

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

**Caracterização Toxicológica e Investigação da
Atividade Antifúngica do Isoeugenol frente a
*Penicillium citrinum***

Sávio Benvindo Ferreira

João Pessoa - PB
2018

Sávio Benvindo Ferreira

**Caracterização Toxicológica e Investigação da
Atividade Antifúngica do Isoeugenol frente a
*Penicillium citrinum***

Tese apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do Centro de Ciências da Saúde, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de **DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, na área de concentração: **FARMACOLOGIA.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Edeltrudes de Oliveita Lima

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa

João Pessoa – PB
2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383c Ferreira, Savio Benvindo.
Caracterização Toxicológica e Investigação da Atividade
Antifúngica do Isoeugenol frente a *Penicillium citrinum*
/ Savio Benvindo Ferreira. - João Pessoa, 2018.
189 f. : il.

Coorientação: Hilzeth de Luna Freire Pessoa.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

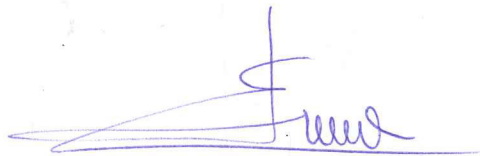
1. Isoeugenol. 2. *P. citrinum*. 3. atividade
antifúngica. 4. citotoxicidade. 5. análise
computacional. I. Título

UFPB/BC

SÁVIO BENVINDO FERREIRA

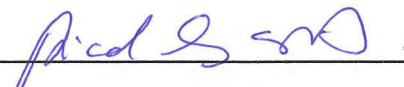
**Caracterização Toxicológica e Investigação da
Atividade Antifúngica do Isoeugenol frente a
*Penicillium citrinum***

Banca de Defesa



Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora

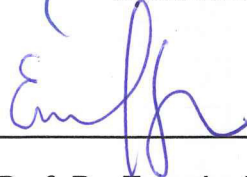
Profa. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Membro interno



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Membro interno



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha
Membro externo



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Membro externo

Mais uma vez... e sempre...à meus pais, Ana Cristina e Almir

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram até esta etapa da minha vida acadêmica, direta ou indiretamente. Agradeço:

Antes de tudo, a Deus, pois esses quatro anos do doutorado ele me deu forças para vencer mais esse desafio da forma correta, superando meus limites.

Os meus amados pais: Ana Cristina Benvindo e Sousa Ferreira e Almir da Costa Ferreira, por todo amor, carinho, força e apoio em todos os momentos. Hoje percebo o quanto eles se sacrificaram para me permitir evoluir em meus estudos. Nunca poderei agradecer esse presente de valor infinito e eterno. Obrigado por sempre me fazerem sentir amado, cuidado e pelo apoio. Não existe melhor lugar no mundo que não seja perto de vocês.

Aos meus irmãos: Pablo Benvindo Ferreira, Siluana Benvindo Ferreira e Paula Benvindo Ferreira por sempre me apoiarem e por torcerem pelo meu sucesso e felicidade. Ainda bem que posso sempre contar com vocês.

A toda minha família pelo amor, força, orações e pensamentos positivos. Eu consigo sentir todo esse apoio, mesmo à distância.

A minha Orientadora, professora Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima, pela imensa compreensão, paciência e boa vontade comigo. Minha admiração vem desde a graduação, sem nunca imaginar que um dia seria orientado pela senhora. Obrigado por me deixar livre, mas observado e cobrado quando deveria e me permitir ter a experiência na docência, mesmo durante o doutorado. Foi uma experiência única em minha vida e confirmação do que quero para minha vida. Que Deus a ilumine sempre, a senhora e sua família.

A minha co-orientadora, professora Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa, por toda disponibilidade e enriquecimento nesses anos. Só Deus conseguirá retribuir sua bondade e dedicação para com seus alunos.

Aos professores Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Dr. Ricardo Dias de Castro e Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha pela dupla disposição em participar da minha qualificação e defesa do doutorado,

contribuindo de maneira fundamental ao enriquecimento do meu trabalho e nível acadêmico.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza por aceitar participar da banca de defesa da tese, mesmo sem me conhecer. Obrigado por contribuir para minha melhora acadêmica.

Aos amigos do “Com Futuro Real”: Tassiana Dantas, Paula Benvindo, Carol Lima, Thamara Melo e Danilo Lemos. Foram 6 anos, desde o mestrado, juntos, lutando para concluir esses ciclos em nossas vidas. Foram anos de alegrias, força, superação, desespero e conhecimento individual. Espero que estejamos sempre unidos, mesmo que espiritualmente, torcendo sempre pelo sucesso dos outros e servindo de apoio quando necessário. Avante!

As minhas amigas: Karlla Viana, Júlia Dias, Danyelle Oliveira e Silvy Vieira, por serem um pilar de alegria e força durante estes anos. Sei que essa vitória é muito comemorada por vocês.

Aos meus professores da Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos ensinamentos transmitidos e exemplos de profissionais. Não tenho como pagar esse presente.

A meus amigos de sempre e para sempre: Rafaela Soares, João Maurício, Joelly Holanda e Magda Araújo. Desde a graduação estão comigo e sempre é uma felicidade, emoção e satisfação quando nos encontramos. Quero sempre estar na vida de vocês. Amo vocês!

Ao meus amigos do “Valha Amigo”: Danillo Moreira, Hélio Souza e Francisco Barbosa, por sempre estarem disponíveis para me escutar, pelas risadas, amizade e cumplicidade nesses anos.

Aos meus amigos Zilka Nanes Lima e Ronnie Tenório da Fonseca, pela amizade, pelo amor, cuidado e compreensão nesse tempo todo. Obrigado por sempre serem meus pais paraibanos, vocês são essenciais em minha vida.

A todos do Laboratório de Micologia pelo apoio, risadas e paciência. Em especial a Daniele de Figueirêdo Silva pelo suporte dado nos experimentos e pela disposição de sempre.

A todos os companheiros do LABETOX-II, em especial a Andressa Brito Lira pelo auxílio nos testes toxicológicos e pela ajuda prestada.

A todos os funcionários do IPeFarM, pelos serviços e ajuda disponibilizados sempre que possível.

A secretária do PPgPNSB, em especial a Caroline Manguiera, por toda paciência, preocupação, eficiência, agilidade, comprometimento e serviços prestados ao longo de todos esses anos. Você é show.

A todos os técnicos dos laboratórios envolvidos durante este doutorado, vocês são essenciais para a continuação desse processo.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Josean Fachine Tavares, e pelo vice-coordenador Prof. José Maria Barbosa Filho pelo apoio na conclusão dessa jornada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro para a viabilização desse estudo.

A meus amigos da turma de doutorado, pelo apoio, ajuda, alegrias, acolhimento e por todos os bons momentos que podemos desfrutar juntos.

Enfim, gostaria de agradecer à todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

RESUMO

A perda de alimentos causada por uma variedade de micro-organismos tem sido reconhecida como inconveniente e uma das maiores preocupações das indústrias de alimentos, principalmente, pelo impacto econômico. Além disso, com o aumento da prevalência de agentes patogênicos resistentes às drogas ocorre em um momento em que a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ocorrem lentamente. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar *in vitro* e *in silico* a atividade antifúngica do isoeugenol frente a cepas *Penicillium citrinum* e seus efeitos tóxicos. Para avaliar as bioatividades e risco toxicológico *in silico*, foram utilizadas os softwares PASS on-line, Molinspiration e Osiris. Para investigar a atividade antifúngica *in vitro*, foram utilizadas as técnicas de microdiluição, *checkerboard* e os ensaios com ergosterol e sorbitol. O efeito citotóxico foi demonstrado utilizando eritrócitos humanos. O fitoconstituente apresentou parâmetros de biodisponibilidade oral satisfatórios e risco toxicológico reprodutivo e mutagênico na análise *in silico*, mas não foi citotóxico. Apresentou ação antifúngica nas cepas testadas com efeito fungicida, causando perturbação na membrana plasmática antifúngica. Desta forma, o isoeugenol demonstrou ser um possível candidato a biocida e/ou droga antifúngica para tratamento de infecções fúngicas.

Palavras-chave: Isoeugenol, *P. citrinum*, atividade antifúngica, toxicidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

The loss of food caused by a variety of microorganisms has been recognized as an inconvenience and one of the major concerns of the food industry, mainly because of the economic impact. In addition, with the increasing prevalence of drug-resistant pathogens occurs at a time when the discovery and development of new antimicrobial agents occur slowly. In this way, the present study aims to investigate *in vitro* and *in silico* the antifungal activity of isoeugenol against strains *Penicillium citrinum* and its toxic effects. In order to evaluate the bioactivities and toxicological risk *in silico*, the online PASS, Molinspiration and Osiris software were used. To investigate the antifungal activity *in vitro*, the microdilution, checkerboard and ergosterol and sorbitol tests were used. The cytotoxic effect was demonstrated using human erythrocytes. The phytoconstituent had satisfactory oral bioavailability parameters and a reproductive and mutagenic toxicological risk after *in silico* analysis, but it was not cytotoxic. It presented antifungal action in the strains tested with fungicide effect, causing disturbance in the antifungal plasma membrane. In this way, isoeugenol has been shown to be a possible candidate for biocide and / or antifungal drug for the treatment of fungal infections.

Keywords: *Isoeugenol*, *P. citrinum*, *antifungal activity*, *toxicity*, *cytotoxicity*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura celular básica de <i>Penicillium</i> spp.	24
Figura 2	Estruturas-alvo nas células fúngicas dos fármacos antimicrobianos.	30
Figura 3	Estrutura molecular do eugenol (A) e isoeugenol (B).	38
Figura 4	Estrutura molecular do cinamaldeído.	39
Figura 5	Estrutura molecular do estragol.	40
Figura 6	Estrutura molecular do safrol.	40
Figura 7	Estrutura molecular do anetol.	41
Figura 8	Risco de toxicidade do isoeugenol comparada a antifúngicos padrão calculados usando o programa Osiris Property Explorer.	86
Figura 9	Atividade citotóxica do isoeugenol nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg/ml frente a eritrócitos tipo A.	88
Figura 10	Atividade citotóxica do isoeugenol nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg/ml frente a eritrócitos tipo B.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Triagem da atividade antifúngica dos fitoconstituintes na concentração de 1024 µg/mL frente a cepas de <i>Penicillium citrinum</i> .	54
Tabela 2	Valores da CIM e CFM para o isoeugenol e voriconazol frente as cepas de <i>P. citrinum</i> .	56
Tabela 3	Valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ do isoeugenol e voriconazol para as cepas clínicas e padrão de <i>P. citrinum</i> .	58
Tabela 4	Valores de CFM ₅₀ e CFM ₉₀ do isoeugenol e voriconazol para as cepas clínicas e padrão de <i>P. citrinum</i> .	60
Tabela 5	Relação CFM/CIM do isoeugenol e voriconazol frente as cepas de <i>P. citrinum</i> .	61
Tabela 6	Efeito do isoeugenol frente a cepas de <i>P. citrinum</i> na ausência e presença de sorbitol 0,8 M.	67
Tabela 7	Efeito do isoeugenol e anfotericina B frente a cepas de <i>P. citrinum</i> na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL.	69
Tabela 8	Resultados da CIM (µg/mL) do isoeugenol e voriconazol isolados e após a associação frente a cepas de <i>P. citrinum</i> .	73
Tabela 9	Predição da atividade do isoeugenol com probabilidade de ser ativo ($P_a > 70\%$) determinada por meio do software Pass on-line.	77
Tabela 10	Análise teórica das propriedades físico-químicas do isoeugenol obtidas pelo software Molinspiration.	80
Tabela 11	Probabilidade de interação com alvos farmacológicos calculados através do software Molinspiration.	83
Tabela 12	Análise teórica das propriedades físico-químicas do isoeugenol requeridas para biodisponibilidade oral teórica comparada aos padrões da “Regra dos cinco” Lipinski – Molinspiration.	84
Tabela 13	Probabilidade de interação do isoeugenol / agentes	85

antifúngicos com alvos farmacológicos calculados através do software Osiris.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ❖ **ADMET** - Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
- ❖ **AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ❖ **AMB** - Anfotericina B
- ❖ **ANVISA** – Agência de Vigilância Sanitária
- ❖ **ASD** - Ágar Sabouraud dextrose
- ❖ **ATCC** - American Type Culture Collection
- ❖ **CCLSI** - Clinical and Laboratory Standards Institute
- ❖ **CCS** - Centro de Ciências da Saúde
- ❖ **CFM** - Concentração Fungicida Mínima
- ❖ **CIF_A** - Concentração inibitória fracionada de A
- ❖ **CIF_B** - Concentração inibitória fracionada de B
- ❖ **CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- ❖ **clogP** - Coeficiente de partição água:óleo
- ❖ **CSD** - Caldo Sabouraud dextrose
- ❖ **Da** – Peso molecular
- ❖ **DMSO** - Dimetilsulfóxido
- ❖ **DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- ❖ **EI** – Inibidor enzimático
- ❖ **E.P.M.** – Erro padrão da media
- ❖ **GPCRL** – Ligante do receptor acoplado a proteína G
- ❖ **Hb** – Hemoglobina
- ❖ **ICIF** – Índice de concentração inibitória fracionada
- ❖ **ICZ** – Itraconazol
- ❖ **IRRI** – Potencial irritante
- ❖ **KI** – Inibidor de quinase
- ❖ **LM** – Laboratório de micologia
- ❖ **metHb** – Metahemoglobina
- ❖ **MTT** - 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
- ❖ **nALH** – Número de aceptores de hidrogênio
- ❖ **nDLH** – Número de doadores de hidrogênio

- ❖ **NRL** – Ligante de receptor nuclear
- ❖ **NTCC** - National Collection of Type Cultures
- ❖ **NTP** - National Toxicology Program
- ❖ **OCM** – Óleo essencial obtido comercialmente
- ❖ **OEX** – Óleo essencial obtido por extração
- ❖ **OMS**- Organização Mundial de Saúde
- ❖ **Pa** – Probabilidade de ativação
- ❖ **Pi** – Probabilidade de inatividade
- ❖ **PI** – Inibidor de protease
- ❖ **Ph** – Fenilhidrazina
- ❖ **PM** – Peso molecular
- ❖ **REP** – Dano ao aparelho reprodutor
- ❖ **RPMI** – Roswell Park Memorial Institute
- ❖ **SINITOX** - Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
- ❖ **TUMO** – Tumorigênico
- ❖ **UFC** – Unidades formadoras de colônias
- ❖ **UFPB** – Universidade Federal da Paraíba
- ❖ **VRC** – Voriconazol

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Percentual

α – Alfa

β – Beta

°C – Grau Celsius

μg – Micrograma

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro

mL – Mililitro

μL – Microlitro

mm – Milímetro

nm – Nanômetro

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônias por mililitro

LogUFC/mL - Logaritmo do número de Unidade Formadora de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
	2.1 Gênero <i>Penicillium</i>	23
	2.2 Terapia Antifúngica.....	28
	2.3 Plantas Medicinais.....	32
	2.4 Fenilpropanóides: Conceito e Atividade Antimicrobiana.....	36
3	OBJETIVOS.....	42
	3.1 Geral.....	43
	3.1 Específicos.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.	44
	4.1 Local da pesquisa.....	45
	4.2 Substância teste e Drogas antifúngicas.....	45
	4.3 Meios de Cultura.....	45
	4.4 Micro-organismos.....	45
	4.5 Inóculo Fúngico.....	46
	4.6 Eritrócitos humanos.....	46
	4.7 Triagem Antifúngica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	46
	4.8 Ensaio com sorbitol.....	48
	4.9 Ensaio com ergosterol.....	48
	4.10 Estudo de associação do fitoconstituente com o voriconazol.....	48
	4.11 Ensaio <i>in silico</i>	49
	4.11.1 PASS online.....	49
	4.11.2 Molinspiration.....	50
	4.11.3 Osiris.....	50
	4.12 Avaliação citotóxica Ct-OE em eritrócitos humanos.....	51
	4.13 Análise Estatística.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
	5.1 Triagem Antifúngica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	54
	5.2 Ensaio com sorbitol.....	67

5.3 Ensaio com ergosterol.....	69
5.4 Estudo de associação do fitoconstituente com o voriconazol.....	72
5.5 Ensaio <i>in silico</i>	76
5.5.1 PASS online.....	76
5.5.2 Molinspiration.....	80
5.5.3 Osiris.....	84
5.6 Avaliação citotóxica do isoeugenol em eritrócitos humanos.....	87
6 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS.....	128
ANEXO A.....	129
ANEXO B.....	131
ANEXO C.....	139
ANEXO D.....	147
ANEXO E.....	165
ANEXO F.....	180

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A perda de alimentos causada por uma variedade de micro-organismos tem sido reconhecida como inconveniente e uma das maiores preocupações das indústrias de alimentos, principalmente, pelo impacto econômico (SAHIN, 2004). Os fungos são um dos grupos de organismos que deterioram os alimentos, sendo responsáveis por modificar suas características físico-químicas e organolépticas, quando colonizam maciçamente esses produtos, o que torna o tratamento e profilaxia destes micro-organismos um importante problema na indústria alimentícia. Este quadro gera, além do comprometimento da qualidade do produto e conseqüente prejuízo financeiro, um possível acúmulo de micotoxinas que colocam em risco à saúde dos indivíduos que consumirem estes alimentos. (NORBERG; SERRA-FREIRE, 1993; LACAZ et al., 2002).

As micotoxinas são consideradas metabólitos secundários de fungos, que não são, necessariamente, essenciais ao seu crescimento e sobrevivência, mas que podem afetar, de alguma forma, os organismos que por ventura a ingerem, quando presentes em água ou alimentos contaminados, podendo acarretar prejuízos na saúde, tanto em animais quando em humanos (OLIVEIRA, 1999; BALBANI; BUTUGAN, 2001; LINO et al., 2004; HACKBART, 2009). Existem relatos graves de micotoxicoses em seres vivos que ingeriram alimentos deteriorados por fungos produtores de micotoxinas, entre elas a citrina.

Esta micotoxina foi isolada a partir do *Penicillium citrinum*, sendo também produzida por outras espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus* (MANABE, 2001; VITORINO, 2011). Grãos de aveia com mofo, de centeio, de cevada, de milho e de trigo são excelentes para a formação dessa toxina nefrotóxica, que pode causar, no homem e em animais, sérios problemas aos rins e aos tubos proximais, além de potenciais agentes causadores da nefropatia endêmica de Balkan, bem como relato de casos na literatura como problemas asmáticos, rinite e conjuntivite, sendo relatados também efeitos embriotóxicos, teratogênicos e genotóxicos (IZAWA, 1996; ABRAMSON et al., 2001; PEPELJNJAK, 2002; SCOTT, 2004; MURRAY, 2006).

Devido as preocupações com a saúde dos consumidores e o prejuízo econômico em razão da contaminação por micro-organismos fitopatogênicos,

pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de descobrir compostos que serão empregados com segurança na substituição de fungicidas para inibir o crescimento de fungos ou a produção de micotoxinas nos produtos agrícolas. Como alternativa, a utilização de pesticidas é uma das ferramentas empregadas no controle da contaminação e proliferação desses micro-organismos contaminantes. No entanto, devido ao uso abusivo desses fitossanitários, uma série de problemas foram surgindo, que vão desde os efeitos residuais decorrente do uso desses compostos sintéticos ao longo dos anos, o que leva a sua acumulação em tecidos vegetais e na cadeia alimentar a curto e longo prazos, como também os efeitos negativos que podem ser observados através da contaminação do solo e águas, intoxicação letal de indivíduos não alvo, além dos efeitos nocivos progressivos à saúde humana (D'AMATO et al., 2002).

Sendo assim, o interesse no uso de substâncias vegetais para o controle de pragas é crescente, principalmente pela popularização da agricultura sustentável, que tem por objetivo a produção de alimentos livre de resíduos de agrotóxicos, priorizando a manutenção da biodiversidade local, preservação e qualidade da água e dos solos. Diante dessa necessidade da redução do uso dos agrotóxicos, cada vez mais pesquisas que utilizam a produção de insumos biológicos, principalmente extratos e óleos de espécies vegetais, para a validação do seu potencial biocida têm oferecido informações valiosas sobre a composição e atuação dos produtos gerados por estes no combate às pragas (DIETRICH et al., 2011).

Os óleos essenciais são caracterizados por serem uma mistura complexa dos metabólitos secundários das plantas, por apresentarem odor forte, alta volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos ou com traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação (BANDONI; CZEPAK, 2008; ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2009), apresentando majoritariamente terpenos e fenilpropanóides. Esses compostos, constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (ANDRADE et al., 2012). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 2000).

Essa atividade antifúngica, demonstrada pelos óleos essenciais, é de grande importância tanto no combate a pragas em vegetais como também no tratamento de infecções fúngicas. Segundo Santos (2017), as infecções fúngicas sistêmicas tem menor incidência do que as superficiais, entretanto, as doenças invasivas exigem preocupação já que estão associadas a altos índices de mortalidade. Muitas espécies fúngicas são responsáveis por infecções invasivas, as quais estão associadas a cerca de 1.5 milhão de mortes por ano. Estima-se que a taxa de mortalidade exibida pelas dez infecções fúngicas mais frequentes supere os valores de importantes doenças mundiais, como a tuberculose ou malária. O gênero *Penicillium* aparece entre esses gêneros mais frequentes devido a peniciliose causada por *P. marneffeii*, com taxa de mortalidade entre 2 – 75% (BROWN et al, 2012). No entanto, relatos de casos comprovam que o *P. citrinum* também é capaz de desenvolver doenças oportunistas em humanos (GUGNANI; GUPTA; TALWAR, 1978; MONK et al., 1997; MORI et al., 1987; KRISHNAN et al., 2015).

Esta possibilidade é muito útil diante do cenário atual de escassez de drogas eficazes no combate a infecções fúngicas. Desde a descoberta de compostos antimicrobianos no século XX, esses agentes reduziram substancialmente a ameaça de doenças infecciosas. O uso dessas substâncias associadas às melhorias nos programas de saneamento, habitação, produção de alimentos e imunização levou a uma redução dramática da morbidade e da mortalidade humana. Entretanto, devido a vários fatores, como o uso inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal bem como na produção de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções, além da troca de informação genética de resistência entre as espécies dos mais diversos micro-organismos, cada vez mais estão surgindo cepas multirresistentes de forma crescente (MULVEY; SIMOR, 2009; ANDERSSON; HUGHES, 2010; WHO, 2010; OMS, 2012).

Com o aumento da prevalência de agentes patogênicos resistentes às drogas ocorre em um momento em que a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ocorrem lentamente (SPELLBERG et al., 2008). Conseqüentemente, há uma preocupação de que em um futuro próximo possa ser um número crescente de infecções potencialmente intratáveis (STEPHENS, 2014; ALIROL et al., 2017). Assim, os óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em

potencial de substâncias biologicamente ativas que podem ser utilizadas no combate a infecções por diversos micro-organismos (ANDRADE et al., 2012).

Diante desse potencial, e verificando que óleos essenciais contendo isoeugenol como composto majoritário apresentam atividade antimicrobiana, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico do isoeugenol frente a cepas de *Penicillium citrinum*, bem como investigar seu mecanismo de ação, além de verificar preliminarmente se o fitoconstituente exibe um perfil toxicológico seguro para uso como ferramenta terapêutica e/ou como biopesticida na indústria de alimentos.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Penicillium*

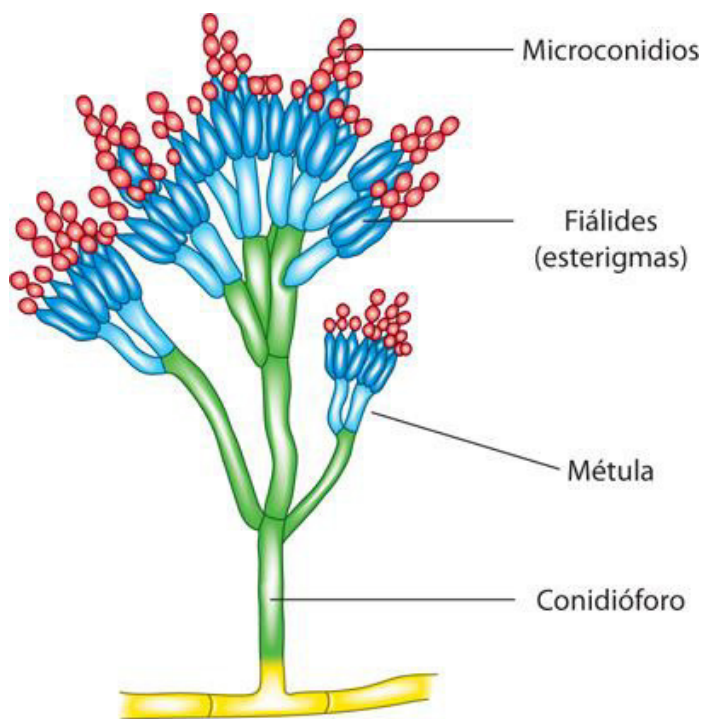
O nome *Penicillium* foi introduzido a primeira vez por Heinrich Friedrich Link em 1809, e é derivado de *Penicillus*, que significa "pequeno pincel". Diversos trabalhos surgiram no século 19 sobre o gênero, entretanto Dierckx (1901) foi o primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundária, incluindo os subgêneros *Aspergilloides*, *Eupenicillium*, e *Biverticillium* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011).

Penicillium spp. apresenta-se como um grupo de fungos, compreende mais de 350 espécies descritas, em sua maioria filamentosos, comuns em uma diversidade de habitats, sendo encontrados como saprófitas no solo, ambientes internos, vários produtos agrícolas, industrializados, alimentos em deterioração e no ar (SAMSON; FRISVAD, 2004; VISAGIE et al., 2014). Distribui-se mundialmente e causa um grande impacto econômico na vida humana. Sua principal função na natureza é a transformação de materiais orgânicos, onde as espécies causam devastações em lavouras como patógenos pré e pós-colheitas no plantio de alimentos (FRISVAD; SAMSON, 2004; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Estes micro-organismos pertencem ao filo *Ascomycota*, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes e a ordem Eurotiales (NCBI, 2018). Morfologicamente, pode-se observar nas espécies desse gênero hifas septadas. Essas hifas apresentam-se anastomosadas, geralmente, com paredes desprovidas de pigmentação (PITT, 2002).

Os conidióforos surgem como ramos do micélio e são frequentemente perpendiculares ao substrato (Figura 1). A estrutura do conidióforo consiste de um estipe que pode ser estreito ou alargado. Dependendo da espécie, podem apresentar parede delgada ou espessa, lisa ou finamente à fortemente rugosa. No ápice do estipe surge o "Penicillus", que pode consistir de células conidiogênicas, denominadas fiálides. Estas podem incidir diretamente no estipe ou nas métulas (células de apoio) e ramos. Além disso, algumas espécies do gênero possuem uma ramificação adicional, denominada râmulo, localizada entre a métula e o ramo (ONIONS; BRADY, 1987; PITT, 2002).

Figura 1: Estrutura celular básica de *Penicillium* spp.



Fonte: TRUJILLO, 2015

Os conídios são unicelulares, uninucleados, hialinos, pequenos, com formas que variam de globosas a cilíndricas. Dependendo da espécie, a parede pode ser lisa, rugosa, fortemente rugosa ou espinescente. Algumas espécies produzem esclerócios, que são estruturas multicelulares de resistência que podem permanecer latentes por longos períodos até as condições do meio se tornarem propícias ao seu desenvolvimento. Podem apresentar variação na composição química da parede de hifas e de conídios, com a presença de glicose, galactose, manose, aminoácidos e glicosamina, em concentrações diferentes (RIZZA; KORNFELD, 1969).

Devido a variação e complexidade dos conidióforos do gênero *Penicillium*, foi necessário agrupar espécies que possuíssem padrão de ramificação similar e, apesar da discordância entre alguns autores, todos concordam que os ramos devem ser contados de cima para baixo, sendo considerado para classificação, o tipo de conidióforo predominante (ONIONS; BRADY, 1987).

Ecologicamente, as espécies do gênero *Penicillium* são de extrema importância na natureza, pois participam ativamente em ciclos biogeoquímicos, atuando na transformação de matéria orgânica. Embora o solo seja o habitat natural dessas espécies, elas podem ser encontradas em vários ecossistemas. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma imensa variedade de condições físico-químicas tais como temperatura, atividade da água e pH. É exatamente esta alta tolerância às condições extremas que lhes conferem a capacidade de crescer em quaisquer ambientes que lhes proporcionem o mínimo de oligoelementos essenciais até às mais complexas fontes de carbono, como por exemplo maltose, dextrose, sacarose e amido (BENNET, 2010; SAMSON et al., 2014; CARDOSO, 2015).

Além disso, as espécies deste gênero tem apresentado um grande potencial biotecnológico, uma vez que estão sendo utilizadas como modelo em pesquisas básicas e aplicadas. Entre os estudos onde são empregam estes micro-organismos, podemos citar biocontrole, micoparasitismo, utilização de seus metabólitos secundários para diversas indústrias, como fontes de enzimas de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010).

Fungos deste gênero são bastante conhecidos pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, como por exemplo: alcalóides, terpenóides, peptídeos, dentre outros e também enzimas extracelulares, como as pectinases, utilizadas na indústria de suco de laranja (SARGO, 2009; CARDOSO et al, 2007). Estas substâncias podem ser aplicadas em diversos setores da ciência, como o controle biológico, fonte de fármacos, antiparasitários, antibióticos e imunossupressores (ALECRIM, 2010).

