

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LARISSA FERREIRA ARAÚJO

PLANTAS MEDICINAIS NO CONTROLE DE FUNGOS PATOGÊNICOS
HUMANOS

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2018

LARISSA FERREIRA ARAÚJO

**PLANTAS MEDICINAIS NO CONTROLE DE FUNGOS PATOGÊNICOS
HUMANOS**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Enyara Rezende Moraes

Co-orientadora: Natália Silva da Trindade

PATOS DE MINAS – MG

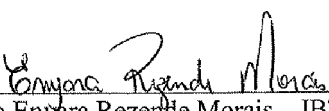
DEZEMBRO DE 2018

LARISSA FERREIRA ARAÚJO

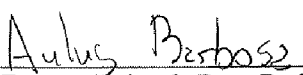
Plantas Medicinais no Controle de Fungos Patogênicos Humanos

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Profa Dra Enyara Rezende Moraes – IBTEC - UFU
Presidente


Profa Dra Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC - UFU
Membro


Prof Dr Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa – IBTEC - UFU
Membro

Patos de Minas, 12 de dezembro de 2018

RESUMO

Os fungos patogênicos humanos são parasitas heterotróficos que infectam o organismo causando lesões. Em organismos imunossuprimidos os casos de infecções por fungos são mais graves podendo levar a morte. Atualmente os antifúngicos mais utilizados para tratamento de infecções pertencem a três classes que são os polienos, os azóis e as equinocandinas. No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos propiciou o surgimento de cepas resistentes, assim o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas se faz necessário para tratar as emergentes e novas patologias fúngicas. As plantas medicinais possuem potencialidade de síntese de substâncias ativas, fontes de importantes metabólitos secundários que podem ser explorados como potenciais antifúngicos. Dentre estes estão os terpenos, linalol e γ -terpinene; flavonoides, flavan-3-ol e catequina; alcaloides, sampangina e azafluorenona; e as naftoquinonas. Em grande parte, os extratos ou óleos essenciais das espécies oriundas da família Lamiaceae possuem verificada capacidade antifúngica. Também, o óleo essencial de *Persicaria hydropiper* e o extrato etanólico de *Vitex agnus-castus* apresentaram capacidade antifúngica ativa e ausência de toxicidade. Portanto, a bioprospecção de agentes antifúngicos em plantas medicinais é uma alternativa promissora frente ao problema da falta de medicamentos e terapias que sejam realmente efetivas para erradicar o desenvolvimento desses patógenos no organismo.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Plantas medicinais. Potencial antifúngico.

ABSTRACT

*Human pathogenic fungi are heterotrophic parasites that infect the body causing injury. In immunosuppressed organisms, cases of fungal infections are more serious and can lead to death. Currently the most commonly used antifungal agents for treatment of infections belong to three classes which are polyenes, azole and echinocandins. However, the indiscriminate use of these drugs has led to the emergence of resistant strains, so the development of new therapeutic strategies is necessary to treat emerging and new fungal pathologies. Medicinal plants have the potential to synthesize active substances, sources of important secondary metabolites that can be exploited as potential antifungal agents. Among these are the terpenes, linalool and γ -terpinene; flavonoids, flavan-3-ol and catechin; alkaloids, sampangine and azafluorenone; and naphthoquinones. In large part, the extracts or essential oils of the species from the family Lamiaceae have verified antifungal capacity. Also, the essential oil of *Persicaria hydropiper* and the ethanolic extract of *Vitex agnus-castus* showed active antifungal activity and lack of toxicity. Therefore, bioprospecting of antifungal agents in medicinal plants is a promising alternative to the problem of the lack of drugs and therapies that are actually effective in eradicating the development of these pathogens in the body.*

Keywords: Secondary metabolites. Medicinal plants. Antifungal potential.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me capacitar, fortalecer, e me permitir chegar até aqui.

À minha orientadora e Prof^ª Dr^ª Enyara Rezende Moraes pela oportunidade a mim concedida e pela paciência em me instruir na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Natália Silva da Trindade pela paciência e tempo gasto em dedicação a este trabalho.

À minha Família, Pais, Irmãos, Sobrinhos e todos que diretamente e indiretamente me ajudou na execução deste trabalho.

Ao meu Esposo pela compreensão e apoio.

Aos meus filhos por serem meu incentivo e por me darem diariamente motivação a alcançar meus objetivos.

Aos Professores do curso de Biotecnologia, pelos ensinamentos a mim transmitidos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-binding cassette
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AgNPs	Silver nanoparticles
CaCdr1p	Transportadores de múltiplos fármacos
CaMdr1p	Transportadores de múltiplos fármacos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM50	Concentração Inibitória Mínima de 50%
CIM90	Concentração Inibitória Mínima de 90%
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CYP	Cytochrome P450
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGCG	Galato de epigallocatequina
ERG11	Lanosterol 14-alfa-desmetilase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FKS1	Subunidade catalítica de 1,3-beta-D-glucan sintase
Ger	Geraniol
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
MC	Meningite Criptocócica
MTT	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
R6G	Rodamina 6G
SAPs	Proteína aspartil secretada
UV	Radiação Ultravioleta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNGOS NO ÂMBITO CLÍNICO E SEU CONTROLE TERAPÊUTICO A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS	11
2.1.1 Micoses Superficiais	13
2.1.2 Micoses cutâneas.....	14
2.1.3 Micoses subcutâneas	15
2.1.4 Micoses sistêmicas	16
2.1.5 Micoses oportunistas	17
2.2 Farmacologia antifúngica	18
2.2.1 Polienos.....	20
2.2.2 Azóis	22
2.2.3 Flucitosina	23
2.2.4 Equinocandinas	24
2.3 Mecanismos de resistência dos fungos aos antifúngicos	25
2.4 Produtos naturais no desenvolvimento de antimicrobianos.....	25
2.5 Testes de Suscetibilidade Antifúngica	26
2.5.1 Método de difusão de Ágar	27
2.5.2 Método de diluição.....	28
2.6 Estudo de plantas com propriedades antifúngicas.....	29
2.6.1 Metabólitos secundários antifúngicos.....	30
2.6.2 Composições dos óleos e extratos analisados	35
2.6.3 Ação dos compostos presentes nas plantas estudadas.....	36
2.6.4 Métodos de extração.....	37
2.6.5 Relação do clima e métodos de extração.....	40
2.6.6 Sinergia antifúngica.....	41
2.6.7 Avaliação da toxicidade	42
3 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Os fungos, classificados em seu próprio reino Mycota, são heterotróficos e determinados como organismos parasitas que se alimentam de matéria viva causando lesões ou eucariontes saprófitos que se alimentam de matéria orgânica em estado de decomposição. Podem ser unicelulares ou multicelulares e são classificados morfolologicamente em leveduras e filamentosos. Os fungos filamentosos possuem células alongadas e ramificadas chamadas de hifas que se multiplicam formando os micélios e permitem a troca de nutrientes e possivelmente sinais de crescimento. A forma de reprodução desses fungos é por esporos, pequenas partículas resistentes responsáveis por causar infecções. Enquanto as leveduras se reproduzem por brotamento ou fissão (HARVEY, 2008; LIN et al., 2015; SIL et al., 2015; KIRKLANDA et al., 2018).

Todos os seres vivos podem ser infectados por fungos, no entanto, dentre as espécies de fungos catalogadas, cerca de 1 % desse total são as responsáveis por infecções fúngicas em humanos, e apenas algumas causam infecções de importância clínica (HARVEY, 2008). Apesar do clima tropical favorecer as infecções fúngicas em humanos, há muitos casos de infecções fúngicas em vários lugares do mundo, e tem aumentado as ocorrências. Relaciona-se esse aumento de casos, com o aumento de pessoas que apresenta o sistema imunológico comprometido, como os pacientes diagnosticados com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (RAVEN, 2011).

Geralmente a infecção fúngica é impedida por um sistema imunológico intacto, no entanto, em um organismo imunossuprimido a suscetibilidade de infecção é maior. Eventos para eliminar patógenos, como os fungos, são induzidos por receptores codificados para reconhecer moléculas estranhas expressadas por um invasor, ao reconhecer esses ligantes, inicia-se uma cascata de sinalização, resultando na expressão de citocinas e quimiocinas, gerando o recrutamento de células imunes fagocitárias inatas (neutrófilos e monócitos) para a área de infecção. Posteriormente sinais de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), chegam até as células T específicas, impulsionando a imunidade adaptativa fúngica. No entanto, variações encontradas na imunologia inata do hospedeiro e a adaptação evolutiva de fungos patogênicos conduzem para uma infecção progressiva (PLATO et al., 2015; TEMPLETON et al., 2018).

A formulação de fármacos antifúngicos se faz necessária devido ao aumento de casos de infecções fúngicas oportunistas a imunossuprimidos, e consequentemente o aumento de micoses em imunocompetentes (TORRES et al., 2018). Contudo, o uso disseminado de antifúngicos fez com que cepas adquirissem resistência, assim, existiu a necessidade de programas de vigilância de resistência por todo o mundo. Hoje em dia apenas três classes de antifúngicos estão disponíveis para o tratamento de micoses sistêmicas, polienos, equinocandinas e triazóis. Considerando esse número limitado de antifúngicos disponíveis, uma das principais estratégias para melhorar a eficácia dos antimicóticos, seria superar a resistência de infecções sistêmicas (GAO et al., 2018; PAI et al., 2018; SILVA et al., 2008; FUTURO et al., 2018).

Atualmente a área farmacêutica tem investido em estudos de extratos de plantas para avaliar a efetividade destes em ação antimicrobiana. Mesmo com os produtos fitoterápicos serem a fonte principal de agentes farmacêuticos, hoje em dia menos de 2 % dos recursos botânicos foi avaliado. E, apesar do progresso em bioquímica e síntese orgânica, há uma dificuldade de replicação daquilo que é projetado pela natureza. Portanto, se vê a importância de estudos para avaliar o potencial terapêutico das plantas ainda não estudadas (SEPEHRI et al., 2016; GNABRE et al., 2015).

Sendo assim, o aumento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais, e o número limitado de antifúngicos disponíveis e muitos deles não serem seguros em determinados casos, se vê a necessidade de síntese de novos antifúngicos mais eficazes e seguros. Portanto, este trabalho tem como objetivo revisar em banco de dados, artigos para análise das infecções fúngicas emergentes, e as plantas com potencial antifúngico já relatadas e identificar compostos presentes nos extratos e óleos com atividade antifúngica.

2 FUNGOS NO ÂMBITO CLÍNICO E SEU CONTROLE TERAPÊUTICO A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS

O trabalho constituiu em uma revisão de literatura, baseado na análise de artigos científicos selecionados dos bancos de dados online, Pub Med (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), Scielo (www.scielo.org/php/index.php) e Google Acadêmico (scholar.google.com.br).

2.1 Patologias fúngicas em humanos

As infecções de origem fúngicas são denominadas como micoses. Devido ao crescimento lento dos fungos, as micoses são geralmente infecções de longa duração e crônicas. De acordo com o local de infecção, a gravidade e o meio de contaminação, as micoses são classificadas, em micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas, sendo esta última a responsável pelos casos clínicos mais graves (TORTORA, 2005) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Distribuição das micoses de acordo com seu local de infecção.

Tipo de micose	Micose	Etiologia
Superficial	Candidíase	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida sp</i>
		<i>Malassezia furfur</i>
	Tinea versicolor	<i>Exophiala werneckii</i>
	Banheira preta	<i>Trichosporum heigelii</i>
	Pedra branca e preta	<i>Piedraia hortae</i>
Cutânea	Dermatofitose	<i>Microsporum sp.</i>
		<i>Trichophyton sp.</i>
		<i>Epidermophyton floccosum</i>
	Onicomicose	<i>Candida sp.</i>
Subcutânea	Esporotricose	<i>Sporothrix schenckii</i>
	Cromomicose	<i>Phialophora verrucosa</i>
	Micetoma	<i>Pseudallescheria boydii</i>
		<i>Mycetophila mycetomatis</i>
	Ficomicose	<i>Basidiobolus haplosporius</i>

	Rinoentomoftromicose	<i>Enromophrhora coronata</i>
	Rinosporidiose	<i>Rhinosporium seclwri</i>
	Lobomicose	<i>Lobo lobo</i>
Sistêmica	Coccidioidomicose	<i>Coccidioides immitis</i>
	Histoplasmosse	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Blastomicose	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	Aspergilose	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus sp.</i>
	Mucormicose	<i>Mucor sp.</i> <i>Rhizopus</i> <i>Absidia</i>
	Candidíase Sistêmica	<i>Candida sp.</i>
Oportunista	Meningite Criptocócica	<i>Cryptococcus spp</i>

Fonte: Adaptado de KÜSTNER, 1998.

2.1.1 Micoses Superficiais

São infecções fúngicas que afetam principalmente a camada mais superficial da pele, são indolentes e podem não provocar reação imune. As principais doenças são as causadas por leveduras e a detecção do fungo causador garante uma eficácia no tratamento, além de garantir um tratamento específico, que impede a resistência do fungo a antifúngicos (OLIVEIRA, 2016).

A piedra branca e preta, tinea e pitíriase, são infecções superficiais causadas por fungos, por geralmente não ocasionar resposta imune, na maioria dos casos, a infecção se torna crônica. O diagnóstico é feito por estudos micológicos das manchas, exame direto e isolamento para identificação dos fungos. Para o tratamento de micoses superficiais não é necessário métodos sistêmicos, o mais eficaz normalmente é o tratamento tópico (PEREZ-TANOIRA et al., 2018).

