulo de livro publicado no período do mestrado - I Congresso Brasileiro Integrado em Saúde Pública e Coletiva (I CONBRAISPUC) – fevereiro de 2023.

CAPÍTULO 15

CUIDADO FARMACÊUTICO NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE DO BRASIL: REVISÃO NARRATIVA

PHARMACEUTICAL CARE IN PRIMARY HEALTH CARE IN BRAZIL: NARRATIVE REVIEW

ATENCIÓN FARMACÉUTICA EN LA ATENCIÓN PRIMARIA DE SALUD EN BRASIL: REVISIÓN NARRATIVA

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-6794-1601>

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5936-2127>

NÚBIA KELLY RODRIGUES RIBEIRO

Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-9011-157X>

EIXO TEMÁTICO: Assistência Básica

Capítulo de Livro 3: Coautoria em Capítulo de livro publicado no período do mestrado - I Congresso Brasileiro Integrado em Saúde Pública e Coletiva (I CONBRAISPUC) – fevereiro de 2023.

CAPÍTULO 5

PERFIL DE INTOXICAÇÕES PELA UTILIZAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS E BARBITÚRICOS NA PARAÍBA NO ANO DE 2020

**PROFILE OF INTOXICATIONS THROUGH THE USE OF BENZODIAZEPINES AND BARBITURATES IN
PARAÍBA IN THE YEAR 2020**

**PERFIL DE INTOXICACIONES POR USO DE
BENZODIAZEPINAS Y BARBITÚRICOS EN PARAÍBA EN EL AÑO 2020**

BRENDA KERCYA DA SILVA FARIAS

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5936-2127>

MATHEUS MORAIS DE OLIVEIRA MONTEIRO

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-7199-8053>

NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA

Universidade Federal da Paraíba | João Pessoa, Paraíba, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-6794-1601>

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

Universidade Federal do Rio Grande do Norte | Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-9051-1175>

EIXO TEMÁTICO: Políticas Públicas de Saúde

**Apresentação de trabalho 1: Comunicação oral em congresso no período do mestrado -
Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências – julho de 2022.**



EPIDEMIOLOGIA DE ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL (2000-2018)

Nayana da Rocha Oliveira¹
Tássio Macedo Silva²
Ana Clara da Rocha Sousa³
Kaline Kelly da Silva Ferreira⁴

RESUMO

No panorama epidemiológico mundial, o Brasil se encontra junto com o Vietnã, na terceira posição em número de acidentes com serpentes peçonhentas. Ainda que os números de notificações sejam alarmantes, aspectos como o acesso ao tratamento, qualificação dos profissionais de saúde e pesquisa epidemiológica, são negligenciados pelas políticas públicas de saúde. Sendo assim, este estudo objetivou traçar o panorama nacional epidemiológico de acidentes ofídicos notificados nos anos de 2000 a 2018, no Brasil. Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo e epidemiológico. Os dados foram coletados do site do Ministério da Saúde. O Brasil notificou 500.901 casos de acidentes ofídicos nos anos de 2000 a 2018. A região norte teve a maior incidência com 151.889 notificações, 2018 foi o ano de maior incidência (9.580), e o estado do Norte (Pará), com 83.964 casos. Em relação à incidência por 100.000 habitantes, os dados obtidos provocam alterações. O Norte continua sendo a região brasileira de maior incidência (52,7), entretanto o estado agora é Roraima (100,8); Centro-oeste (16,6) antes a terceira região com maior número de acidentes, agora é a segunda; Mato Grosso (29,3) se mantém; Nordeste em terceiro (13,0), com Maranhão (25,2) em vez da Bahia; Sudeste continua apresentando um dos menores índices (8,0), com seu estado de maior notificação sendo o Espírito Santo, e não Minas Gerais (23,6) e, por fim, o Sul (7,7), com Santa Catarina (9,2), antes Rio Grande do Sul. A epidemiologia de óbitos apresenta 1.991 notificações. Os altos números de acidentes ofídicos obtidos para o Brasil evidenciam a magnitude do problema negligenciado. Este estudo pode contribuir para uma melhor compreensão da incidência de acidentes com cobras por regiões e estados no Brasil.