No entanto, algumas espécies também produzem substâncias tóxicas, as micotoxinas. A presença de micotoxinas em alimentos e rações animais é um problema sério que tem chamado a atenção das autoridades sanitárias em nível internacional. Muitas restrições a produtos contaminados com esses metabólitos tóxicos têm ocorrido em diversos países. Estas restrições traduzem-se diretamente em impactos na economia, e por isso no produto interno bruto de países produtores desses alimentos e de rações animais (FREIRE et al., 2007).

Dentre as micotoxinas produzidas por *Penicillium* spp. e utilizadas na caracterização e identificação dessas espécies, destacam-se a patulina, a citrinina e a ocratoxina A (OTA). A citrinina é um poliquetídeo, com peso molecular de 250,25 Da e fórmula empírica C₁₃H₁₄O₅, que apresenta ação nefrotóxica. Trata-se de uma micotoxina produzida principalmente por *Penicillium citrinum*, entretanto, outras espécies de *Penicillium* e até mesmo de *Aspergillus* mostraram-se capazes de produzir esta toxina (FRISVAD et al., 2004; FRISVAD et al., 2005).

Alguns países e órgãos, preocupados com a qualidade da população que consome cada vez mais produtos industrializados, estabeleceram restrições de algumas micotoxinas. A OMS estabeleceu em 50 mg/L (m/v) como máximo tolerado de patulina em suco de maçã. Já o Brasil, por sua vez, estabeleceu Resolução RDC 07/2011, publicada no Diário Oficial da União em fevereiro de 2011, determinando que alimentos comercializados no Brasil como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros, deverão respeitar um limite máximo para a presença de micotoxinas, com quantidades máximas variando de acordo com o produto e público direcionado do alimento. Esta RDC estabelece limites máximos para as aflatoxinas (aflatoxina B1, B2, G1, G2 e M1) que variam entre 0,5 e 20 µg/kg, para a ocratoxina A (OTA) no intervalo de 2 a 50 µg/kg, para a desoxinivalenol (DON) com limites variando de 200 a 3.000 µg/kg, para as fumonisinas (FB1 + FB2) entre 200 e 5.000 µg/kg, 50 µg/kg para patulina (PAT) e entre 100 a 1.000 µg/kg para a zearalenona (ZON). Os produtores deverão seguir um cronograma que entrou em vigor a partir da publicação no Diário Oficial da União e que vai até janeiro de 2016 para se adaptar a nova resolução (FREIRE et al., 2007; ANVISA, 2013).

As espécies de *Penicillium* estão entre os fungos mais comuns em todo o mundo (VISAGIE et al., 2014). Eles habitam diversos ambientes internos e externos causando incômodos ocasionais, além de terem participado no provável maior experimento falho de todos os tempos, a descoberta de penicilina de Alexander Fleming. Apesar de sua onipresença, as espécies de *Penicillium* não-marneffeii raramente causam doenças humanas.

Entre os principais integrantes deste gênero que produzem micotoxinas, *Penicillium citrinum* se destaca. Apresenta-se como um fungo filamentososo de

ocorrência comum com uma distribuição mundial e pode ser uma das formas de vida eucarióticas mais comuns na Terra. A distribuição deste micro-organismo pode estar relacionada ao clima, onde, geralmente, é encontrado em solos subtropicais e presentes em menor frequência em solos de regiões temperadas (PITT; HOCKING, 2009; HOUBRAKEN et al., 2011). Esta espécie foi isolada de vários substratos como solo, cereais, especiarias e ambientes fechados e hipersalinos (SAMSON; FRISVARD, 2004; CANTRELL et al., 2006).

Asan et al. (2010) isolaram fungos filamentosos do ar e do solo com intervalos sazonais, na cidade de Luleburgaz, na província turca de Kirklareli. Dos fungos isolados do ar, o gênero mais representativo foi *Alternaria* e do solo, *Penicillium*. No caso do *Penicillium*, foram isoladas 15 espécies, sendo *P. citrinum* a espécie mais abundante no solo.

Outro estudo, realizado na região do Vale do São Francisco, em Petrolina, no estado de Pernambuco, por Coutinho et al. (2010), isolaram fungos filamentosos da rizosfera de meloeiros (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivados em solos ricos em compostos orgânicos. Os autores encontraram 78 espécies, sendo os gêneros mais representativos *Aspergillus* e *Penicillium*, com 15 e 13 espécies, respectivamente. Foram identificados *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. waksmanii*, *P. restrictum*, *P. solitum* var. *crustosum*, *P. spinulosum* e *P. vinaceum*.

Este fungo é capaz de produzir metabólitos secundários tóxicos que lhe confere benefícios na natureza, fornecendo vantagem competitiva para colonizar um novo substrato (ABBOTT, 2002; PITT, 2002). A citrinina, nome derivado do epíteto deste micro-organismo, é a principal toxina produzida por esta espécie e caracteriza-se por ser nefrotóxica (HETHERINGTON; RAISTRICK, 1931), sendo a micotoxina majoritariamente sintetizada por *P. citrinum*. Além disso, outros compostos, como o ácido tanzowaico A, quinolactacinas, quinocitrininas, ácido astérico e compactina, são produzidos por esta espécie (TURNER; ALDRIDGE, 1983; MALMSTRØM et al., 2000; KIM et al., 2001; KOZLOVSKI et al., 2003a, b).

Apesar de não ser comum sua presença em infecções em humanos, a literatura demonstra casos de isolamento desta espécie como patógenos. Foram encontrados quatro relatos de infecção por *P. citrinum* em seres humanos, três dos quais ocorreram

em pacientes com leucemia aguda que receberam quimioterapia intensiva (MONK et al., 1997; MORI et al., 1987; KRISHNAN et al., 2015) e uma que ocorreu no estabelecimento de inoculação direta (GUGNANI; GUPTA; TALWAR, 1978). Com base no grau significativamente mais amplo de imunodeficiência do paciente em relação ao induzido por aguda leucemia mais quimioterapia, conclui-se que *P. citrinum* provavelmente não seria a causa invasiva de pneumonia neste caso. No entanto, devido ao crescimento de *P. citrinum* de múltiplas culturas lavado broncoalveolar, suspeita-se da sua presença na árvore traqueobronquial no organismo humano.

Diante deste cenário, o desenvolvimento de drogas com espectro de ação que inclua o *P. citrinum* é importante, uma vez que não só na agricultura, mas em determinadas condições humanas, como em casos de incompetência imunológica, este fungo pode acarretar prejuízos a saúde como agente causador de infecções.

2.2 Terapia Antifúngica

Certas populações de pacientes mostram-se particularmente suscetíveis às infecções fúngicas (micoses). Essas populações incluem pacientes cirúrgicos e na unidade de terapia intensiva (UTI), pacientes com próteses e pacientes com comprometimento das defesas imunológicas. O número de indivíduos imunossuprimidos continua a aumentar devido a fatores como maior expectativa de vida, um aumento de pacientes infectados com HIV, transplantados de órgãos e de medula óssea ou pacientes com câncer tratados com fármacos citotóxicos. Muitos fármacos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas tem baixa biodisponibilidade ou são muito tóxicos para o uso prolongado. Além do fato de que muitas linhagens fúngicas estão adquirindo resistência devido ao elevado tempo de tratamento das infecções. (ECKERMAN; GRAHAM, 2000; GOLAN et al., 2009; MORSCHHÄUSER, 2010).

Os fungos, por serem seres eucariontes, apresentam vias metabólicas homólogas aos humanos para a produção de energia, a síntese de proteínas e a divisão celular. Consequentemente, existe uma maior dificuldade no desenvolvimento de agentes antifúngicos seletivos do que no desenvolvimento de antibacterianos seletivos. O primeiro agente utilizado no tratamento de micoses foi o iodeto de potássio em 1903, mas só nas primeiras décadas do século XX houve uma maior pesquisa por novas moléculas para o tratamento de doenças infecciosas.

Diferentemente dos antibacterianos, novos compostos antifúngicos só vieram a ser em 1980, devido surgimento de doenças oportunistas decorrentes da pandemia da AIDS (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

A escolha do antifúngico adequado é baseada no quadro clínico geral do paciente, tipo de micose e o micro-organismo envolvido na infecção. Esses fatores são levados em consideração não só para a decisão do tratamento farmacológico que será aplicado, mas também da formulação da droga que será empregada na administração do medicamento. Entretanto, o tratamento de infecções micóticas contam com um número limitado de fármacos para o uso clínico, e as opções disponíveis são limitantes por vários motivos: surgimento de cepas resistentes, reduzido espectro de ação, relevantes efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade em alguns tecidos (BROOKS et al., 2014; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

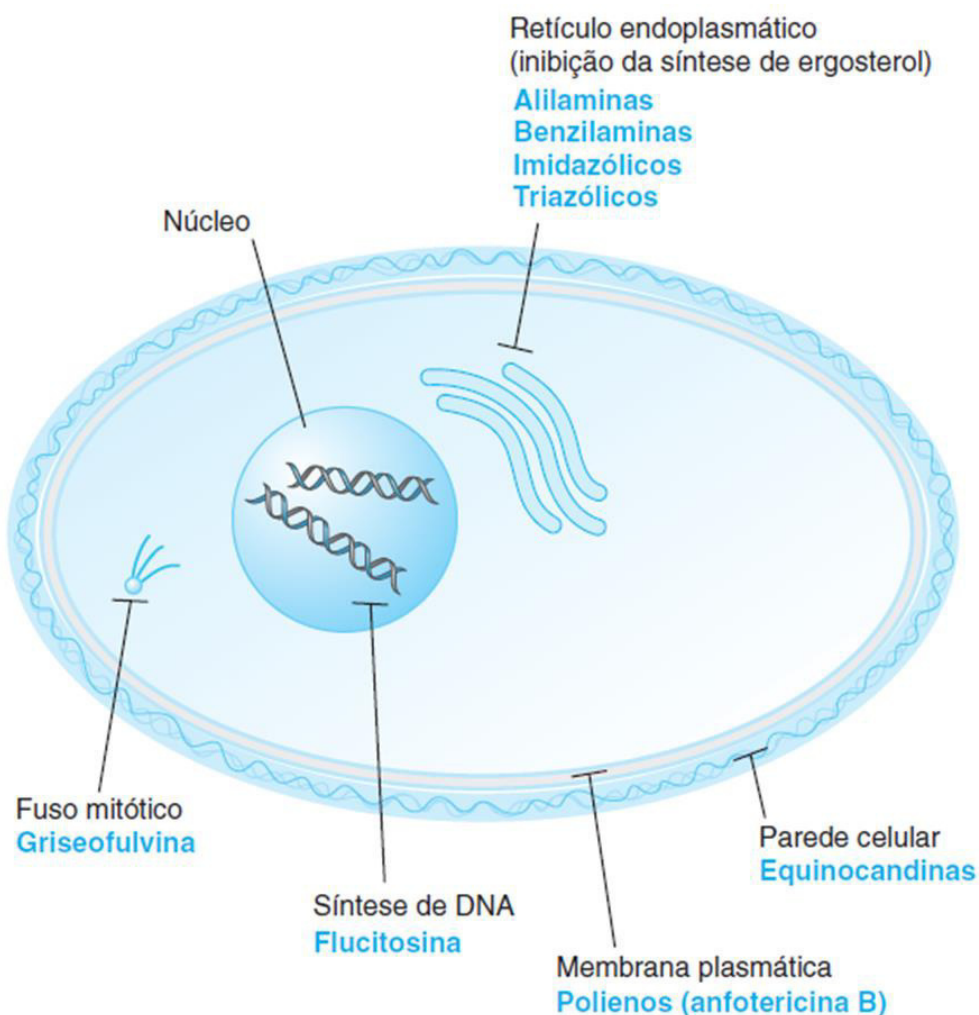
Como pode ser observado na Figura 2, os principais alvos moleculares da terapia antifúngica consistem em enzimas e outras moléculas envolvidas na síntese da parede celular, membrana plasmática, na mitose e na síntese de DNA dos fungos. Dentre as classes disponíveis de drogas antifúngicas, encontram-se os poliênicos, os azóis, os tiocarbanatos, as alilaminas, os derivados morfolínicos, a 5-fluorocitosina, a griseofulvina e as equinocandinas (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015)

Os polienos são moléculas anfipáticas com alta afinidade química por esteróis 24-substituídos, que atuam através de sua ligação ao ergosterol que leva a ruptura da estabilidade da membrana dos fungos devido a produção de canais ou poros aquosos na membrana das células, que alteram a permeabilidade da membrana do fungo e que permitem o extravasamento de constituintes celulares essenciais como íons, açúcares, proteínas e ácidos nucleicos, levando finalmente à morte da célula. Entre os representantes desta classe, encontram-se a anfotericina B, nistatina e a pimaricina (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Os agentes antifúngicos azólicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em imidazólicos (anel contendo 2 átomos de nitrogênio) e triazóis (anel contendo 3 átomos de nitrogênio), que compartilham o mesmo mecanismo de ação e espectro antifúngico semelhante. Como os triazólicos de administração sistêmica tendem a ter menos efeito do que os imidazólicos também administrados

sistemicamente sobre a síntese de esteróis nos seres humanos, o desenvolvimento de novos fármacos tem sido direcionado principalmente para os triazólicos (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Figura 2: Estruturas-alvo nas células fúngicas dos fármacos antimicrobianos



Fonte: GOLAN et al., 2009.

Esses compostos agem inibindo a 14α -demetilação de molécula de lanosterol. Eles se ligam ao átomo de ferro presente no grupo protoporfirínico localizado no sítio ativo da enzima da enzima $C14\alpha$ -lanosterol demetilase por meio dos átomos de nitrogênio do núcleo imidazol ou triazol. Assim, ocorrerá uma depleção de ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos com concomitante acúmulo de esteróis

tóxicos, alterando a permeabilidade e fluidez da membrana, interferindo na fisiologia do micro-organismo e, conseqüentemente, a inibição do seu crescimento. Entre os representantes dos imidazólicos, destacam-se o cetoconazol, clotrimazol, miconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, sertaconazol e o sulconazol. Já na classe de agentes antifúngicos triazólicos estão disponíveis o itraconazol, fluconazol, voriconazol, terconazol, posaconazol e o ravuconazol, que está na fase de estudos clínicos (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Outra classe de fármacos que atua na via sintética do ergosterol são os morfolínicos. Estes fármacos atuam na $\Delta 14$ -redutase e na $\Delta 8$ -isomerase, levando a inibição da síntese do ergosterol. A amorolfina é a representante desta classe (TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Na biossíntese do ergosterol, o esqualeno é convertido em lanosterol pela ação da esqualeno-epoxidase. As drogas da classe das alilaminas e benzilamina são compostos por fármacos que inibem a enzima esqualeno epoxidase, impedindo a formação do lanosterol, que é um precursor do ergosterol. Essa ação leva a depleção de ergosterol na membrana e o acúmulo de esqualeno no citoplasma fúngico, levando ao efeito tóxico na célula, o que os torna fungicidas na maioria das circunstâncias. Os representantes das alilaminas são a terbinafina e naftifina, e da benzilamina é a butenafina (GOLAN et al., 2009; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Os componentes-chave da parede celular dos fungos são a quitina, o β -(1,3)-D-glicano, o β -(1,6)-D-glicano e as glicoproteínas da parede celular. Como as células humanas não possuem parede celular, os componentes da parede celular dos fungos representam alvos exclusivos para a terapia antifúngica, e os agentes antifúngicos dirigidos contra esses alvos tendem a ser relativamente atóxicos. Desta forma, as equinocandinas inauguram uma nova classe de fármacos antifúngicos que perturbam a síntese do polissacarídeo da parede celular β -glucana por inibição não-competitiva da 1,3 β -glucana sintase, perturbando a integridade da parede celular. A ruptura da integridade da parede celular resulta em estresse osmótico, lise da célula fúngica e, por fim, morte do fungo. Os representantes desta classe são lipopeptídios semissintéticos derivados de produtos naturais, onde a caspofungina, micafungina e a anidulafungina são os principais integrantes (BROOKS et al., 2014; GOLAN et al., 2009)

A griseofulvina é um composto derivado do *Penicillium griseofulvum* que apresenta como ação a inibição da mitose dos fungos via ligação à tubulina e a uma proteína associada aos microtúbulos, rompendo, assim, a organização do fuso mitótico. Além disso, o fármaco age inibindo a síntese de RNA e de DNA pelo fungo. Esse antifúngico acumula-se nas células precursoras de queratina e liga-se firmemente à queratina nas células diferenciadas. Após a administração oral, a griseofulvina distribui-se pelo corpo e se acumula nos tecidos queratinizados. Essa associação prolongada e firme da griseofulvina com a queratina permite o novo crescimento da pele, dos cabelos ou das unhas livres de infecção por dermatófitos. Na maioria das situações, a griseofulvina parece ser fungistática (BROOKS et al., 2014; GOLAN et al., 2009).

A flucitosina é um derivado fluorado da citosina. Após seu transporte para o interior da célula fúngica pela citosina permease, ocorre sua conversão em 5-fluouracil pela enzima citosina-desaminase. Esse composto é um análogo de nucleotídeo, em que será incorporado ao RNAm no lugar do uracil durante o processo de transcrição, inibindo a síntese proteica. Somando a esta ação, o fármaco ainda inibe a timidilato sintase, cessando o processo de síntese de DNA (BROOKS et al., 2014; TRABULSI; ALTERTHUM et al., 2015).

Além de seus usos na clínica, substâncias com atividade antibiótica também tem amplo emprego na agricultura, em especial, os antibióticos com atividade fungicida, pois prejuízos econômicos devido a perdas de lavouras, de grãos e frutas armazenados, causados pela presença de fungos, são preocupantes (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

2.3 Plantas Medicinais

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos animais foram as principais fontes de drogas (BAJPAI et al., 2008; SCREMIN et al., 2016). O documento médico mais antigo conhecido é sumeriano e data de mais de 2.000 a.C. Este documento menciona remédios a base de plantas utilizados no tratamento de diversas doenças (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

O interesse e os registros da utilização de produtos naturais feitos pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, espécie de farmacopeia faraônica, escrita em torno em 1.550 a.C. descoberto e traduzido pela primeira vez em 1890 por H. Joachim, no qual são enumeradas mais de 100 doenças e já fazia referência aos medicamentos de origem vegetal e mencionava cerca de 700 remédios, entre eles, o bulbo da cila, o óleo de rícino e a genciana (VILELA, 1977; GURGEL et al., 2005). Os egípcios já faziam uso medicinal dos vegetais, e algumas das espécies que eles utilizavam continuam sendo empregadas até os dias de hoje, tais como: *Papaver somniferum* (papoula), *Scilla maritima* (scila), *Aloe vera* (babosa) e *Ricinus communis* (óleo de rícino ou óleo de mamona) (LAVABRE, 1993; MOTSEI et al., 2003; YAYLI et al., 2005; MAGWA et al., 2006; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007; ABDELGALEIL et al., 2008).

A eficácia e o uso de plantas medicinais são atribuídos as observações populares que contribuem de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem apesar de não terem seus constituintes químicos muitas vezes conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas ao longo dos anos (MACIEL et al., 2002). As suas aplicações antimicrobianas, antissépticas e outras aplicações terapêuticas são relatadas desde a pré-história por todas as civilizações, como o uso de extratos vegetais e de óleos essenciais (OEs) no tratamento de infecções bacterianas (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2016).

O interesse popular na utilização de produtos naturais para fins terapêuticos tem sido muito significativo nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. Segundo a OMS, entre 60% e 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI et al., 2007). Ainda segundo a organização, 25% de todos os medicamentos utilizados sejam derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, aumentando para 60% se consideramos apenas a classe dos antimicrobianos e antitumorais (ROBINSON; ZHANG, 2011).

As plantas medicinais são os únicos recursos terapêuticos de grande parcela da população brasileira e mais de 2/3 da população do planeta. Vários fitoterápicos

movimentam o mercado mundial, sendo que a balança comercial brasileira ainda é deficitária neste aspecto. O Brasil exporta sete milhões de reais em extratos vegetais de alcaçuz, aloés, bardana, catuaba, ipeca e quina entre outros e apesar da biodiversidade da nossa flora, o país ainda importa grande quantidade de cosméticos, hormônios e outras drogas produzidas a partir de fontes naturais (FERNANDES; ANTUNES, 2000). Além disso, o Brasil compõe o grupo dos quatro maiores produtores mundiais de óleos essenciais, acompanhado da Índia, China e Indonésia, destacando-se pela produção de óleos essenciais provenientes da prensagem de pericarpos de frutos cítricos, subprodutos da indústria de sucos (BIZZO et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Os óleos essenciais são constituídos de substâncias orgânicas voláteis presentes em vários órgãos vegetais (folhas, cascas, raízes, frutos, e flores). (SARTORATTO et al., 2004). Os principais gêneros de plantas produtoras de OEs estão incluídos nas famílias Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperaceae (EL ASBAHANI et al., 2015). São originados do metabolismo secundário das plantas e possuem grande importância como marcadores taxonômicos nos diferentes níveis de hierarquia, incluindo na investigação de problemas taxonômicos, evolutivos e intraespecíficos (GONÇALVES et al., 1999; TRIGO et al., 2003). Apresentam baixo peso molecular, são voláteis, lipofílicos e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente inferior a da água, odoríferos e líquidos a temperatura ambiente, incolores ou ligeiramente amarelados. São sensíveis ao oxigênio, luz e calor (SHERRY et al., 2013; DHIFI et al., 2016)

Os óleos essenciais apresentam composição química muito variada sendo constituído de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis, de baixo peso molecular, sendo que dois ou três destes componentes estão em concentrações bastante elevadas (20-70%), sendo denominados de compostos majoritários (DELAMARE et al., 2007; BAKKALI et al., 2008). Essas moléculas orgânicas voláteis de pesam no máximo 300 Daltons e, em geral, compreendem misturas de várias classes de produtos naturais, principalmente terpenóides (especificamente monoterpenos-C10, e sesquiterpenos-C15, embora diterpenos-C20 possam também estar presentes), derivados de ácidos graxos, benzenóides e compostos nitrogenados; e cada uma delas pode conter os mais diversos grupos funcionais tais

como: hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados ou insaturados), ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, lactonas, compostos contendo nitrogênio e enxofre, dentre outros.(SIMÕES et al., 2000, HENRIQUES et al., 2009).

Os óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Assim como a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo. Portanto, o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre sua composição química (SIMÕES et al., 2000).

Nas plantas, os óleos essenciais desempenham importantes funções ecológicas agindo como sinais químicos para a comunicação entre espécies, na proteção contra micro-organismos patogênicos, herbívoros, na atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, promovendo assim a perpetuação das espécies e contribuem também com o odor de folhas, flores e frutos (TAIZ; ZEIGER, 2009; CHIN; VEPOORTE, 1999). Esses compostos têm despertado o interesse da comunidade científica e muitas pesquisas de bioprospecção de substâncias ativas a partir das plantas medicinais vem sendo realizadas, muitas das quais já relatam as suas atividades biológicas atribuídas aos OEs, como ação antimicrobiana, antioxidante, larvicida, ansiolítica, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antitumoral, entre outras (DHIFI et al., 2016; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Entre os constituintes químicos dos óleos essenciais, ocorre majoritariamente os terpenos e os fenilpropanóides, além de alcaloides e policetídeos (DE SOUSA, 2011). A formação dos compostos dos óleos essenciais se dá a partir da derivação química de terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (GUENTHER, 1977 e SIMÕES et al. 2000). Os fenilpropanóides são componentes aromáticos biossintetizados a partir da tirosina e fenilalanina e ocorrem com menos frequência que os terpenos, sendo representados principalmente pelo cinamaldeído e eugenol. Apesar de suas vias biossintéticas serem distintas, ambas essas classes podem coexistir em um mesmo espécie (SA et al., 2014). Embora os terpenos representem a maioria dos

componentes e ocorram com muito mais freqüência e abundância, sempre que os fenilpropanóides estão presentes fornecem um sabor e odor indispensáveis e significativos ao óleo. Biogeneticamente, terpenóides e fenilpropanóides originam-se de metabolismos precursores diferentes e são gerados por rotas biossintéticas completamente distintas (SANGWAN et al. 2001).

2.4 Fenilpropanóides: Conceito e Atividade Antimicrobiana

Os fenilpropanóides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico. Embora não sejam constituintes majoritários comuns de óleos essenciais de plantas, os óleos essenciais de certas espécies contêm proporções abundantes ou significativas de tais compostos. Quando ocorrem, sua natureza e suas propriedades alteram significativamente as características sensoriais do óleo. Esses compostos desempenham funções importantes na planta como realizar uma reprodução satisfatória do vegetal e em resposta ao estresse vegetal como variação luminosa, tratamento mineral e como forma de resistência a pragas. Entre os representantes desta classe, podemos citar o eugenol, metil eugenol, cinamaldeído, safrol, vanilina, miristicina, elemicina, chavicol, metil chavicol, dilapiol, anetol, estragol, apiol. (SANGWAN et al. 2001; DUDAREVA et al., 2004; LA CAMERA et al., 2004; VOGT, 2010).

A diversidade estrutural dos fenilpropanóides é derivada da variação dos substituintes no anel de benzeno e na posição da ligação dupla na cadeia lateral de propenilo. Os alilfenóis, o chavicol e o eugenol, e os seus respectivos isômeros posicionais de dupla ligação, isochavicol e isoeugenol, não são particularmente voláteis (GANG et al., 2001). Em contraste, devido à metilação de todos os seus grupos hidroxila, o estragole, anetol, metileugenol e o metiliseugenol são mais voláteis e podem ser facilmente detectados, por exemplo, por microextração em fase sólida (YAUK et al., 2015).

Esses compostos atraíram um interesse científico considerável, pois são importantes constituintes do sabor de uma série de especiarias, como por exemplo, craco-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e anis estrelado (*Illicium verum*) e ervas aromáticas, como manjeriço doce (*Ocimum basilicum*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*). O eugenol é o constituinte principal (70-90%) do óleo essencial de cravo e

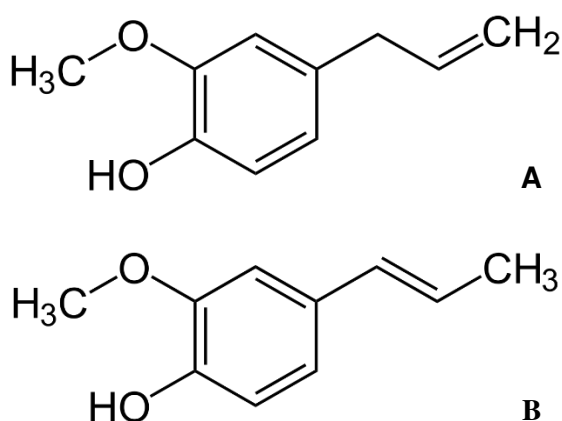
dá-lhe o seu aroma distintivo pontudo (JIROVETZ et al., 2006). O anis estrelado contém altas proporções de (E)-anetol (50-80%) e tem um forte sabor de anis, com um sabor de alcaçuz (HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009). No manjerição doce, existem quimiotipos que acumulam apenas estragole, apenas eugenol, ou estragole e metileugenol em quantidades similares e alguns ainda que acumulam quase nenhum fenilpropanóide (LEWINSOHN et al., 2000; GANG et al., 2001). Já a erva-doce contém principalmente estragol e (E)-anetol e tem um sabor suave, doce e anis (GROSS et al., 2009). A acumulação de altos níveis de chavicol é relativamente rara. Alguns óleos, como o de *Pimenta racemosa*, contém altos níveis de chavicol e eugenol e possuem notas de canela, cravo e noz-moscada (TUCKER et al., 1991). Os fenilpropenos também são componentes-chave de sabor de alimentos processados, incluindo alcaçuz, chás, salsichas e bebidas aromatizadas com cola (SIANO et al., 2003; ELLER; RYCHLIK, 2006; WAGNER; SCHIEBERLE; GRANVOGL, 2017).

Os compostos fenólicos também foram reconhecidos como componentes bioativos dos óleos essenciais (TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013). A atividade antimicrobiana dos fenilpropanóides depende das cepas microbianas selecionadas, do tipo e número de substituintes no anel aromático, e parâmetros experimentais como temperatura e meio escolhidos para o crescimento, etc (PAULI; KUBECZKA, 2010). Vários estudos publicados demonstram a atividade antimicrobiana desses compostos naturais, seja de forma isolada ou com o extrato ou óleos essenciais.

O eugenol, ou 4-alil-2-metoxifenol, apresenta fórmula química $C_{10}H_{12}O_2$ (Figura 3), sendo encontrado, principalmente, nos óleos essenciais de cravo-da-índia, cânfora, açafreão, tomilho, canela e noz-moscada. É um líquido viscoso amarelo, hidrofóbico e com um odor pronunciado de cravo, em temperatura ambiente. Tem sido aplicado de forma ampla na medicina como anestésicos, analgésicos, agente anti-inflamatório e antibacteriano (CHAIEB et al., 2007; XING et al., 2012; KONG et al., 2014; Raja et al., 2015). Esse efeito antimicrobiano é comprovado por pesquisas que comprovaram sua ação antifúngica (AHMAD et al., 2010), antibacteriana (DEVI et al., 2010), antiparasitária (UEDA-NAKAMURA et al., 2011), antiviral (TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007) e contra fitopatógenos (VENTUROSIO et al., 2011). Além disso, o Food and Drug Administration (FDA) reportou o eugenol como substância segura e considerada não carcinogênica e não mutagênica (KONG et al., 2014). Derivados do eugenol como acetileugenol, isoeugenol, e metileugenol possuem atividade

atinfúngica contra os fungos causadores de podridão branca da madeira (*Lenzites betulina*) e fungos da podridão marrom da madeira (*Laetiporus sulphureus*) (SENSUNG et al., 2008). O isoeugenol também apresenta atividade antimicrobiana, com ação sobre *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *Penicillium brevicompactum*, *P. expansum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* (ZABKA; PAVELA, 2013).