A Pitíriase versicolor, por exemplo, é uma doença crônica da camada de queratina da pele, que provoca manchas irregulares, escamosas localizadas geralmente nas extremidades próximas do tronco. Ocorre pela infecção do fungo *Malassezia furfur*, um microrganismo oportunista que muda para forma micelial em condições favoráveis da pele, umidade, oleosidade, sudorese e imunossupressão. O tratamento tópico com antifúngicos em relação ao manejo sistêmico possui menos efeitos colaterais e menor custo. Mais comumente são utilizados cremes azóis e o tempo de tratamento varia de 2 a 3 semanas (HAY, 2018). Em um estudo a eficácia do creme de miconazol 2 % foi de 75 % para o tratamento de pitíriase versicolor (SHARMA et al., 2018).

2.1.2 Micoses cutâneas

As infecções por fungos que afetam partes queratinosas do organismo humano são chamadas dermatomicoses. Infectam as unhas (onicomicoses), o cabelo, e superfície da pele gerando uma resposta inflamatória. Estes fungos estão presentes na flora normal e são acometidos em humanos, quando encontram condições favoráveis de proliferação (PEICZAR et al., 1997).

As dermatomicoses são de difícil tratamento e requer persistência por parte do paciente. No tratamento tópico a utilização de cremes como miconazol, cetoconazol, isoconazol e terbinafina são instaurados, e em alguns casos necessita-se também a utilização do tratamento sistêmico que é realizado principalmente por azóis (flucanazol, cetoconazol e itraconazol), griseofulvina e terbinafina (CAMPANHA et al., 2007).

Um exemplo de dermatomicoses são as onicomicoses, estas alteram a estética das unhas, e se não tratadas no estágio inicial, afeta cronicamente a matriz ungueal. Em pacientes de diabetes, as onicomicoses são mais frequentes e os casos são mais graves. A falta de insulina altera o metabolismo e consequentemente a vascularização periférica, e faz com que se tenha um maior risco de amputação (SADER et al., 2003; HOFFMANN, 2011).

Cerca de 80 a 90 % dos relatos de onicomicoses são diagnosticadas como dermatófitos, mas pode ser ocasionada por leveduras (5 a 17 %) e fungos filamentosos não dermatófitos (2 a 12 %). O diagnóstico micológico é, portanto, necessário para definir os antifúngicos para o tratamento (ARAÚJO et al., 2003).

Para o tratamento é utilizado métodos tópicos com ciclopirox e efinaconazol. Em casos mais graves que afetam a matriz ungueal a utilização do tratamento tópico com oral é necessária. Os orais utilizados nestes tratamentos são: fluconazol e terbinafina. Métodos a laser em que se utiliza terapia fotodinâmica baseados em metilaminolevulinato têm sido muito relatadas com resultados mais satisfatórios de menor duração (GUPTA et al., 2018).

2.1.3 Micoses subcutâneas

As micoses subcutâneas ocorrem em um grau de risco maior que as dermatomicoses e afetam o tecido subcutâneo, causando destruição do tecido (PEICZAR, 1997). A infecção ocorre por inoculação no tecido subcutâneo ou na derme, ocasionada por lesão na pele. Os fungos responsáveis por esta micose estão presentes no solo, madeira e plantas em decomposição, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais úmidas (FERREIRA et al., 2018).

Existem três principais tipos de micoses subcutâneas, micetoma, cromoblastomicose e esporotricose. Todas ocorrem por inoculação traumática do tecido e se diferem pelos micro-organismos e tecido atingido. O micetoma é uma micose subcutânea supurativa e granulomatosa, que é destrutiva do osso, tendão e músculo esquelético contíguo. A cromoblastomicose é uma micose subcutânea caracterizada por lesões verrucoides da pele. Enquanto a esporotricose é causada pelo *Sporothrix schenckii* e envolve o tecido subcutâneo no ponto de inoculação traumática. A infecção geralmente se espalha ao longo dos canais linfáticos cutâneos da extremidade envolvida (WALSH, 1996).

Sporothrix schenckii é uma espécie de fungo que causa esporotricose, uma doença que gera nódulos cutâneos infeccionados na pele, sistema linfático e em outros órgãos. Ocorre

também em animais, e são responsáveis pela contaminação em humanos quando em contato. O fungo no hospedeiro libera vesículas extracelulares de bicamadas lipídicas, estas fazem o transporte de moléculas, interagem com células imunes ocasionando resistência e circula pelos fluidos corporais do organismo hospedeiro aumentando a patogênese fúngica. (ABUDU et al., 2018; IKEDA et al., 2018). Esta infecção envolve o tecido subcutâneo no ponto de inoculação traumática e se espalha ao longo dos canais linfáticos cutâneos da extremidade envolvida (WALSH et al., 1996). Para tratamento, o itraconazol é a primeira escolha, a dose diária varia de 100 a 200 mg por via oral em formas cutâneas. Para crianças com peso até 20kg recomenda-se de 5 a 10 mg/kg/dia (SIZAR et al., 2018).

2.1.4 Micoses sistêmicas

Causado principalmente pelos fungos dimórficos, afeta camadas mais profundas, alcançando tecidos e órgãos. Não é uma doença contagiosa, os fungos que causa este tipo de infecção vivem no solo, e a rota de transmissão é exclusivamente por inalação de conídeos/esporos que se encontram na natureza, sendo assim, sua infecção se inicia nos pulmões (TORTOTA et al., 2005; PALMEIRA, 2014).

Para detecção são utilizados testes sorológicos do sangue e mucosas. Estes testes avaliam a presença de anticorpos específicos da imunologia inata. Não são testes muito sensíveis, por isso devem ser indicados a infecções progressivas. Pacientes imunossuprimidos possuem resposta de anticorpos reduzida, o que dificulta a um resultado concreto. São ensaios que envolvem avaliação quantitativa e qualitativa, e para o melhor diagnóstico deve ser associado a exames diretos e laboratoriais de cultura (RICHARDSON et al., 2018).

A Histoplasmose clássica é uma doença causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum*, é considerada uma doença endêmica do continente americano, principalmente território tropical, mas se conhece relatos em várias partes do mundo. É um fungo dimórfico encontrado no solo e no excremento de pássaros e morcegos. A temperatura de 25°C favorece a reprodução assexuada do fungo formando microconídeos (2-5 µm), que entram nos pulmões e alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, podendo chegar até órgãos vitais como fígado e medula óssea (DEEPE, 2018; FERREIRA et al., 2009).

Anfotericina B e seus derivados lipossomais são mais efetivos contra *Histoplasma sp.* do que itraconazol, por outro lado o itraconazol gera menos efeitos colaterais, portanto, a anfotericina B é recomendada para infecções mais graves que requer internação (AIDÉ, 2009).

E Coccidioidomicose é uma doença causada pelas duas espécies de fungos, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, e se diferem por polimorfismo genético e características de crescimento. É uma doença endêmica das regiões desérticas das Américas e a contaminação é por aerossóis microbianos. Quando endósporos alcançam o interior dos pulmões que possui temperatura próxima de 37 °C, o amadurecimento de esférulas que se fixam em alvéolos e bronquíolos é favorecido, e ao se multiplicarem causam pneumonias coccidióidico (KIRKLAND et al., 2018).

As drogas mais utilizadas para o tratamento de Coccidioidomicose são: fluconazol, itraconazol, e anfotericina B, sendo a última a mais indicada para infecções mais severas. A utilização de triazóis para terapia de manutenção deve ser feito até constatação da cura a partir de exames eficazes (FILHO, 2009).

2.1.5 Micoses oportunistas

As micoses oportunistas afetam o organismo que se encontra comprometido imunologicamente e são ocasionadas por fungos com baixa capacidade de virulência presentes na microbiota do organismo humano. Atuam de forma severa por não haver um sistema imune eficaz que possa combatê-lo, podendo ser letal (TORTORA et al., 2005; BERGOLD et al., 2004).

Casos de imunossupressão como em pessoas com HIV, pessoas passando por tratamento oncológico, pessoas com diabetes mellitus, pessoas transplantadas, ou que estejam utilizando corticoides são os mais afetados por essas infecções. Um diagnóstico tardio e uma falha terapêutica pode levar a uma progressão da doença ocasionando consequentemente complicações severas irreversíveis que leve a morte do paciente (GARCIA-GIRALDO et al., 2018). *Cryptococcus neoformans* é um tipo de microrganismo presente na microflora dérmica humana, e na ausência de imunidade em pacientes imunossuprimidos pode causar meningite (RÓNAVÁRI et al., 2018).

A Meningite Criptocócica é uma das infecções oportunistas de maior importância relacionada ao HIV. Causada pelo fungo *Cryptococcus* spp., a infecção ocorre por inalação dos esporos de fungos presentes no solo, que se instalam nos pulmões. Em pacientes imunossuprimidos não há resposta imune eficaz o que leva a uma infecção progressiva e letal, o que torna uma das causas de morte mais comum em países com número relevante de casos de AIDS, mais frequentes que a bactéria *Streptococcus pneumoniae* causadora de meningite. O número de casos mundiais de AIDS é cerca de 33,2 milhões, e a maior quantidade de casos

está no continente africano. Em países menos desenvolvidos a fatalidade foi estimada em 55 % dos casos de Meningite Cripitocócica (MC), com exceção a África Subsaariana com estimativa de 70 %. De 13-44 % de mortes com HIV se deve pela infecção com *Cryptococcus* spp (PARK et al., 2009; RUSCHEL et al., 2018).

Anfotericina B é mais eficaz no tratamento de MC do que o fluconazol. A taxa de mortalidade de pacientes com AIDS foi de 30 % para tratamento com fluconazol e 24 % para tratamento com anfotericina B. Apesar da Anfotericina B ser mais potente, o fluconazol gera menos efeitos adversos e suas doses podem ser muito altas. A terapia combinada é a melhor opção para que ocorra menos efeitos colaterais (CURRIER et al., 2018).

2.2 Farmacologia antifúngica

Com a disseminação do vírus HIV nos anos 80, conseqüentemente houve um aumento nos casos de infecções fúngicas, sobretudo as mais graves, as micoses sistêmicas, o que impulsionou nos anos 90 a produção de antifúngicos pela indústria farmacêutica. Um longo trabalho de investigação possibilitou a produção de antifúngicos mais seletivos e menos causadores de danos colaterais (LEMSADDEK, 2008).

O primeiro antifúngico produzido foi a griseofulvina, aprovado em 1959, que é um produto natural isolado a partir de *Penicillium griseofulvum*, um fungo filamentoso que apresenta ação fungistática (inibe o crescimento do fungo). Atua de forma a desconfigurar a polimerização dos microtúbulos, impedindo a mitose das células fúngicas (LEMSADDEK, 2008; PAGUIGAN et al., 2017).

Os fungos são organismos eucariontes, e possuem semelhanças às células humanas, pois possuem organelas, envoltório nuclear e analogia no metabolismo, por isso o desenvolvimento de antifúngicos precisa ser específico às células fúngicas, para evitar toxicidade (**Quadro 2**) (PLAS, 2016).

Quadro 2. Mecanismos de ação antifúngica e implicações para sua efetividade

Agente Antifúngico	Sítio de ação na célula Fúngica	Atividade	Implicações Clínicas

Polienos	Membrana	Se une ao ergosterol, causando a morte celular.	Poderosa atividade antifúngica de amplo espectro
Azóis	Membrana	Inibe a enzima CYP 450, responsável pela síntese de ergosterol, danifica a membrana citoplasmática.	Atividade fungistática de potencial e espectro variável
Flucitosina	Núcleo	Interfere com a síntese de DNA inibindo a timidilato sintetase.	Espectro restrito. Atividade antifúngica somatória em combinação com anfotericina B.
Equinocandinas	Parede celular	Inibe a síntese do glucano, destruindo a estrutura da parede celular causando lise fúngica.	Poderosa atividade antifúngica de amplo espectro. Potência do efeito aditivo em terapias combinadas.

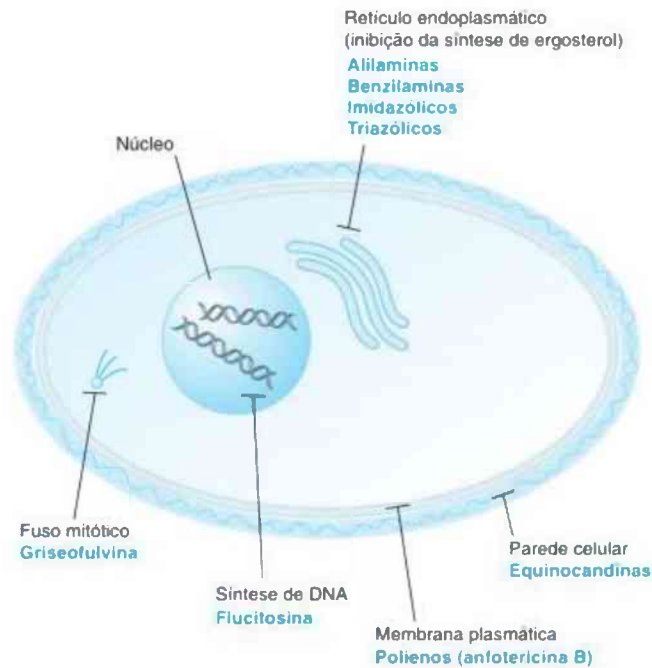
Fonte: DIOMEDI, A. P.; 2004.

As células fúngicas são diferentes das células humanas por possuírem na parede celular o glicano e quitina, que são proteínas estruturais ausentes nas células humanas, além do ergosterol na membrana citoplasmática, um lipídeo componente funcional e estrutural das membranas fúngicas. Enquanto o lipídeo presente nas células humanas é o colesterol, constituinte da membrana celular (PLAS, 2016).