**Apresentação de trabalho 2: Comunicação oral em congresso no período do mestrado -
Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências – julho de 2022.**



**INTERNALIZAÇÃO DE PACIENTES DIABÉTICOS EM HOSPITAIS
PÚBLICOS E O PAPEL DA FARMÁCIA CLÍNICA**

Tássio Macedo Silva ¹
Nayana da Rocha Oliveira ²
Ana Clara da Rocha Sousa ³
Kaline Kelly da Silva Ferreira ⁴

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é um importante e crescente problema de saúde pública em todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. Em 2017 foi estimado que 8,8% (424,9 milhões) da população mundial viviam com Diabetes, desse quantitativo, 12,5 milhões, com 20 a 79 anos de idade, brasileiros. Esta patologia é responsável pelas maiores taxas de hospitalizações e de incidências de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputações. Em vista disso, objetivou-se realizar um levantamento do número de pacientes diabéticos internados em hospitais públicos da Macrorregião de Saúde I do Estado da Paraíba, entre janeiro de 2019 e janeiro de 2021, identificando os recursos financeiros demandados pelos serviços de saúde em razão dos pacientes hospitalizados e avaliar o papel da farmácia clínica. Para isso, foram utilizadas informações coletadas através da Plataforma DATASUS do Ministério da Saúde. Trata-se de um estudo de método misto (quanti-qualitativo) e de carácter descritivo. No período avaliado foram internalizados 2038 pacientes diabéticos, com idade variando de 1 a 80 anos ou mais, com média de permanência em torno de 8,6 dias. A internalização do gênero feminino e masculino foi, respectivamente, de 1185 e 853 pacientes, sendo o valor total de gastos em serviços hospitalares superior a 2 milhões de reais. A taxa de mortalidade foi de 8,68%. Portanto, conclui-se que os resultados obtidos nos fornecem informações de grande relevância no campo da saúde pública, bem como dados relacionados aos gastos em saúde que evidenciam a urgente necessidade de uma maior observância por parte dos gestores em todos os níveis de atenção à saúde, além da imprescindibilidade de investimentos em medidas de prevenção de agravos ocasionados pela DM. O farmacêutico clínico possui papel de educador, orientando os pacientes nos mais diferentes aspectos da doença e, em particular, em relação ao uso racional de medicamentos.

Participação em evento 1- I Congresso Brasileiro Integrado em Saúde Pública e Coletiva (I CONBRAISPUC) – fevereiro de 2023.

Acesse <https://doi.org/10.53524/978-65-995572-978-65-84528> para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 9ZPH0HMH

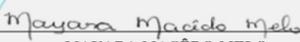


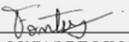
**I CONBRAISPUC
2023**

CERTIFICADO

A Literacia Científica Editora & Cursos certifica que **NAYANA DA ROCHA OLIVEIRA** participou com êxito das atividades desenvolvidas no **I CONGRESSO BRASILEIRO INTEGRADO EM SAÚDE PÚBLICA E COLETIVA (I CONBRAISPUC)**, evento ocorrido de maneira remota, durante o período de 02 a 03 de fevereiro de 2023, perfazendo um total de **60 horas**.

Teresina (PI), 03 de fevereiro de 2023.


MAYARA MACÊDO MELO
Presidente do I CONBRAISPUC


FRANCISCO LUCAS DE LIMA FONTES
Presidente da Comissão Científica do I CONBRAISPUC

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO

CNPJ: 40.370.149/0001-87
PREFIXO DOI: 10.53524
PREFIXOS ISBN:
978-65-995572
978-65-84528

LITERACIA
CIENTÍFICA
EDITORA &
CURSOS