Figura 3. Estrutura molecular do eugenol (A) e isoeugenol (B).

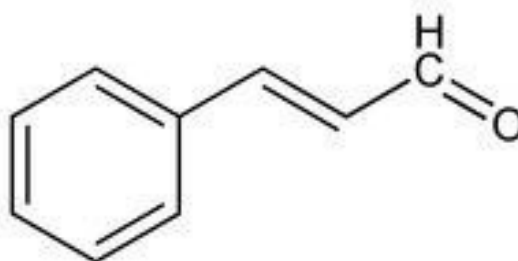


Fonte: The Merck Index, 2013.

O trans-cinamaldeído, também chamado de cinamaldeído, (E)-cinamaldeído, aldeído cinâmico ou trans-3-fenil-2-propenal, é um fenilpropanóide, com fórmula molecular C_9H_8O , formado biologicamente a partir da redução do ácido cinâmico, encontrado no óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em diferentes concentrações (Figura 4). Na casca, essa substância encontra-se majoritariamente, variando entre 65 a 85%, e nas folhas, em menor concentração, entre 1 a 5%. Esse composto orgânico é responsável pelo sabor e odor da canela, presente principalmente em suas cascas (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011). O óleo essencial da canela demonstrou atividade contra diversas espécies de bactérias e fungos, entre eles, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterococcus* sp, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, entre outros (NAVABI et al, 2015). Outros estudos relataram que o fitoconstituente, isoladamente, apresenta atividade bactericida frente a *Helicobacter pylori* em concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, não sendo observado o

desenvolvimento de resistência ao composto testado, e também efeito inibitório sobre *Mycobacterium tuberculosis* com concentração inibitória de $166,66 \pm 22,82 \mu\text{g/mL}$ (ALI et al., 2005; MOTA, 2014). Estudos investigaram o mecanismo de ação deste composto e verificaram que o fitoconstituente age na inibição de bactérias, fungos filamentosos e leveduras por interferir na ATPase mitocondrial tipo-F e age na membrana do micro-organismo promovendo a redução da concentração intracelular de ATP (SHREAZ et al., 2011; KHAN et al., 2012).

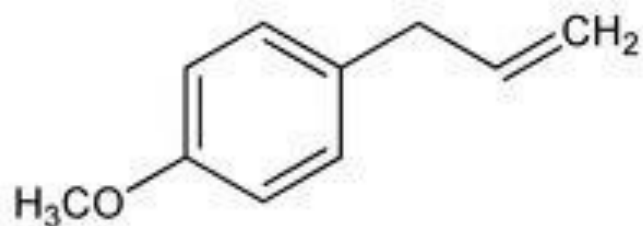
Figura 4. Estrutura molecular do cinamaldeído.



Fonte: The Merck Index, 2013.

O estragol, também denominado de metilchavicol, é um fenilpropanóide com fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ e que confere aroma de “anis” a algumas espécies vegetais (Figura 5). Este fitoconstituente é relativamente não tóxico, volátil, presente no óleo essencial de inúmeras plantas utilizadas na aromaterapia e na medicina popular, tais como manjeriço-de-folha-larga ou basil (*Ocimum basilicum*), tarragon (*Artemisia dracunculoides*), canela de cunhã (*Croton zehntneri*) e ravensara (*Ravensara anisata*) (CRAVEIRO et al., 1981; FRANCHOME; PENOEL, 1995). Esta substância é responsável por várias atividades biológicas, incluindo, nematicida e inseticida (DAVID et al., 2006). Além disso, este fitoconstituente mostrou-se capaz inibir o crescimento de cepas bacterianas de *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* e *Salmonella paratyphi*, e também dos fungos *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale* e *Cryptococcus neoformans* (ANDRADE et al., 2015).

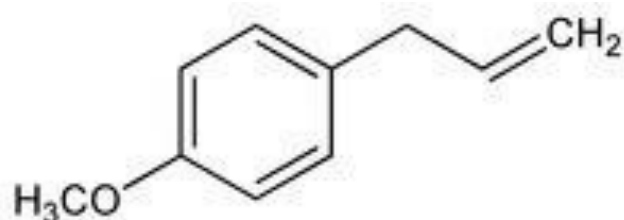
Figura 5. Estrutura molecular do estragol.



Fonte: The Merck Index, 2013.

Safrol ou 4-allyl-1,2-metilenodioxibenzeno é um fenilpropanóide com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_2$ (Figura 6). É um líquido levemente amarelado de odor característico, insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos, tais como etanol, clorofórmio e éter etílico. Ocorre naturalmente em plantas das famílias: Aristolochiaceae, Lauraceae e Piperaceae (COSTA, 2000; PESCADOR et al., 2000). É encontrado em grande quantidade no óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium*), espécie vegetal muito difundida na região amazônica do Brasil. Esta substância é volátil e possui grande importância na indústria farmacêutica e cosmética (PESCADOR et al., 2000; BRAGA; CREMASCO, 2016). Estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais que continham esse composto como majoritário apresentaram efeito inibitório frente a fungos, bactérias, insetos e ameba (GUPTA et al., 1985; PINO et al., 1998; SILVA; BASTOS et al., 2007; DUARTE et al., 2007; LIMA et al., 2009; ZACARONI et al., 2009; MONZOTE et al., 2010; DOGNINI et al., 2012; SAUTER et al., 2012).

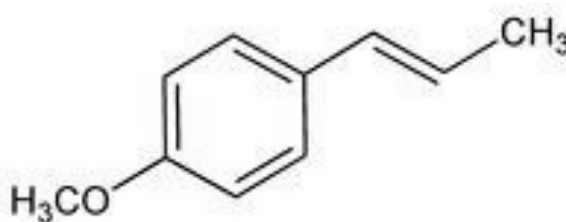
Figura 6. Estrutura molecular do safrol.



Fonte: The Merck Index, 2013.

O anetol é um composto aromático encontrado como componente majoritário nos óleos essenciais de anis (*Pimpinella anisum*), anis-estrelado (*Illicium verum*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*). Apresenta a forma de cristais branco, em temperatura ambiente, miscível em éter e clorofórmio e praticamente insolúvel em água. Apresenta fórmula química ($C_{10}H_{12}O$), Figura 7, e é encontrado na natureza como os isômeros cis-anetol e trans-anetol (AZAMBUJA, 2009). O óleo essencial da semente de *Foeniculum vulgare*, que apresenta o anetol majoritariamente, inibiu o crescimento de importantes bactérias patogênicas de plantas pertencente aos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xantomonas*, *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Rhodococcus* (CANTORE et al., 2004). Além do mais, na literatura são encontradas pesquisas que constataam a atividade antimicrobiana do fenilpropanóide frente a diversos micro-organismos causadores de infecção no homem, entre eles: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium acnes* (KUBO et al., 2008; TINOCO; MARTINS; CRUZ-MORAIS, 2007; ESFANDYARI-MANESH et al., 2013).

Figura 7 - Estrutura molecular do anetol.



Fonte: The Merck Index, 2013.

Estes estudos demonstram que os fenilpropanóides apresentam atividade contra diversos micro-organismos, o que os tornam uma fonte de compostos viáveis a pesquisa de novos antimicrobianos. Desta forma, este estudo investigou a atividade antifúngica do fenilpropanóide isoeugenol contra cepas de *P. citrinum*, bem como os efeitos toxicológicos, *in vitro* e *in silico*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a atividade antifúngica do isoeugenol frente a cepas de *Penicillium citrinum* e os possíveis efeitos tóxicos do fitoconstituente em células eucarióticas *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Específicos:

- ❖ Realizar uma triagem antifúngica dos fitoconstituintes frente a *Penicillium citrinum*.
- ❖ Avaliar o espectro de atividades biológicas e risco tóxico do isoeugenol por meio da análise *in silico*;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do isoeugenol;
- ❖ Investigar a ação do isoeugenol na parede celular fúngica;
- ❖ Verificar o efeito do fitoconstituente na membrana plasmática do *P. citrinum*;
- ❖ Avaliar o resultado da associação do isoeugenol com o antifúngico voriconazol;
- ❖ Avaliar o potencial citotóxico do isoeugenol frente a eritrócitos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

Os testes de atividade antifúngica foi realizada no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Ensaio Toxicológicos II (LABETOX-II / IPeFarM/ UFPB).

4.2 Substância teste e Drogas antifúngicas

O isoeugenol, carvacrol, (+)- α -pineno, R-citronelal, S-citronelal, 7-hidroxi-citronelal, voriconazol e anfotericina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brasil). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), em uma proporção de até 10% e 2% respectivamente, para uma quantidade suficiente para (q.s.p.) produzir 5 ml das diluições empregadas nos ensaios.

4.3 Meios de Cultura

Para avaliação da atividade antifúngica foram utilizados os meios de cultura RPMI-1640-L-glutamina (sem bicarbonato de sódio) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil) e Ágar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). Os meio de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e esterilizados por autoclavação a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos.

4.4 Micro-organismos

Foram utilizadas 10 cepas de *Penicillium citrinum* de origem clínica e a cepa padrão INCQS 40011 (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) usada como referência foi oriunda da Micoteca do Laboratório de Micologia / Departamento

de Ciências Farmacêuticas / CCS / UFPB. As cepas de origem clínica foram isoladas do meio ambiente (LM-03, LM-04 e LM-157), unha (LM-02, LM-145 e LM-278), ouvido (LM-08 e LM-155) e pele (LM-30, LM-161 e LM-171), e fazem parte da Coleção do Laboratório de Microbiologia / Departamento de Ciências Farmacêuticas / CCS / UFPB. As cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4 °C até o momento de preparar o inóculo para os testes.

4.5 Inóculo Fúngico

Para o preparo do inóculo, as linhagens fúngicas foram inoculadas em caldo Sabouraud dextrose (CSD) e incubadas em temperatura de 28-30 °C por 5-7 dias. Após esse período, uma alíquota foi semeada em Ágar Sabouraud Dextrose e após o período de incubação, foi realizada uma suspensão fúngica e ajustada escala 0,5 de Mc Farland, que corresponde a aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000; CLSI, 2008).

4.6 Eritrócitos Humanos

Os eritrócitos humanos tipo A e tipo B, todos Rh +, foram obtidos de sangue com prazo para uso em transfusões sanguíneas vencido (sangue a ser descartado), coletado pela Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte do sangue foi realizado de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa - CCS/UFPB e está em processo de avaliação pelo órgão.

4.7 Triagem Antifúngica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima do isoeugenol e voriconazol, realizou-se a técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; HADACEK, GREGER, 2000; CLSI,

2008). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL de RPMI-1640 duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da solução dos produtos duplamente concentrados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Para a triagem antifúngica dos produtos, foi utilizada uma concentração de 1.024 µg/mL para os fitoconstituintes. O fitoconstituente que apresentou melhor resultado frente aos micro-organismos testados e seguiu os experimentos. O fitoconstituente escolhido, foi testado nas concentrações de 0,5 até 1024 µg/mL, sendo obtidas por diluição seriada a razão de dois, de modo que na primeira linha da placa se encontra a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo fúngico de cada isolado nas cavidades, onde cada cepa ficou disposta em uma coluna da placa.

Concomitantemente, foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas (100 µL de RPMI-1640 duplamente concentrado e 10 µL do inóculo de cada cepa). E para verificar a interferência ou não dos agentes emulsificantes, empregados na diluição do fitoconstituente, nos resultados, foi feito um controle no qual foi colocado nas cavidades 100 µL do RPMI-1640, DMSO (5%), Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado apenas 100 µL do RPMI-1640 em cavidades sem a suspensão fúngica.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 – 30°C por 5-7 dias para a realização da leitura. Posteriormente, foi realizada a leitura dos resultados observando a mudança do meio RPMI. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visualmente verificado pela manutenção da coloração original do meio (rosa). Os ensaios foram realizados em triplicata. E a classificação da CIM foi realizada de acordo com Sartoratto et al. (2004), onde substâncias que apresentem CIM até 500 µg/mL são considerados com forte poder antimicrobiano; uma CIM entre 600 e 1500 µg/mL –moderado poder antimicrobiano, e uma CIM acima de 1500 µg/mL - fraco poder antimicrobiano.

Para avaliação da CFM, alíquotas de 20 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico foram transferidas para placas de ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 28 – 30°C por 5 – 7 dias. A CFM foi considerada como a menor concentração em que o crescimento foi inferior a 3 colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Os ensaios

foram realizados em triplicata e a média aritmética foi calculada (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

4.8 Ensaio com sorbitol

O ensaio com sorbitol foi utilizado para verificar se o isoeugenol apresenta ação antifúngica por atuar na parede celular fúngica. Esse composto um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos.

Para este experimento foram selecionadas aleatoriamente as cepas *P. citrinum* INCQS 40011, LM-03, LM-161, LM-171, e determinada a CIM das substâncias para estes exemplares, na presença do sorbitol, de acordo com o protocolo descrito no item 4.8. Neste caso, foi utilizado meio de cultura previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17) a 0,8 M. Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de sorbitol. Os ensaios foram realizados em triplicata (ESCALANTE et al., 2008; FROST et al., 1995).

4.9 Ensaio com ergosterol

Para determinar se o isoeugenol interage com o ergosterol, sua CIM foi determinada para as cepas *P. citrinum* INCQS 40011, LM-03, LM-161, LM-171, na presença do ergosterol exógeno pelo método de microdiluição, de acordo com o protocolo descrito no **item 4.8**. Para isso, foi utilizado meio de cultura previamente adicionado de 400 µg/mL de ergosterol. Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de ergosterol exógeno.

Para controle do método, foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cujo mecanismo de ação envolve a interação com ergosterol da membrana. Os ensaios foram realizados em triplicata (ESCALANTE et al., 2008).

4.10 Estudo de associação do fitoconstituente com o voriconazol

As combinações do isoeugenol com o voriconazol foram testadas frente as cepas *P. citrinum* INCQS 40011, LM-03, LM-161, LM-171, utilizando a técnica de microdiluição *checkerboard* (WHITE et al., 1996).

Primeiramente, 100 µL de caldo foram adicionados nos poços da placa de microdiluição. Em seguida, foi adicionado o fitoconstituente no sentido vertical e o voriconazol no sentido horizontal da placa. Cada produto foi testado em diferentes concentrações (CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4 e CIM÷8). Por fim, foi adicionado 10 µL da suspensão fúngica. As placas foram incubadas a 28-30 °C por 5-7 dias.

Para avaliar a interação de cada associação, foi calculado o ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) através da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o isoeugenol e B o voriconazol. O CIF^A , por sua vez, é obtido através da relação CIM_A combinado/CIM_A isolado, enquanto que o CIF^B é calculado através da relação CIM_B combinado/CIM_B isolado. De acordo com o valor obtido em cada relação, foi utilizado a classificação segundo Lewis et al. (2002): sinergismo (ICIF ≤0,5), aditividade (0,5 < ICIF <1), indiferença (1 ≤ ICIF <4) ou antagonismo (ICIF ≥4,0).

4.11 Ensaios *in silico*

4.11.1 PASS on-line

O “*Prediction of Activity Spectra for Substances*” - PASS on-line é um *software* projetado para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano, de acordo com seu arranjo estrutural. As probabilidades fornecidas pelo programa são geradas via consulta a um banco de dados (www.way2drug.com/passonline) constituído de outras moléculas orgânicas com atividade biológica definida, fornecendo assim previsões simultâneas de atividades biológicas baseando-se apenas na estrutura química do composto orgânico (CHAND, 2011; KHURANA et al., 2011).

O espectro de atividades biológicas de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de atividades biológicas, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. Desta forma, o PASS on-line proporciona vários alvos prováveis da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa

(probabilidade " de ser ativo") e P_i (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

4.11.2 Molinspiration

O software Molinspiration Molecule Viewer (www.molinspiration.com) permite a percepção das moléculas empregando estatísticas Bayesianas sofisticadas, que combinam as estruturas e as propriedades do composto representativo ativo no alvo específico com as estruturas de moléculas inativas, para reconhecer características da subestrutura típicas das moléculas ativas. Este programa é capaz de avaliar a molécula fornecendo diversos parâmetros, entre estes a capacidade de prever em probabilidade do composto em atuar sobre determinados alvos farmacológicos (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; GUPTA; ANIYERY; PATHAK, 2017).

Além disso, o software é capaz de informar parâmetros físico-químicos importantes na predição da biodisponibilidade oral teórica da droga em estudo. Estes parâmetros são: área de superfície polar total (TPSA), coeficiente de partição (água/óleo) - $c\text{LogP}$, peso molecular, número de aceptores de hidrogênio - $n\text{ALH}$, número de doadores de hidrogênio - $n\text{DLH}$ (URSU; OPREA, 2010; URSU et al., 2011).

Para verificar se o composto pode ser planejado para ser administrado via oral, foi realizada uma análise baseada na "Regra dos cinco", conforme descrito por Lipinski (2004). Nesta regra, caso a molécula apresente scores de pelo menos 3 parâmetros atendendo o exigido ($\text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$; $c\text{LogP} \leq 5$; peso molecular < 500 daltons; $n\text{ALH} \leq 10$; $n\text{DLH} \leq 5$), a molécula possivelmente apresentará, teoricamente, uma boa biodisponibilidade oral.

4.11.3 Osiris

Para verificar a toxicidade e parâmetros farmacocinéticos teóricos do isoeugenol, o composto foi submetido ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o programa Osiris. Esta ferramenta on-line (www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html)

é capaz de prever a toxicidade da substância por meio da comparação de sua estrutura química com fragmentos moleculares, cuja toxicidade definida encontra-se num banco de dados. Os resultados da toxicidade são expressos em efeito mutagênico, tumorigênicos, irritabilidade e efeitos sobre o sistema reprodutor (URSU; OPREA, 2010; URSU et al., 2011).

Após análise, o software forneceu o potencial de semelhança com outros fármacos (druglikeness) e o potencial como candidato a fármaco (drug-score), que estão relacionados a descritores topológicos, e outras propriedades como cLogP e massa molecular, além da análise teórica dos efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução. Os resultados obtidos foram então classificados a partir de uma escala de 1 a 3, onde: 1 significa toxicidade ausente, 2 toxicidade moderada e 3 toxicidade severa.

4.12 Avaliação citotóxica do isoeugenol em eritrócitos humanos

Para avaliação citotóxica do fitoconstituente sobre eritrócitos humanos, foi utilizado o teste de hemólise. Para isto, uma amostra de sangue (2 mL) tipo A e B foram misturados com NaCl 0,96 %, na proporção de 1:30, e centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação ressuspensão em uma concentração final de 0,5 % de eritrócitos. O fitoconstituente foi adicionado nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg/mL em tubos contendo 2 mL da suspensão de eritrócitos. Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos com NaCl 0,96 % (0 % de hemólise) e o controle positivo, com uma suspensão de eritrócitos acrescida de 100 µL de Triton X-100 1% (100 % de hemólise). Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

4.13 Análise Estatística

Os experimentos para avaliar a citotoxicidade do isoeugenol foram realizados em triplicata e expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem Antifúngica e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A triagem antifúngica dos compostos foi realizada utilizando uma concentração padrão de 1.024 µg/mL de cada fitoconstituente sobre as cepas de *P. citrinum*, por meio da técnica de microdiluição. Após o tempo de incubação, foi possível verificar a eficácia ou não dos compostos, como pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Triagem da atividade antifúngica dos fitoconstituintes na concentração de 1024 µg/mL frente a cepas de *Penicillium citrinum*.

Cepas	Fitoconstituintes (1.024 µg/mL)					
	Carvacrol	R-citronelal	S-citronelal	7-hidróxi-citronelal	(+)-α-pineno	Isoeugenol
INCQS 40011	-	+	+	-	-	-
LM-02	-	+	+	+	-	-
LM-03	-	+	+	+	-	-
LM-04	-	+	+	+	-	-
LM-08	-	+	+	+	-	-
LM-30	-	+	+	+	+	-
LM-145	-	+	+	+	+	-
LM-171	+	+	+	+	-	-

(-): inibição de crescimento fúngico. (+): presença de crescimento fúngico.

Pode-se observar que os enantiômeros R e S-citronelal não foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos testados na concentração utilizada (1.024

µg/mL), e o 7-hidróxi-citronelal teve ação apenas na cepa padrão INCQS 40011. Entretanto, o (+)- α -pineno, carvacrol e o isoeugenol foram os fitoconstituintes com melhor espectro de ação dentre os compostos testados, sendo capaz de inibir o crescimento de 6, 7 e 8 cepas, respectivamente.

Após a incubação, os controles do meio de cultura permaneceu estéril durante o tempo em que ficou incubado e em todos os poços contendo o caldo RPMI e os inóculos fúngicos foi possível visualizar crescimento microbiano, o que comprova que as cepas utilizadas estavam viáveis para o experimento e que os solventes, DMSO e Tween 80, empregados para solubilizar os fitoconstituintes não interferiram no crescimento das cepas nas concentrações utilizadas no teste.

No resultado obtido após a realização da triagem antifúngica dos fitoconstituinte, pode-se verificar que o isoeugenol foi o único fitoconstituinte que apresentou efeito inibitório em todas as cepas fúngicas na concentração padrão, sendo, desta forma, a substância escolhida para a realização dos testes de avaliação da atividade antifúngica, investigação do mecanismo de ação e demais atividades biológicas, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento de 100% das amostras de *P. citrinum*.

O método aceito como referência para avaliação in vitro de compostos com potencial antifúngico é a diluição em caldo, preconizado pelo CLSI nos documentos M27-A2, M27-A3 e M27-S4 para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e o documento M38-A2, para fungos filamentosos, como o caso do *P. citrinum*. Os relatórios de testes de susceptibilidade in vitro geralmente incluem tanto a Concentração Inibitória Mínima como a Concentração Fungicida Mínima (letal) (CFM). Desta forma, foram determinadas a CIM e CFM do isoeugenol individualmente para as cepas de *P. citrinum*, padrão e clínicas, e os resultados foram agrupados na Tabela 2.

A CIM do isoeugenol variou entre 256 e 32 µg/mL, sendo o maior valor da CIM para a cepa LM-21 e o menor valor para as cepas LM-02, LM-03, LM-08, LM-155, LM-157 e LM-161.

Existem vários métodos para verificar a atividade antimicrobiana de compostos. O método da microdiluição desenvolvido por Eloff (1998) foi escolhido nesta pesquisa por necessitar de uma pequena quantidade da substância teste, por deixar um registro permanente, por ser barato, por apresentar uma sensibilidade trinta vezes maior que

outros métodos na literatura, por ter a possibilidade de uso em um grande número de amostras e por ser reprodutível (OSTROSKY et al., 2008).

Tabela 2 - Valores da CIM e CFM para o isoeugenol e voriconazol frente as cepas de *P. citrinum*.

Cepas	Isoeugenol		Voriconazol		*C1	**C2
	(µg/mL)		(µg/mL)			
	CIM	CFM	CIM	CFM		
INCQS 40011	64	64	256	+	+	-
LM-02	32	64	64	128	+	-
LM-03	32	64	0,5	2	+	-
LM-04	256	512	+	+	+	-
LM-08	32	64	0,5	+	+	-
LM-30	128	256	8	16	+	-
LM-145	64	128	32	32	+	-
LM-155	32	64	64	64	+	-
LM-157	32	64	1	4	+	-
LM-161	32	64	2	8	+	-
LM-171	64	64	2	8	+	-
LM-278	64	128	256	+	+	-

*C1 – Controle de crescimento microbiano: poços contendo caldo RPMI-1640, DMSO (5%), Tween 80 (2%) e o inóculo de cada cepa, na ausência do fitoconstituente ou antifúngicos. **C2 – Controle de esterilidade do meio de cultura: poços contendo caldo RPMI-1640, DMSO (5%), Tween 80 (2%), na ausência do fitoconstituente ou antifúngicos. (-): inibição de crescimento fúngico. (+): presença de crescimento fúngico. CIM: Concentração Inibitória Mínima. CFM: Concentração Fungicida Mínima

A triagem para avaliação da atividade antifúngica dos fitoconstituintes frente a cepas padrão e clínicas de *Penicillium citrinum* foi realizada com o objetivo de verificar quais substâncias apresentavam eficácia contra a cepa fúngica. As substâncias (+)- α -pineno, carvacrol, R-citronelal, S-citronelal, 7-hidróxi-citronelal e isoeugenol foram escolhidas devido a relatos na literatura indicarem que esses compostos possuem ação antimicrobiana contra outros micro-organismos (NOSTRO; PAPALIA, et al., 2012; SILVA et al., 2012; MEDEIROS, 2016; NIELSEN et al., 2017). Após a triagem microbiológica, o fitoconstituente, que apresentasse melhor eficácia contra as cepas fúngicas testadas, seria escolhido para dar continuidade a investigação de suas atividades biológicas.

Pizzolitto et al. (2015) também realizaram uma triagem antifúngica dos fitoconstituintes timol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, creosol, m-Creosol, p-Creosol, o-Cresol e fenol, frente a cepas de *Aspergillus parasiticus*. Neste estudo, constataram que o isoeugenol apresentou uma CIM no valor de 206 $\mu\text{g/mL}$, valor este sendo menor que os encontrados nos demais compostos testados, mostrando sua potência frente ao micro-organismo, incluindo o carvacrol. Este resultado corrobora com os valores da CIM obtidos neste estudo, uma vez que o maior valor da CIM para *Penicillium citrinum* foi de 256 $\mu\text{g/mL}$.

Em uma pesquisa desenvolvida por Peixoto et al. (2017), foi investigada a ação do óleo essencial de *Laurus nobilis* Linnaeus, conhecido popularmente como louro, contra espécies de *Candida*. Em seus resultados, encontraram o valor de CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$, para os micro-organismo testados. Uma vez que o referido óleo essencial possui como composto majoritário o isoeugenol, correspondendo a 53,5% de sua composição, pode-se considerar, levando em conta a devida proporção, que o valor expresso tem semelhança com o valor da CIM do isoeugenol encontrado neste estudo.

Zabka e Pavela (2013) avaliaram a eficácia de fenóis individuais, 13 compostos, e seus ácidos, 8 substâncias, totalizando 21 fitoconstituintes contra um grupo de seis importantes fungos toxinogênicos e patogênicos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre as substâncias testadas inclui o isoeugenol. Este composto apresentou uma CIM variando entre 236 – 301 $\mu\text{g/mL}$ para o gênero *Aspergillus*, 351 – 609 $\mu\text{g/mL}$ para o gênero *Fusarium* e 482 – 489 $\mu\text{g/mL}$ para as espécies do gênero

Penicillium. Este último valor difere do encontrado neste estudo, uma vez que as espécies testadas foram diferentes, possuindo, conseqüentemente, um perfil de sensibilidade distinto. Apesar disso, o isoeugenol mostra-se versátil, pois apresenta ação inibitória contra fungos de diferentes gêneros.

Em um outro estudo realizado por Vázquez e colaboradores (2001), foi avaliado o efeito inibitório do eugenol e timol em cepas de *P. citrinum* NRRL 2274 e 2269. Placas contendo ágar extrato de levedura em diferentes concentrações dos fitoconstituintes foram inoculadas com *P. citrinum* e, após o tempo de incubação, foram medidos os diâmetros das UFC's formadas. Verificaram que o eugenol na concentração de 200 µg/mL foi capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo, enquanto o timol, na mesma concentração, não apresentou o mesmo resultado. Apesar dos autores terem utilizado uma metodologia diferente e o eugenol, isômero do isoeugenol, o resultado obtido foi semelhante ao encontrado nesta pesquisa, uma vez que a CIM foi de 256 µg/mL.

O valor da CIM encontrada para o isoeugenol frente as cepas de *P. citrinum*, neste estudo, foi de 256 µg/mL. Segundo Sartoratto et al. (2004), diante deste resultado, a substância pode ser classificada como um forte inibidor antimicrobiano.

Para complementar a determinação da CIM, foram obtidos também os valores da CIM₅₀ e a CIM₉₀ para o isoeugenol, como pode ser observado na Tabela 3. Essas concentrações são definidas como as concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das cepas fúngicas testadas, respectivamente.

Tabela 3 – Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ do isoeugenol e voriconazol para as cepas clínicas e padrão de *P. citrinum*.

Cepas	Isoeugenol (µg/mL)		Voriconazol (µg/mL)	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>Penicillium citrinum</i>	64	128	4	>1024

CIM₅₀: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras fúngicas testadas. CIM₉₀: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras fúngicas testadas.

Nesta trabalho, o valor para o isoeugenol da CIM₅₀ foi de 64 µg/mL e da CIM₉₀ foi de 128 µg/mL, ou seja, valores muito próximos. Outro estudo também calculou a CIM₅₀ do isoeugenol, mas para diferentes espécies do gênero *Penicillium*. Segundo os dados obtidos por Zabka e Pavela (2013), a CIM₅₀ para as espécies de *P. brevicompactum* e *P. expansum* foram 86 e 71 µg/mL, respectivamente.

Xie et al. (2017) avaliaram a relação estrutura-atividade de derivados do eugenol, incluindo o isoeugenol, e do cinamaldeído contra cepas dos fungos patogênicos na agricultura: *Rhizoctonia solani* (ACCC 36124) e *Fusarium oxysporum* (ACCC 37438). Eles observaram que o isoeugenol teve uma CIM₅₀ para o *R. solani* de 33,1 µg/mL e de 97.2 µg/mL para *F. oxysporum*. Os autores chegaram a conclusão que a lipofilicidade parece desempenhar um papel importante na determinação da toxicidade de fenilpropanóides e que a presença da dupla ligação do grupo propenil nos compostos desempenhou um papel fundamental na toxicidade frente aos micro-organismo testados.