Na **Figura 1** as classes de agentes fúngicos são indicadas, caracterizando seu sítio de ação fúngica. Os polienos, equinocandinas e triazóis atuam direta e indiretamente nas camadas do envoltório celular ocasionando ruptura celular, sendo assim atuam como fungicida matando a célula. As griseofulvinas e flucitosinas atuam no interior das células fúngicas, inibindo o crescimento, atuam como fungistáticos. Portanto, a combinação de antifúngicos fungicida e fungistático aumenta a eficácia do controle a infecções fúngicas. Assim como retratado em Molloy et al. (2018) em que se avaliou a combinação de antifúngicos no tratamento de micoses em pacientes adultos infectados pelo HIV, e constatou melhor eficácia no tratamento utilizando anfotericina B com sinergia a flucitosina. A parceria

de atuação dessas duas drogas diminuiu o tempo de tratamento implicando em menos efeitos colaterais.

Figura 1. Classes de agentes antifúngicos e seus sítios de ação



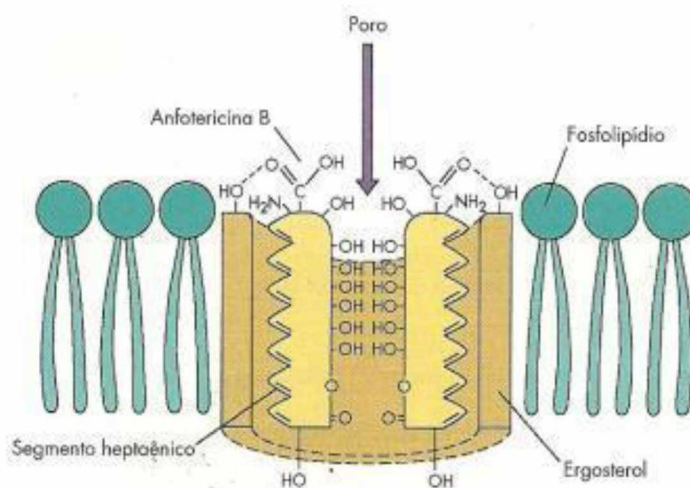
Fonte: VALASQUES, 2015.

2.2.1 Polienos

Os polienos são antifúngicos fungicidas, que atuam na degradação da membrana dos fungos. Eles possuem a capacidade de se ligar a uma porção esterol abrindo canais na membrana, em consequência, há permeabilidade da membrana e extravasamento de moléculas essenciais, culminando na morte celular (BERGOLD et al., 2004).

Os polienos são representados pela anfotericina B e nistatina, sua estrutura é macrocíclica e possui átomos de carbono divalente que se ligam em afinidade ao segmento heptaênico do ergosterol formando o poro, demonstrado na **Figura 2** (MARTINEZ, 2006).

Figura 2. Anfotericina B ligada ao ergosterol formando poro.



Fonte: VALASQUES, 2015.

A anfotericina B é um polieno fungicida que atua na membrana citoplasmática dos fungos. Sua formulação convencional é associada ao desoxicolato de sódio, com a finalidade de solubilidade na água, formação de micélios para estabilização e suspensão. As reações adversas podem estimular o sistema imunológico e gerar toxicidade renal, nefrotoxicidade e anemia, relacionada a doses acumulativas, portanto, seu uso é mais empregado em casos de pacientes imunossuprimidos (MARTINEZ, 2006).

Para aumentar o potencial terapêutico da anfotericina B, são utilizadas três formulações lipídicas: em dispersão coloidal, em complexo lipídico e lipossomal. Essas formulações facilitam o transporte e alteram a afinidade entre tecidos, tornando a droga menos nefrotóxica (MARTINEZ, 2006; PLAS, 2016).

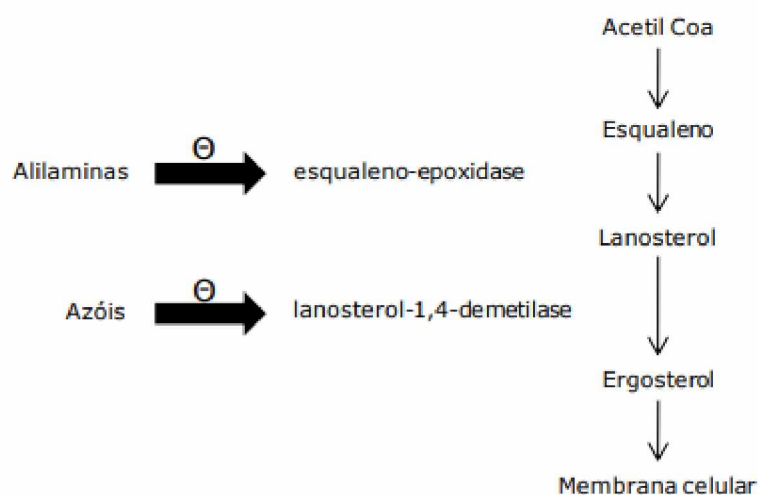
Também utilizada como antifúngico em plantas de consumo humano, uma dosagem maior do que a permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) causa contaminação que para saúde pública tem sido um problema. Os efeitos tóxicos da Anfotericina B variam de alterações no tecido hepático, infertilidade em homens, teratogênese e mutagênese (MOREIRA et al., 2016).

Com semelhança a estrutura da anfotericina B, a nistatina possui a capacidade de se ligar ao ergosterol da membrana fúngica como os outros políenos. Para impedir a recidiva de infecções fúngicas o tratamento deve permanecer por 48 horas após o desaparecimento de sintomas visíveis, e é contra indicada a dosagem por via parental devido sua alta toxicidade. Quando administrada oralmente a mesma não é absorvida e não possui muita eficácia, por isso é mais indicado seu uso tópico (PLAS, 2016; COUTINHO et al., 2003).

2.2.2 Azóis

São compostos sintéticos, atuam impedindo a síntese do ergosterol como as Alilaminas, mas a partir do lanosterol-1,4-demetilase (citocromo P450), uma enzima responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, representado na **Figura 3**. Consequentemente há acúmulo de 14- α -metilesteróis, que altera as propriedades da membrana, impedindo o desenvolvimento do fungo (LEMSADDEK, 2008; BERGOLD et al., 2004). Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006).

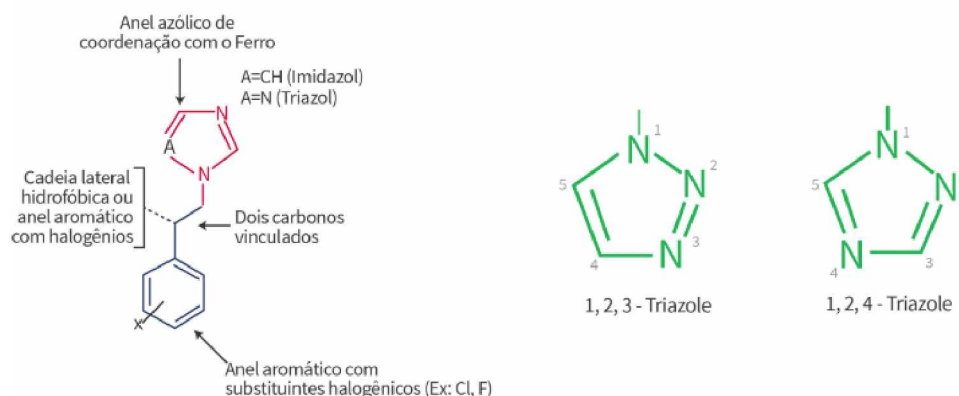
Figura 3. Via metabólica do ergosterol, e atuação dos azóis.



Fonte: LEMSADDEK, 2008.

Sua estrutura possui diferentes quantidades de átomos de azoto no heterocíclico (**Figura 4**), o que os classifica em imidazóis ou triazóis. A diferença de átomos de azoto nos triazóis confere a este um aumento de espectro na ação do antifúngico, também uma diminuição do seu potencial tóxico em relação aos imidazóis (LEMSADDEK, 2008).

Figura 4. Estrutura dos azóis, evidenciando a variação do anel aromático.



Fonte: MARQUES, 2017.

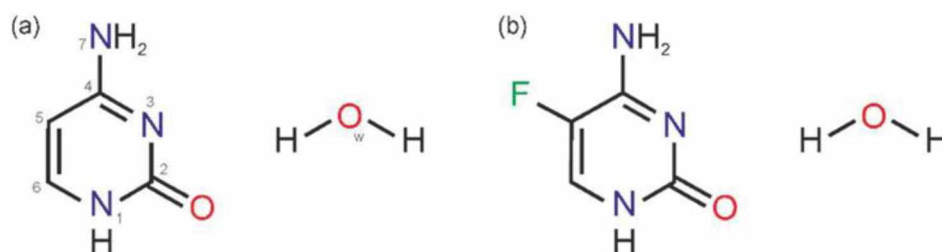
Possui ação fungicida e fungistática e o uso excessivo leva ao aparecimento de resistência, são menos potentes que polienos como a anfotericina B, mas por outro lado causam menos reações adversas (BERGOLD et al., 2004).

O primeiro grupo, dos imidazóis, compreende o miconazol e cetoconazol e o último dos triazóis compreende o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol (MARTINEZ, 2006; PLAS, 2016). O fluconazol é o azol mais utilizado por via oral, ele penetra facilmente em muitos tecidos, tem alta biodisponibilidade e é facilmente administrado em via endovenosa. Em relação a menor recaída e taxa de resposta, o itraconazol é melhor tolerado que o cetoconazol. No entanto, o fluconazol e o itraconazol são teratogênicos e não podem ser indicados a pacientes grávidas (FILHO, 2009; SIZAR et al., 2018).

2.2.3 Flucitosina

É um composto antifúngico sintético, com capacidade antifúngica intrínseca, derivado da citosina, ao ser absorvido pelas células fúngicas converte-se a 5-fluorouracil (**Figura 5**), e, posteriormente, é convertido em metabólitos que inibem a síntese do ácido desoxirribonucleico e ribonucleico dos fungos. O desenvolvimento de resistência em monoterapia gera a necessidade da utilização de combinações terapêuticas da Flucitosina com outros antifúngicos, como a Anfotericina B, comentada anteriormente. Bem absorvido em uso oral, penetra nos tecidos e é excretado pelos rins. Nos casos de insuficiência renal, os ajustes posológicos devem ser feitos (VERMES et al., 2000; BRAUN et al., 2017).

Figura 5. Diagramas moleculares de (a) mono-hidrato de citosina e (b) mono-hidrato de 5-flucitosina.

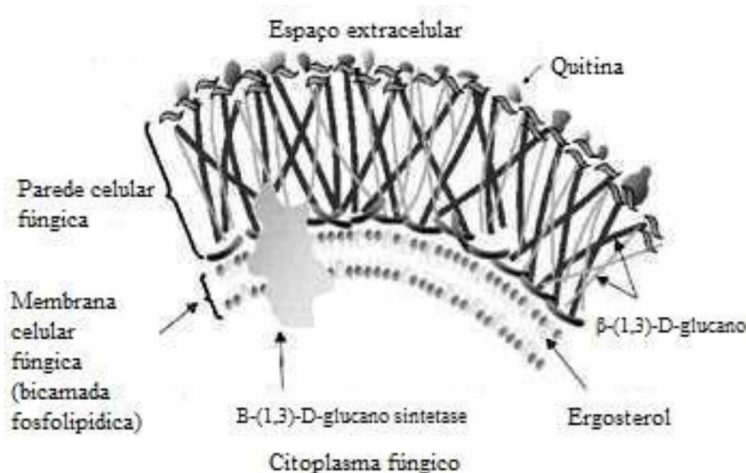


Fonte: BRAUN et al., 2017.

2.2.4 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídicos sinteticamente modificados, originados da fermentação de caldo fúngico. Atuam na inibição da síntese de um componente essencial da parede celular fúngica, o β (1,3) -D-glucano (**Figura 6**), o bloqueio da síntese resulta em um desequilíbrio osmótico. A administração é feita exclusivamente por via intravenosa e seus efeitos adversos são mínimos (MARTINEZ, 2006; DIOMEDI, 2004; PLAS, 2016).

Figura 6. Diagrama da membrana celular fúngica.



Fonte: DIOMEDI, A. P.; 2004.

As caspofungina, micafungina e anidulafungina são as equinocandinas utilizadas comercialmente. Foram aprovadas para uso clínico em 2001 e são consideradas fungicidas para *Candida*. O complexo enzimático em que elas atuam é codificado pelas enzimas FKS1 e FKS2 (HEALEY et al., 2018).

2.3 Mecanismos de resistência dos fungos aos antifúngicos

A resistência microbiológica se refere à falta de sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico, esta pode se desenvolver sem a exposição ao antimicrobiano determinada primária (intrínseca) ou se desenvolver após a exposição ao antimicrobiano, determinada como secundária (adquirida). Certas espécies de fungos são intrinsecamente resistentes, como *Cryptococcus neoformans* para equinocandinas, *Candida krusei* a fluconazol e *Candida* não-albicans para flucitosina (PAI et al., 2018).

O Fluconazol por ser um antimicótico fungistático, oferece maior capacidade de resistência adquirida em espécies isoladas de *Candida*, do que Anfotericina B e Nistatina, que são fungicidas (BANSAL et al., 2018). No entanto, a anfotericina B e azóis (triazol) não foram eficazes em testes de resistência com o fungo *Aspergillus fumigatus*, e se tornou um problema emergente (ASHU et al., 2018; MOHAMMADI et al., 2018).

Mudanças nos processos intracelulares dos antifúngicos e alterações das enzimas responsáveis pelas vias metabólicas são outros mecanismos que geram resistência. Alterações das vias de síntese do ergosterol e do conteúdo de ergosterol na membrana tem sido um dos principais motivos de resistência adquirida a polienos, e a elevada expressão de transportadores ABC (ATP-binding cassette) está relacionada a resistência adquirida de azóis. (SILVA et al., 2008).