Na pesquisa realizada com diversos compostos fenólicos naturais contra *Aspergillus parasiticus*, foi observado que o isoeugenol apresentou CIM₅₀ e CIM₉₀ nos valores de 83,74 µg/mL e 182,26 µg/mL respectivamente. A CIM₅₀ do isoeugenol foi a menor que a maioria dos fitoconstituintes, ficando acima apenas do timol e carvacrol que obtiveram respectivamente 58,6 e 60,09 µg/mL. Já a CIM₉₀ do isoeugenol foi a menor que todos os outros 10 compostos fenólicos testados. Diante dos resultados encontrados, pode-se notar que, apesar dos estudos utilizarem diferentes espécies e gêneros, os valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ encontrados são semelhantes ao determinado nesta pesquisa. Tal fato demonstra uma certa homogeneidade no comportamento antifúngico do isoeugenol frente aos fungos patogênicos relatados na literatura.

Com o cálculo da CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ foi possível classificar o perfil de resistência das cepas de *P. citrinum* frente ao fitoconstituente. De acordo com a classificação proposta por Nascente et al. (2003), as substâncias podem ser consideradas como sensíveis (S), quando CIM da amostra \leq CIM₅₀, sensibilidade intermediária (I), quando CIM₅₀ < CIM da amostra \leq CIM₉₀, e resistente (R), quando CIM da amostra for > CIM₉₀. Utilizando estas condições, foi observado, nesta pesquisa, que 11 cepas (91,67%) foram sensíveis e 1 (8,33%), a cepa LM21, foi resistente ao isoeugenol.

Após ser encontrada a CIM do isoeugenol para as cepas de *P. citrinum*, foi determinada a Concentração Fungicida Mínima (CFM), como também a CFM₅₀ e a CFM₉₀. A CFM₅₀, CFM₉₀ e CFM foi considerada como a menor concentração capaz de causar a redução em 50%, 90% e 99,9% das unidades formadoras de colônias após o tempo de incubação no inóculo inicial. De acordo com a Tabela 2 e a Tabela 4, pode-se observar que o isoeugenol desempenhou uma ação fungicida para 8 cepas (66,67%) na concentração de 64 µg/mL, 10 cepas (83,33%) na concentração de 128 µg/mL, para 11 cepas (91,67%) na concentração de 256 µg/mL e para as 12 cepas (100%) na concentração de 518 µg/mL. Desta forma, a CFM₅₀, CFM₉₀ e CFM do isoeugenol para as linhagens de *P. citrinum* testadas foram, respectivamente, 64, 256 e 518 µg/mL.

Tabela 4 – Valores de CFM₅₀ e CFM₉₀ do isoeugenol e voriconazol para as cepas clínicas e padrão de *P. citrinum*.

Cepa	Isoeugenol (µg/mL)		Voriconazol (µg/mL)	
	CFM ₅₀	CFM ₉₀	CFM ₅₀	CFM ₉₀
<i>Penicillium citrinum</i>	64	256	8	256

Há uma escassez de dados na literatura que mostrem a determinação da CFM do isoeugenol, o que evidencia a contribuição que este trabalho trará com valiosas informações sobre este fitoconstituente e também revela a necessidade de mais pesquisas sobre o composto e suas bioatividades. Apesar disso, Peixoto et al. (2017) testaram o óleo essencial de *Laurus nobilis* (louro), que possui como composto majoritário o isoeugenol (53,5%), em amostras de *Candida* spp. e encontraram uma CFM variando de 250 – 500 µg/mL. Os resultados obtidos neste estudo, apesar de serem realizados com diferentes espécies e substâncias, são similares aos obtidos pelos pesquisadores citados.

Quanto a CFM, pode-se observar que os resultados mostraram que entre as cepas ensaiadas 16,67% apresentaram CFM equivalente a CIM do isoeugenol e 83,37% apresentaram CFM equivalente a CIMx2 do fitoconstituente. Após a obtenção

desses dados, foi possível classificar a natureza do efeito antifúngico do isoeugenol e voriconazol para *P. citrinum*. De acordo com Siddiqui et al. (2013), o efeito de um composto é considerado fungistático se a relação CFM/CIM ≥ 4 e fungicida se a CFM/CIM < 4 . Aplicando essa condição, pode-se considerar que o isoeugenol possuem efeito bactericida frente as cepas de *P. citrinum*, uma vez que todas as relações CFM/CIM, para todas as 12 cepas testadas, foram menores que 4 (Tabela 5).

Tabela 5 – Relação CFM/CIM do isoeugenol e voriconazol frente as cepas de *P. citrinum*.

Cepas de <i>P. citrinum</i>	Isoeugenol ($\mu\text{g/mL}$)		Voriconazol ($\mu\text{g/mL}$)	
	CFM/CIM	Efeito	CFM/CIM	Efeito
INCQS 40011	64/64 = 1	Fungicida	>4	Fungistático
LM-02	64/32 = 2	Fungicida	128/64 = 2	Fungicida
LM-03	64/32 = 2	Fungicida	2/0,5 = 4	Fungistático
LM-4	512/128 = 2	Fungicida	+	ND*
LM-08	64/32 = 2	Fungicida	>4	ND*
LM-30	256/128 = 2	Fungicida	16/8 = 2	Fungicida
LM-145	128/64 = 2	Fungicida	32/32 = 1	Fungicida
LM-155	64/32 = 2	Fungicida	64/64 = 1	Fungicida
LM-157	64/32 = 2	Fungicida	4/1 = 4	Fungistático
LM-161	64/32 = 2	Fungicida	4/1 = 2	Fungicida
LM-171	64/64 = 1	Fungicida	8/2 = 4	Fungicida
LM-278	128/64 = 1	Fungicida	>4	Fungistática

+: Houve crescimento nos poços acima de 4xCIM. ND: Não foi possível definir.

Essa natureza da ação antifúngica demonstrada pelo isoeugenol é vantajosa, do ponto de vista terapêutico. A ação fungicida é mais importante na clínica do que a atividade fungistática, uma vez que o uso profilático de drogas fungistáticas tem sido associado a um aumento da frequência de resistência inata ou adquirida em isolados clínicos em pacientes com sistema imunológico debilitado (MONK; GOFFEAU, 2008). Além disso, a diretriz de 2009 da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas para o tratamento da candidemia sugere que os agentes fungicidas podem ser mais benéficos para o tratamento da candidemia em comparação com os agentes fungistáticos (PAPPAS et al., 2009). Dados recentes de adultos sustentam que o tratamento com agentes fungicidas (anfotericina B e equinocandinas) resultou em menor mortalidade em comparação com agentes fungistáticos (triazoles), com uma mortalidade de 30% para o tratamento com agentes fungicidas e 36% para o tratamento com agentes fungistáticos (ANDES, 2013).

Para o controle dos experimentos, foi utilizado o voriconazol como antifúngico padrão. Embora existam relatos na literatura utilizando o voriconazol em diversas espécies de fungos, este estudo realizou, de forma inédita, a determinação e caracterização da atividade antifúngica da substância frente a cepas padrão e clínicas de *Penicillium citrinum*. Como ocorreu com o isoeugenol, foram determinadas a CIM, CIM₅₀, CIM₉₀, CFM, CFM₅₀ e CFM₉₀ do voriconazol e posteriormente a caracterização do seu efeito antifúngico. Esta determinação é importante, uma vez que não há nos órgãos oficiais que padronizam os testes de sensibilidade a antimicrobianos (CLSI, EUCAST e BRCAS) um intervalo definido da CIM para classificação de sensibilidade de cepas de *P. citrinum* ao voriconazol.

O voriconazol foi introduzido no uso clínico em 1995, e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos em maio de 2002 e no Brasil em julho de 2012 (ANVISA, 2002; KONTOYIANNIS et al., 2003; NAITHANI; KUMAR, 2005). É um novo agente antifúngico da classe dos triazóis que mostra ser uma promessa para o tratamento de um amplo espectro de patógenos fúngicos, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *Scedosporium apiospermum* entre outros (RADFORD et al., 1997; CLANCY; NGUYEN, 1998; CUENCA-ESTRELLA et al., 1999; ESPINEL-INGROFF, 1998; JOHNSON et al., 1998; KAUFFMAN; ZARINS, 1998; NGUYEN; YU, 1998; OAKLEY et al., 1998; PFALLER et al., 1998; VERWEIJ et al., 1998)

Este antifúngico apresenta ação in vitro sobre espécies de *Aspergillus* mais intensa do que o itraconazol, inclusive sobre o *A. terreus*, que é comumente resistente à anfotericina B. Tem atividade sobre muitas espécies de *Fusarium* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium* spp, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Bipolaris* e sobre *Scedosporium apiospermum* e *Pseudallescheria boydii*. É fungistático para espécies de *Candida*, inclusive aquelas resistentes ao fluconazol, *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp., agindo também sobre fungos de micoses endêmicas. O voriconazol não apresenta atividade in vitro frente às espécies de zigomicetos (EGGIMANN et al., 2003; KONTOYIANNIS et al., 2003; MARTINEZ, 2006).

Nos experimentos realizados neste trabalho, a CIM do voriconazol teve uma considerável variação, mostrando uma grande diferença de sensibilidade entre as cepas utilizadas. A faixa da CIM do antifúngico foi de 0,5 a 256 µg/mL, sendo que para cepa LM-21 não foi possível definir a concentração inibitória mínima pois ela foi superior a 1.024 µg/mL e o menor valor da CIM foi para a cepa LM-03 (Tabela 2). Foi observado que as cepas de *P. citrinum* apresentaram um forte perfil de resistência também com o voriconazol. Essa constatação é baseada nos dados obtidos em estudos publicados na literatura em que determinaram a CIM do voriconazol para diversas espécies de fungos.

Liu, Liang e Chen (2013) definiram a CIM do antifúngico para 39 amostras de *Penicillium marneffe* e observaram uma variação entre 4 e 250 µg/mL, sensibilidade esta, menor que a apresentada pelas cepas de *P. citrinum*. Já os valores definidos por Pfaller et al. (2011) e Li et al. (2000) também corroboram com esta constatação. O estudo realizado pelos autores determinaram a CIM do voriconazol em 16.484 isolados de *Candida* sp., obtendo uma faixa de sensibilidade entre 0,007 e 8 µg/mL. Já Li e demais pesquisadores determinaram a CIM do antifúngico em 304 amostras das espécies *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*, encontrando uma CIM variando entre 0,03 e 16 µg/mL. Ambos valores menores que os encontrado para *P. citrinum*.

Como anteriormente observado na Tabela 3, os valores da CIM₅₀ e a CIM₉₀ para o voriconazol também foram calculados. Nota-se que ocorreu uma variação de mais de 256 vezes entre o determinado nas CIM₅₀ e CIM₉₀, uma vez que a CIM₅₀ foi de 4 µg/mL e a CIM₉₀ >1.024 µg/mL.

É possível encontrar estudos que determinaram a CIM₅₀ e CIM₉₀ do voriconazol para diversos fungos. Sabatelli et al. (2006) testaram quase 19.000 amostras de diferentes espécies fúngicas, entre elas *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Candida* spp. Em seus resultados, a CIM₅₀ variou entre 0,008 e 128 µg/mL e a CIM₉₀ ficou na faixa de 0,063 e 128 µg/mL. Em uma outra pesquisa realizada com isolados de várias espécies do gênero *Candida*, Pfaller et al. (2011) verificaram que a CIM₅₀ e a CIM₉₀ do voriconazol variou em uma faixa de 0,007 e 1 µg/mL e 0,007 e 2 µg/mL, respectivamente. Comportamento semelhante foi encontrado também por Pfaler et al. (2013), onde utilizarem 1.573 amostras de *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., *Sarocladium* spp., *Paecilomyces* spp. e das espécies *Scedosporium apiospermum*, *Gibberella fujikuroi* SC e *Cryptococcus neoformans*, a CIM₉₀ definida para o antifúngico variou entre ≤0,008 e 16 µg/mL.

Apesar da literatura revelar uma faixa de sensibilidade ao voriconazol ampla e variada, nenhum dos experimentos obtiveram uma CIM₉₀ tão elevada quanto a apresentada pelos isolados de *P. citrinum* empregados nesta pesquisa. Desta forma, é possível verificar que a sensibilidade ao voriconazol possui ampla variação, de acordo com a espécie testada, conforme constatado pelos trabalhos expostos. Entretanto, em nenhum dos estudos disponíveis nos bancos de dados consultados, um micro-organismo apresentou-se tão resistente ao antifúngico e nem apresentou uma CIM₉₀ tão elevada como a apresentada pelas cepas de *P. citrinum* utilizadas nesta pesquisa.

Com relação a CFM, pode-se observar que o voriconazol apresentou uma variação de 2 µg/mL a valores maiores que 1.024 µg/mL entre as cepas utilizadas, estabelecendo uma CFM na concentração de 2 µg/mL para 8,33% das cepas, de 4 µg/mL para 16,67% das cepas, de 8 µg/mL para 33,33% das cepas, de 16 µg/mL para 41,67% das cepas, de 32 µg/mL para 50% das cepas, de 64 µg/mL para 58,33% das cepas e de 128 µg/mL para 66,67% das cepas. Importante ressaltar que para 33,33% das amostras não foi possível detectar a CFM pois houve crescimento acima de 1.024 µg/mL (Tabela 2 e Tabela 4). Sendo assim, a CFM₅₀, CFM₉₀ e CFM do voriconazol para as linhagens de *P. citrinum* testadas foram, respectivamente, 8, >1.024 e >1.024 µg/mL.

Esses valores de CFM encontrados neste experimento são elevados, quando são comparados com outras espécies fúngicas que foram submetidas ao voriconazol. Por exemplo, Lemos (2008) avaliou a ação antifúngica do voriconazol frente a cepas de *Candida* spp. e verificou que a CFM não ultrapassou 8 µg/mL. Li et al. (2000) também determinaram a CFM₅₀ e CFM₉₀ do voriconazol mas para as espécies de *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. Os autores observaram uma CIM₅₀ e CIM₉₀ para *B. dermatitidis* no valor de 0,125 µg/mL e 4 µg/mL, para *C. immitis* de >32 µg/mL e >32 µg/mL, para *H. capsulatum* de 8 µg/mL e >32 µg/mL, respectivamente. Isso demonstra, mais uma vez, uma maior resistência das cepas de *P. citrinum* as drogas antifúngicas testadas, o que pode dificultar o tratamento de uma infecção por esse patógeno.

Os resultados mostraram também que a CFM variou de 2 µg/mL a valores maiores que 1.024 µg/mL entre as cepas utilizadas, 16,67% apresentaram CFM equivalente a CIM, 16,67% apresentaram CFM equivalente a CIMx2, 58,33 % apresentaram CFM igual ou maior que a CIMx4 e para 16,67% não foi possível estabelecer a proporção CIM/CFM. Assim, aplicando a classificação proposta por Siddiqui et al. (2013) para classificação da natureza do efeito antifúngico dos compostos, pode-se considerar que o voriconazol foi fungicida para 50% das cepas, fungistático para 41,83% dos isolados de *P. citrinum* usados e não foi classificada para a cepa LM-04, por crescer acima de 1.024 µg/mL.

Esse perfil ambíguo fungicida/fungistático do voriconazol já era esperado, uma vez que estudos descrevem diferentes comportamentos do composto. Apesar de Tavares (2001) afirmar que os quimioterápicos antifúngicos do grupo dos azólicos exercem ação apenas fungistática, Diakema et al. (2003) e Johnson e Kauffman (2003) relatam que esta substância possui realmente ação fungistática para *Candida*, incluindo aquelas resistentes ao fluconazol, *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp, mas que, por bloquear mais intensamente a síntese de ergosterol dos fungos filamentosos, pode chegar a ser fungicida. Sendo assim, dependendo do perfil de resistência intrínseco de determinada cepa fúngica, o voriconazol produzirá seu efeito bactericida e/ou bacteriostático.

Com relação ao perfil de sensibilidade das cepas utilizadas, foi possível verificar que LM-04, de origem ambiental, foi a que se apresentou mais resistente, tanto ao isoeugenol como ao voriconazol. Esse comportamento frente as substâncias

antifúngicas pode ser devido ao uso de compostos antimicrobianos pela medicina humana e veterinária, já que em alguns ambientes, como efluentes de hospitais e fazendas, acontece a liberação constante de antimicrobianos, o que pode modificar a atividade metabólica dos micro-organismo presentes entorno da região. Uma vez que algumas dessas drogas não são biodegradáveis, permanecem por um longo período no ambiente. Desta forma, o uso de drogas com ação antifúngicas, por exemplo, em hospitais, na agricultura e pecuária, pode levar a produção de grandes quantidade de resíduos desses compostos, induzindo e/ou facilitando a resistência cruzada desses compostos alterando seu perfil de resistência, como observado neste experimento (KÜMMERER, 2004; MARTINEZ, 2009).

A fim de comprovar que os resultados obtidos nos experimentos são referentes apenas as substâncias empregadas não havendo interferência, foram realizados os controles de viabilidade dos isolados fúngicos, esterilidade do meio e interferência dos solventes.

Pode ser observado na Tabela 2 o controle de viabilidade das cepas, onde todas as amostras foram capazes de crescer no meio RPMI-1640 sem adição de substâncias (fitoconstituente/antifúngico), demonstrando que os micro-organismos estavam viáveis para serem utilizados nos ensaios. Concomitantemente, foi realizado o teste de esterilidade do meio de cultura e confirmado que o RPMI-1640 utilizado no teste não estava contaminado, o que confirma que a ação mostrada pelas substâncias evidenciaram seu potencial máximo de efeito diante das condições em que foram submetidas e das cepas empregadas, não havendo interferência de outros micro-organismo. Além disso, poços contendo meio de cultura ausente de isoeugenol e/ou voriconazol e acrescido dos solventes DMSO (5%) e Tween 80 (2%) foram inoculados com as cepas de *P. citrinum*, sendo observado o crescimento de todas as amostras (Tabela 2), o que demonstra que os solventes utilizados para solubilizar o fitoconstituente não interferiram no seu efeito antifúngico.

Após a determinação e caracterização da ação antifúngica do isoeugenol, foram selecionadas 3 cepas clínicas e uma padrão com o objetivo de investigar o mecanismo de ação do fitoconstituente, bem como realizar o ensaio de associação do isoeugenol com o antifúngico padrão.

A cepa *P. citrinum* INCQS 40011 foi escolhida por ser um padrão de referência para comparação com futuros testes de bioatividades. Uma cepa ambiental e outra

clínica foram propostas para verificar se o comportamento frente ao isoeugenol, nos ensaios seguintes, era o mesmo. Entre as cepas ambientais de *P. citrinum*, a LM-04 foi excluída por não ter sido possível determinar a CIM e CFM para o voriconazol. Enquanto as cepas LM-03 e LM-157 apresentaram comportamento semelhante frente aos compostos antifúngicos, sendo então selecionada a LM-03. A cepa clínica de *P. citrinum* escolhida foi a LM-161, por apresentar menor CIM e CFM para o isoeugenol. A cepa LM-171 foi acrescentada nos ensaios para efeito de comparação com a LM-161, que mesmo sendo obtidas da pele, tiveram sensibilidade diferentes ao fitoconstituente, com CIM de 64 e 32 µg/mL, respectivamente.

5.2 Ensaio com sorbitol

Como demonstrado na Tabela 6, a CIM do isoeugenol não foi alterada quando mensurada na presença de sorbitol 0,8 M, sugerindo que o fitoconstituente não age modificando a parede celular fúngica.

Tabela 6 – Efeito do isoeugenol frente a cepas de *P. citrinum* na ausência e presença de sorbitol 0,8 M.

Cepas de <i>P. citrinum</i>	CIM (µg/mL)	
	Isoeugenol	
	Sem Sorbitol	Com Sorbitol
INCQS	64	64
LM-03	32	32
LM-161	32	32
LM-171	64	64

A parede celular é uma estrutura dinâmica que protege os protoplastos fúngicos de choques osmóticos externos e define sua morfogênese. Desta forma, mudanças organizacional ou ruptura funcional da parede celular induzida por compostos

antifúngicos são mecanismos de ação envolvidos na morte destes micro-organismos (SARTORATO et al., 2004; BOWMAN; FREE, 2006).

De acordo com Lis-Balchin e Deans (1997), a atividade antifúngica de compostos fenólicos pode ser devido a um dano grave à membrana fúngica e às paredes celulares, levando a deformações morfológicas, colapso e deterioração de conídios e/ou hifas.

Para investigar a interferência do isoeugenol na formação e manutenção da integridade da parede celular fúngica foi verificada a influência do sorbitol, que é um protetor osmótico, no crescimento das cepas de *P. citrinum* selecionadas para o ensaio. Segundo Frost et al. (1995), este ensaio é de natureza genérica e é útil na busca de compostos que inibam diretamente a síntese de constituintes da parede celular, como glicanos, mananos, quitina ou os mecanismos reguladores, conforme encontrado nos estudos sobre os efeitos do eugenol na célula paredes. Ele baseia-se no princípio de que compostos que agem como inibidores da parede celular fúngica podem ser identificados experimentalmente quando seus valores da CIM obtidos na presença do sorbitol (com sobitol) apresentam-se maiores do que os determinados sua ausência (sem sobitol) após o período de incubação. Desta forma, os fungos que apresentarem paredes celulares danificadas não conseguem crescer na ausência de sorbitol. Entretanto, seu crescimento poderá ser restabelecido caso o sorbitol seja fornecido ao meio. Sendo assim, valores da CIM foram determinados para as cepas de *P. citrinum* LM-03, LM-161, LM-171 e INCQS 40.011 pela técnica de microdiluição.

Não há relatos na literatura de pesquisas que investigaram a ação do isoeugenol na parede celular de *P. citrinum* ou de outras espécies de fungos, dificultando uma discussão de forma objetiva desse dado. Entretanto, uma vez que o isoeugenol é isômero de posição do eugenol, diferindo na posição da instauração, é possível que apresentem um efeito antifúngico semelhantes entre si, possibilitando uma correlação entre os compostos.

Levando em conta essa relação estrutural, o estudo de Carrasco et al. (2012) corrobora com o este resultado, pois os autores observaram que a atividade antifúngica do derivado de eugenol 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol contra *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans* não foi revertida na presença de um suporte osmótico. Em contraste com esta correlação, Pereira et al. (2013) observaram que, após exposição de cepas de *Trichophyton rubrum* ao eugenol em meio de cultura suplementado com

sorbitol, o micro-organismo apresentou-se mais resistente ao eugenol, onde sua CIM aumentou 4 vezes em comparação com o ensaio realizado em sua ausência.

Diante de negativa da hipótese do efeito antifúngico do isoeugenol ser devido a uma alteração da parede celular em *Penicillium citrinum*, foi averiguado se a ação contra os micro-organismo testados foi devido a danos na membrana plasmática via interação com o ergosterol da membrana plasmática.

5.3 Ensaio com ergosterol

Diante dos resultado mostrados na Tabela 7, pode-se notar que a CIM do isoeugenol aumentou quando as amostras de *P. citrinum* foram inoculados em meio RPMI-1640 suplementado com ergosterol 400 µg/mL, quando comparado com ensaio realizado na ausência do ergosterol. O composto aumentou a CIM das cepas de *P. citrinum* INCQS 40011, LM-171, LM-03 e LM-161 em 8, 64, 128 e 128 vezes, respectivamente.

Tabela 7 – Efeito do isoeugenol e anfotericina B frente a cepas de *P. citrinum* na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL.

Cepas	CIM (µg/mL)			
	Isoeugenol		Anfotericina	
	Sem Ergosterol	Com Ergosterol	Sem Ergosterol	Com Ergosterol
INCQS	64	64	16	>128
LM-03	32	32	2	>256
LM-161	32	32	2	>256
LM-171	64	64	4	>256

Dessa forma, implica dizer que o fitoconstituente causa perturbação na membrana plasmática por interferir na disponibilidade do ergosterol para que o mesmo

possa ser utilizado manutenção da integridade da célula fúngica, o que leva a morte celular.

Os valores da CIM do isoeugenol, frente as cepas de *P. citrinum* selecionadas, foram definidas em meio de cultura suplementado de ergosterol. Desta forma, se o composto alterar a disponibilidade do ergosterol, sua CIM será maior na presença de ergosterol em comparação da CIM determinada na sua ausência (LEE et al., 1999). Isso ocorre pois o fitoconstituente, que modifica a quantidade de ergosterol necessário para a célula fúngica manter a integridade da membrana celular, necessitará de uma maior quantidade do composto para que consiga reduzir ainda mais a disponibilidade do ergosterol a um nível suficiente que provoque a morte das cepas presentes no meio.

Todos os fungos e outros micro-organismos, como algas e alguns protozoários, possuem em sua membrana celular o ergosterol, um análogo ao colesterol das células mamíferas (GHANNOUM; RICE, 1999). O ergosterol está envolvido na formação de jangadas lipídicas em leveduras, sendo estas cruciais para a presença de determinadas proteínas na membrana plasmática (BAGNAT et al., 2000). Além disso, participa da regulação da rigidez/fluidez da membrana plasmática alterando o movimento e atividade de proteínas de membrana e evita mudanças drásticas de fluidez membranar em condições ambientais flutuantes (RODRIGUEZ et al., 1985; VAN DER REST et al., 1995).

Peixoto et al. (2017) investigaram o mecanismo de ação do óleo essencial de *Laurus nobilis*, que possui como composto majoritário o isoeugenol, em cepas de *Candida albicans*. Este estudo mostrou um aumento dos valores da CIM do óleo essencial na presença do ergosterol exógeno, evidenciando uma afinidade do composto pelo ergosterol, o que poderia desequilibrar a permeabilidade iônica da membrana celular, levando a morte dos micro-organismos.

Esse comportamento frente ao ergosterol era esperado. Estudos realizados por Sikemma et al. (1995) e Gill et al. (2006) revelaram que o eugenol, isômero do isoeugenol aqui testado, possui ação antimicrobiana devido sua capacidade de causar ruptura da membrana citoplasmática. Tal efeito possivelmente ocorre devido ao fato de que o grupo hidroxilo fenólico pode contribuir para o aumentar a solubilidade desta substância em suspensões aquosas, o que facilita seu transporte através do envelope celular do micro-organismo.

Outros autores também relataram mecanismo semelhante do eugenol. Chami et al. (2005) sugerem que a ação contra *Candida* inerente ao eugenol poderia ser atribuída ao dano do envelope de células fúngicas. Já Pinto et al. (2009) demonstraram que o eugenol também inibe a biossíntese de esteróis.

Diante da semelhança estrutural do eugenol e isoeugenol, cogita-se que essas mesmas constatações acerca do mecanismo de ação do eugenol sejam estendidas ao seu isômero, o isoeugenol. Apesar disso, não se descarta que outros mecanismos possam ser empregados pelo isoeugenol para produzir seu efeito antifúngico em *Penicillium citrinum*, como inibição enzimática. De acordo com Farag et al. (1989), essa hipótese pode ser atribuída ao isoeugenol devido à presença do núcleo aromático e o grupo –OH fenólico que é conhecido por ser reativo e formar ligações de hidrogênio com locais ativos de enzimas alvo.

Além disso, estudos na literatura auxiliam na compreensão do mecanismo de ação do isoeugenol, acrescentando que o efeito antifúngico da substância é potencializado devido sua ação na membrana plasmática do micro-organismo. Uma explicação a essa afinidade do isoeugenol pela membrana lipídica é explicada por Ultee et al. (2002.), que justificam a preferência da membrana plasmática como alvo de seu efeito devido à natureza hidrofóbica da substância. Pina-Vaz et al. (2004) e Braga et al. (2007) esclarecem esse afinidade do fitoconstituente, justificando que, devido sua característica lipofílica, o composto apresenta a capacidade de penetrar nas cadeias que compõem as bicamadas lipídicas da membrana, modificando sua fluidez e a permeabilidade das membranas celulares, comprometendo assim, a atividade e a regulação de importantes enzimas da membrana que catalisam a síntese de uma série de componentes principais de polissacarídeos da parede celular, interferindo no crescimento celular e na morfogênese.

Como controle do método foi utilizado a anfotericina B. Esse agente antifúngico, que possui uma estrutura do tipo macrolídea, é caracterizado por possuir em sua estrutura química átomos de carbono divalentes dispostos em série, apresentando mecanismo de ação relacionado, parcialmente, as suas características físico-químicas e sua interação com as membranas fúngicas (MANDELL; PETRI, 1996; GHANNOUM; RICE, 1999; NOSANCHUK, et al., 1999; MARTINEZ, 2006).

Essa droga antifúngica é empregada em casos de infecções fúngicas invasivas, particularmente em pacientes imunossuprimidos, na doença disseminada, em

imunocompetentes e em situações especiais, como neuromicoses ou na ausência de outra droga eficaz. O composto possui indicação clínica para a aspergilose, blastomicose, candidose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmoses, paracoccidioidomicose, esporotricose, zigomicose, inclusive penicilose, bem como no tratamento empírico de pacientes febris neutropênicos, na prevenção de infecções fúngicas em doentes com cancro, transplantados ou considerados de alto risco, na meningoencefalite amebiana primária e em infecções parasitárias como a leishmaniose (MARTINEZ, 2006; ASHP, 2012).

No ensaio realizado com meio RPMI-1640 acrescido da anfotericina B, na presença do ergosterol e inoculado com as cepas de *P. citrinum* obteve como resultado o aumento da CIM do antifúngico, como já era esperado tendo em vista que seu mecanismo de ação justifica esse comportamento.

A anfotericina B é utilizada no tratamento das principais micoses sistêmicas por ligar-se ao ergosterol da parede celular fúngica, promovendo a formação de poros, alterando a permeabilidade celular ocasionando a perda de constituintes citoplasmáticos e consequente morte do micro-organismo. Adicionalmente, causa alterações imunológicas e lesões oxidativas, resultando em mudanças prejudiciais no metabolismo celular nocivas à sobrevivência celular (PATEL, 1998; MARTINEZ, 2006; LUISI et al., 2008). Sendo assim, uma vez que o meio de cultura possui uma maior disponibilidade de ergosterol, a anfotericina B, conseqüentemente, necessitará de maiores concentrações para produzir o mesmo efeito nas cepas de *P. citrinum*, podendo ser evidenciado com a elevação da CIM neste meio suplementado, observado neste experimento.

5.4 Estudo de associação do fitoconstituente com o voriconazol

A Tabela 8 revela o resultado do ensaio de combinação entre o isoeugenol e o voriconazol frente as cepas de *P. citrinum* INCQS 40.011, LM-03, LM-161 e LM-171. Como pode ser observado, todas as cepas fúngicas mantiveram o valor da CIM após a combinação do isoeugenol com o voriconazol.

Diante desse resultado, foi calculado o Índice FIC. O IFIC é o somatório dos FICs para cada droga, sendo a FIC definida como a CIM de cada droga, quando usado em combinação, dividido pela CIM de cada droga, quando testada isoladamente.

Como resultado do ensaio, a combinação entre as substâncias pode produzir sinergismo, promovendo a inibição do crescimento do micro-organismo com 25% ou menos da CIM de cada agente isolado, efeito aditivo, quando é necessário atingir metade da CIM para inibir o crescimento da cepa, ou indiferentismo ou antagonismo, quando inibe menos que o composto isolado (MOREIRA, 2004).

Tabela 8 – Resultados da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do isoeugenol e voriconazol isolados e após a associação frente a cepas de *P. citrinum*.

Cepas	Agentes Isolados		Agentes Combinados		IFIC*	Interação
	CIM _{ISO}	CIM _{VRZ}	CIM _{ISO}	CIM _{VRZ}		
INCQS**	64	256	64	256	2	Indiferente
LM – 03	32	0,5	32	0,5	2	Indiferente
LM - 161	32	2	32	2	2	Indiferente
LM – 171	64	2	64	2	2	Indiferente

*IFIC: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. CIM_{ISO}: Concentração Inibitória Mínima do isoeugenol. CIM_{VRZ}: Concentração Inibitória Mínima do voriconazol. INCQS**: Cepa padrão de *P. citrinum* INCQS 40.011.

Diversos fungos podem estar associados a doenças infecciosas no ser humano e animais, enquanto outros podem produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas) quando estão se multiplicando nos alimentos e, quando ingeridos, podem acarretar diferentes afecções (MINERVINI et al., 2001; LACAZ et al., 2002). Casos dessas infecções aumentaram consideravelmente e passaram a ser de grande importância, pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade, associadas as constantes falhas no tratamento de infecções micóticas, o que tem chamado a atenção para o grave problema do mecanismo de resistência aos agentes antifúngicos. Esse aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontra disseminada e fora de controle. Desta forma, a busca por alternativas terapêuticas ou até mesmo associações seguras e efetivas de fármacos se faz interessante (MENEZES, 2009; NUNES, 2012).

Apesar da grande maioria das infecções poder ser tratada com um único agente antimicrobiano, existem algumas situações em que está justificada a associação com outro fármaco que favorece seu efeito, melhorando os desfechos clínicos. Essas estratégias vem alcançando resultados promissores com o uso de terapia combinada de antifúngicos, frente a diversas espécies (DURAND-JOLY et al., 2003; JONHSON et al., 2004; MOREIRA, 2004; HO et al., 2007). Diversos estudos relatam um efeito positivo na ação antifúngica de compostos naturais associados com drogas antifúngicas, inclusive com representantes da classe dos azóis.

Como benefícios, a utilização de combinações racionais no tratamento clínico de infecções, aumentam a eficácia e diminuem a toxicidade, ampliam o espectro em infecções por múltiplos germes, previnem emergência de resistência, evitam a inativação do antimicrobiano por beta-lactamases ou reduzem a metabolização do antimicrobiano (MOREIRA, 2004).

A compreensão dos benefícios da associação de drogas para o tratamento de infecções causadas por fungos e a busca por novas combinações de agentes antifúngicos não é atual. Bennett et al. (1979) verificaram o efeito da terapia combinada da 5-fluorocitosina com a anfotericina para o tratamento da meningite criptocócica; em 2006 foi realizado um ensaio *in vivo* com ratos imunossuprimidos onde foi administrado um agente quelante de chumbo, EDTA, em associação com a anfotericina B, apresentando sinergismo com a anfotericina B frente a cepas de *Aspergillus fumigatus* (HACHEM et al., 2006); posteriormente, Spader et al. (2009) e Venturini et al. (2011) demonstraram o efeito sinérgico da anfotericina com 5-flucitosina, rifampicina, caspofungina, voriconazol e ibuprofeno sobre *Fusarium* spp.; em um modelo experimental utilizando as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, Menezes et al. (2012) demonstraram que a anfotericina B apresentava sinergismo com a sinvastatina contra esses micro-organismos. Desta forma, constata que a combinação de fármacos é uma opção terapêutica com perspectivas crescentes de uso na prática clínica nos próximos anos.

Laboratorialmente, apesar de existirem métodos normatizados para avaliar a atividade antifúngica de substâncias, não há um teste padronizado para verificar a ação combinada de duas ou mais drogas antifúngicas. Para a realização do estudo da interação entre agentes antifúngicos, podem ser utilizados os métodos de cinética

de morte (*time-kill*), *checkerboard* e o teste *Epsilometer Strip Test* (E-test) (WHITE et al., 1996).

Devido ao método *checkerboard* apresentar prática execução, padronização, bons resultados e custo baixo, em comparação com os demais testes disponíveis, este método é o mais utilizado nas pesquisas de associação de compostos antifúngicos. Seu nome refere-se à posição dos tubos ou poços na forma de “xadrez”, onde existem múltiplas diluições das substâncias antimicrobianas em concentrações superiores ou inferiores à CIM de cada um deles frente ao micro-organismo estudado (ODDS, 2003; MELETIADIS et al., 2007). Este método tem como base a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos em combinação, sendo muitas vezes seguido por uma análise mais aprofundada, não paramétrica, utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (*Fractional Inhibitory Concentration Index* - FICI), ou a resposta do modelo de superfície totalmente paramétrico (RSM) (MELETIADIS et al., 2007).

Após a realização do ensaio, foram calculados o IFIC para todas as cepas, encontrando o valor do IFIC = 2 para todos os isolados de *P. citrinum*. De acordo com a classificação proposta por LEWIS et al. (2002), este resultado demonstra que não ocorreu interação entre os compostos, uma vez que não ocorreu alteração da CIM em nenhum grau, classificando a associação do fitoconstituente com o quimioterápico fúngico como indiferente para as cepas de *P. citrinum* testadas. Esta interação é definida quando o resultado da CIM das duas substâncias é igual ao obtido apenas com aquela que é mais eficaz (RONALD; TALLARIDA, 2001; JOHNSON et al., 2004)

Anteriormente, foi demonstrado que o isoeugenol atua na disponibilidade do ergosterol para a cepa fúngica, fazendo com que o micro-organismo não consiga manter a integridade da membrana plasmática, o que é incompatível com a sobrevivência celular. Já o voriconazol, segundo Chapman et al. (2008), afirma que os derivados dos azólicos, como o voriconazol, atuam na biossíntese do ergosterol através da inibição seletiva do lanosterol 14 - a- esteroil desmetilase (P- 450), causando a depleção do ergosterol, e originando anomalias na permeabilidade da membrana. Uma vez constatado que a interação entre as drogas foi indiferente e baseando na definição deste conceito, é possível, que o isoeugenol, fenilpropanóide isômero do eugenol, apresente o mesmo alvo de ação que o voriconazol, um composto triazólico de segunda geração, visto que o fitoconstituente apresenta a mesma eficácia, tanto

isoladamente como em associação com o voriconazol. Esta afirmação pode ser justificada pelo resultado obtido na investigação do mecanismo de ação do fitoconstituente e corroborada por O'Shaughnessy et al. (2006), que alegam a presença de uma interação do tipo sinérgica só é possível quando as drogas em combinadas possuem diferentes mecanismos de ação.

Este entendimento é embasado por um estudo desenvolvido por Johnson et al. (2004), que mostra a existência de uma interação sinérgica entre equinocandinas e os derivados azólicos. Este sinergismo ocorreu, provavelmente, pois ambas drogas, quando combinadas, estariam atuando na inibição simultânea de diferentes alvos das células fúngicas, como a parede celular (caspofungina) e membrana células fúngica (voriconazol).

5.5 Ensaio *in silico*

A utilização de ferramentas computacionais trouxe mais velocidade e eficiência no desenvolvimento de novos fármacos. O processo de descoberta de fármacos *in silico* envolve a identificação do alvo de interesse (estrutura do receptor), a escolha dos compostos a partir das bases de inibidores, avaliação da interação da proteína com os possíveis inibidores e cálculo das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos possíveis inibidores (ZOETE et al., 2009).

5.5.1 PASS on-line

A Previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) on-line é um software utilizado para avaliar o potencial biológico de uma substância no organismo humano de acordo com sua semelhança com um fármaco orgânico. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos, podendo ser usado para estimar virtualmente os perfis de atividade biológica para moléculas, antes de sua síntese química e testes biológicos.

Após a análise das prováveis atividades biológicas do isoeugenol por meio do PASS on-line, foram obtidas mais de 522 atividades com mais de 30% de probabilidade de serem ativas ($P_a > 30\%$), desse total, 49 atividades possuem alta probabilidade de ocorrência ($P_a > 70\%$). Na Tabela 9, pode ser observado que

atividades com maior probabilidade de ser exercida pelo composto. Entre as 522 atividades com chance de ser desempenhado pelo isoeugenol, são destacadas as antimicrobianas: antisséptica (Pa: 0,571 e Pi: 0,009), antifúngica (Pa: 0,492 e Pi: 0,032), antibacteriana (Pa: 0,379 e Pi: 0,035), antimicobacteriana (Pa: 0,478 e Pi: 0,022) e anti-helmíntica (Pa: 0,335 e Pi: 0,028), especialmente contra nematoda (Pi: 0,562 e Pa: 0,009).

Tabela 9 – Predição da atividade do isoeugenol com probabilidade de ser ativo (Pa > 70%) determinada por meio do software Pass on-line.

Atividades	Pa	Pi
Inibidor da 1-Acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferase	0,711	0,004
Inibidor da 2-Hidroxiquinolina 8-monooxigenase	0,729	0,011
Inibidor da 4-Coumarate-CoA ligase	0,756	0,002
Potencializador da expressão APOA1	0,705	0,005
Inibidor da expressão AR	0,702	0,005
Inibidor da Aldeido oxidase	0,724	0,015
Antimutagênico	0,805	0,004
Agonista Apoptótico	0,733	0,012
Inibidor da Aspulvinone dimetilaliltransferase	0,923	0,005
Inibidor da Beta-caroteno 15,15'-monooxigenase	0,807	0,003
Indutor da CYP1A	0,793	0,003
Substrato da CYP1A	0,717	0,010
Indutor da CYP1A1	0,769	0,003
Inibidor da CYP1A	0,748	0,002

Substrato da CYP1A2	0,744	0,007
Substrato da CYP2C12	0,779	0,041
Substrato da CYP2E	0,845	0,004
Substrato da CYP2E1	0,851	0,004
Substrato da CYP2J	0,750	0,034
Carminativo	0,938	0,001
Estimulante da Caspase 3	0,778	0,007
Inibidor da Clordecona redutase	0,862	0,010
Inibidor da Diidro-L-gulonato descarboxilase	0,718	0,020
Inibidor da aciyl-CoA sintase	0,761	0,006
Inibidor da Feruloil esterase	0,963	0,002
Fibrinolítico	0,731	0,013
Sequestrador de radical livre	0,716	0,004
Substrato da GST A	0,719	0,020
Substrato da GST M	0,729	0,003
Inibidor da 2-Gluconato desidrogenase (receptor)	0,772	0,024
Inibidor da expressão de HIF1A	0,822	0,010
Potencializador da expressão de HMOX1	0,712	0,007
Inibidor da Insulina	0,724	0,006
Inibidor da expressão de JAK2	0,942	0,002
Inibidor da Linoleate diol sintase	0,868	0,004

Estimulante da MAP quinase	0,806	0,003
Inibidor da expressão de MMP9	0,893	0,001
Agonista da Integridade de Membrana	0,922	0,006
Inibidor da Permeabilidade de Membrana	0,785	0,012
Protetor Mucomembranoso	0,824	0,013
Tratamento da Mucositi	0,831	0,011
Inibidor da Expressão de NOS2	0,724	0,002
Tratamento de Condições Pré-Neoplásicas	0,879	0,002
Inibidor da esteróide N-acetilglucosaminil transferase	0,826	0,003
Inibidor da Expressão de TNF	0,852	0,003
Potencializador da Expressão de TP53	0,766	0,015
Inibidor da Ubiquinol-citocromo-c redutase	0,903	0,005
Inibidor da álcool-vanilil oxidase	0,928	0,001
Vasoprotetor	0,775	0,006

Pa = Probabilidade " de ser ativo". Pi = Probabilidade "de ser inativo"

Essas atividades antimicrobianas podem ser atribuídas a diversas características do isoeugenol relatadas na literatura. Bhatia et al. (2012) constataram que a atividade antifúngica do isoeugenol frente a cepas de *Candida* spp. é decorrente da capacidade de inibição do bombeamento de H⁺ por meio da ATPase de membrana plasmática e alteração da permeabilidade da membrana fúngica. Esses dados são apoiados pelo resultado da análise do PASS on-line que demonstra que o fitoconstituente tem consideráveis chances de exercer instabilidade na membrana plasmática fúngica como potencializador da permeabilidade da membrana (Pa: 0,408 e Pi: 0,054) e antagonista da integridade da membrana (Pa: 0,316 e Pi: 0,105). Esses

dados amparam a hipótese defendida por Sikemma et al. (1995) e Gill et al. (2006) que atribuem ao isoeugenol a ação de desestabilizador da membrana fúngica devido sua estrutura química.

Outras atividades benéficas suspeitas são atribuídas isoeugenol de acordo com o PASS on-line, como por exemplo: sequestrador de radical livre (Pa: 0,716 e Pi: 0,004), antioxidante (Pa: 0,470 e Pi: 0,008), citoprotetor (Pa: 0,665 e Pi: 0,01), anticarcinogênica (Pa: 0,408 e Pi: 0,029), antimutagênica (Pa: 0,805 e Pi: 0,004) e antineoplásica (Pa: 0,678 e Pi: 0,03), o que desperta o interesse em investiga-las.

5.5.2 Molinspiration

Para a obtenção dos parâmetros moleculares TPSA (área da superfície polar total da molécula), hidrofobicidade (MLogP) e do volume espacial (Vol), foi utilizado o software Molinspiration. Os resultados de predição para o isoeugenol obtidos após a análise do programa podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise teórica das propriedades físico-químicas do isoeugenol obtidas pelo software Molinspiration.

Composto	Propriedades Físico-químicas ^a					
	TPSA	nON	MlogP	Nv	nROTB	Vol
Isoeugenol	29,46	2	2,38	0	2	161,59
Voriconazol	76,73	6	1,49	0	5	285,11
Anfotericina	319,61	18	-2,49	3	3	865,48

^aTPSA: área de superfície polar total; nON: Interação O/NH O-HN; nV: número de violação; nROTB: número de rotação; Vol: volume

De acordo com Verma (2012), o MLogP é calculado como uma soma de contribuições baseadas nos fragmentos moleculares e dos fatores de correção que são usados para verificar a permeabilidade através das membranas celulares.

A TPSA é calculada pela metodologia publicada por Ertl, Rohde e Selzer (2000) como sendo a adição das contribuições dos fragmentos moleculares, sendo considerados fragmentos polares de O e N. Este parâmetro relaciona o potencial de ligações de hidrogênio de uma molécula em particular e também é um bom preditor

de propriedades de transporte de fármacos através das membranas celulares, incluindo a absorção no intestino, em células caco-2 que correspondem a uma importante célula de carcinoma do cólon humano que mimetizam o epitélio gastrointestinal, a barreira hematoencefálica e a biodisponibilidade (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000).

O cálculo do volume baseia-se em grupos contribuidores. O número de ligações rotativas mensura a flexibilidade molecular, o qual é um bom descritor da absorção e biodisponibilidade dos fármacos (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000).

A área de superfície polar total (TPSA) é calculada pela metodologia publicada por Ertl, Rohde e Selzer (2000) como sendo a adição das contribuições dos fragmentos moleculares, sendo considerados fragmentos polares de O e N. O PSA mostrou ser um excelente descritor para a caracterização da absorção de drogas, incluindo absorção intestinal, biodisponibilidade e penetração da barreira hematoencefálica. Outra característica importante para a biodisponibilidade de um composto é a flexibilidade da molécula, que pode estar associada ao número de bandas rotáveis nROTB, que corresponde ao número de ligações simples, fora de um anel, ligado a um átomo não terminal.

De acordo com Veber et al (2002), compostos com uma TPSA menor ou igual a 140 \AA^2 e um nROTB menor ou igual a 10 apresentaram elevada probabilidade de boa biodisponibilidade oral. Diante disso, o isoeugenol enquadra-se neste perfil, uma vez que a TPSA foi de $29,26 \text{ \AA}^2$ e o nROTB foi de 2, apresentando grande probabilidade de ser utilizado por via oral.

Estes critérios se confirmam na prática, uma vez que a anfotericina B apresenta $TPSA = 319,61$, ou seja, acima de 140 \AA^2 e sua administração é restrita ao uso parenteral, por via endovenosa. No entanto, podem ser feitas, excepcionalmente, irrigações em articulações, aparelho urinário e aplicação intratecal (TOLINS; RAIJ, 1991). Ainda assim, os resultados corroboram com as conclusões de Veber et al. (2002).

Respaldando ainda os autores acima, a análise do voriconazol mostrou a TPSA no valor de 76, 73, menos que 140 \AA^2 . Esse fármaco possibilitou a adaptação às diferentes necessidades terapêuticas dos pacientes com infecções fúngicas, uma vez que encontra-se disponível em formas farmacêuticas para administração oral (Vfend®) e endovenoso, coincidindo com seus valores de TPSA e rROTB (QUINDÓS et al., 2007).

O MLogP é a medida da hidrofobicidade, ou seja, é a capacidade que uma substância possui de interagir com as membranas celulares. Moléculas com valores altos de MLogP têm uma maior hidrofobicidade e, conseqüentemente, melhor transporte através de membranas. Assim, o isoeugenol apresentou MLogP de 2,38, valor superior aos de antifúngicos utilizados na prática clínica, como a anfotericina e voriconazol, mostrando mais uma vez um critério positivo para sua biodisponibilidade.

Em seguida, foi averiguado a probabilidade do isoeugenol de se ligar a determinados alvos farmacológicos, o que pode ajudar a compreender como a molécula desenvolve sua atividade biológica, bem como seus efeitos tóxicos. Para isso, foi utilizado o software Molinspiration que fornece uma probabilidade do composto de se ligar a estruturas celulares, ou seja, valores menores ou igual a 1 indicam a substância tem grandes chances de interagir com a estrutura analisada.

O potencial de semelhança com outros fármacos ou *drug likeness* do isoeugenol foi calculado considerando o MlogP (coeficiente de partição), massa molecular, número de átomos pesados, número de aceptores de hidrogênio, número de doadores de hidrogênio, número de violações, número de ligações rotativas e volume molecular. A bioatividade do fitoconstituente foi verificada por cálculos do índice de atividade de ligantes de GPCR, modulador de canais iônicos, ligantes de receptores nucleares, inibidor de cinase e inibidor de enzima com a ajuda do software (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000).

Na Tabela 11 é possível observar que o isoeugenol apresentou todos os parâmetros de atividade ligante ao GPCR, modulador do canal iônico, ligante de receptor nuclear, inibidor de quinase, inibidor de protease e inibidor enzimático negativos.

O voriconazol mantém as propriedades gerais dos azólicos, ou seja, inibe a enzima esterol-14- α -desmetilase, porém bloqueia mais intensamente a síntese de ergosterol dos fungos filamentosos, para os quais chega a ser fungicida (MARTINEZ, 2006). Desta forma, o mecanismo de ação do agente antifúngico coincide com o dado de Inibição Enzimática (EI) de 0,19 apresentado pelo fármaco na análise pelo software.

O mecanismo de ação antifúngico da anfotericina B não envolve inibição enzimática e sim a interação com o ergosterol das membranas fúngicas (MANDELL; PETRI, 1996). Isso é verificado nos dados apresentados na Tabela 11. O escore EI

(inibição enzimática) da anfotericina B foi de -2,59, muito abaixo do voriconazol, e em concordância com seu mecanismo de ação.

Tabela 11 – Probabilidade de interação com alvos farmacológicos calculados através do software Molinspiration.

Composto	“Drug-likeness” ^a					
	GPCRL	ICM	KI	NRL	PI	EI
Isoeugenol	-1,02	-0,53	-1,06	-0,7	-1,35	-0,51
Voriconazol	0,23	0,17	0,14	-0,22	0,02	0,19
Anfotericina	-3,06	-3,53	-3,59	-3,45	-2,45	-2,95

^a“Drug-likeness”: probabilidade de interação do composto com o alvo farmacológico; GPCRL: ligante ao GPCR; ICM: modulador de canal iônico; KI: inibidor de quinase; NRL: ligante de receptor nuclear; PI: inibidor de protease; EI: inibidor enzimático.

Semelhante a anfotericina B, o isoeugenol também apresentou todos os seus parâmetros negativos. Isso pode auxiliar na investigação do mecanismo de ação do fitoconstituente, que pode agir da mesma forma que a anfotericina B.

Em seguida, foram calculadas as propriedades moleculares do isoeugenol, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software Molinspiration Online Property Calculation Toolkit (<http://www.molinspiration.com/>), como pode ser observado na Tabela 12.

Esta análise foi realizada fundamentada na regra dos cinco de Lipinski que estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral, que está agregada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (1) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (2) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (3) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (4) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (5) área de superfície polar total (TPSA) menor ou igual a 140 Å. Moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas com a biodisponibilidade.

Tabela 12: Análise teórica das propriedades físico-químicas do isoeugenol requeridas para biodisponibilidade oral teórica comparada aos padrões da “Regra dos cinco” Lipinski – Molinspiration.

Substância	Parâmetros para Avaliação de Biodisponibilidade				
	TPSA	nDLH	nALH	Da	cLogP
Isoeugenol	29,46	1	2	164,20	2,33
Voriconazol	76,73	1	6	349,32	1,49
Anfotericina	319,61	18	12	924,09	0,32
Padrão da “Regra dos cinco” Lipinski	≤ 140	≤ 5	≤ 10	≤ 500	≤ 5

nDLH: Número de doadores de hidrogênio; nALH: Número de aceptores de hidrogênio; Da: Peso molecular; cLogP: Coeficiente de partição água: óleo.

De acordo com os resultados obtidos no Molinspiration por meio da “Regra dos cinco” de Lipinski (2004), foi possível constatar que o isoeugenol apresentou uma boa biodisponibilidade oral teórica, uma vez que todos os parâmetros físico-químicos avaliados para esta molécula apresentaram dentro do ponto de corte estabelecido pela “Regra dos cinco” Lipinski (Tabela 12). Em contraste, a anfotericina violou 4 das 5 regras, o que na prática condiz com seu uso majoritário por via endovenosa e não por via oral.

5.5.3 Osiris

Atualmente, várias abordagens foram desenvolvidas para avaliar a semelhança de drogas de compostos bioativos com base em descritores topológicos, impressões digitais de estrutura molecular ou outras propriedades, como peso molecular, solubilidade em água e cLogP (TETKO, 2005).

Para a análise da toxicidade teórica e dos parâmetros farmacocinéticos do isoeugenol, foi realizado um estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) com o auxílio da ferramenta Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>). O software envolve um banco de dados de drogas comercializadas e compostos comercialmente disponíveis (Fluka) que utiliza um conjunto de dados não

farmacológico para avaliar a frequência de ocorrência de cada fragmento na estrutura individual. Efeito mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução foram avaliados, além do potencial farmacológico no parâmetro “drug-score”, que é um parâmetro que combina os valores obtidos de “drug-likeness”, MLogP, solubilidade, massa molar e riscos toxicológicos em um único valor.

O programa é ideal para o desenho de estruturas químicas, estimando propriedades físico-químicas e biológicas com um bom grau de confiabilidade e calculando parâmetros extras como o drug-score, que verifica a probabilidade da molécula virar um fármaco comercial. As análises são realizadas pelo software por meio da comparação com dados de mais de 3.300 fármacos comerciais e 15.000 substâncias químicas.

Neste estudo foram determinados o potencial de semelhança com outros fármacos (*druglikeness*) e seu potencial como candidato a fármaco (*drug-score*), ambos relacionados a descritores topológicos, além da massa molecular, número de doador/aceptor de hidrogênio, entre outras (Tabela 13). Os valores de “drug-score” entre 0,1 e 1,0 e indica que a molécula avaliada contém grupos frequentes em medicamentos comerciais.

Tabela 13 – Probabilidade de interação do isoeugenol / agentes antifúngicos com alvos farmacológicos calculados através do software Osiris

Compostos	“Drug score” ^a						
	CLP	S	D-L	D-S	nALH	nDLH	Da
Isoeugenol	2.33	-2.24	-3.96	0.10	2.00	1.00	164.20
Voriconazol	1.47	-3.23	4.08	0.84	6.00	1.00	349.32
Anfotericina	0,32	-5,07	-0,13	0,27	18	12	924,09
Itraconazol	5,15	-7,3	7,61	0,07	12	0	705,64

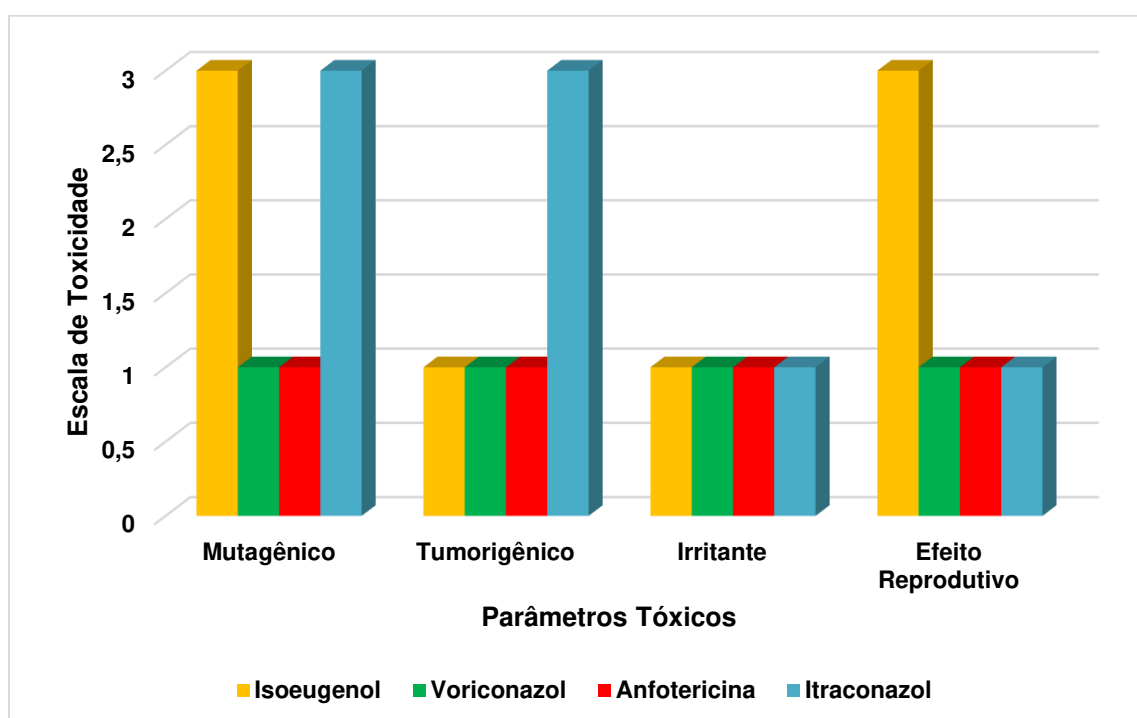
^aCLP: cLogP; S: solubilidade; DL: “Drug-likeness”; DS: “Drug-Score”; nALH: número de aceptores de ligação hidrogênio; nDLH: número de grupos doadores de ligação hidrogênio; Da: peso molecular.

Como verificado nos resultados, o isoeugenol apresentou o parâmetro “drug-score” inferior ao voriconazol e a anfotericina. Este parâmetro é uma medida do

potencial do composto para atender aos critérios de um possível candidato a medicamentos. Apesar disso, o isoeugenol não pode ser descartado como possível fármaco, uma vez que o itraconazol, um agente antifúngico utilizado na rotina clínica, apresenta este mesmo parâmetro em valor menor que o isoeugenol. Assim, a escolha de uma molécula para estudos de atividades biológicas e segurança não devem levar em consideração apenas um parâmetro.

Além dessas informações, o software também estimou os riscos de efeitos colaterais, através da análise dos parâmetros farmacológicos: efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos (Figura 8). Os resultados foram classificados de acordo com uma escala de 1 a 3, onde: 1 significa toxicidade ausente, 2 toxicidade moderada e 3 toxicidade severa. Essas análises de predição toxicológica foram realizadas de forma comparativa com fragmentos tóxicos de mais de 3000 fármacos comerciais.

Figura 8 – Risco de toxicidade do isoeugenol comparada a antifúngicos padrão calculados usando o programa Osiris Property Explorer.