A heterogeneidade alélica dos fungos aumenta a possibilidade de resistência a antifúngicos. *Candida auris* e *Candida glabrata* apresentaram resistência a equinocandinas, e esses mecanismos de resistência estão relacionados a mutações no gene FKS1, que expressa a enzima alvo das equinocandinas, a 1,3-beta-glucano síntase. A exposição repetida ou crônica das equinocandinas leva a resistência. No caso do flucanazol, a resistência de *C. auris* está relacionada a mutações no gene ERG11, assim, devido a constatação de resistência de *C. auris* a equinocandinas 7 %, azóis (fluconazol) 93 % e anfotericina B 35 %, deve-se optar para tratamento, a terapia combinada de equinocandinas com anfotericina B lipossomal (CORTEGIANI et al., 2018; BEARDSLEY et al., 2018; HEALEY et al., 2018).

2.4 Produtos naturais no desenvolvimento de antimicrobianos

As plantas medicinais são vegetais que possuem no seu total, ou em alguns órgãos, substâncias com potencial terapêutico, os fitoterápicos. Eles são, portanto, uma mistura complexa composta por substâncias ativas, obtido exclusivamente por matéria prima vegetal ativa. Sua complexidade de composição emprega a capacidade de sinergismo e antagonismos dos seus componentes (OLIVEIRA, 2003). O foco dos pesquisadores tem sido produtos naturais para medicina terapêutica, uma vez que infecções microbianas causadas por bactérias e fungos se tornam cada vez mais resistente a antibioticoterapia (SADIQ et al., 2016).

A capacidade terapêutica de uma planta é determinada também pelos seus metabólitos secundários, estes variam tanto em quantidade de concentração, quanto em diversidade em uma mesma planta. São produtos de vias não essenciais para planta, mas possui papel importante na adaptação da planta ao seu habitat (SIMÕES et al., 1999). O conhecimento dessas características e potencial biológico de determinadas espécies, pode indicar o potencial biológico de plantas da mesma família (SADIQ et al., 2016).

Devido o Brasil ser o maior possuidor de biodiversidade do mundo, várias espécies de plantas ainda não foram submetidas a experimentos de validação de sua capacidade terapêutica. Atualmente, as plantas medicinais necessitam passar por métodos laboratoriais de validação, que garantem a eficácia e segurança das mesmas. O avanço desses estudos se deu pela necessidade de observar a toxicidade e carcinogênese do confrei (*Symphytum officinalis*), que na década de 70 foi uma panacéia mundial. Com os estudos foi comprovado que o consumo de confrei ocasionava câncer de fígado, e hoje pela ANVISA é desaconselhado seu consumo (CAFFARO et al., 2015; BRANDÃO, 2003).

2.5 Testes de Suscetibilidade Antifúngica

Os testes de suscetibilidade em análise de plantas medicinais são métodos laboratoriais usados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos ou óleos essenciais extraídos de plantas. Comitês como Europeu de testes de Suscetibilidade a Antibióticos e o Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais propõem técnicas de referência para reprodução dos testes em todo o mundo. Ambas as instituições categorizam os resultados em suscetível (tratamento apropriado), resistente (não é recomendado) e intermediário (apropriado, dependendo das condições) (ANEKE et al., 2018).

Para melhor eficácia nos métodos, a padronização na execução dos testes se faz necessária para evitar fatores que afetam os resultados do teste de suscetibilidade. Esses fatores são pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo, condições de incubação (temperatura e agitação) e recursos para medição dos halos (OSTROSKY et al., 2008). A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração do potencial antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de microrganismos, avalia, portanto, capacidade fungistática (NCCLS, 2002). O CIM50 representa a menor concentração do potencial antimicrobiano capaz de reduzir 50 % ou mais no crescimento, e CIM90 é a menor concentração do potencial antimicrobiano capaz de reduzir 90 % ou mais no crescimento (CORDEIRO et al., 2018).

A determinação da concentração fungicida mínima (CFM) é baseada nos métodos utilizados para obter a CIM, com algumas modificações. Os poços já testados nos testes de diluição são utilizados para análise de crescimento fúngico. Retira-se a amostra com hastes e colocam em nova cultura e incubação para avaliar o crescimento. Considera-se a CFM na concentração de potencial antifúngico que não houver crescimento, ela avalia capacidade fungicida por morte celular (MACÊDO, 2018). No entanto, as concentrações de CFM são geralmente 2x maiores que CIM (GUCWA et al., 2018).

2.5.1 Método de difusão de Ágar

O método de difusão em Ágar, é um método que avalia discos (6 mm) impregnados com potenciais antimicrobianos. A metodologia consiste em fixar os discos em placa de ágar inoculada com micro-organismos testes. Em geral, se coloca no máximo 12 discos a cada placa de 150 mm. O espaçamento entre eles deve ser igual, para melhor medição dos halos formados após a incubação (NCCLS, 2003).

A eficácia do método se limita a micro-organismos que crescem rápido e a avaliação é comparativa a um antibiótico padrão de referência, o controle positivo. O halo é medido a partir da circunferência do disco, até a margem onde se observa crescimento do micro-organismo. Os halos são classificados de acordo com o tamanho em relação ao controle, em sensíveis (halo ≥ 3 mm menos que o controle), moderadamente sensível (halo < 2 mm e menor que o controle) e resistente (halo ≤ 2 mm) (OSTROSKY et al., 2008).

As concentrações inibitórias mínimas obtidas pelos resultados de difusão de ágar, obtidos em tabelas a partir do tamanho do halo, são mais altas que as produzidas em métodos de diluição de caldo. Por isso, deve-se haver cautela na interpretação para prever a

susceptibilidade ou a resistência dos potenciais microbianos (ANEKE et al., 2018; NCCLS, 2003).

2.5.2 Método de diluição

O método consiste em avaliar o crescimento de determinado microrganismo diluído em meio aquoso contendo potencial antimicrobiano, o padrão para diluição em caldo, é de 10^5 UFC/mL. Após inoculação do micro-organismo ao meio é feita uma agitação para homogeneizar a solução. E, posteriormente, são incubados sem agitação a uma temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (NCCLS, 2002; VOUKENG et al., 2016).

Os extraídos de plantas são considerados ativos com valores de CIM menor que 8 mg / mL. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é considerada significativa quando CIM $< 100\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$, moderada quando CIM estiver entre 100 e $625\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ e baixa quando a CIM $> 625\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ (VOUKENG et al., 2016). A medida da inibição do crescimento microbiano em microdiluição é feita por espectrofotômetro de microplacas (OLIVEIRA, 2009).

Dos métodos em diluição, existe o ensaio de microdiluição em caldo, neste método é utilizado microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 ml. Por ser um método barato, 30 vezes mais sensível, com boa reprodutibilidade, utilizado em grandes números de amostra e requerer pouco volume de amostra é muito indicado para avaliação de efeito antifúngico de fitoterápicos. O tempo de incubação deve variar de 24- 48h para melhores resultados, identificando assim, a capacidade de resistência do potencial antimicrobiano (OSTROSKY et al., 2008). O método de macrodiluição em caldo, são feitos em tubos de ensaio com volume do meio variando de 1 a 10 ml e requer muito tempo e área de trabalho, gera grande quantidade de resíduos e usa poucas réplicas em relação ao ensaio de microdiluição (OSTROSKY et al., 2008; NCCLS, 2002).

2.6 Estudo de plantas com propriedades antifúngicas

Foram selecionadas 16 plantas de espécies diferentes para análise e comparação dos dados contidos em 14 artigos. De todas as plantas estudadas, elas representam 10 Famílias de plantas, as Lamiaceae, Verbenaceae, Fabaceae, Polygomaceae, Lythraceae, Chrysobalamus, Poaceae, Myrtaceae e Hypericaceae. Sendo que, a Família das Lamiaceae possuíram mais plantas estudadas, seguido das Verbenaceae. As famílias representam em grande parte a

Magnoliopsida. As espécies de Lamiaceae são utilizadas para tratar distúrbios gastrintestinais e infecções microbianas, e são descritos por possuir propriedades antissépticas, antimicrobianas e antifúngicas (KHOURY et al., 2016).

As plantas são na maioria nativas do Oriente Médio e proximidades, duas espécies são nativas do Brasil das regiões de Cerrado e também das Américas em geral. A maioria são plantas domésticas, e muito utilizadas na culinária mundial, como orégano, tomilho, persicária picante, verbena de limão, e na medicina terapêutica, como limonete, capim-limão, pau ferro.

Três extratos foram considerados ativos com valores de CIM menores que 8 µg / mL foram as espécies *Ziziphus spina christi*, *Salvia mirzayanii* e *Persicaria hydropiper*. Dez foram consideradas significativas com CIM <100 µg / mL, quatro foram consideradas moderadas por apresentar CIM entre 100 e 625 µg / mL e dois foram consideradas potenciais antifúngicos baixos com CIM > 625 µg / mL (**Tabela 1**).

Em relação ao controle positivo, grande parte dos estudos, teve valores abaixo dos fitoterápicos de teste. O método escolhido na maioria dos artigos para obtenção dos valores de CMI, CMI50, CMI90 e CFM foi de microdiluição em caldo. CIM50 teve valores mais baixos que CIM90, e mostra que para inibição de 90% a quantidade de droga deve ser maior (**Tabela 1**).

Os valores de CFM em relação ao CMI foram maiores, indicando que a maior concentração é necessária para causar morte celular fúngica (**Tabela 1**). Os resultados para óleo essencial de *Salvia mirzayanii* demonstraram as diferenças nas concentrações mínimas para diminuir o crescimento em 50% (CIM50 0,5 µg / mL), em 90% (CIM90 1,0 µg / mL) e para cessar o crescimento fúngico foi de 2,0 µg / mL (CFM) e indica possuir grande potencial fungicida contra *C. albicans*, como também o extrato alcoólico de frutos imaturos da espécie *Ziziphus spina christi* que apresentou CIM50 0,05 µg / mL e CIM90 0,1 µg / mL.

Os extratos da planta *Caesalpinia férrea* apresentaram grande potencialidade fungistática com valores de CIM 9,7 µg / mL e CFM 1.250 µg / mL, o que indica a capacidade de inibição do crescimento fúngico, e não a morte celular contra *C. albicans*. Como também ocorreu no óleo essencial da espécie *Psidium salutare* que apresentou CIM50 32,4 µg / mL e CFM 1.024 µg / mL contra *C. krusei*.

Candida ssp. foi a espécie mais avaliada, principalmente isolados de mucosas orais e vaginais. A *C. albicans* por exemplo é um fungo dimórfico responsável por infecções superficiais, cutânea e sistêmica. Este organismo encontra-se em relação de comensalismo com organismo humano, no entanto, pode se tornar um patógeno, causando infecções orais, genitais e gastrointestinais. Sua forma hifal ocorre pelo aumento de temperatura (37 °C),

aumento de pH e de indutores. A forma constituída por hifas promove o desenvolvimento de biofilmes, associado à capacidade de resistência a antifúngicos (MACÊDO et al., 2018; JERUTO et al., 2016). Estes biofilmes estão relacionados a 90 % das infecções causadas em pacientes hospitalizados, isto ocorre pela facilidade da adesão deste micro-organismo a superfícies. O contato com superfícies leva a produção de polímeros extracelulares (SOLIMAN et al., 2017).

Tabela 1. Estudos da atividade antifúngica de fitoterápicos considerando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) 50 %, 90 % e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) através do método de suscetibilidade por microdiluição.

Autor (ano)	Planta (espécie) e Família	Origem	Nome Popular	Controle +	Extração e parte da planta	Microrganismo	CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CIM50 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CIM90 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CFM ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
MARDA NI et al., 2018.	<i>Ziziphus spina christi</i> e <i>Rhamnaceae</i>	Oriente Médio e Mediterrâneo	Jujuba	Nistatina e Fluconazol	Extrato etanólico 80% de frutos imaturos	<i>Candida albicans</i>	–	0,05	0,1	–
ZOMO RODIA N et al., 2017.	<i>Salvia mirzayanii</i> e <i>Lamiaceae</i>	Sul do Irã	Salvia	Itraconazol e Fluconazol	Óleo essencial das folhas	<i>Candida albicans</i>	–	0,5	1,0	2,0
MOYEE NUL et al., 2014.	<i>Persicaria hydropiper</i> e <i>Polygonaceae</i>	Continente Asiático	Persicária -picante	Fluconazol e Cetoconazol	Óleo essencial das Folhas	<i>Epidermophyton floccosum</i>	7,81	–	–	–
KEIKH A et al., 2018.	<i>Vitex agnus-castus</i> e <i>Lamiaceae</i>	Oriente Médio e Europa	Vitex	Fluconazol	Extrato etanólico 70% das folhas	<i>Candida albicans</i>	–	7,81	15,62	–
SOARE S et al., 2018.	<i>Caesalpinia ferrea</i> e <i>Fabaceae</i>	Brasil (Cerrado)	Pau ferro	Nistatina e anfotericina B	Extrato etanólico 70% das sementes	<i>Candida albicans</i>	9,7	–	–	1.250
TOCCI et al., 2018.	<i>Hypericum hircinum</i> subsp. <i>Majus</i> e <i>Hypericaceae</i>	Europa Mediterrânea	Tutsan fedorento	Fluconazol	Extrato metanólico 50% de hastes e folhas	<i>Candida glabrata</i>	–	16	64	–
MACÊD O et al., 2018.	<i>Psidium salutare</i> e <i>Myrtaceae</i>	Brasil (Cerrado)	Araçá-rasteiro	Fluconazol	Óleo essencial das Folhas	<i>Candida krusei</i>	–	32,4	–	1.024
GAVAN JI et al., 2015.	<i>Zataria multiflora</i> e <i>Lamiaceae</i>	Irã	Tomilho iraniano	Anfotericina B e cetoconazol	Óleo essencial de partes aéreas	<i>Candida albicans</i>	34	–	–	64
GAVAN	<i>Satureja hortensis</i> e		Segurelha	Anfotericina B	Óleo essencial	<i>Candida</i>	40			73

JI et al., 2015.	<i>Lamiaceae</i>	Irã	-anual	e cetoconazol	de partes aéreas	<i>albicans</i>				
Autor (ano)	Planta (espécie) e Família	Origem	Nome Popular	Controle +	Extração e parte da planta	Microrganismo	CIM (μ g / mL)	CIM50 (μ g / mL)	CIM90 (μ g / mL)	CFM (μ g / mL)
KHOUR Y et al., 2016.	<i>Origanum syriacum</i> e <i>Lamiaceae</i>	Mediterrâneo e Ásia Ocidental	Orégano	Itraconazol e Fluconazol	Óleo essencial de topos de floração	<i>Trichophyton rubrum</i>	64	–	–	–
SHIN et al., 2004.	<i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Poaceae</i>	Ásia (Índia)	Capim-limão	Cetoconazol	Óleo essencial da folha	<i>Trichophyton rubrum</i>	<125	–	–	–
KHOUR Y et al., 2016.	<i>Coridothymus capitatus</i> e <i>Lamiaceae</i>	Mediterrâneo e Ásia Ocidental	Orégano espanhol	Itraconazol e Fluconazol	Óleo essencial de topos de floração	<i>Candida albicans</i>	128	–	–	–
SOLIMAN et al., 2017.	<i>Lawsania inermis</i> e <i>Lythraceae</i>	Norte da África e Sul da Ásia	Henna	Cetoconazol	Extrato etanólico 95% de partes aéreas	<i>Candida albicans</i>	625	–	–	–
GHASEMPOU et al., 2016.	<i>Lippia citriodora</i> e <i>Verbenaceae</i>	América do Norte	Limonete	Nistatina e Fluconazol	Extrato etanólico 95% de folhas	<i>Candida albicans</i>	625	–	–	–
EBANI et al., 2018.	<i>Aloysia tryphilla</i> e <i>Verbenaceae</i>	América do Sul	Verbena de limão	Voriconazol	Óleo Essencial	<i>Aspergillus fumigatus</i>	855	–	–	–
SILVA et al., 2017.	<i>Chrysobalanus icaco</i> e <i>Chrysobalanus</i>	Américas	Guajuru	Nistatina	Extrato etanólico 70% das folhas	<i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	3120 e 6250	–	–	–

2.6.1 Metabólitos secundários antifúngicos

Produtos secundários de plantas, responsáveis pela defesa a micro-organismos, tem o potencial de serem úteis no controle a micro-organismos patogênicos humanos, uma vez que os seres humanos não possuem essa linha de defesa. Os alcaloides e flavonoides são classes de metabólitos em que se têm relatos de possuírem forte potencial antimicrobiano. Outros metabólitos secundários são os terpenos, também são muito abundantes nos óleos essenciais utilizados para medicina terapêutica (SADIQ et al., 2016; VIZZOTO et al., 2010).

Técnicas de cromatografia instrumental são utilizadas para quantificar e separar os compostos presentes em uma amostra do extrato ou óleo essencial. Esse método acoplado ao espectrômetro de massa capacita a qualificação dos compostos e a sua estrutura molecular. A análise quantitativa de flavonóides ocorre por espectrometria UV-Visível (CHABARIBERI et al., 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada na análise de compostos fenólicos, utiliza gradiente da fase móvel para separação de diferentes classes de compostos, como os flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos. Muitos laboratórios de instituições disponibilizam sistemas CLAE equipados apenas com bomba simples, de menor custo, e empregando eluição isocrática, mantendo constante o fluxo da fase móvel na coluna, por ser um sistema de fácil operação e com boa reprodução entre diferentes marcas de equipamentos (DUTRA et al., 2010).

Para determinação do teor de taninos utiliza-se CLAE e a espectrofotometria. A quantificação do ácido úrico por Folin e Macallum, que gera complexos azuis formados pela reação oxi-redução de polifenóis. A reação não é específica para taninos, mas é utilizada para determina-los calculando a diferença entre o teor de polifenóis e fração polifenólica (VERZA et al., 2007).

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, também muito utilizada para determinação de compostos em uma amostra de extrato ou óleo essencial de plantas, consiste no arraste das moléculas através da coluna e essas moléculas se separam por volatilidade diferentes, em sequência se caracteriza os compostos na espectroscopia de massa (KEIKHA et al., 2018).

Os terpenos pertencem à classe derivada de isopreno, se originam da glicólise através da via do mevalonato ou também da via do metileritritol fosfato. Possui 30.000 compostos

conhecidos e são classificados pela quantidade de números de carbonos, hemiterpeno (5 carbonos), monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), etc. Esse grupo possui ampla aplicação na indústria farmacêutica, cosméticos, alimentícios, entre outras. Para evitar autotoxicidade, são armazenados nas plantas em canais de resina e tricomas glandulares, que são estruturas escretoras (WU et al., 2018; HOLOPAINEN et al., 2018).

A hidrodestilação de plantas ricas em terpenos gera os óleos essenciais e, normalmente, a composição desses contém de 1 a 3 terpenos principais e vários outros de composição menores. São normalmente voláteis, utilizados geralmente como fragrâncias, e para as plantas possuem comumente o papel de defesa, possuindo grande potencial pesticida (SCALERANDI et al., 2018).

Os Fenóis são metabolitos secundários originados da via do ácido chiquímico, se relaciona com o metabolismo de carboidratos e aminoácidos aromáticos (HOLOPAINEN et al., 2018). Os flavonóides são polifenóis, e há relatos da presença deles, com forte potencial antibacteriano como a rutina, miricetina e albanol B, nas plantas das famílias Moraceae, Fabaceae e Leguminosae (SADIQ et al., 2016).

Os compostos ferúlico, cinâmico e vanílico são fenóis presentes em tecidos de plantas e possuem efeitos nos fungos em relação ao crescimento e a produção de micotoxinas. Em concentrações muito altas, os ácidos p-hidroxibenzoico, protocatequínico e vanílico são inibidores, mas a atividade inibitória de micro-organismos não depende das altas concentrações, pode estar relacionado com diferentes estruturas, como os derivados do ácido cinâmico, metil éster ácido cis-3,4-dimetoxicinâmico e metil éster ácido cisferúlico, que inibem crescimento fúngico em concentrações de 1 a 10 nM (SOUZA et al., 2010).

Atualmente foram encontrados 21.000 compostos conhecidos dos metabólitos alcalóides, e estes são compostos nitrogenados derivados de precursores de aminoácidos, encontrados com predominância nas dicotiledôneas, principalmente o gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae (HOLOPAINEN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2009).

As quinonas são obtidas pela oxidação de fenóis, possui esqueleto de carbono aromático com no mínimo duas ligações duplas entre carbonos. As quinonas no organismo estão relacionadas a processos oxidativos de transferência de elétrons para produção de energia como na fotossíntese e na fosforilação oxidativa (FUTURO et al., 2018). Há três grupos principais de quinonas, em função do tipo de ciclo, um deles são as antraquinonas que possuem potencial anticancerígeno (BAJPAI et al., 2018).

Outro grupo de quinonas são as naftoquinonas que tiveram sua atividade antifúngica comparada a da anfotericina B. Alguns dos compostos de naftoquinonas se mostraram

eficazes, dentre eles, a 2-cloro-5,8-di-hidroxi-1,4-naftoquinona que foi mais ativo contra *C. krusei* (CIM de 2 µg / mL) (FUTURO et al., 2018).

2.6.2 Composições dos óleos e extratos analisados

A grande quantidade de metabólitos secundários analisados mostra a proporção de potencialidade das plantas na síntese de substâncias ativas. Maioria dos extratos, descritos a seguir, foram obtidos pelas folhas, partes aéreas e topos de floração.

- *Lippia citriodora*: seus compostos são pertencentes aos cisquiterpenos. São estes o beta-cariofileno e o óxido beta-cariofileno possuem ação antifúngica. São encontrados no extrato vegetal, também geraniol, geranial e neral que possuem estudos que comprovam a atividade contra *Aspergillus flavus* (GHASEMPOUR et al., 2016).
- *Psidium salutare*: terpinolene, τ - caadinol e γ -terpinene, são compostos do extrato da planta que possuem ação antifúngica contra *Candida albicans*, e o p-cimeno e linalol possuem efeito inibitório a *Candida tropicalis* (MACÊDO et al., 2018).
- *Caesalpinia ferrea*: antraquinonas, alcaloides, depsídeos, depsidonas, lactonas, saponinas, açúcares, sesquiterpenos e triterpenos são encontrados (SOARES et al., 2018).
- *Hypericum hircinum* subsp. *majus*: os compostos mais abundantes encontrados foram flavonóis, benzoato e cinamatos (ácido clorogênico e ácido neoclorogênico) e flavan-3-óis. O principal foi o flavonol hyperoside, e mais abundantes. O ácido neoclorogênico e a epicatequina flavan-3-ol. As propriedades anti- *Candida* de flavan-3-ols, e em particular de catequina e epigalocatequina, são conhecidas (TOCCI et al., 2018).
- *Persicaria hydropiper*: isolado do óleo essencial, o Confertifolin, possui atividades antifúngicas. Também possui Polygodial que inibe *Candida albicans* (DURAIPANDIYAN et al., 2009; MOYEENUL HUQ et al., 2014).
- *Origanum syriacum* e *Coridothymus capitatus*: Timol em *Origanum syriacum* foi o principal constituinte com 74,4 %, e em *Coridothymus capitatus* representou 29,3 % do óleo essencial, assim como o carvacrol que em *Coridothymus capitatus* representou 29,3%. Todas as duas espécies também obtiveram porcentagens altas nos compostos *p*- cimeno e γ - terpineno (KHOURY et al., 2016).

- *Aloysia tryphilla*: sua composição resultou em 24 % de sabineno, 36,7 % de limoneno e 12 % de citronelal. Sendo que estudos com o sabineno e o citronelal demonstraram eficiência contra *A. fumigatus* (EBANI et al., 2018).
- *Ziziphus spina christi*: sua ação antifúngica de acordo com estudos é devido ao flavonóide. Possui como constituintes, portanto, rutina, quercetina, miricetina, apigenina, quercetina-3-O-galactosídeo, luteolina, kaempferol e kaempferol-3-O-robinosídeo, apigenina-7-O-lucosídeo, quercitrina, quercetina, isovitexina, e quercetina-3-O-lucoside-7-O-arabinose rhamnoside (MARDANI et al., 2018).
- *Chrysobalanus icaco*: os resultados relataram a presença de saponina, flavonóides, taninos, catequinas, triterpenóides e esteróides. Diversos compostos foram identificados e isolados em preparações obtidas de diferentes partes de *C. icaco*, incluindo diterpenos tipo kaurano, fitoesteróis (estigmasterol, sitosterol e campesterol), terpeno (ácido pomólico), flavonóide 7-O-metil kaempferol, catequina e antocianinas. Flavonóides e terpenos são os principais compostos presentes nas espécies de Chrysobalanaceae (SILVA et al., 2017).
- *Zataria multiflora* Boiss e *S. hortensis* L.: Possuem dois componentes principais o timol e o carvacrol. Sendo que *Zataria* contém mais carvacrol (YAHYARAEYAT et al., 2013, GAVANJI et al., 2015).
- *Vitex agnus-castus*: os compostos principais são pineno, isoterpinoleno, cariofileno e azuleno. Possui também terpenos com relatos de ação antifúngica como Dl-Limonene, γ -Terpinene, α -Terpinolene, 5-amino-6-nitroquinolina (KEIKHA et al., 2018).
- *Salvia mirzayanii*: os principais constituintes do óleo são monoterpenos 1,8-cineol, acetato de linalol e α -terpinyl acetato. Em outras espécies de *Salvia*, o 1,8-cineol é o principal constituinte do seu óleo essencial (ZOMORODIAN et al., 2017).

2.6.3 Ação dos compostos presentes nas plantas estudadas

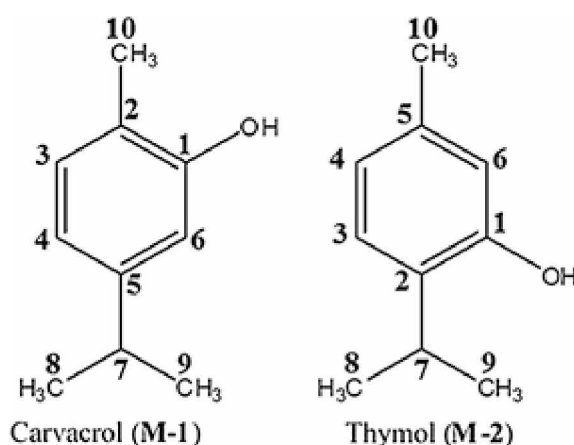
Dentre os compostos presentes nas plantas estudadas, foi revisado em banco de dados e encontrado a ação de alguns compostos que apresentaram atividades antifúngicas. Essas ações estão relacionadas à diminuição de resistência, diminuição da atividade de bombas de efluxo, alteração na membrana celular causando lise, alterações na síntese de DNA.

Em um estudo a morte celular foi evidenciada na CMI do composto limoneno, os esporos nos poços tratados com iodeto de propídio foram avaliados e constatados coloração

vermelho-alaranjado o que indica a alteração da integridade da membrana celular do fungo *Trichophyton rubrum*, caracterizando assim, o limoneno como fungicida. A coloração do kit de viabilidade também obteve resultados de células mortas com pouca ou nenhuma atividade metabólica das que foram tratadas com limoneno, observando anomalias na estrutura da hifa. Indicando que o limoneno pode afetar as estruturas das hifas (CHEE et al., 2009).

A capacidade do timol e do carvacrol de dissolver a membrana causando a perda de moléculas é devido a um grupo hidroxilo em posição diferente ao anel fenólico (**Figura 7**). Estes isômeros causam no fungo alterações morfológicas, alteram a homeostase, afetam o crescimento radial, resulta na depleção do ATP intracelular e morte celular, impedindo assim, o crescimento micelial (OCHOA-VELASCO et al., 2018).