De acordo com os dados plotados no gráfico, o isoeugenol apresenta alto risco de desenvolver efeitos mutagênicos e reprodutivos e baixo risco em desenvolver efeitos irritantes e tumorigênico. O risco mutagênico e reprodutivo do isoeugenol alertado pelo software não é corroborado com os dados publicados pelo NTP, National

Toxicology Program, (2010). Após a realização de estudos toxicológicos em vários modelos experimentais, os autores constataram que o isoeugenol não foi mutagênico em ensaios com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, bem como não induzindo aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês, não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos machos expostos ao isoeugenol por gavagem durante 3 meses.

Assim, o potencial risco tóxico *in silico* do fitoconstituente não se aplica na prática nos testes *in vivo*. Além disso, outras drogas já usadas na terapia antifúngica, como o itraconazol, também apresentam risco mutagênico *in silico* mas não *in vivo* em nível de excluir seus benefícios na prática clínica.

Este fitoconstituente apresentou também, no ensaio *in silico*, probabilidade de agir na membrana plasmática das células. Este foi um dos motivos atribuído ao composto para justificar sua atividade antimicrobiana. Entretanto, essa capacidade de causar danos na membrana pode também agir em outras células eucariontes, o que tornaria o composto tóxico para uso em seres vivos. Para verificar seu possível efeito tóxico, foi realizada a avaliação da atividade hemolítica do isoeugenol.

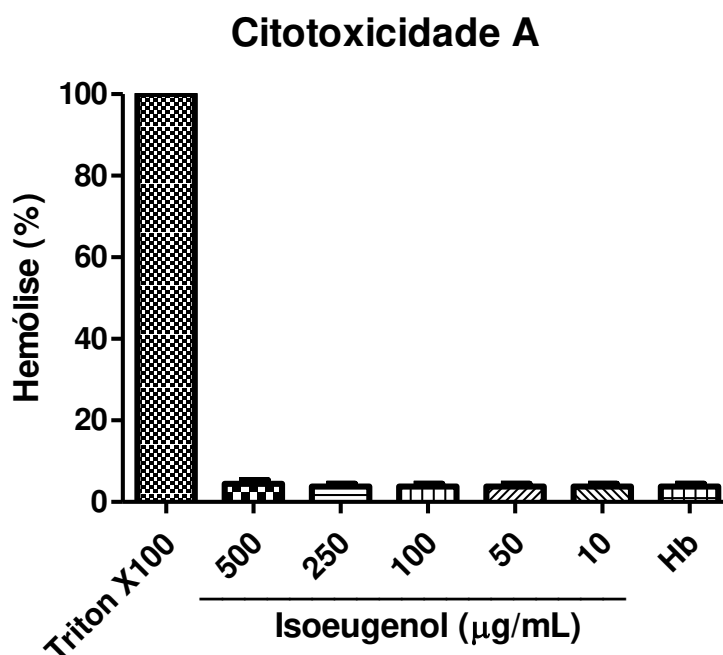
5.6 Avaliação citotóxica do isoeugenol em eritrócitos humanos

Na avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos, observou-se que o isoeugenol não apresentou atividade citotóxica frente a eritrócitos tipo A (Figura 9) e tipo B (Figura 10), onde os valores expressos não foram significativamente diferentes ao controle negativo (Hb).

As avaliações de toxicidade abrangem ensaios efetuados nas matérias-primas, formulações em desenvolvimento e produtos acabados, aos quais são aplicados testes *in vivo* e/ou *in vitro*. Com relação aos ensaios *in vitro*, avaliação em sistemas de cultura celular, como a citotoxicidade, assume grande importância, por serem sensíveis, reprodutíveis, fáceis de gerenciar e envolverem menor custo (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Citotoxicidade corresponde aos efeitos adversos resultantes da interferência nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular. Estes efeitos podem envolver a integridade da membrana e do citoesqueleto; alterações no metabolismo, na síntese e na degradação ou mesmo na liberação de

constituintes celulares ou produtos, na regulação de íons, e na divisão celular (OECD/GD 129, 2010).

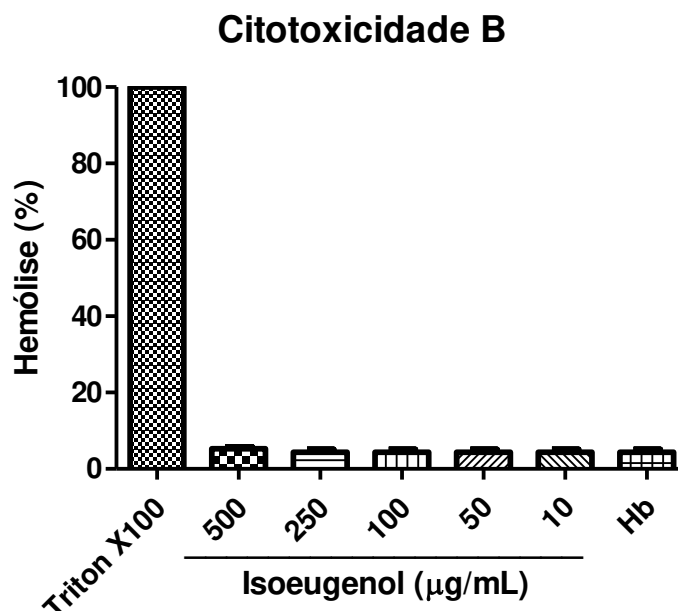
Figura 9 – Atividade citotóxica do isoeugenol nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg/ml frente a eritrócitos tipo A.



Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). Como controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

O resultado do teste de hemólise apresentado na Figura 10, mostra que o fitoconstituente causou 5,3% ($\pm 0,86\%$) de hemólise na concentração de 500 µg/mL, e exibiu um comportamento hemolítico igual ao controle negativo (Hb) nas concentrações de 250 a 10 µg/mL, com um percentual de hemólise de 4,37% ($\pm 1,2\%$). Esses valores apresentados, tanto na concentração de 500 µg/mL como no controle negativo, não são estatisticamente diferentes entre si, levando a afirmar que o isoeugenol, nestas concentrações, não é citotóxico para as células utilizadas no experimento.

Figura 10 – Atividade citotóxica do isoeugenol nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg/ml frente a eritrócitos tipo B.



Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). Como controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado na ISO 10993-1 (Órgão Internacional de Padronização) como o primeiro ensaio para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material. Esse teste promove resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais (ROGERO et al., 2003) e são utilizadas diversos tipos de células, entre elas os eritrócitos humanos. Essas células fornecem uma ferramenta acessível para estudos de toxicidade dos compostos, porque eles estão prontamente disponíveis, suas propriedades de membrana são bem conhecidas e sua lise é facilmente monitorada medindo a liberação de hemoglobina (SITU; BOBEK, 2000). A estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador dos efeitos danosos de compostos sobre os eritrócitos *in vitro*, sendo utilizado para a pesquisa de citotoxicidade, e é dependente das suas propriedades físicas e estruturais (SHARMA; SHARMA, 2001).

Diante disso, o teste *in vitro* para a ação hemolítica tem sido utilizado como um dos métodos de triagem para diferentes agentes tóxicos, sendo empregado em diversos estudos que visam avaliar a toxicidade de plantas e seus metabólitos (KUBLIK et al., 1996; TARIKU et al., 2011; KLENICY et al., 2013; VASCONCELOS, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

A termo hemólise referi-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias, liberando a hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia. A quantidade de hemoglobina livre no plasma depende da capacidade e da velocidade de remoção do pigmento pelo organismo de cada indivíduo, sendo fisiológica a quantidade de 6 mg%. Quando este valor supera 100 mg% a hemoglobina passa a ser filtrada pelos rins e quando excessivamente alto (superiores a 3.000 mg%), pode promover lesão renal (CARVALHO et al., 2007; KALEGARI et al., 2011) A hemólise pode ocorrer como consequência de substâncias ou compostos utilizados como medicamentos ou presentes nas plantas.

Desta forma, a investigação da citotoxicidade *in vitro* do isoeugenol através do teste de hemólise é de grande importância para a comprovação da segurança do composto e foi realizada de forma inédita, visto que não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a citotoxicidade do compostos ou de óleos essenciais que o apresentassem como composto majoritário. Apesar disso, outros trabalho verificaram a atividade citotóxica do isoeugenol através de outra metodologia

Zarlaha et al. (2014) estudaram os efeitos tóxicos do isoeugenol sobre linhagens cancerígenas humanas de adenocarcinoma cervical (HeLa), melanoma (FemX), leucemia mielóide crônica (K562) e células ovarianas (SKOV3). Os autores evidenciaram uma menor citotoxicidade do isoeugenol em comparação com a droga padrão (cisplatina), sendo 20, 14, 2,8 e 2,4 vezes menos citotóxico para as linhagens HeLa, FemX, K562 e SKOV3 respectivamente.

Leite et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade do eugenol frente fibroblastos NCTC929. Os pesquisadores concluíram que o fenilpropanóide não foi citotóxico na concentração de 50 µg/mL. Apesar de empregarem uma metodologia alternativa de avaliação da toxicidade de substâncias, esse resultado indica uma provável viabilidade do uso seguro desse composto na pratica clínica e, possivelmente, do seu isômero.

É admissível admitir a hipótese de que os fenilpropanóides apresentem atividade hemolítica, uma vez são compostos presentes em grandes quantidades nos óleos essenciais e estes atuam predominantemente na superfície celular, causando a interrupção da integridade da membrana celular (BAKKALI et al., 2008; MIRON et al. 2014; LOPEZ-ROMERO et al., 2015). Entretanto, outros pesquisas demonstram que a citotoxicidade apresentada pelos óleos essenciais não são necessariamente devido a presença dos fenilpropanóides, mais especificadamente do eugenol. Lazzarini et al. (2015) compararam a toxicidade dos óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* com diferentes níveis de eugenol. Tanto o óleo essencial adquirido comercialmente (OCM) quanto o obtido por extração (OEX), apresentam o eugenol como constituinte majoritário, 66,93% e 34,38%, respectivamente. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com fibroblasto murino (L929) pelo método de redução do MTT e concluíram que o extrato não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas (10 a 100 µg/mL), e que o OCM não foi tóxico em concentrações menores ou igual a 250 µg/mL e o OEX em concentrações inferiores ou igual a 62,5 µg/mL não apresentaram citotoxicidade. Apesar disso, observou uma maior citotoxicidade do OEX em relação ao OCM, sugerindo que a citotoxicidade dos óleos é devido a sua matriz complexa e não ao eugenol exclusivamente, uma vez que, neste mesmo estudo, o eugenol não apresentou citotoxicidade em concentrações menores ou igual a 125 µg/mL.

Diante disso, o resultado encontrado neste estudo conduz a uma avaliação preliminar positiva da toxicidade do isoeugenol. Esse dado é muito importante para verificar a segurança desse composto, visto que o mesmo é encontrado em plantas utilizadas na medicina popular e é usado incorporado em inúmeros produtos de higiene pessoal e doméstico, incluindo perfumes, cremes, sabões e detergentes, como agente aromatizante adicionado a bebidas não alcoólicas, alimentos cozidos e gomas de mascar (NTP, 2010), e que a presença de toxicidade restringe seu uso.

Desta forma, o isoeugenol se qualifica como potencial molécula para o desenvolvimento de um fármaco antifúngico para uso contra infecções. Igualmente, estes resultados embasam a realização de futuros estudos que possibilitem a candidatura do isoeugenol a um agente biopesticida, levando a um menor uso de agrotóxicos na agricultura. Com isso, ocorreria uma redução do risco à saúde alimentar dos consumidores, da contaminação ambiental pelo uso de agrotóxicos, dos

custos de produção dos alimentos e aumento da eficiência na conservação dos produtos pelas produtores.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na investigação *in vitro* e *in silico* dos efeitos antifúngicos e toxicológicos do isoeugenol, pode-se concluir que:

- ❖ O isoeugenol foi a substância mais ativa entre os fitoconstituintes testados contra as cepas de *P. citrinum* utilizadas na triagem microbiológica.
- ❖ O composto apresenta ação fungicida, não por alterar a permeabilidade da parede celular e sim por interferir na disponibilidade do ergosterol, causando perturbação na membrana plasmática antifúngica.
- ❖ O efeito antifúngico do isoeugenol demonstrado *in vitro* foi confirmado pelo estudo *in silico*, que evidenciou também alta probabilidade da molécula agir na estrutura da membrana plasmática.
- ❖ Esse fenilpropanóide apresenta parâmetros de biodisponibilidade condizentes com fármacos que podem ser administradas por via oral no estudo *in silico*.
- ❖ O isoeugenol exibiu teórico risco toxicológico reprodutivo e mutagênico na análise computacional.
- ❖ O composto não foi citotóxico para os eritrócitos sorotipo A⁺ e B⁺.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. P. Mycotoxins and indoor moulds. **Indoor Environment Connections**, v. 3, n. 4, p. 14-24, 2002.

ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A. A. A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5947-5950, 2008.

ABRAMSON, D.; USLEBER, E.; MARLBAUER, E. Immunochemical method for citrin. In: Trucksess, M. W., Pohland, A. F. (ed.). **Mycotoxin protocols**. Totowa: Humana Press, 2001, p. 195-204.

AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazol against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178–1184, 2010.

ALECRIM, M. M.; SOUZA, T. C. de; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. de A. Metabólitos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* promovendo antagonismo frente a bactérias patogênicas. In: 62ª Reunião Anual da SBPC, Natal-RN. **Anais do 62a. Reunião Anual da SBPC**, 2010. Disponível em:<<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3607.htm>>. Acesso em: novembro de 2016.

ALI, S. M. et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials**, v. 4, n. 20, p. 1-7, 2005.

ALIROL, E.; WI, T. E.; BALA, M.; BAZZO, M. L.; CHEN, X. S.; DEAL, C. et al. Multidrug-resistant gonorrhoea: A research and development roadmap to discover new medicines. **PLoS Med**, 2017, v. 14, n. 7, p. 1-12.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS - ASHP, Inc. **Amphotericin B (Systemic)**. Disponível em < <http://www.ashp.org/> >. Acessado em 28/09/2017.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?" **Nature Review Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260-71, 2010.

ANDES, D. Optimizing antifungal choice and administration. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, suppl. 4, p. 13 – 18, 2013. doi: 10.1185/03007995.2012.761135.

ANDRADE, M. A., CARDOSO, M. G., BATISTA, L. R., et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANDRADE, T. C. B.; LIMA, S. G.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S.; ISLAM, T.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 173-182, 2015.

ANVISA – BRASIL: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **RE nº 1185, de 09 de julho de 2002**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185_02re.htm. Acesso em 05/09/2017.

ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, n. 7, p. 457-463, 2008.

ASAN, A.; SARICA OKTEN, S.; SEN, B. Airborne and Soilborne Microfungi in the Vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kirklareli City (Turkey), Their Seasonal Distributions and Relations with Climatological Factors. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 164, n. 1-4, p. 221-231, 2010. doi:10.1007/s10661-009-0887-8.

ASTANI, A. REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n. 3, p. 1-8, 2009.

AZAMBUJA, W. **Anetol**. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/>>. Acesso em 27 jan. 2018.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

- BAGNAT, M.; KERAˆNEN, S.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3254–3259, 2000.
- BAJPAI, V. K.; SHUKLA, S.; KANG, S. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8903 – 8908, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 2008. p. 624.
- BASTOS, C. N. Ação antibiótica de metabólitos de *Penicillium citrinum* Thom. Sobre *Phytophthora palmivora* (Buti.) Buti. **Revista Theobroma**, v.17, n.1, p. 31-37, 1987.
- BENNETT, J. E.; DISMUKES, W. E.; DUMA, R. J.; MEDOFF, G.; SANDE, M. A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B. T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z. A.; CATE, T.R.; COBBS, C. G.; WARNER, J. F.; ALLING, D. W. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 301, n. 3, p. 126-131, 1979.
- BENNET, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M; GOMI, K. (eds.). **Aspergillus: molecular Biology and Genomics**. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010, p. 1-17.
- BHATIA, R.; SHREAZ, S.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; BASIR, S. F. et al. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 504-512, 2012.
- BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p.528-534, 2000.
- BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOWMAN, S.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioassays**, v. 28, n. 8, p. 799 – 808, 2006.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Oxford, **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625 - 631, 2007.

BRAGA, P. C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 396-400, 2007.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. **Toxicology**, n. 196, v. 1-2, p. 1-19, 2004.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26ed. McGraw-Hill, 2014.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 4, p. 1107-1109, 1977.

CANTORE, P. et al. Antibacterial Activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. Vulgare (Miller) Essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7862-7866, 2004.

CANTRELL, S. A. et al. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. **Mycological Research**, v. 110, n. 8, p. 962-970, 2006.

CARDOSO, P. G.; QUEIROZ, M. V. de; PEREIRA, O. L.; ARAÚJO, E. F. de. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 71-77, 2007.

CARDOSO, E. B. **Diversidade de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* identificadas por filogenia molecular e espectrometria de massas Maldi-tof**. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

CARRASCO, H.; RAIMONDI, M.; SVETAZ, L. et al. Antifungal activity of eugenol analogues: influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002 – 1024, 2012.

CARVALHO, E.B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 11 - 19, 2010.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. **Phytotherapy Research**, v. 506, p. 501–506, 2007.

CHAMI, N.; BENNIS, S.; CHAMI, F.; ABOUSSEKHRA, A.; REMMAL, A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and *in vivo*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 106–111, 2005.

CHAND, B. Structure-Bioactivity-Relationships and Crystallographic Analysis of Secondary Interactions in Pregnane-Based Steroids. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 12, p. 1901-1926, 2011.

CHAPMAN, S. W.; DISMUKES, W. E.; PROIA, L. A.; BRADSHER, R. W.; PAPPAS, P. G.; THRELKELD, M. G.; KAUFFMAN, C. A.; Clinical practice guidelines for the management of blastomycosis: 2008 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12. p. 1801–12, 2008.

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

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. In vitro efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 573–575, 1998.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: Lorian VMD. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, p.739-788, 1991.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard-Second Edition, CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, PA, USA 2008.

COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.

COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI, M. A. de Q.; YANO-MELO, A. M. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. **Acta Botanica Brasilica**. [online], v. 24, n. 1, p. 292-298, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, CE, Brazil, 1981.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RUIZ-DIEZ, B.; MARTINEZ-SUAREZ, V.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparative *in vitro* activity of voriconazol (UK-109-496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 149–151, 1999.

DAVID, E. F. S.; PIZZOLATO, M.; MORAIS, R.; FERRI, A. F.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Influência da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 66-70, 2006.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2233-2252, 2011.

DELAMARE, A. P. L. MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDAIN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v. 25, p. 1-16, 2016.

DIAKEMA, D. J.; MESSER, A. S.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623-6, 2003.

DOGNINI, J.; MENEGHETTI, E. K.; TESKE, M. N.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; VERDI, M.; DE GASPER, A. L. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, p. 241–244, 2012.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197–201, 2007.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.

DURAND-JOLY, I.; SOULA, F.; CHABÉ, M.; DALLE, J. H.; LAFITTE, J. J.; SÉNÉCHAL, M.; PINON, A.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, suppl, p.614–615, 2003.

ECKERMAN, S. J.; GRAHAM, K. J. Using chemical ecology to locate new antifungal natural products, In: Rahman, A. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 55- 92, 2000.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685–702, 2003.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-43, 2015.

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

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3714-3717, 2000.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720–1725, 2008.

ESFANDYARI-MANESH, M.; GHAEDI, Z.; ASEMI, M.; KHANAVI, M.; MANAYI, A.; JAMALIFAR, H.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, p. 290–295, 2013.

ESPINEL-INGROFF, A. In vitro activity of the new triazole voriconazol (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 198–202, 1998.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; HEWEDI, F. M.; EL-BAROTY, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 665–667, 1989.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S. Informações estratégicas sobre plantas medicinais obtidas a partir de base de dados em linha mimeo. Rio de Janeiro, Escola de Química: **UFRJ**, 2000.

FRANCHOME, P.; JOLLOIS, R.; PENOEL, D.; MARS, D. **L’Aromathérapie Exactement: Encyclopedie de l’Utilisation Thérapeutique des Huiles Essentielles**. Roger Jollois Edition, Limoges, France, 1995.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 48, 2007.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O., SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 201-242, 2004.

FRISVAD, J. C.; LUND, F.; ELMHOLT, S. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 684–692, 2005.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

GALGANI, J. N. Antifungal susceptibility tests. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, v. 31, p.1867-1870, 1987.

GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K. H.; SIMON, J. E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**. v. 125, p. 539–555, 2001.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 501-17, 1999.

GILL, A.; HOLLEY, R. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1–9, 2006.

GOLAN et. al. **Princípios de Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; GRAYER, R. J.; CHASE, M. W.; SIMMONDS, M. S. J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie de Pflanzen". **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 369-393, 1999.

GROSS, M.; LEWINSOHN, E.; TADMOR, Y.; BAR, E.; DUDAI, N.; COHEN, Y.; FRIEDMAN, J. The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 308–316, 2009.

GUENTHER, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: **The Essential Oils**, 4.ed.v.4. New York: Van Nostrand, 1977.

GUGNANI, M. C.; GUPTA, S.; TALWAR, R. S. - Role of opportunistic fungi in ocular infections in Nigeria. **Mycopathologia (Den Haag)**, v. 65, p. 155-166, 1978.

GUPTA, M. P.; ARIAS, T. D.; WILLIAMS, N. H.; BOS, R.; TATTJE, D. H. E. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. **Journal of Natural Products**, v. 48, p. 330, 1985.

GUPTA, A.; ANIYERY, R. B.; PATHAK, A. *In silico* pharmacological and *in vitro* biological study of novel organotinorobate. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 10, p. 4201-4212, 2017.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 409-12, 2005.

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

HACHEM, R.; BAHNA, P.; HANNA, H.; STEPHENS, L. C.; RAAD, I. EDTA as an adjunct antifungal agent for invasive pulmonary aspergillosis in a rodent model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 1823-1827, 2006.

HACKBART, H. C. S. **Ocratoxina e a citrinina em arroz: um estudo de metodologia para determinação simultânea de ocorrência**. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2009.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**; Editora UNIVALI, Itajaí, p. 221, 2009.

HETHERINGTON, A. C.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of microorganisms. XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 220, p. 269–295, 1931.

HO, V. S.; WONG, J. H.; NG, T. B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, v. 28, p. 760–766, 2007.

HOUBRAKEN, J. et al. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53-138, 2011.

HOWES, M. J.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. Distinguishing Chinese star anise from Japanese star anise using thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5783–5789, 2009.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIÈRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 659, n. 3, p. 274 - 283, 2009.

IZAWA, S.; HARADA, N.; WATANABE, Y. Inhibitory effects of food coloring agents derived from *Monascus* on the mutagenicity of heterocyclic amines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3980-3984, 1997.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 547-62, 2011.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6303–6307, 2006.

JOHNSON, E. M.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D. W. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 741–745, 1998.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: a new triazole antifungal. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 630-7, 2003.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693 - 715, 2004.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KAUFFMAN, C. A.; ZARINS, L. T. In vitro activity of voriconazole against *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, p. 297–300, 1998.

KHAN, N.; SHREAZ, S.; BHATIA, R.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, v. 83, p. 434-440, 2012.

KHURANA, N. I.; MOHAN, P. S.; GAJBHIYE, A.; GOEL, R. K. PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.662, n.1-3, p.22-30, 2011.

KIM, W. G.; SONG, N. K.; YOO, I. D. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v.54, p. 831–835, 2001.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v. 17, p. 37-43, 2002.

KONG, X., LIU, X., LI, J., YANG, Y. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2-11, 2014.

KONTOYIANNIS, D.P.; MANTADAKIS, E. & SAMONIS, G. Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 4, p. 243-258, 2003.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, cavacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 989, n. 18, p. 8788-8795, 2008.

KOZLOVSKIĀ, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ADANIN, V. M.; ANTIPOVA, T. V.; OZESKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A.; GRÄFE, U. The fungus *Penicillium citrinum* Thom 1910 VKM FW-800 isolated from ancient permafrost sediments as a producer of the ergot alkaloids agroclavine-1 and epoxyagroclavine-1. **Microbiologia** v. 72, p. 723–727, 2003a.

KOZLOVSKIĀ, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; ADANIN, V. M.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A.; SCHLEGEL, B.; DAHSE, H. M.; GOLLMICK, F. A.; GRÄFE, U. Quinocitrinines A and B, new quinoline alkaloids from *Penicillium*

citrinum Thom 1910, a permafrost fungus. **The Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 488–491, 2003b.

KRISHNAN, S. G.; SIM TEE, N. W.; TAN, A. L.; TAN, A. M.; AAN KOH, M. J.; CHONG, C. Y. et al. A case of cutaneous penicilliosis in a child with acute myeloid leukaemia. **JMM Case Reports**, v. 2, n. 5, 2015.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 242-247, 2008.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311-320, 2004.

LA CAMERA, S. et al. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 267-284, 2004.

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

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2 ed. Rio de Janeiro: **Record**, 1993.

LAZZARINI, J. A. **Avaliação fitoquímica, potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

LEITE, N. F. et al. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LEE, S. H.; LEE, J. R.; LUNDE, C. S.; KUBO, I. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. **Planta Medica**, v. 65, n. 3, p.204-208, 1999.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of

synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LEWINSOHN, E.; ZIV-RAZ, I. I.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; LASTOCHKIN, E.; LARKOV, O.; CHAIMOVITSH, D.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; PICHERSKY, E.; SHOHAM, Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. **Plant Science**, v. 160, p. 27–35, 2000.

LI, R. K.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D.W.; MCGINNIS, M. R. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1734–1736, 2000.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, P. L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagartado-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, p. 377–378, 2009.

LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JARVENTAUS, H.; FALCK, G. C.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 617, n. 1 - 2, p. 33 - 45, 2007.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2011.

LIPINSKI, C. A. Drug discovery today. **Technologies**, v. 1, n. 1, p. 337-341, 2004.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 759–762, 1997.

LIU, D.; LIANG, L.; CHEN, J. In vitro antifungal drug susceptibilities of *Penicillium marneffe* from China. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, p. 776–778. doi:10.1007/s10156-012-0511-7.

- LOPEZ-ROMERO, J. C.; GONZÁLEZ-RÍOS, H.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- LUISI, S. B.; SANT'ANA FILHO, M.; CHIES, J. A. B.; BARBACHAN, J. J. D. Uso de anfotericina B como antifúngico no meio de cultura para células pulpareas humanas. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 1, p. 58-62, 2008.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIRO, V. F.; GRYNBERG, N. F.; MAGWA, M. L.; GUNDIDZA, M.; GWERU, N. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 103, p. 85-89, 2002.
- MAGWA, M. L.; GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; HUMPHREY, G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 103, p. 85-89, 2006.
- MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v.54, p.301–309, 2000.
- MANABE, M. Fermented foods and mycotoxins. **Mycotoxins**, v. 51, p. 25-28, 2001.
- MANDELL, G. L.; Petri Jr JA. Fármacos antimicrobianos. In: Goodman LS, Gilman A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; p. 777-89, 1996.
- MARASCHIN, M.; VEPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. Brasília, **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 24-28, 1999.
- MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.
- MCGREGOR, J. T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogens and mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MEDEIROS, C. I. S Atividades Antifúngica e Toxicológica *In Silico* dos Enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

MELETIADIS, J. et al. Concentration –Dependent synergy and antagonism within a triple antifungal drug combination against *Aspergillus* species: Analysis by a New Response Surface Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 6, p. 2053 - 2064, 2007.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.3, p. 354-355, 2009.

MENEZES, E. A. et al. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 415-420, 2012.

MINERVINI, F.; MONTAGNA, M. T.; SPILOTROS, G.; MONACI, L.; SANTACROCE, M. P.; VISCONTI, A. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.141-6, 2001.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660–667, 2014.

MOK, T.; KOEHLER, A. P.; YU, M. Y.; ELLIS, D. H.; JOHNSON, P. J.; WICKHAM, N. W. Fatal *Penicillium citrinum* pneumonia with pericarditis in a patient with acute leukemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2654–2656, 1997.

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

- MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 168–173, 2010.
- MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. Produtos Naturais estudos químicos e biológicos. Fortaleza, **UECE**, 2007.
- MOREIRA, L. B. Princípios para o uso racional de antimicrobianos. **Revista AMRIGS**, v. 48, n. 2, p. 118-20, 2004.
- MORI, T.; MATSUMURA, M.; KOHARA, T.; WATANABE, Y.; ISHIYAMA, T.; WAKABAYASHI, Y.; IKEMOTO, H.; WATANABE, A.; TANNO, M. & other authors. A fatal case of pulmonary penicilliosis. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 28, p. 341–348, 1987.
- MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi, **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 94–106, 2010.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.
- MOTSEI, M. L.; LINDSEY, K. L.; VAN STANDEN, J.; JAGER, A. K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 235-241, 2003.
- MUGHAL, A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. B. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 700, n. 1 - 2, p. 86 - 94, 2010.
- MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should be? **CMAJ**, v.180, p.371-372, 2009.
- MURRAY, P. R.; PFALLER, M. I. C. **Microbiología Médica**. 5.ed. Madrid: Elsevier España. p. 794, 2006.
- NABAVI, S. F.; LORENZO, A. Di; IZADI, M. et al. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7729-48, 2015.

NAITHANI R.; KUMAR, R. Voriconazole. **Indian Pediatrics**, v. 42, n. 12, p. 1207-1212, 2005.

NASCENTE, Patrícia da Silva et al. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 359-362, 2003. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000400015>.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, v. 551, p. 1-178, 2010.

NCBI. *Penicillium* spp. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>> (Acesso em: novembro de 2016).

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, vol. 7, no. 12, pp. 1797–1806, 2008.

NGUYEN, M. H.; YU, C. Y. In vitro comparative efficacy of voriconazol and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 471–472, 1998.