Figura 7. Estrutura química do carvacrol (M-1) e timol (M-2).



Fonte: KHAN et al., 2017.

O espectro de atividade antifúngica do carvacrol está relacionado com a inibição da expressão dos genes SAPs em isolados de *Candida albicans*. Esses genes são responsáveis pela adesão de *C. albicans*, evasão de respostas imunes do hospedeiro e dano tecidual. Portanto, a inibição dessas proteinases impede a resistência de *C. albicans* (HOSSEINI et al., 2016). O efeito sinérgico da atuação dos dois isômeros aumenta a capacidade fungicida ao desintegrar a membrana e facilitar a entrada do carvacrol que atua também no citoplasma (OCHOA-VELASCO et al., 2018).

A Hsp90 é uma enzima responsável por vários processos como transição de fase em fungos dimórficos, resistência a drogas antifúngicas e patogenicidade. Usando ancoragem molecular, avaliou-se que os flavonóides luteolina e rutina foram os inibidores principais da

Hsp90, embora todos os outros compostos de *Cardiospermum halicacabum* demonstraram afinidade à enzima. No entanto, a atuação do extrato total da planta obteve efetividade antifúngica mais evidente. O que demonstra a importância do sinergismo dos compostos que podem ter agido inibindo a Hsp90 e também orquestrando em outros pontos de ação resultando em maior atividade antifúngica do extrato total (GAZIANO et al., 2018).

A superexpressão de bombas de efluxo de antifúngicos, que pertence ao cassete de ligação ao ATP (ABC) nas células fúngicas está relacionado com mecanismo de resistência dos fungos a antifúngicos. Para combater esses mecanismos de resistência, o alvo deve ser a inibição e modulação da função desses transportadores. Foi, portanto, avaliado a atividade antifúngica do Geraniol (Ger) em relação aos transportadores CaCdr1p e CaMdr1p. Células de *Candida albicans* foram suspensas ao corante fluorescente Rhodamine 6G. Em seguida, foi examinado o efeito de Ger nas atividades da bomba de efluxo, monitorando o acúmulo intracelular dos corantes fluorescentes na presença de Ger, projetando que as células tratadas com Ger não foram capazes de efluir o corante. Estas observações afirmam que Ger inibe especificamente CaCdr1p efluxo em *C. Albicans* (SINGH et al., 2018).

O sesquiterpeno polygonal inibe a germinação de hifas impedindo a formação do micélio. A ação deste composto altera a morfologia das células fúngicas, ocasionando danos nas membranas. Outro composto semelhante, o drimenol, inibe o crescimento micelial de forma eficiente, mas por mecanismos diferentes. As diferentes atividades antifúngicas desses compostos são discutidas em termos da densidade eletrônica na ligação dupla (**Figura 9**). Uma comparação de estruturas químicas para estes compostos indica que a principal diferença repousa sobre o efeito eletrônico do substituinte C-8 na ligação dupla, isto é, a densidade eletrônica desta ligação é aumentada pelo metil, e diminuída pelo aldeído, substituição em C-8. Portanto, o efeito inibitório desses compostos sobre o crescimento de *B. cinerea* parece ser determinado principalmente pela densidade eletrônica de dupla ligação. O polygonal inibe a germinação das hifas e o drimenol o crescimento hifálico e a germinação de conídios. Sendo assim, o Polygonal inibe o crescimento inicial do fungo (CARRASCO et al., 2017).

Figura 9. Estruturas químicas do poligodial (1) e drimenol (2).

altas concentrações ou combinação de diferentes óleos para potencializar o sinergismo e aumentar a eficácia (SHIN et al., 2004). Por exemplo, o óleo essencial de *Psidium salutare* associado ao fluconazol se mostrou eficaz por reduzir a dose antifúngica, e simultaneamente diminuir os níveis toxicológicos, e produzir efeito fungicida (MACÊDO et al., 2018).

2.6.4.1 Extratos

Os extratos de plantas são obtidos a partir de extração por solvente como água, metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, acetona, hexano e outros. O estudo de extratos derivados de plantas é geralmente desafiador, pois diferentes solventes, métodos ou várias condições de armazenamento dão origem a diferentes ingredientes ativos de plantas, levando à variação no modo de ação (CHEN et al., 2018).

Primeiramente, se faz a moagem de partes da planta em moinhos limpos e esterilizados. Os tipos de moinhos são pinos, jato de ar, de discos, de martelos e de facas. Os princípios de moagem podem ser de concussão, atrito e corte e são escolhidos de acordo com a matéria-prima a ser utilizada e o resultado esperado (SIMÕES et al., 1999). Após a extração, o produto é filtrado e seco a temperaturas favoráveis ao solvente utilizado (SIMÕES et al., 1999; KEIKHA et al., 2018).

2.6.5 Relação do clima e métodos de extração

No entanto, a síntese de metabólitos secundários está relacionada com fatores principalmente bióticos que alteram a concentração e composição dos extratos e óleos essenciais de acordo com a variação climática. Foi observado na espécie *Psidium salutare* diferentes concentrações de linalol, p-Cymene, terpinolene, γ -terpinene e τ -caadinol em diferentes estações do ano, na estação chuvosa obteve-se mais produto o que indica melhor época de colheita (MACÊDO et al., 2018). Em outro estudo a quantificação dos componentes do óleo essencial variavam em relação a linhagem selvagem e a cultivável da espécie *Salvia mirzayanii*, na espécie selvagem a concentração era de 5-Neo-cedranol (15,48%) e 1,8-cineol (11,23%) e na cultivável, 5-neo-cedranol (19,42%) e espatulenol (7%) (ZOMORODIAN et al., 2017).

A planta *Aspidosperma polineuron* (peroba rosa) foi avaliada em seu potencial antifúngico e de todos os extratos etanólicos processados a partir de partes da planta, apenas os obtidos a partir do caule foram efetivos contra o crescimento do fungo *Cladosporium*

herbarum. Outro estudo avaliou o extrato etanólico da *A. polineuron* obtidos de rejeitos de uma madeireira e obtiveram resultados positivos contra o fungo *Pseudomonas mirabilis*. Neste estudo, também foi avaliada a composição dos extratos por método de espectroscopia de ultravioleta o qual demonstrou a presença do alcalóide polineuridina, confirmando a antifúngicidade desse alcaloide, já descrito em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2009). Alcalóides isolados de *Cananga odorata* e *Mitrephora diversifolia*, como sampangina e azafluorenona também foram descritos como potenciais antifúngicos (SADIQ et al., 2016).

A padronização dos métodos de extração é de extrema importância para validar comparações de experimentos. A composição e concentração de componentes são variáveis e dependentes de muitos fatores como período de colheita, armazenamento, condições de cultura. A falta de controle dessas variáveis pode levar a divergência de resultados de estudos com a mesma temática. Ghasempour et al. (2016) analisou resultados distintos de estudos anteriores por utilizar a menor concentração de extratos nos testes de susceptibilidade em difusão de disco em ágar, os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que não houve inibição do crescimento e nem aparecimento de halos.

Os extratos aquosos e alcoólicos possuem constituintes diferentes de acordo com a solubilidade de cada solvente utilizado no preparo do extrato. No estudo de Ghasempour et al. (2016) o extrato etanólico apresentou resultados mais satisfatórios antimicrobiano em relação ao extrato aquoso. Isso se deve pela quantidade de fenólicos no extrato etanólico, em relação ao extrato aquoso.

Em *H. hircinum* subsp. *majus*, foram testados a infusão e os extratos hidroalcoólicos, observou que o extrato metanólico possuiu maior citotoxicidade, mas, no entanto, possui maior atividade antifúngica que o extrato da infusão (TOCCI et al., 2018).

O extrato aquoso de vitex teve menos efeito se comparado ao extrato alcoólico em relação a isolados clínicos de *Candida albicans* (KEIKHA et al., 2018). Nos estudos de Mardani et al. (2018), no método de difusão em disco de ágar, os halos de inibição foram produzidos para diferentes concentrações de ácido etanólico da planta *Chrysobalanus icaco*, mas para o extrato aquoso os halos de inibição não se formaram.

2.6.6 Sinergia antifúngica

Em relação aos óleos essenciais frente aos controles azóis, a sensibilidade dos fungos aos óleos essenciais é mais significativa, por possuírem diferentes mecanismos de ação em comparação aos azólicos. O óleo essencial hidrofóbico possui interação com a membrana

celular, e apesar de apresentar CIM moderado, os efeitos colaterais dos óleos são menores (ZOMORODIAN et al., 2017). Portanto, para otimizar o potencial fúngico de antifúngicos, a terapia combinada representa um benefício terapêutico para combate da resistência antifúngica. A associação de óleos essenciais ao fluconazol reduz a dose indicada, diminuindo níveis tóxicos e reações adversas, e ao mesmo tempo produz efeito fungicida (MACÊDO, 2018). Em um estudo a sugestão de sinergia a combinação do óleo de *P. graveolens* e cetoconazol foi feita para o tratamento de espécies de *Trichophyton*, especialmente *T. soudanense* e *T. Schoenleinii* (SHIN et al., 2004).

No óleo essencial de sementes de endro, limoneno e carvona são os principais constituintes e apresentaram um efeito sinérgico em relação ao efeito interferencial. O óleo diminui significativamente o ergosterol da membrana do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e atividades vitais da malato desidrogenase (MDH) e succinato desidrogenase (SDH) foram significativamente diminuídas nas concentrações de 0,5 e 0,75 $\mu\text{L} / \text{mL}$ ($p < 0,05$) de óleo (MA et al., 2015) Óleo de *Ocimum basilicum* combinado com geraniol e fluconazol exibiu atividade sinérgica frente a cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol (CARDOSO et al., 2016).

Mecanismos de interação antimicrobiana são menos conhecidos. Existem algumas hipóteses que mencionam que misturas fenólicas podem aumentar o número, tamanho ou duração da membrana por meio da ligação de proteínas com diferentes proteínas ou enzimas embutidas na membrana celular. Um efeito sinérgico seria alcançado quando dois componentes provavelmente desintegram a membrana lipídica e facilitam a entrada do outro componente no citoplasma (OCHOA-VELASCO et al., 2018).

Ger foi sinérgico (FICI $< 0,5$) com fluconazol, que é uma droga antifúngica bem conhecida. Além disso, Ger sensibiliza o par de isolados clínicos sensíveis e resistentes à FLC e levou a um efluxo R6G anulado e a um ergosterol empobrecido (SINGH et al., 2018).

2.6.7 Avaliação da toxicidade

Métodos de avaliação toxicológica devem ser adotados de forma a garantir a segurança da utilização de um fitoterápico. Os testes MTT *in vitro* é um teste muito utilizado que avalia a apoptose de células HeLa em cultura. As células são submetidas às concentrações do extrato testado para teste MTT e posteriormente é exposta a radiação para teste de radiosensibilidade. A determinação do fator de sinergismo de radiosensibilização é calculada de acordo com a morte celular induzida pelo extrato e pela radiação, valores > 1

demonstra o sinergismo da droga à radiação. A apoptose é avaliada por citometria de fluxo, as células que sofreram apoptose são detectadas por coloração com iodeto de propídio (FOROUZMAND et al., 2018).

Teste que avaliam toxicidade *in vivo*, utilizam como modelo de ensaio o peixe-zebra. Na linha de pesquisa sua aplicação tem vantagens como rápido desenvolvimento embrionário, alta fecundidade, desenvolvimento embrionário visível, pouco espaço de manuseio e custo baixo de manutenção. Estas vantagens possibilitam a utilização deste modelo para estudos toxicológicos na descoberta de drogas de origem naturais. Esse modelo é de grande utilidade, uma vez que o peixe-zebra compartilha homologias genéticas, morfológicas e fisiológicas com vertebrados superiores. As anormalidades expressadas no peixe-zebra são analisáveis, malformação do coração, curvatura excessiva da coluna, desfiguração da mandíbula, edemas e distúrbios cardiovasculares (CHEN et al., 2018).

Não foram relatados efeitos colaterais após o uso do extrato de folhas de *L. citriodora*, pelo contrário, seus efeitos protetores positivos sobre a saúde geral foram demonstrados (GHASEMPOUR et al., 2016). No estudo de *Caesalpinia ferrea* os AgNPs revestido com *C. ferrea* (30–50 nm) não tiveram efeito aparente sobre as células L929. Em concentrações baixas de AgNPs revestido, observou maior viabilidade celular, tanto o extrato de *C. ferrea* quanto o AgNPs apresentaram elevada viabilidade celular em uma faixa percentual de 82,32–102,71% e 67,13–96,43%, respectivamente, em concentrações que variaram de 3,5 a 1.000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (SOARES et al., 2018).

O extrato de *H. hircinum* subsp. *majus* foram submetidos a testes de citotoxicidade em linhas de células Hs27 de fibroblastos da pele humana na dose de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$, essa dose em relação ao teste de susceptibilidade positivo em *Candida* é de 10 vezes maior. Houve, no entanto, diferença entre os resultados de extratos aquosos, metanólico e alcoólicos, apenas nos extratos aquosos resultantes de método de infusão não houve efeito citotóxico, nos outros extratos existiram inibição da viabilidade em 50% (TOCCI et al., 2018).

Foi considerado seguro o consumo oral do extrato etanólico da folha de *P. hidropiper* contendo 7% de poligodio. De acordo com testes de micronúcleo em medula óssea de rato, e injeção via intraperitoneal, o extrato de *P. hidropiper* não é carcinogêneo nem tóxico (MOYEENUL HUQ et al., 2014). E a espécie *Vitex agnus-castus* já está em uso no mercado, e possui muitos relatos em artigos da sua ausência de toxicidade. (BARROS, J. D., et al.; 2010; VASCONCELOS, E.F. et al.; 2014; OLIVEIRA, J.C.M.; 2005.)