NIELSEN, C. K.; KJEMS, J.; MYGIND, T.; SNABE, T.; SCHWARZ, K.; SERFERT, Y.; MEYER, R. L. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 7–12, 2017.

NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE, N. M. Caracterização da dose letal mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** [online], v. 35, n. 6, p. 527-533, 1993.

NOSANCHUK, J. D.; CLEARE, W.; FRANZOT, S. P.; CASADEVALL, A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at sub inhibitory concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 233- 239, 1999as.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, p. 28-35, 2012. <http://dx.doi.org/10.2174/157489112799829684>.

NTP – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Proposed standard M27- NCCLS**, Villanova, PA, 1992.

NUNES, E. B. et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil, **Revista PanAmaz Saude**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

O'SHAUGHNESSY, E. M. et al. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1168-1176, 2006.

OAKLEY, K. L.; MOORE, C. B.; DENNING, D. W. In-vitro activity of voriconazole against *Aspergillus* spp. and comparison with itraconazole and amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 91–94, 1998.

OLIVEIRA, J. C. **Micologia médica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Control-Lab. 1999. p.196.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v.11, n.6, p.272–279, 2003.

OLIVEIRA, M. R. de; FERREIRA, C. C.; SOUZA, M. G. de; CHAVES, F. C. M. Antimicrobial activity of essential oils from *Piper hispidum* and *Piper hispidinervum*. **Anais do 8th Brazilian Symposium on Essential Oils - International Symposium on Essential Oils**, Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, L.B.S. BATISTA, A.H.M.; FERNANDES, F.C.; SALES, G.W.P.; NOGUEIRA, N.A.P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n. 2, p. 511-523, 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de ação**. 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf
Acesso em: 15 de jan. 2018.

ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In PEBERDY, J. F. [ed.], ***Penicillium and Acremonium***. [Biotechnology Handbooks] pp. 1-36. New York & London; Plenum Press, 1987.

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

_____. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, No. 129**. Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 129 - ENV/JM/MONO (2010) 20). Acesso em: 20 jan. 2017.

PALLU, A. P. de S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010, 130f, Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzymes-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. **Mutation Research**, v. 543, p. 181-89, 2003.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 503–35, 2009.

PATEL R. Antifungal agents - Part I- Amphotericin B preparations and flucytosine. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 73, p. 1205-1225, 1998.

PAULI, A.; KUBECZKA, K. H. Antimicrobial properties of volatile phenyl propanes. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1387–1394, 2010.

PEIXOTO, I. R.; ROSALEN, P. L.; FERREIRA, G. L. S.; FREIRES, I. A.; CARVALHO, F. G.; CASTELLANO, L. R.; CASTRO, R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v.73, p.179–185, 2017.

PEPELJNJAK, S.; EGVIC, M.; OZEGOVIĆ, L. Citrininotogenicidade de *Penicillium* sp. isolado de maçãs deterioradas. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 134-137, 2002.

PEREIRA, F de O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. de O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*", **Medical Mycology**, v.51, n.5, p. 507–513, 2013.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A. In vitro susceptibilities of *Candida* blood-stream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 3242–3244, 1998.

PFALLER, M. A. et al. Validation of 24-hour posaconazole and voriconazole MIC readings versus the CLSI 48-hour broth microdilution reference method: application of epidemiological cutoff values to results from a global *Candida* antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 1274–1279, 2011.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. In vitro activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 2608–2616, 2013. doi:10.1128/JCM.00863-13.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1367-1373, 2004.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; RODRIGUEZ, M.; GARCIA, D. Composition of leaf oil of *Piper auritum* H.B.K. grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, v. 10, p. 333–334, 1998.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454-1462, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Ensaio toxicológico de inocuidade. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 697-772.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000. p. 197.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and spoilage**. 3 ed. London: Blackie academic and Professional, 2009.

PIZZOLITTO, R. P.; BARBERIS, C. L.; DAMBOLENA, J. S.; HERRERA, J. M.; ZUNINO, M. P.; MAGNOLI, C. E.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; DALCERO, A. M. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. **Journal of Chemistry**, 2015 doi: 10.1155/2015/547925.

QUINDÓS G. et al. In vitro antifungal activity of voriconazole: New data after the first years of clinical experience. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 43, n. 3, p. 198-208, 2007.

RAJA, M. R. C.; SRINIVASAN, V.; SELVARAJ, S.; MAHAPATRA, S. K.; Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 5, 2015.

RADFORD, S. A.; JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W. In vitro studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p. 841–843, 1997.

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

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.; organizadores. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA; 2003. p.21-27.

RIZZA, V.; KORNFELD, J. M. Components of conidial and hyphal walls of *Penicillium chrysogenum*. **Journal of General Microbiology**, v. 58, p. 307-315, 1969.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The World Medicines Situation 2011—Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges**. WHO: Geneva, Switzerland, p. 1–14, 2011.

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

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

RONALD, J.; TALLARIDA. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 298, n. 3, p. 865 – 872, September, 2001.

SA, R. C. S.; ANDRADE, L. N.; OLIVEIRA, R. dos R. B. de O.; De SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459-80, 2014.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; McNICHOLAS, P. M. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2009–2015, 2006.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of Basil, oregano and yhyeme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1-33, 2016.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**, 7th edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium subgenus Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology (Baarn)**, v. 49, n. 49, p. 1-260, 2004.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **Food and Indoor Fungi**. CBS laboratory manual Series 2 CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, NL, 2010.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus Biverticillium. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**. v. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, F. M. **Modulação da homeostase de zinco em macrófagos como estratégia antifúngica ao patógeno *Cryptococcus neoformans***. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SARGO, C. R.; SILVA, J. V. da; SILVA, B. F. da; FILHO, E. R. Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009. Disponível em:< <http://sec.sbq.org.br/cdrom/1ra/resumos/T0881-1.pdf>> (Acesso em: novembro de 2016).

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.275 – 280, 2004.

SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE. E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629 - 799, 2000.

SAUTER, I. P.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; SILVA, L. A. A.; ROTT, M. B.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of ***Piper hispidinervum*** (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292–295, 2012.

SCREMIN, F. M. Indicação farmacêutica de fitoterápicos: uma análise dos conceitos legais em relação à prática profissional. **Revista Ciência & Cidadania**. v. 2, n. 1, 2016.

SCOTT, P. M. Other mycotoxins. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Orgs.). **Mycotoxins in Food**. Eds.; Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press: Boca Raton, p. 406-440, 2004.

SEQUEIRA, D. C. M. de; COSTA, G. L. da; BARBOSA, J. P. Isolamento e identificação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de *Penicillium* spp. **32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza – CE, 2009. Disponível

em:< http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/lista_area_QB.htm> (Acesso em: fevereiro de 2017).

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes — by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239 – 243, 2001.

SHERRY, M.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H.; GREIGE-GERGES, H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 4, p. 268-75, 2013.

SHREAZ, S.; SHEIKH, R. A.; BHATIA, R.; NEELOFAR, K.; IMRAN, S.; HASHMI, A. A.; MANZOOR, N.; BASIR, S. F.; KHAN, L. A. Antifungal activity of α -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. **Biometals**, v. 24, p. 923-933, 2011.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIDDIQUI, F.; KRISHNA, S. K.; TANDON, P. K.; SRIVASTAVA, S. Arsenic accumulation in *Ocimum* spp. and its effect on growth and oil constituents. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1071–1079, 2013. doi: 10.1007/s11738-012-1145-1.

SIANO, F.; GHIZZONI, C.; GIONFRIDDO, F.; COLOMBO, E.; SERVILLO, L.; CASTALDO, D. Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products. **Food Chemistry**, v. 81, p. 469–475, 2003.

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

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Editora alcance, p. USER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by Comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 941-947, 2002.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **FEBS Letters**. v. 32, p.143–145, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SITU, H.; BOBEK, L. A. In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1485–1493, 2000.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SPADER, T. B.; VENTURINI, T. P.; CAVALHEIRO, A. S.; MAHL, C. D.; MARIO, D. N.; LARA, V. M.; SANTURIO, J. ALVES, S. H. In vitro interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampin against *Fusarium* spp. **Mycoses**, v. 54, p. 131–136, 2009.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; BARTLETT, J. G.; EDWARDS, J. Jr. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 155-64, 2008.

SRINIVAS, N.; SANDEEP, K. S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B. N. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An *In Silico* Approach. **International Invention Journal Biochemistry Bioinformatics**, 2014.

STEPHENS, P. **Para OMS, resistência de bactérias a antibióticos é ‘ameaça global’**. **BBC**. Disponível em: www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/04/140430_resistencia_antibioticos_rb>.

Acesso em 01 janeiro de 2018.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 19–28, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. Roma, **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, v. 45, n. 3, p. 260 - 264, 2009.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica, **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAVARES, W. Azóis antifúngicos. In: TAVARES, W. editor. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, p. 869-86, 2001.

TETKO, I, V. Computing chemistry on the web. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 22, p. 1497–1500, 2005.

TINOCO, M. T.; MARTINS, M. R.; CRUZ-MORAIS, J.. Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. **Revista de Ciências Agrárias [online]**. v. 30, n. 1, p. 448-454, 2007.

TOLINS, J. P.; RAIJ, L. Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat: protective effect of calcium channel blockade. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, p. 98–102, 1991.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 7, p. 1231-49, jul. 2014.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**: 6. ed. São Paulo: Atheneu; 2015.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex vírus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.). Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1153–1158, 2007.

TRIGO, J. R.; LEAL, I. R.; MATZENBACHER, N. I.; LEWINSOHN, T. M. Chemotaxonomic value of pyrrolidine alkaloids in southern Brazil Senecio (SENECIONEAE: ASTERACEAE). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1011-1022, 2003.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; ADAMS, R. P.; LANDRUM, L. R.; ZANONI, T. A. Volatile leaf oils of caribbean Myrtaceae. I. Three Varieties of *Pimenta racemosa*

(Miller) J. Moore of the Dominican Republic and the commercial bay oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, p. 323–329, 1991.

TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. Academic, London, 1983.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2011.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561–1568, 2002.

URSU, O.; OPREA, T. I. Model-Free Drug-Likeness from Fragments. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 8, p. 1387-1394, 2010.

URSU, O.; RAYAN, A.; GOLDBLUM, A.; OPREA, T. I. Understanding drug-likeness. **Computational Molecular Science**, v. 1, n. 5, p. 760-781, 2011.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, J. C. BON, A. M. L.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 536, n. 1-2, p. 79 - 90, 2003.

VAN DER REST, M. E.; KAMMINGA, A. H.; NAKANO, A.; Anraku, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 304-322, 1995.

VASCONCELOS, I. R. A. **Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.** 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

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

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

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VERMA, A. Lead finding from *Phyllanthus debelis* with hepatoprotective potentials. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 1735-1737, 2012.

VENTURINI, T. P.; ROSSATO, L.; SPADERA, T. B.; TRONCO-ALVES, G. R.; AZEVEDO, M. I.; WEILERA, C. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 126–130, 2011.

VERWEIJ, P. E., M. MENSINK, A. J. M. M. RIJS, J. P. DONNELLY, J. F. G. M. MEIS, and D. W. DENNING. In-vitro activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 389–392, 1998.

VILELA, J.D. Revista Paulista de Medicina, v.89, p.115, 1977. In: PINTO, C. A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. Quimica Nova, v.25, suplemento:1, p.45-61, 2002.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v.78, p.343–371, 2014.

VITORINO, O. C. L. **Micotoxinas na Alimentação e na saúde animal e humana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Universidade de Açores. 2011.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2- 20, 2010.

WAGNER, J.; SCHIEBERLE, P.; GRANVOGL, M. Characterization of the key aroma compounds in heat-processed licorice (*Succus Liquiritae*) by means of molecular sensory science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 126–132, 2017.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C, S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. Swansea, **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153 - 162, 2008.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now **Mutation Research**, v. 437, p. 105-112, 1999.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. SOS-chromotest results in a boader context empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency and carcinogenic potency. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 270-305, 1996.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparasion of three diferente in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard and E-test. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v. 40, p.1914-1918, 1996.

WORLD HEATLH ORGANIZATION - **WHO Health**, Geneve: <http://www.who.int/en>, 2010. Acesso em outubro de 2016.

YAUK, Y. K.; CHAGNE, D.; TOMES, S.; MATICH, A. J.; WANG, M. Y.; CHEN, X.; MADDUMAGE, R.; HUNT, M. B.; ROWAN, D. D.; ATKINSON, R. G. The O-methyltransferase gene MdoOMT1 is required for biosynthesis of methylated phenylpropenes in ripe apple fruit. **The Plant Journal**, v.82, p. 937–950, 2015.

YAYLI, N.; YASAR, A.; GULEC, C.; USTA, A.; KOLAYLI, S.; COSKUNCELEBI, K.; KARAOGLU, S. Composition antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1741-1745, 2005.

XU, B. J.; JIA, X. Q.; GU. L. J.; SUNG, C. K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, p. 271-285, 2006.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 193–198, 2009.

ZARLAHA, A.; KOURKOU MELIS, N.; STANOJKOVIC, T.; KOVALA-DEMERTZI, D. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 9, p. 907 – 917, 2014.

ZEIGER, E.; MARGOLIN, B. H. The proportions of mutagens among chemicals in commerce. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 219–225, 2000.

ZELLER, A.; RYCHLIK, M. Character impact odorants of fennel fruits and fennel tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3686–3692, 2006.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 238- 248, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Resumo publicado no Anais do XXIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia.

TRABAJOS CIENTÍFICOS

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de las bajas temperaturas y de la radiación UV sobre la supervivencia de *C. jejuni* en el agua bajo condiciones controladas de laboratorio.

Se recolectaron dos muestras de 5 litros de agua de laguna de uso recreacional de la ciudad de Resistencia. Se preparó una suspensión 0,5 de Mc Farland de una cepa de *C. jejuni* con la cual se inocularon ambas muestras; una de ellas se colocó a 4°C y la otra se mantuvo a temperatura ambiente expuesta a la acción directa de la luz solar.

Utilizando secuencialmente membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm y 0,20 µm, 100 ml de cada muestra se filtraron a las 24 hs de su inoculación y semanalmente hasta que no se obtuvo desarrollo de *Campylobacter*.

Cada membrana filtrante fue colocada en caldo Bolton, incubada 4 hs a 37°C y luego 20 hs a 42°C en aerofilia. Transcurridas las 24 hs, se realizaron repiques en medio mCCDA, incubando durante 48 hs a 42°C en microaerofilia. A las colonias que desarrollaron en mCCDA se les realizó tinción de Gram, examen en fresco para observar la motilidad, pruebas de catalasa, de oxidasa y de crecimiento en aerofilia.

A partir de las muestras colocadas a 4°C se obtuvo desarrollo de *C. jejuni* hasta los 21 días.

La sobrevivencia de *C. jejuni* en las muestras que fueron expuestas a la acción directa de la luz solar fue menor a 24 hs, período en el cual la temperatura ambiente varió entre 26 y 35°C.

En el presente ensayo se observó que la supervivencia de *C. jejuni* en agua de laguna en condiciones controladas se ve favorecida por las bajas temperaturas e inhibida por la acción del componente UV de la luz solar.

JU-1301

Detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in water from aquaculture by qPCR.

MF Falcone-Dias¹, MV Rodrigues², JP Araújo Junior², RJ Silva², GS David¹

¹São Paulo State Agency for Agribusiness Technology (APTA), Brasil. ²Univ. Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

Aquaculture is probably the fastest growing food-producing sector and now accounts for nearly 50 percent of the world's fish that is used for food. In Brazil, aquaculture production has been increasing in the last years, where 82.3% of the total fish production comes from continental aquaculture, and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most farmed aquatic species. In Brazil, as well as in other tilapia producing tropical countries has been an increase of disease outbreaks in aquaculture, and some implicated the presence of *Francisella* spp. We studied six cage fish farms, localized in hydroelectrical reservoirs of São Paulo state, Brazil. In these fish farms were detected by histopathology and qPCR (real time polymerase chain reaction) *Francisella noatunensis orientalis* in Nile tilapia in a previous work. Thus, the main of this study was to detect this bacteria species in water. Water samples from six fish farms, and sampling points downstream and upstream the farms were collected (seventeen points total). The *iglC* gene for *Francisella* spp. was amplified by qPCR with the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems. Eight points of five fish farms yielded *Francisella*-positive results. The identity of the isolates was confirmed by Sanger sequencing as *Francisella noatunensis orientalis*, which is identified as worldwide emerging pathogen of fish. The presence of the potential pathogens in these waters can be a contamination source to farmed and wild fish, as well as a risk for humans by consuming contaminated water or fish. Therefore, assessment of fish pathogens in water can be an important tool for fish disease management and planning.

JU-1302

Evaluation of antifungal activity OF (+)- α -pinene against *Penicillium citrinum* strain of environmental origin.

SB Ferreira¹, TB Dantas², DF Silva², EO Lima²

¹Federal University of Campina Grande (UFCG), Cajazeiras, Paraíba, Brasil. ²Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Introduction: In many tropical and subtropical regions, the weather allows agricultural production throughout the year, however, these same conditions, high humidity and optimum temperatures are also conducive to the development of fungi. The *Penicillium citrinum* is usually found in subtropical and soils present less frequently in temperate regions soils. This microorganism is known to produce toxic secondary metabolites and has been isolated from various sources, tropical soils, cereals, spice closed and hypersaline environments.

Objectives: Because of this problem, this study aimed to evaluate the antifungal activity of (+) - α -pinene front of environmental strains and pattern of *P. citrinum* by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Materials and Methods: The (+) - α - pinene was purchased from Sigma - Aldrich (Brazil). For antifungal activity assays were selected a total of three *P. citrinum* strains isolated from the environment, obtained from the collection of Mycology Laboratory, and a standard strain INCQS (National Institute for Quality Control in Health) 40,011. Fungal suspensions were prepared and adjusted to a concentration of approximately 1x10⁶ CFU/ml. Assays were performed by broth microdilution technique broth, using plates 96 sterile holes and cover, with an initial concentration of 1.024 µg/ml and by means of a serial dilution ratio of two concentrations were obtained from 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 and 2 µg/ml. It was tested the interference of DMSO and Tween 80 in solvents growing said strains, besides the sterility of the medium, and the control microorganism. In parallel, the same procedure was performed for the standard antifungal variconazol. The plates were aseptically sealed and incubated at 28 ° C for 7 days, to perform the reading. The MICs for (+) - α -pinene and variconazol were defined as the lowest concentration able to visually inhibit fungal growth recorded in the holes compared to the growth control, and MIC50, which corresponds to the concentration which inhibited 50% of the tested strains. The experiments were performed in triplicate and the results expressed as the arithmetic mean of the MIC's obtained in the three tests and MIC50. Results: The (+) - α -pinene inhibited the growth of strains of *P. citrinum* INCQS 40011 at a concentration of 256 µg/ml; environmental strains, LM-03 and LM-21 at a concentration of 1024 µg/ml and the LM 157 strain in a concentration of > 1.024 µg/ml. Since MIC50 of the compound to the species was 1024 µg/ml. The standard antifungal, variconazol inhibited strains INCQS 40011, LM-30, LM-161 and LM-171 at concentrations of 256, 4, 2 and 2 µ/ml respectively. The culture medium is presented sterile and functional and solvents, DMSO and Tween 80 didn't affect the growth of the strains.

ANEXO B – Trabalho completo apresentado como comunicação oral e publicado no Anais do I Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO α -PINENO FRENTE A CEPAS CLÍNICAS DE *Penicillium citrinum* ISOLADAS DA PELE

Sávio Benvindo Ferreira¹; Tassiana Barbosa Dantas²; Daniele de Figueredo Silva³; Edeltrudes de Oliveira Lima⁴

1-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: saviobenvindo@gmail.com

2-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: tassianadantas@hotmail.com

3- Universidade Federal da Paraíba. E-mail: danielefigueredo31@gmail.com

4-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: edelolima@yahoo.com.br

RESUMO: O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados substratos, podendo causar infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista. Devido esta problemática, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do (+)- α -pineno frente à cepas de *Penicillium citrinum* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O (+) – α – pineno foi adquirido da Sigma – Aldrich (Brasil). Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 3 cepas de *P. citrinum* isoladas de infecções cutâneas e uma cepa padrão INCQS 40.011. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo. Como controle, foram testado os solventes, DMSO e Tween 80, a esterilidade do meio, o controle de micro-organismo e o antifúngico padrão, o variconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura. O (+)- α -pineno inibiu o crescimento das cepas de *P. citrinum* INCQS 40.011 na concentração de 256 μ g/ml; já as cepas clínicas, LM-161 e LM-171, a concentração do composto capaz de inibir o crescimento foi de 1024 μ g/ml e 128 μ g/ml, respectivamente, enquanto a CIM para a cepa LM 30 foi maior que 1.024 μ g/ml. Já a CIM₅₀ do composto para a espécie foi de 512 μ g/ml. O variconazol, inibiu as cepas testadas, o meio de cultura apresentou-se estéril e funcional e os solventes, DMSO e Tween 80, não interferiram no seu crescimento das cepas.

Palavras-chave: Monoterpenos, *Penicillium citrinum*, Atividade antifúngica, (+) – α – pineno.

INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, devido ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, observa-se, hoje, o

desenvolvimento de microrganismos cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais, o que pode ser um fator relevante para o surgimento de doenças infecciosas de difícil controle (Akinpelu, 2001). Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas teve um

grande impulso (Coelho et al., 2004). A utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas (Mesa-Arango et al. 2009). O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados substratos (Pitt & Hocking, 1997). Severas micotoxicoses, alergias e contaminações do ar são atribuídas a ele, comprometendo, assim, a saúde de humanos e animais (Samson & Frisvad, 2004). Pode também ser causador de infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista (Brasil, 2009). Desta forma, a busca de opções terapêuticas para o tratamentos de infecções causadas por este micro-organismo torna-se cada vez mais importante e necessária, sendo as plantas naturais importantes fontes destes compostos.

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferente classe de metabólitos secundários, tais como, cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (Cowan, 1999). Os

compostos antimicrobianos isolados das plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando direta ou indiretamente uma síntese proteica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (Singh e Shukla, 1984). Os componentes de diferentes óleos essenciais têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Dentre os monoterpenos, temos o α -pineno que possui dois isômeros ativos constitucionais: α e β -pineno. Ambos têm enantiômeros conhecidos na natureza como (-)- α -pineno (mais comum em pinheiros europeus), (+)- α -pineno (mais comum na América do Norte), (-)- β -pineno e (+)- β -pineno. A mistura racêmica está presente em alguns óleos essenciais, tais como óleo de eucalipto (Tabanca et al., 2007; Solomons e Fryhle, 2009; Yang et al., 2011). Alguns autores atribuíam à atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais a este monoterpeno (Aligiannis et al, 2001; Couladis et al, 2003; Leite et al 2007). Por outro lado, outros autores relataram que o α -pineno não apresenta atividade antimicrobiana (Angioni et al, 2003; Koutsoudaki; Krsek e Rodger, 2005; Yang et al, 2011). Para entender esses resultados controversos sobre o atividade

antimicrobiana do α -pineno, Silva et al (2012) avaliaram os efeitos antimicrobianos dos diferentes enantiômeros do α -pineno contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *Rhizopus oryzae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Esse estudo mostrou que apenas o enantiômero positivo desse monoterpene possui atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, e que essa ação a foi ainda mais promissora contra a formação de biofilme, o que torna α -pineno útil na formulação de estratégias para limitar *C. albicans* formação de biofilme.

Diante de indícios positivos da ação antimicrobiana do (+)- α -pineno, este trabalho teve como objeto de avaliar a atividade antifúngica do (+)- α -pineno frente à linhagens clínica isoladas de infecções cutâneas e cepa padrão IHCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) de *Penicillium citrinum*, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O monoterpene, (+) – α – pineno, foi adquirido da Sigma – Aldrich (Brasil) e dissolvido de

acordo com as recomendações do fabricante e as concentrações utilizadas nos respectivos experimentos foram obtidas após diluição. Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 3 cepas de fungos do gênero *Penicillium*, obtidas da coleção do Laboratório de Micologia e uma cepa padrão do IHCQS 40.011, as quais foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado (DIFCO Laboratories Ltda.), a temperatura ambiente (28° a 30°C) e a 4°C. As cepas fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura ASD, por 10-14 dias, a temperatura de 28 a 30°C, com a finalidade de atingirem o crescimento satisfatório. Para o preparo da suspensão das cepas, as colônias fúngicas recentes foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em “L”, as suspensões foram obtidas. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (Cleeland & Squires, 1991; Eloff, 1998; Hadacek & Greger, 2000). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 μ L do meio líquido Caldo Sabouraud dextrose (CSD) duplamente concentrado. Em seguida, 100 μ L da solução dos fitoconstituintes na concentração inicial de 1024 μ g/mL (também duplamente

concentrados), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E, por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2 $\mu\text{g/mL}$, de modo que na primeira linha da placa encontre-se a maior concentração e, na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados nas cavidades 10 μL do inóculo, de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, das cepas fúngicas, correspondendo cada coluna da placa a uma cepa. Para verificar a ausência de interferência dos solventes DMSO e Tween 80, que foram utilizados na preparação da solução dos monoterpenos, sobre os resultados, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 μL do CSD duplamente concentrado, DMSO (até 10%), Tween 80 (2%) e 10 μL da suspensão fúngica. Além disso, um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 μL do CSD duplamente concentrado, 100 μL de água destilada estéril e 10 μL do inóculo de cada cepa. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram adicionados 200 μL do CSD em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos. Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para o antifúngico padrão Variconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura. As CIMs

para o (+)- α -pineno e o variconazol foram definidas como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios e da CIM50, sendo considerado a CIM para o (+)- α -pineno e para variconazol como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle e CIM50 correspondente a concentração em que inibiu 50% das cepas ensaiadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios, observou-se que o (+)- α -pineno apresentou atividade frente as cepas testadas. O monoterpeno inibiu o crescimento da cepa ATCC IHCQS 40.011 na concentração de 256 $\mu\text{g/ml}$ e nas cepas clínicas LM-161 e LM-171 nas concentrações de 1024 $\mu\text{g/ml}$ e 128 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para a cepa LM-30 a CIM > 1024 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma, podemos dizer que a CIM do (+)- α -pineno foi $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ e sua CIM50 foi de 512 $\mu\text{g/ml}$. O antifúngico padrão, variconazol, inibiu as cepas ATCC IHCQS 40.011, LM-30, LM-161 e LM-171 nas concentrações 256, 4, 2 e 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. O meio de cultura

apresentou-se estéril durante o experimento e positivo quando inoculado com o inóculo fúngico, comprovando as condições de esterilidade e eficiência do meio em manter viáveis as cepas. Nos poços onde foram incubados o meio de cultura com os solventes DMSO e Tween 80 e o inóculo fúngico, observou-se crescimento normal do fungo constatando que os solventes não interferem no seu crescimento nas concentrações utilizadas de 10% e 2%, respectivamente.

Nóbrega (2013) pesquisou a atividade antifúngica do alfa-pineno, mistura racêmica, e não conseguiu determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente frente a cepas de *Rhizopus oryzae*, pois mesmo na maior concentração preconizada pelos estudos in vitro, houve crescimento fúngico. O maior valor da CIM detectado pela metodologia utilizada é de 1024 µg/mL.

Silva e colaboradores (2012) avaliaram a atividade do alfa-pineno e do betapineno sobre cepas de *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae* e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), porém, os mesmos avaliaram os enantiômeros separadamente, ou seja, avaliaram a ação do (+)- α -pineno, (-)- α -pineno, (+)- β -pineno e o (-)- β -pineno e concluíram que apenas os enantiômeros positivos do alfa-pineno e beta-pineno possuíam atividade antimicrobiana e os

enantiômeros negativos não mostraram atividade até o valor de 20mg/mL.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que o (+)- α -pineno possui atividade contra as cepas de *Penicillium citrinum*, tornando-o um candidato a pesquisas mais profundas a respeito do seu mecanismo de ação e atividade contra outras espécies de micro-organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Bark. **Fitoterapia**, Milano, 72 (3), 2001, 286-287.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. **J. Agric. Food Chem.**, 49, 2001, 811–815.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; RUSSO, M.T.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition of the essential oils of Juniperus from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 3073–3078, 2003.
- BRASIL (2009) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de fungos de

importância médica. Módulo VII. Brasília, DF.

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

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143. 2004.

COULADIS, M. CHINO, I.B.; TZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). **Phytother. Res.**, 17, 152–154, 2003.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

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

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

KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 7681–85, 2005.

LEITE, A. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online]. 2007, vol.43, n.1 [cited 2016-05-10], pp.121-126. Available from:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000100015&lng=en&nrm=iso)

93322007000100015&lng=en&nrm=iso

ISSN 1516-9332.

[http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000100015)

93322007000100015.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia Alba*

(Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (6): 878-884, 2009.

NÓBREGA, F.M. **Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae***. 2013. 65f. Monografia (Graduação em Farmácia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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

SAMSON, R.A; FRISVAD, J.C. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Utrecht, **Netherlands:Centraalbureau voor Schimmelcultures** 49, 2004. p.201-241.

SILVA, A.C.R. et al. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, 17, 2012, 6305-6316.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315, 1984.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica** – volume 2. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 518p.

TABANCA, N. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 2007, 8430–8435.

YANG, Z. et al. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: Effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, 2011, 16, 1044–1054.