3 CONCLUSÃO

A diversidade da flora ainda não analisada nos possibilita a expectativa de maiores descobertas da capacidade terapêutica das plantas. A etnobotânica de famílias com presença de atividade antifúngica deve ser estudada, como nas famílias Laminaceae, Verbenaceae e Fabeacea.

As plantas *Ziziphus spina christi*, *Salvia mirzayanii* e *Persicaria hydropiper* foram as que tiveram melhor capacidade antifúngica. Sendo assim, são grandes indicativas de futuros fungicidas. Tudo indica que a terapia combinada é uma boa opção para os fitoterápicos com valores de CMI considerados moderados.

O estudo dos compostos em relação às variáveis de produção é de extrema importância para padronização dos processos gerando melhores resultados a serem comparados. E a descoberta da ação antifúngica de compostos facilitaria a compreensão das ações sinérgicas e antagônicas.

E devido os fitoterápicos gerarem menos efeitos colaterais, estes devem ser uma opção para pacientes imunossuprimidos, uma vez que estes pacientes são mais susceptíveis a esses tipos de infecções. Testes de teratogênese devem ser feitos para a utilização destes no tratamento antifúngico de gestantes, o que seria mais viável que os antifúngicos convencionais como anfotericina B e fluconazol que são teratogênicos.

Investigações mais rigorosas devem ser feitas no futuro, investigando a faixa de dosagem que é segura para adultos, crianças, gestantes e lactantes e avaliações da toxicidade de órgãos-alvo. Mais experimentos *in vivo* e *in vitro* são necessários para avaliar o potencial para aplicação terapêutica dos extratos, óleos e compostos separados.

REFERÊNCIAS

ABUDU, B.; COHEN, P.R.; Sporotrichoid Keratoacanthomas: Case Report and Review of Neoplasms Presenting in a Sporotrichoid Pattern. *Cureus*. 10(8): e3196. 2018.

AIDÉ, M. A.; Histoplasmose. Cap. 4, J. bras. pneumol. vol.35 no.11 São Paulo Nov. 2009 doi. [org/10.1590/S1806-37132009001100013]

ANEKE, C.I.; OTRANTO, D.; CAFARCHIAL, C.; Therapy and Antifungal Susceptibility Profile of *Microsporum canis*. *J Fungi (Basel)*. 2018 Sep; 4(3): 107. Published online 2018 Sep 5. doi: [10.3390/jof4030107] 2018.

ARAÚJO, A.J.G.; SOUZA, M.A.J.; BASTOS, O.M.P.; Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 78(4):445-455, jul. /ago. 2003.

ASHU, E.E.; KORFANTY, G.U.; SAMARASINGHE, H.; Widespread amphotericin B-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* in Hamilton, Canada. *Infect droga Resist*. 11: 1549-1555. Doi: [10.2147 / IDR.S170952], 2018.

BAJPAL, V.K.; ALAM, M.B.; QUAN, K.T.; Cytotoxic properties of the anthraquinone derivatives isolated from the roots of *Rubia philippinensis*. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18: 200. Published online 2018 Jul 3. doi: [10.1186/s12906-018-2253-2]

BANSAL, R.; PALLAGATTI, S.; SHEIKH, S.; Candidal Species Identification in Malignant and Potentially Malignant Oral Lesions with Antifungal Resistance Patterns. *Contemp Clin Dent*. (Supl 2): S309-S313. doi: [10.4103 / ccd.ccd_296_18], 2018.

BARROS, J. D., FILHO, S. S., CASTRO, V., TORRES, V. M., HIGINO, J. S., MELO, A. F. M.; Estudo Toxicológico Pré-Clínico Agudo E Determinação Da C150 Do Extrato Bruto Seco Das Folhas Da Vitex Agnus Castus Linn. *Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (3)*, 62 – 71, 2010

BEARDSLEY, J.; HALLIDAY, C. L.; CHEN, S. C.; Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol*. 13:1175-1191. doi: 10.2217/fmb-2018-0059. 2018.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S.; New Antifungic Drugs: A Review. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, - ISSN: 1518-5192; 2004.

BRANDÃO, M.G.L.; Plantas Medicinais e Fitoterapia (Em Minas Gerais). Faculdade de Farmácia, pág. 2, Belo Horizonte, 2003.

BRAUN, D.E.; KAHLENBERG, V.; GRIESSER, U.J.; Experimental and Computational Hydrate Screening: Cytosine, 5-Flucytosine and Their Solid Solution. Cryst Growth Des. 17(8): 4347–4364. 2017.

CAFFARO K.M.T, BASTOS M.L.A, ARAÚJO E.C de. A; Enfermagem e a Pesquisa Básica com Plantas Medicinais. Rev enferm UFPE on line. Recife, 9(10), out. 2015.

CAMPANHA, A.M.; TASCA, R.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; Dermatomicoses: Frequência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. Lat. Am. J. Pharm. 26 (3): 442-8 (2007)

CARDOSO, N.N.R; ALVIANO, C.S.; BLANK, A.F.; Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016: 5647182. Published online 2016 May 5. doi: [10.1155/2016/5647182]

CARRASCO, H.; ROBLES-KELLY, C.; RUBIO, J.; Antifungal Effect of Polygodial on *Botrytis cinerea*, a Fungal Pathogen Affecting Table Grapes. Int J Mol Sci. 2017 Nov; 18(11): 2251. Published online 2017 Oct 27. doi: [10.3390/ijms18112251]

CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK, M.L.; Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de Maytenus (Celastraceae) e de Passiflora (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, n.4, p.860-864, 2009

CHEE, H.Y.; KIM, H.; LEE, M.H.; *In vitro* Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. Mycobiology. 2009 Sep; 37(3): 243–246. Published online 2009 Sep 30. doi: [10.4489/MYCO.2009.37.3.243]

CHEN, L.; XU, M.; GONG, Z.; Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. detected using a zebrafish Tuebingen embryo model. BMC Complement Altern Med. 2018; 18: 273. Published online 2018 Oct 5. doi: [10.1186/s12906-018-2303-9]

CORDEIRO, B.M.P.C; SANTOS, N.D.L.; FERREIRA, M.R.A.; Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. BMC Complement Altern Med. 2018; 18: 284. Published online 2018 Oct 19. doi: [10.1186/s12906-018-2350-2] 2018.

CORTEGIANI, A.; MISSERI, G., FASCIANA, T.; Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. J Cuidados Intensivos. 6: 69. Doi: [10.1186 / s40560-018-0342-4], 2018.

COUTINHO, A.; PRIETO, M.; Cooperative Partition Model of Nystatin Interaction with Phospholipid Vesicles. Biophys J. 84(5): 3061–3078. 2003.

CURRIER, J. S.; HAVLIR, D.V.; CROI 2018: Complications of HIV Infection and Antiretroviral Therapy. Top Antivir Med. 2018 Apr; 26(1): 22–29.

DEEPE Jr, G.S.; Outbreaks of Histoplasmosis: The Spores Set Sail. PLoS Pathog. Sep 13;14(9): e1007213. doi: 10.1371/journal.ppat.1007213. eCollection 2018.

DIAS, I.J.; TRAJANO, E.R.I.S; CASTRO, R.D.; Atividade antifúngica do linalol em casos de *Candida* spp. isolados de indivíduos com candidíase oral. Braz. J. Biol. vol.78 no.2 São Carlos. doi[.org/10.1590/1519-6984.171054] 2018

DIBA, A.; ALIZADEH, F.; *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Allium hirtifolium* and *Allium sativum*. Avicenna J Phytomed. 2018 Sep-Oct; 8(5): 465–474.

DIOMEDI, A. P.; Novos antifúngicos: as equinocandinas. Rev Chil Infect; 21 (2): 89-101, 2004.

DURAI PANDIYAN, V.; INDWAR, F.; IGNACIMUTHU, S.; Antimicrobial activity of confertifolin from *Polygonum hydropiper*. Received 12 Jan 2008, Accepted 17 May 2008, Published online: 01 Oct 2009 doi[.org/10.3109/13880200902902471]

DUTRA, F.L.G; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M.; Determinação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência isocrática durante estacionamento da Erva-Mate. Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 119-123, 2010

EBANI, V.V.; NAJAR, B.; BERTELLONI, F.; Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. Vet Sci. 5 (3): 62. Doi: [10.3390 / vetsci5030062] 2018.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; Histoplasmosis. Ver.Soc.Bras.Med. Trop. Vol 42 no. 2, Uberaba, 2009.

FERREIRA, T.A.; SODRÉ, C.T.; COSTA, J.M.; Primary conjunctival sporotrichosis: An atypical presentation of the disease. JAAD Case Rep. 2018 Jun; 4(5): 497–499. Published online 2018 May 7. doi: [10.1016/j.jdc.2018.01.022]

FILHO, A. D.; Coccidioidomycose. Cap.2, J. bras. pneumol. vol.35 no.9 São Paulo Sept. 2009. doi[.org/10.1590/S1806-37132009000900014]

FOROUZMAND, S.H.; MOUSAVI, S.H.; VAZIFEDAN, V.; Synergistic effects of *Ferula gummosa* and radiotherapy on induction of cytotoxicity in HeLa cell line. Avicenna J Phytomed. 2018 Sep-Oct; 8(5): 439–477.

FUTURO, D.O.; FERREIRA, P.G.; NICOLETTI, C.D.; The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. An. Acad. Bras. Ciênc. vol.90 no.1 supl.2 Rio de Janeiro, 2018 doi.org/10.1590/0001-3765201820170815

GAO, J.; WANG, H.; LI, Z.; *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. Nat Commun. 9: 4495. doi: [10.1038/s41467-018-06944-1] 2018.

GARCIA-GIRALDO, A.M.; MORA, B. L.; LOAIZA-CASTAÑO, J.M.; Invasive fungal infection by *Aspergillus flavus* in immunocompetent hosts: A case series and literature review. Med Mycol Case Rep. 2019 Mar; 23: 12–15. Published online 2018 Oct 25. doi: [10.1016/j.mmcr.2018.10.006]

GAVANJI, S.; ZAKER, S.R.; NEJAD, Z.G.; Comparative efficacy of herbal essences with amphotericin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the *in vitro* condition. Integr Med Res. 2015 Jun; 4(2): 112–118. doi: [10.1016/j.imr.2015.01.003] 2015.

GAZIANO, R.; CAMPIONE, E.; IACOVELLI, F.; Antifungal activity of *Cardiospermum halicacabum* L. (Sapindaceae) against *Trichophyton rubrum* occurs through molecular interaction with fungal Hsp90. Drug Des Devel Ther. 2018; 12: 2185–2193. Published online 2018 Jul 12. doi: [10.2147/DDDT.S155610]

GHASEMPOUR, M.; OMRAN, S.M.; MOGHADAMNIA, A.A.; Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Lippia citriodora* on *candida albicans*. Electron Physician. 8(8): 2752–2758. doi: [10.19082/2752] 2016.

GNABRE, J.; BATES, R.; HUANGC, R.C.; Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. J Tradit Complement Med. 2015 Jul; 5(3): 119–126. doi[10.1016/j.jtcme.2014.11.024] 2015.

GUCWA, K.; KUSZNIEREWICZ, B.; MILEWSKI, S.; Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. *Pathogens*. 2018 Jun; 7(2): 56. Published online 2018 Jun 19. doi: [10.3390/pathogens7020056]

GUPTA, A.K.; MAYS, R.R.; The Impact of Onychomycosis on Quality of Life: A Systematic Review of the Available Literature. *Skin Appendage Disord*. 2018 Oct;4(4):208-216. doi: 10.1159/000485632. Epub 2018 Feb 13.

HAY, R.; Therapy of Skin, Hair and Nail Fungal Infections. *J Fungi (Basel)*. 2018 Sep; 4(3): 99. Published online 2018 Aug 20. doi: [10.3390/jof4030099] 2018.

HARVEY R.A., CHAMPE P.C., FISHER B.D., *Microbiologia Ilustrada*. 2ª Ed pág. 203 Porto Alegre 2008.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S.; Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. *J Fungi (Basel)*. pii: E105. doi: [10.3390/jof4030105] 2018.

HOLOPAINEN, J.K.; VIRJAMO, V.; GHIMIRE, R.P.; Climate Change Effects on Secondary Compounds of Forest Trees in the Northern Hemisphere. *Front Plant Sci*. 2018; 9: 1445. Published online 2018 Oct 2. doi: [10.3389/fpls.2018.01445]

HOSSEINI, S.S.; YADEGARI, M.H.; RAJABIBAZL, M.; Inhibitory effects of carvacrol on the expression of secreted aspartyl proteinases 1–3 in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Iran J Microbiol*. 2016 Dec; 8(6): 401–409.

HOFFMANN, A., Ocorrência e Susetibilidade *in vitro* a Terbinafina, Ciclopirox, Cetoconazol e Itriconazol, com ênfase na combinação entre as drogas antifúngicas de agentes de onicomicoses no estado do Espírito Santo. Vitória, 2011.

IKEDA, M.A.K.; ALMEIDA, J.R.F.; JANNUZZI, G.P.; Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. *Front Microbiol*. 9: 2286. doi: [10.3389/fmicb.2018.02286], 2018.

JERUTO, P.; ARAMA, P. F.; ANYANGO, B.; *IN VITRO* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS OF DIFFERENT *Senna didymobotrya* (FRESEN.) H.S. IRWIN & BARNEBY PLANT PARTS. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016; 13(6): 168–174. Published online 2016 Sep 29. doi: [10.21010/ajtcam.v13i6.24]

KHAN, S.T.; KHAN, M.; AHMAD, J.; Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express* 2017, 7: 49, publicado em: 23 fevereiro 2017 doi [. org/10.1186/s13568-017-0344-y]

KEIKHA, N.; SHAFAGHAT, M.; MOUS et al.; Antifungal effects of ethanolic and aqueous extracts of *Vitex agnus-castus* against vaginal isolates of *Candida albicans*. *Curr Med Mycol*. 2018 Mar; 4(1): 1–5. doi: [10.18502/cmm.4.1.26]

KHOURY, M.; STIEN, D.; EPARVIER, V.; Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; 2016: 2547169. Published online 2016 Dec 8. doi: [10.1155/2016/2547169]

KIRKLANDA, T. N.; FIERER, J.; *Coccidioides immitis* and *posadasii*; A review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity. *Virulence*. 2018; 9(1): 1426–1435. Published online 2018 Sep 4. doi: [10.1080/21505594.2018.1509667] 2018.

KÜSTNER, E.C.; CARRIÓN, D.P.; LÓPEZ, J.L.; Antifungal drugs used in the management of mycosis. *Medicina Oral*, 3: 78-90, Barcelona, 1998.

LEMSADDEK, A.; Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Doutorado em Biologia (Microbiologia), Lisboa, 2008.

LIN, X.; ALSPAUGH, J.A.; LIU, H.; Fungal Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Feb; 5(2): a019679. doi: [10.1101/cshperspect.a019679] 2015.

MA, B.; BAN, X.; HUANG, B.; Interference and Mechanism of Dill Seed Essential Oil and Contribution of Carvone and Limonene in Preventing Sclerotinia Rot of Rapeseed. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0131733. Published online 2015 Jul 2. doi: [10.1371/journal.pone.0131733]

MACÊDO, D.G.; SOUZA, M.M.A.; MORAIS-BRAGA, M.F.B.; Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. *PeerJ*. 6: e5476. Doi: [10.7717 / peerj.5476] 2018.

MARDANI, M.; BADIEE, P.; GHARIBNAVAZ, M.; Comparison of anti-*Candida* activities of the ancient plants *Lawsonia inermis* and *Ziziphus spina christi* with antifungal drugs in *Candida* species isolated from oral cavity. *J Conserv Dent*. 21(4): 359–362. doi: [10.4103/JCD.JCD_291_17] 2018.

MARQUES, L.; Modo e mecanismo de ação dos fungicidas triazóis e triazolintione. 2017 disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/modo-e-mecanismo-de-acao-dos-fungicidas-triazois-e-triazolintione/>>. Data de acesso: 9 de novembro de 2018.

MARTINEZ, R.; An update on the use of antifungal agents. J Bras Pneumol, ;32(5):449-60; 2006.

MOHAMMADI, F.; HASHEMI, S.J.; SEYEDMOUSAVI, S.M.; Isolation and Characterization of Clinical Triazole Resistance *Aspergillus fumigatus* in Iran. Irã J Saúde Pública. 47 (7): 994-1000. 2018.

MOLLOY, S.F.; KANYAMA, C.; Robert S. HEYDERMAN, R.S.; Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. N Engl J Med, 378:1004-1017, DOI: 10.1056/NEJMoa1710922, 2018.

MOREIRA M.F., OLIVEIRA T.R., VIEIRA I.G.P., FREIRE F.C.O., SILVA S.C., RIBEIRO L.M., et al. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. Rev Inst Adolfo Lutz; 75:1698, São Paulo, 2016.

MOYEENUL HUQ, A. K. M.; JAMAL, J. A.; STANSLAS, J.; Ethnobotanical, Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Aspects of *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 2014: 782830. Published online 2014 Apr 16. doi: [10.1155/2014/782830].

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OCHOA-VELASCO, C.E.; NAVARRO-CRUZ, A.R.; VERA-LÓPEZ, O.; Growth modeling to control (*in vitro*) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. BRIEF REPORT, DOI: [10.1016/j.ram.2016.11.010] Vol. 50. Núm. 1. Enero - Marzo 2018 páginas 1-112

OLIVEIRA, E.P.; ANDRADE, F.S.; Lima-Neto, R. G.; Occurrence of superficial mycoses in public health unit in the city of Patos – PB, Brazil. DOI: 10.21877/2448-3877.201600064, Patos, 2016.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G; Fundamentos de Farmacobotânica. 2ª Ed, pág 158, São Paulo 2003.

OLIVEIRA, J.C.M.; Estudo farmacológico da *Vitex agnus-castus* L (ação antinociceptiva e toxicidade aguda do extrato aquoso). Dissertação de mestrado. Aracaju, 2005.

OLIVEIRA, T.F.; Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 10, ISSN 1676-6709, 2009.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.1, p.92-99, 2009.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. Rev. bras. farmacogn. vol.18 no.2 João Pessoa. [doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026] 2008.

PAGUIGAN, N.D.; AL-HUNITI, M.; RAJA, H.A.; Chemoselective fluorination and chemoinformatic analysis of griseofulvin: natural vs fluorinated fungal metabolites. Bioorg Med Chem, 25(20): 5238–5246, 2017.

PAI, V., GANAVALLI, A., KIKKERI, N.N.; Antifungal Resistance in Dermatology. Indian J Dermatol. 63(5): 361–368. doi: [10.4103/ijd.IJD_131_17], 2018.

PALMEIRA, S.J.G.; Micoses Sistêmicas. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Lisboa, 2014.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; Estimativa da atual carga global de meningite criptocócica entre pessoas vivendo com HIV / AIDS. Vol 23 Ed 4, 2009.

PEICZAR Jr M. J., CHAN E.C.S., KRIEG N.R., Microbiologia: conceitos e aplicações. Vol 2, 2 Ed, pág. 294, São Paulo, 1997.

PEREZ-TANOIRA, R.; OLIVO, C.Z.; ALEN, J.F.; Tinea nigra palmaris: a clinical case in a rural Ethiopian hospital. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2018; 60: e52. Published online 2018 Sep 13. doi: [10.1590/S1678-9946201860052] 2018.

PLAS, R. Van der; Candidíase oral: Manifestações clínicas e Tratamento. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2016.
 PLATO, A.; HARDISON, S.E.; BROWN, G.D.; Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol.* 37(2): 97–106. 2015.

RAVEN P.H., EVERT R.F., EICHHORN S.E., *Biologia Vegetal*. 7ª Ed, pág 278, Rio de Janeiro, 2011.

RICHARDSON, M.; PAGE, I.; Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections. *Curr Fungal Infect Rep.* 2018; 12(3): 127–136. Published online 2018 Sep 5. doi: [10.1007/s12281-018-0321-1]

RÓNAVÁRI, A.; IGAZ, N.; GOPISETTY, M.K.; Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 695–703. Published online 2018 Feb 1. doi: [10.2147/IJN.S152010]

RUSCHEL, M.A.P.; THAPA, B.; Meningite Criptocócica. Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls; 2018.

SADER, H.S., DURAZZO, A., Terapia antimicrobiana nas infecções do pé diabético. *J Vasc Br.* ;2(1):61-6, 2003.

SADIQ, A.; AHMAD, S.; ALI, R.; Antibacterial and antifungal potentials of the solvents extracts from *Eryngium caeruleum*, *Notholirion thomsonianum* and *Allium consanguineum*. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16: 478. Published online 2016 Nov 24. doi: [10.1186/s12906-016-1465-6] 2016.

SCALERANDI, E.; FLORES, G.A.; PALACIO, M.; Understanding Synergistic Toxicity of Terpenes as Insecticides: Contribution of Metabolic Detoxification in *Musca domestica*. *Front Plant Sci.* 2018; 9: 1579. Published online 2018 Oct 30. doi: [10.3389/fpls.2018.01579].

SEPEHRI, Z.; JAVANDIAN, F.; KHAMMARI, D.; Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of *Echinophora platyloba* and *Rosmarinus officinalis*. *Curr Med Mycol.* 2016 Mar; 2(1): 30–35. doi: [10.18869/acadpub.cmm.2.1.30] 2016.

SHARMA, J.; KAUSHAL, J.; AGGARWALL, K.; A Comparative Study of Efficacy and Safety of Eberconazole versus Terbinafine in Patients of Tinea Versicolor. *Indian J Dermatol.* 2018 Jan-Feb; 63(1): 53–56. doi: [10.4103/ijd.IJD_126_17] 2018.

SHIN, S.; LIM, S.; Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. Journal of Applied Microbiology. Doi: [10.1111/j.1365-2672.2004.02417.x] 2004.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A.; Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens—Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Aug; 5(8): a019794. doi: [10.1101/cshperspect.a019794] 2015.

SILVA, F. M.; Potencial Antifúngico de Extratos de Plantas Medicinais do Cerrado Brasileiro. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. Brasília, 2008.

SILVA, J.P.B.; PERES, A.R.M.N.; PAIXÃO, T.P.; Antifungal Activity of Hydroalcoholic Extract of *Chrysobalanus icaco* Against Oral Clinical Isolates of *Candida* Species. Pharmacognosy Res. 2017 Jan-Mar; 9(1): 96–100. doi: [10.4103/0974-8490.199772]

SIMÕES, C.M.O. et al.; Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRRGS / Ed. Da UFSC, p.244, 1999.

SINGH, S.; FÁTIMA, Z.; AHMAD, K.; A ação fungicida do geraniol contra *Candida albicans* é potencializada pelo efluxo de drogas CaCdr1p anulado e sinergismo do fluconazol. PLoS One. 2018; 13 (8): e0203079. Publicado online 2018 29 de agosto. Doi: [10.1371 / journal.pone.0203079]

SIZAR, O.; TATATI, R.; Esporotricose (*Sporothrix Schenckii*). Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls; 2018 jan. PMID: 30335288

SOARES, M.R.P.S.; CORRÊA, R. O.; STROPPIA, P.H.F.; Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius extract: physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity. PeerJ. 2018; 6: e4361. Published online 2018 Mar 19. doi: [10.7717/peerj.4361]

SOKOVIC, M.D.; VUKOJEVIC, J.; D. MARIN, P.D.; Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules* 2009, 14(1), 238-249; doi:[10.3390/molecules14010238] 2009.

SOLIMAN, S.S.M.; SEMREEN, M.H.; EL-KEBLAWY, A.A.; Assessment of herbal drugs for promising anti-*Candida* activity. BMC Complement Altern Med. 2017; 17: 257. Published online 2017 May 8. doi: [10.1186/s12906-017-1760-x]

SOUZA, M.M.; OLIVEIRA, M.S.; ROCHA, M.; Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella pyrenoidosa*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(3): 680-685, jul.-set. 2010

STEINMANN, J.; BUER, J.; PIETSCHMANN, T.; Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. Br J Pharmacol. 2013 Mar; 168(5): 1059–1073. Published online 2013 Feb 20. doi: [10.1111/bph.12009]

STRINGARO, A.; COLONE, M.; ANGIOLELLA, L.; Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. Open Access Medicines 2018, 5(4), 112; doi:10.3390/medicines5040112

TEMPLETON, S.P.; RIVERA, A.; HUBE, B.; Editorial: Immunity to Human Fungal Pathogens: Mechanisms of Host Recognition, Protection, Pathology, and Fungal Interference. Front Immunol. 9: 2337.2018.

TOCCI, N.; PERENZONI, D.; IAMONICO, D.; Extracts From *Hypericum hircinum* subsp. *majus* Exert Antifungal Activity Against a Panel of Sensitive and Drug-Resistant Clinical Strains. Front Pharmacol. 9: 382. doi: [10.3389/fphar.2018.00382] 2018.

TORTORA G.J., FUNKE B.R., CASE C.L, Microbiologia. 8ª Ed, pág. 342-343 Porto Alegre 2005.

TORRES, P.P.T.S; RABAHI, M.F.; MOREIRA, M.A.C.; Avaliação tomográfica de doenças fúngicas torácicas: uma abordagem de padrões e sinais. Radiol Bras vol.51 no.5 São Paulo set./Oct. 2018.

VALASQUES Jr, G.L.; Farmacologia Clínica das Infecções Fúngicas. Jequié, 2015.

Disponível em: <<http://www.uesb.br/eventos/farmacologiaeclinicaif/arquivos/Farmacologia-clinica-das-infeccoes-fungicas.pdf>> Data de acesso: 09 de novembro de 2018.

VASCONCELOS, E.F.; MEDEIROS, M.G.F; CAVALCANTE, A.A.C.M; Óleo essencial de *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae): composição química, avaliação citotóxica, genotóxica e atividade antibacteriana. Boletim Informativo Geum, v. 5, n. 4, p. 68-77, out./dez., 2014.

VERMES, U.; GUCHELAAR, H.J., DANKERT, J.; Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J Antimicrob Chemother.46(2):171-9. 2000.

VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *psidium guajava* L. Quím. Nova vol.30 no.4 São Paulo July/Aug. 2007 doi[.org/10.1590/S0100-40422007000400011]

VIZZOTO, M; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B.; Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

VOUKENG, I.K.; BENG, V.P.; KUETE, V.; Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes. BMC Complement Altern Med. 2016; 16: 388. Published online 2016 Oct 10. doi: [10.1186/s12906-016-1371-y] 2016.

WALSH, T.J.; DIXON, D.M.; Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 75 Spectrum of Mycoses. 1996.

WU, W.; MARAVELIAS, C.T.; Synthesis and techno-economic assessment of microbial-based processes for terpenes production. Biotechnol Biofuels. 2018; 11: 294. Published online 2018 Oct 27. doi: [10.1186/s13068-018-1285-7]

YAHYARAEYAT, R.; KHOSRAVI, A.R.; SHAHBAZZADEH, D.; The potential effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth, aflatoxin production and transcription of aflatoxin biosynthesis pathway genes of toxigenic *Aspergillus parasiticus*. Braz J Microbiol. 2013; 44(2): 643–649. Published online 2013 Oct 30. doi: [10.1590/S1517-83822013000200045]

ZOMORODIAN, K.; MOEIN, M.; PAKSHIR, K.; Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil From *Salvia mirzayanii* Leaves. J Evid Based Complementary Altern Med. 2017 Oct; 22(4): 770–776. Published online 2017 Jul 10. doi: [10.1177/2156587217717414]