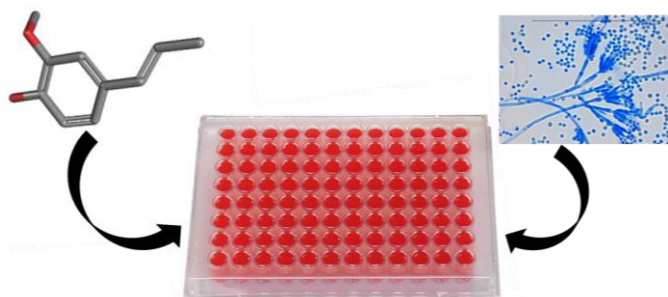
ANEXO C – Trabalho completo publicado na International Conference Series on Multidisciplinary Sciences (MOL2NET-03).

In Vitro Antifungal Effect of Isoeugenol Against *Penicillium citrinum* Strains

Sávio Benvindo Ferreira (saviobenvindo@gmail.com)^a, Tassiana Barbosa Dantas (E-mail: tassianadantas@hotmail.com)^a, Daniele de Figuerêdo Silva (E-mail: danielefigueiredo31@gmail.com)^a, Thamara Rodrigues de Melo (E-mail: th.rmelo@outlook.com)^a, Edeltrudes de Oliveira Lima (E-mail: edelolima@yahoo.com.br)^a.

^a Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa -PB.

Graphical Abstract



Abstract.

Human mycoses have controversial treatment, since the available antifungal drugs besides favoring the appearance of resistant isolates, can present great toxicity to the human organism. This fact has driven the search for more efficient, safe and natural therapeutic alternatives with the objective of reversing this scenario of resistance presented by pathogenic fungi, for this, new natural and effective alternatives, such as the use of plant extracts, natural compounds and semi-synthetic, have been extensively investigated for the development of new drugs. In view of this scenario, this study aims to evaluate the antifungal activity of isoeugenol in vitro against strains of *Penicillium citrinum*. For this, the broth microdilution technique was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) of isoeugenol and voriconazole. The concentrations by which the strains were submitted, 1024 $\mu\text{g/mL}$ to 0.5 $\mu\text{g/mL}$, were obtained by means of serial dilution at a ratio of two, so that in the first row of the plate is the highest concentration and in the last, the lowest concentration. Finally, 10 μL of the fungal inoculum of each isolate was added to the wells, where each strain was placed on a plate

column. MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting fungal growth visually verified by maintaining the original coloration of the medium. After reading the MIC, aliquots of 20 μ L of the supernatant from the wells where complete inhibition of fungal growth in the microdilution plates were observed were plated on Sabouraud dextrose agar plates. Plates were incubated, and MFC was considered the lowest concentration at which growth was less than 3 colonies. The assays were performed in triplicate and the geometric mean was calculated. The CIM of isoeugenol varied between 256 and 32 μ g/mL, being the highest MIC value for the LM-21 strain and the lowest value for the LM-02, LM-03, LM-08, LM-155, LM-157 and LM-161. The MIC range of voriconazole was 0.5 to 256 μ g/mL. The MFC of isoeugenol varied between 64-512 μ g/mL and for voriconazole it was 2 μ g/mL and above 1024 μ g/mL. In this way, we can conclude that isoeugenol presented an antifungal effect, which enables it as a potential antifungal drug, requiring complementary tests that clarify the mechanism of action involved in its antimicrobial activity.

Introduction

The indiscriminate use of antifungal compounds led to the emergence of multiresistant microorganisms for the drugs used in the medical routine. Antifungals considered first choice, especially for dermatophyte and nondermatophytic fungi and new opportunistic pathogenic fungi isolated from immunocompromised patients, have become intrinsically resistant, with resistance developed in response to drug exposure during pharmacological treatment [1-4].

This problem is further accentuated, since treatment with antifungal drugs available in addition to favoring the emergence of resistant isolates can present great toxicity to the human organism. Furthermore, the increase in the number of immunocompromised patients, associated with a greater resistance of fungal strains, poses a challenge to the pharmaceutical industry in the search for new therapeutic agents that present greater safety, efficacy and low toxicity [5-6].

Given this scenario, there was a greater search for more efficient, safe and natural therapeutic alternatives. As alternatives, plants are extremely rich sources of molecules with medicinal potential, however, only about 25% of the medicines produced in Brazil are of vegetable origin. However, the academic interest in this topic has been growing, especially due to indications of empirical origin [7-9]. Among the secondary metabolites produced by plants, we have the essential oils. They are volatile compounds extracted from plants, often as part of the natural defense of plants against microorganisms.

There is still a lot to learn about the mode of action of essential oils, but a common and important feature is their hydrophobicity, which allows interaction with the cell membrane, leading to leakage of important ions and other compounds [10].

Isoeugenol is an essential oil of the subgroup of phenylpropanoids, being chemically designated as 2-methoxy-4- (1-propenyl) phenol, it is naturally present in a naturally occurring phenolic constituent of clove oil, monkey orange, basil, the petunia flower [11-12]. It's used in perfumes, soaps, detergents, air purifiers and as a flavoring agent in cosmetics and food products. In addition, isoeugenol has a propenyl moiety and beneficial properties such as antioxidants and anti-inflammatory [13-16].

The aim of the present study was to verify the *in vitro* antifungal effect of isoeugenol against strains of *Penicillium citrinum*. The objective of the present study was to verify the *in vitro* antifungal effect of isoeugenol in the literature on the antimicrobial activities of essential oils and of the various biological properties of phytoconstituents.

Materials and Methods

Isoeugenol and voriconazole were purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The solutions were prepared at the time of the tests, dissolving them first in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 2% Tween 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil), and using sterile distilled water to perform the dilutions employed in the tests.

The fungal strains used were of the species *Penicillium citrinum* of clinical origin (LM-02, LM-03, LM-04, LM-08, LM-30, LM-145, LM-155, LM-157, LM-161, LM -171 and LM-278) and standard INCQS 40011 (National Institute for Quality Assurance in Health) and performed an inoculum a fungal suspension and adjusted 0.5 scale Mc Farland, which corresponds to approximately $1-5 \times 10^6$ CFU / mL [17-19].

For the determination of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicidal Concentration of isoeugenol and voriconazole were carried out using the broth microdilution technique [17-20]. Sterile, capped 96-well plates were used. At each well in the plate, 100 µl of doubly concentrated RPMI-1640 was added. Then 100 µl of the solution of the doubly concentrated products were dispensed into the wells of the first row of the plate. The concentrations by which the strains were submitted, 1024 µg / mL to 0.5 µg / mL, were obtained by means of serial dilution at a ratio of two, so that in the first row of the plate is the highest concentration and in the last , the lowest concentration. Finally, 10 µL of the fungal inoculum of each isolate was added to the wells, where each strain was placed on a plate column.

The plates were then aseptically closed and incubated at the temperature and time suitable for the reading. Subsequently, the results were observed observing the change of the RPMI medium. MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting fungal growth visually verified by maintaining the original (pink) coloration of the medium. The assays were performed in triplicate.

After reading the CIM, aliquots of 20 µL of the supernatant from the wells where complete inhibition of fungal growth in the microdilution plates were observed were seeded on Sabouraud dextrose agar plates and incubated. CFM was considered the lowest concentration in which growth was less than 3 colonies (approximately 99 to 99.5% of death activity). The assays were performed in triplicate and the geometric mean was calculated [21].

Results and Discussion

According to results obtained from the Minimum Inhibitory Concentration test described in Table 1, we can observe that the MIC of isoeugenol ranged between 256 and 32 $\mu\text{g/mL}$ among the strains, being the highest MIC value for the LM-21 strain and the lowest value for LM-02, LM-03, LM-08, LM-155, LM-157 and LM-161 strains.

Table 1 - Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration values for isoeugenol and voriconazole against *Penicillium citrinum* strains.

Strains of <i>Penicillium citrinum</i>	Isoeugenol ($\mu\text{g/mL}$)		Voriconazol ($\mu\text{g/mL}$)		*C1	**C2
	MIC	MFC	MIC	MFC		
	INCQS 40011	64	64	256		
LM-02	32	64	64	128	+	-
LM-03	32	64	0,5	2	+	-
LM-04	256	512	+	+	+	-
LM-08	32	64	0,5	+	+	-
LM-30	128	256	8	16	+	-
LM-145	64	128	32	32	+	-
LM-155	32	64	64	64	+	-
LM-157	32	64	1	4	+	-
LM-161	32	64	2	8	+	-
LM-171	64	64	2	8	+	-
LM-278	64	128	256	+	+	-

* C1 - Control of microbial growth: wells containing RPMI-1640 broth, DMSO (5%), Tween 80 (2%) and the inoculum of each strain, in the absence of the phytoconstituent or antifungal. ** C2 - Culture medium sterility control: wells containing RPMI-1640 broth, DMSO (5%), Tween 80 (2%), in the absence of the phytoconstituent or antifungal. (+): fungal growth. (-): absence of fungal growth.

After the MIC of isoeugenol was found for the strains of *P. citrinum*, the Minimum Fungicide Concentration (CFM) was determined. As described in Tables 2 and 4, we can observe that isoeugenol presented a CFM at the concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ for 8.33% of the strains, from 4 $\mu\text{g/mL}$ to 16.7% of the strains, 8 $\mu\text{g/mL}$ for 33.33% of the strains, from 16 $\mu\text{g/mL}$ to 41.67% of the strains, from 32 $\mu\text{g/mL}$ to 50% of the strains, from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 58.33% of the strains, from 128 $\mu\text{g/mL}$ to 66.67% of the strains and 512 $\mu\text{g/mL}$ to 100% of the samples.

Pizzolitto et al. [22] also screened strains of the filamentous fungus *Aspergillus parasiticus* using the phytochemicals: thymol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, creosol, m-Creosol, p-Creosol, o-Cresol and phenol. In this study, they found that isoeugenol had a MIC of 206 $\mu\text{g/mL}$, which was lower than those found in the other compounds tested, showing its potency against the microorganism, including carvacrol. This result corroborates the MIC values obtained in this study, since the highest MIC value for *Penicillium citrinum* was 256 $\mu\text{g/mL}$.

For the control of the experiments, voriconazole was used as standard antifungal. Although there are studies in the literature using voriconazole in several species of fungi, this study unprecedentedly carried out the determination and characterization of the antifungal activity of the substance against standard and clinical strains of *Penicillium citrinum*.

In the experiments performed in this study, the MIC of voriconazole had a considerable variation, showing a great difference of sensitivity between the strains used. The MIC range of antifungal was 0.5 to 256 µg/mL, and for LM-21 strain it was not possible to define the minimum inhibitory concentration because it was higher than 1024 µg/mL and the lowest MIC value was for strain LM-03 (Table 1).

Regarding CFM, we can observe that voriconazole presented a variation of 2 µg/mL at values higher than 1,024 µg/mL among the strains used, establishing a CFM at the concentration of 2 µg/mL for 8.33% of the strains. 4 µg/mL for 16.67% of the strains, from 8 µg/mL to 33.33% of the strains, from 16 µg/mL to 41.67% of the strains, from 32 µg / mL to 50% of the strains. 64 µg/mL for 58.33% of the strains and from 128 µg/mL to 66.67% of the strains.

It is important to note that for 33.33% of the samples it was not possible to detect CFM because there was growth above 1024 µg/mL (Table 1). Voriconazole was first introduced in clinical use in 1995 and approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States in May 2002 and in Brazil in July 2012 [23-25].

It is a new anti-fungal agent of the triazole class that shows promise for the treatment of a broad spectrum of fungal pathogens, including species of *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *Scedosporium apiospermum* among others [26-35].

Conclusions

The demonstration of the antifungal effect of the phenylpropanoic acid isoeugenol on strains of *P. citrinum* in vitro makes the molecule a candidate for a possible drug to be used as an agent in the fight against agricultural pests and in infections against other microorganisms.

References

1. Backes, G. L. et al. Potent antimicrobial agents against azole-resistant fungi based on pyridinohydrazide and hydrazomethylpyridine structural motifs. *Bioorganic & medicinal chemistry*, United States. v. 23, p. 3397-3407, 2015.
2. Agbulu, C. O., Iwodi, C., Onekutu, A. In vitro Susceptibility Test of Some Antifungal Drugs on Selected Dermatophytes and Yeasts Isolated from Patients Attending Hospitals in Makurdi Environ. *Microbiology journal*, Nigéria. v. 5, n. 1, p. 9-16, 2015.
3. Ghelardi, E. et al. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or crossresistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Pisa. v. 58, n. 5, p. 2825- 2829, 2014.
4. Tillotson, J., Tillotson, G. S. The Regulatory Pathway for Antifungal Drugs: A US Perspective. *Clinical Infectious Diseases*, Downingtown, PA. v. 61, n. 6, p. 678-683, 2015.
5. Fenner, R., et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci*, v. 42, p. 369-394, 2006.
6. Marin, R., Fuentesfria, A. M., Oliveira, L. F., Apel, M. A., JOAQUIM, A. R., Petrovick, P. R., Henriques, A. T. Solidago chilensis essential oil as a potential new 36 drug against resistant *Candida* isolates, without human blood cell damage and genotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Biology*, v. 5, n. 4, p. 307-313, 2015.

7. Martins, N.; et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 648-670, 2015.
8. Rodrigues, A. G., Amaral, A. C. F. Introdução. In: *Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p. 13-23.
9. Oliveira, F. C. S., Barros, R. F. M., Moita Neto, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.
10. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 (3), 223–253.
11. Kaur, G., Sultana, S., 2012. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2689–2695.
12. Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassao, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N., Pichersky, E., Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (26), 10128–10133, 2006.
13. Kadoma, Y., Atsumi, T., Okada, N., Ishihara, M., Yokoe, I., Fujisawa, S. Radical-scavenging activity of natural methoxyphenol vs. synthetic ones using the induction period method. *Molecules*, 12, 130–138, 2007.
14. Bertrand, F., Basketter, D. A., Roberts, D. W., Lepoittevin, J. P. Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: Possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 335–343, 1997.
15. Murakami, Y., Shoji, M., Hirata, A., Tanaka, S., Yokoe, I., Fujisawa, S. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Arch Biochem Biophys*, 434:326–332, 2005.
16. Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chem*, 118:256–265, 2010.
17. Cleeland, R., Squires, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, pp. 739-787, 1991.
18. Hadacek, F., Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11 (3), 137-147, 2000.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2^a ed., Document M38-A2, v. 28, n. 16, 2008.
20. Eloff, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 64: 711-713, 1998.
21. Espinel-Ingroff, A., A. Fothergill, J. Peter, H. G. Rinaldi, and T. J. Walsh. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *J. Clin. Microbiol.* 40:3204-3208, 2002.
22. Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M., Zunino, M. P., Magnoli, C. E., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., Dalcero, A. M. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *J. Chem.* 2015, 2015.
23. ANVISA – BRASIL: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE n° 1185, de 09 de julho de 2002, disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185_02re.htm. Acesso em 05/09/2017.

24. Kontoyiannis, D. P., Mantadakis, E., Samonis, G. Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. *J. Hosp. Infect.*, 53(4): 243-258, 2003.
25. Naithani R., Kumar, R. Voriconazole. *Indian Pediatr.*, 42(12): 1207-1212, 2005.
26. Radford, S. A., E. M. Johnson, and D. W. Warnock. In vitro studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:841–843, 1997.
27. Clancy, C. J., M. H. Nguyen. In vitro efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:573–575, 1998.
28. Cuenca-Estrella, M., B. Ruiz-Diez, J. V. Martinez-Suarez, A. Monzon, and J. L. Rodriguez-Tudela. Comparative in-vitro activity of voriconazol (UK-109-496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:149–151, 1999.
29. Espinel-Ingroff, A. In vitro activity of the new triazole voriconazol (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36:198–202, 1998.
30. Johnson, E. M., A. Szekely, and D. W. Warnock. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:741–745, 1998.
31. Kauffman, C. A., L. T. Zarins. In vitro activity of voriconazol against *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31:297–300, 1998.
32. Nguyen, M. H., C. Y. Yu. In vitro comparative efficacy of voriconazol and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:471–472, 1998.
33. Oakley, K. L., C. B. Moore, and D. W. Denning. In-vitro activity of voriconazole against *Aspergillus* spp. and comparison with itraconazole and amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:91–94, 1998.
34. Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, G. V. Doern, M. E. Brandt, and R. A. Hajjeh. In vitro susceptibilities of *Candida* blood-stream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3242–3244, 1998.
35. Verweij, P. E., M. Mensink, A. J. M. M. Rijs, J. P. Donnelly, J. F. G. M. Meis, and D. W. Denning. In-vitro activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:389–392, 1998.

ANEXO D – Capítulo publicado no livro “Saúde e Meio Ambiente: os desafios da interdisciplinaridade nos ciclos da vida humana”, ISBN: 9788592522148.

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

CAPÍTULO 13

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Sávio Benvindo FERREIRA ¹

Tassiana Barbosa DANTAS ¹

Daniele de Figueredo SILVA ¹

Paula Benvindo FERREIRA¹

Edeltrudes de Oliveira LIMA ²

¹ Doutorandos do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB;

²Orientadora/Professora do PgPNSB/UFPB

saviobenvindo@gmail.com

RESUMO: O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados substratos, podendo causar infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista. Devido esta problemática, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fungitóxica do (+)- α -pineno frente à cepas de *Penicillium citrinum* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 12 cepas de *P. citrinum* de origem clínica e ambiental e uma cepa padrão INCQS 40.011. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo. Como controle, foram testado os solventes, DMSO e Tween 80, a esterilidade do meio, o controle de micro-organismo e o antifúngico padrão, o voriconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura. O (+)- α -pineno inibiu o crescimento das cepas de *P. citrinum*, sendo

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

sua CIM para a espécie o valor de $\leq 1.024 \mu\text{g/ml}$ e o voriconazol teve sua CIM determinada em $1.024 \mu\text{g/ml}$. O meio de cultura apresentou-se estéril e funcional e os solventes não interferiram no crescimento das cepas. Desta forma, pode-se concluir que o (+)- α -pineno apresentou atividade frente as cepas testadas, necessitando de testes complementares que elucidem o mecanismo de ação da substância.

Palavras-chave: α – pineno. Atividade antifúngica. *Penicillium citrinum*.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, devido ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, observa-se, hoje, o desenvolvimento de micro-organismos cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais, o que pode ser um fator relevante para o surgimento de doenças infecciosas de difícil controle (AKINPELU, 2001). Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas teve um grande impulso (COELHO et al., 2004). A utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas (MESA-ARANGO et al. 2009). O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

substratos (PITT; HOCKING, 1997). Severas micotoxicoses, alergias e contaminações do ar são atribuídas a ele, comprometendo, assim, a saúde de humanos e animais (SAMSON; FRISVAD, 2004). Pode também ser causador de infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista (BRASIL, 2009). Desta forma, a busca de opções terapêuticas para o tratamentos de infecções causadas por este micro-organismo torna-se cada vez mais importante e necessária, sendo as plantas naturais importantes fontes destes compostos.

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferente classe de metabólitos secundários, tais como, cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999). Os compostos antimicrobianos isolados das plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando direta ou indiretamente uma síntese proteica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

Os componentes de diferentes óleos essenciais têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Dentre os monoterpenos, encontra-se o α -pineno, que possui dois isômeros ativos constitucionais: α e β -pineno. Ambos têm enantiômeros conhecidos na natureza como (-)- α -pineno (mais comum em pinheiros europeus), (+)- α -pineno (mais comum na América do Norte), (-)- β -pineno e (+)- β -pineno. A mistura racêmica está

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

presente em alguns óleos essenciais, tais como óleo de eucalipto (TABANCA et al., 2007; SOLOMONS; FRYHLE, 2009; YANG et al., 2011). Alguns autores atribuíam à atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais a este monoterpreno (ALIGIANNIS et al, 2001; COULADIS et al, 2003; LEITE et al 2007). Por outro lado, outros autores relataram que o α -pineno não apresenta atividade antimicrobiana (ANGIONI et al, 2003; KOUTSOUDAKI; KRSEK; RODGER, 2005; YANG et al, 2011). Para entender esses resultados controversos sobre o atividade antimicrobiana do α -pineno, Silva et al (2012) avaliaram os efeitos antimicrobianos dos diferentes enantiômeros do α -pineno contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *Rhizopus oryzae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicilina (MRSA). Esse estudo mostrou que apenas o enantiômero positivo desse monoterpreno possui atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, e que essa ação a foi ainda mais promissora contra a formação de biofilme, o que torna α -pineno útil na formulação de estratégias para limitar *C. albicans* formação de biofilme.

Diante de indícios positivos da ação antimicrobiana do (+)- α -pineno, este trabalho teve como objeto avaliar a atividade antifúngica do (+)- α -pineno frente à linhagens clínica, ambientais e cepa padrão INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) de *Penicillium citrinum*, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

2 MATERIAIS E MÉTODO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O monoterpeno, (+) – α – pineno, foi adquirido da Sigma – Aldrich (Brasil) e as soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-o primeiramente em Tween 80 a 2% e DMSO em uma proporção de até 10%, e utilizando água destilada estéril para alcançar as concentrações desejadas (CLEELAND; SQUIRES, 1991). Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 12 cepas de *Penicillium citrinum*, obtidas da coleção do Laboratório de Micologia e uma cepa padrão do INCQS 40.011, as quais foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado (DIFCO Laboratories Ltda.), a temperatura ambiente (28° a 30°C) e a 4°C.

Para manutenção das cepas selecionadas e realização dos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados Ágar Sabouraud Dextrose – ASD e Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO Laboratories Ltda, USA), os quais foram preparados conforme instruções do fabricante. Antes de sua utilização, os meios serão solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

As cepas fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura ASD, por 10-14 dias, a temperatura de 28 a 30°C, com a finalidade de atingirem o crescimento satisfatório. Para o preparo da suspensão das cepas, as colônias fúngicas recentes foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

% p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em “L”, as suspensões foram obtidas.

A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (FANEM), comparando-se e ajustando-se, posteriormente, sua turbidez com a escala 0,5 de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Por fim, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões serão ajustadas no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; SANTOS; HAMDAN, 2005).

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

Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; HADACEK; GREGER, 2000). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 μ L do meio líquido Caldo Sabouraud dextrose (CSD) duplamente concentrado. Em seguida, 100 μ L da solução dos fitoconstituintes na concentração inicial de 1024 μ g/mL (também duplamente concentrados), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E, por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2 μ g/mL, de

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e, na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados nas cavidades 10 μ L do inóculo, de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, das cepas fúngicas, correspondendo cada coluna da placa a uma cepa.

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

As CIMs para o (+)- α -pineno e o voriconazol foram definidas como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios e da CIM₅₀, sendo considerado a CIM para o (+)- α -pineno e para voriconazol como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle e

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

CIM₅₀ correspondente a concentração em que inibiu 50% das cepas ensaiadas (SANTOS; HAMDAN, 2005).

A atividade biológica dos produtos será interpretada, através de sua CIM, conforme os seguintes critérios: 50-100 $\mu\text{g/mL}$ = atividade excelente/ótima; 100-500 $\mu\text{g/mL}$ = atividade moderada; 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ = baixa atividade; maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$ = produto inativo (HOLETZ et al., 2002; HOUGHTON et al, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios, observou que o (+)- α -pineno apresentou atividade frente as cepas testadas. O monoterpreno inibiu o crescimento da cepa INCQS 40.011 na concentração de 256 $\mu\text{g/ml}$ e para as cepas ambientais a CIM variou entre 1.024 $\mu\text{g/ml}$ e $\leq 1.024 \mu\text{g/ml}$, conforme mostrado na Tab. (1).

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
 IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do (+) - α -pineno frente a cepas de *P. citrinum* de origem ambiental

(+) - α -pineno	Concentração Inibitória Mínima (CIM) $\mu\text{g/ml}$			
	Cepas			
	INCQS 40011	LM - 03	LM - 21	LM - 157
1.024	-	-	-	+
512	-	+	+	+
256	-	+	+	+
128	+	+	+	+
64	+	+	+	+
32	+	+	+	+
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
Meio	-	-	-	-
Micro- organismo	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+

Fonte: Experimento (Ferreira et al. 2016)

Fonte: Experimento (Ferreira et al. 2016)

Já para as cepas clínicas, a CIM variou entre 128 $\mu\text{g/ml}$ e $\leq 1.024 \mu\text{g/ml}$, conforme a Tab. (2).

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
 IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do (+) - α -pineno frente a cepas de *P. citrinum* de origem clínica

Concentração Inibitória Mínima (CIM) $\mu\text{g/ml}$								
(+) - α -pineno	Cepas							
	LM 02	LM 08	LM 30	LM 145	LM 155	LM 161	LM 171	LM 278
1.024	-	-	+	+	-	-	-	+
512	+	+	+	+	+	+	-	+
256	+	+	+	+	+	+	-	+
128	+	+	+	+	+	+	-	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Experimento (Ferreira et al. 2016)

Desta forma, pode-se afirmar que a CIM do (+)- α -pineno foi $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ e sua CIM₅₀ foi de $1024 \mu\text{g/ml}$, uma vez que

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

nesta concentração o composto inibiu o crescimento de 66,7% das cepas testadas.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima do Voriconazol frente a cepas de *P. citrinum* de origem clínica

Concentração Inibitória Mínima (CIM) $\mu\text{g/ml}$									
Voriconazol	Cepas								
	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM
	02	08	30	145	155	161	171	278	
1.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-	+
64	-	-	-	-	-	-	-	-	+
32	+	-	-	-	+	-	-	-	+
16	+	-	-	+	+	-	-	-	+
8	+	-	-	+	+	-	-	-	+
4	+	-	+	+	+	-	-	-	+
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+
1	+	-	+	+	+	-	+	+	+
0,5	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Meio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Experimento (Ferreira et al. 2016)

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

O antifúngico padrão utilizado no experimento, voriconazol, inibiu as cepas ATCC INCQS 40.011 na concentração de 256 $\mu\text{g/ml}$, e para as cepas ambientais e clínicas, a CIM variou entre ≤ 1.024 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$, como mostram as Tab. (3) e Tab. (4).

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Voriconazol frente a cepas de *Penicillium citrinum* de origem ambiental

Concentração Inibitória Mínima (CIM) $\mu\text{g/ml}$				
Voriconazol	Cepas			
	INCQS 40011	LM – 03	LM – 21	LM – 157
1.024	-	-	-	-
512	-	-	+	-
256	-	-	+	-
128	+	-	+	-
64	+	-	+	-
32	+	-	+	-
16	+	-	+	-
8	+	-	+	-
4	+	-	+	-
2	+	-	+	-
1	+	-	+	-
0,5	+	-	+	+
Meio	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+

Fonte: Experimento (Ferreira et al. 2016)

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Com isso, a CIM do voriconazol foi determinada na concentração de 1.024 $\mu\text{g/ml}$ para a espécie estudada.

Foi observado também que o meio de cultura apresentou-se estéril durante o experimento e positivo (crescimento) quando inoculado com o inóculo fúngico, comprovando as condições de esterilidade e eficiência do meio em manter viáveis as cepas. Nos poços onde foram incubados o meio de cultura com os solventes DMSO e Tween 80 e o inóculo fúngico, observou-se crescimento normal do fungo constatando que os solventes não interferem no seu crescimento nas concentrações utilizadas de 10% e 2%, respectivamente, como mostrado nas Tab. (1), Tab. (2), Tab. (3) e Tab. (4).

Algumas cepas de *P. citrinum* apresentarão uma CIM elevada, em comparação a cepa padrão INCQS aqui utilizada. Esse perfil parece ser uma característica comum em algumas cepas da espécie, visto que Paiva (2013) também observou um perfil de resistência diferenciado em outros isolados de *P. citrinum*. No estudo, foram testadas 16 compostos sintéticos contra *P. citrinum*. Destes, 4 tiveram sua CIM determinada em 500 $\mu\text{g/ml}$ e 12 compostos tiveram sua CIM maior que 500 $\mu\text{g/ml}$. Destes as 6 espécies fúngicas testadas, o *P. citrinum* foi o que teve a menor sensibilidade diante das substâncias sintéticas analisadas no estudo, o que demonstra uma resistência a compostos antifúngicos.

O estudo aqui realizado é pioneiro pois, até a presente data, não foi publicado na literatura nenhuma pesquisa que avaliasse a ação do enantiômero positivo do alfa-pineno frente a cepas de *P. citrinum*, nem a outra cepa do gênero.

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Alguns estudos sobre o monoterpene aqui testado são disponibilizados na literatura. Nóbrega (2013) pesquisou a atividade antifúngica do alfa-pineno, a mistura racêmica, e não conseguiu determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente frente a cepas de *Rhizopus oryzae*, pois mesmo na maior concentração preconizada pelos estudos in vitro, houve crescimento fúngico. O maior valor da CIM detectado pela metodologia utilizada é de 1.024 $\mu\text{g/mL}$.

Silva et al. (2012) avaliaram a atividade do alfa-pineno e do betapineno sobre cepas de *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae* e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), porém, os mesmos avaliaram os enantiômeros separadamente, ou seja, avaliaram a ação do (+)- α -pineno, (-)- α -pineno, (+)- β -pineno e o (-)- β -pineno e concluíram que apenas os enantiômeros positivos do alfa-pineno e beta-pineno possuíam atividade antimicrobiana e os enantiômeros negativos não mostraram atividade até o valor de 20 mg/mL.

Outro ponto que pode-se destacar nesta pesquisa é a determinação da Concentração Inibitória Mínima do voriconazol para a espécie de *P. citrinum*. Este é o primeiro registro na literatura que define a CIM do antibiótico para a espécie.

Duarte et al. (2012) realizou a determinação da CIM do voriconazol para as espécies *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme*, *Candida carpophila* (syn. *C. guilliermondii*), *Galactomyces candidum* e *Cryptococcus laurentii*, encontrando as faixas de CIM de 30 $\mu\text{g/mL}$ para *T. asahii*, 30 – 60 $\mu\text{g/mL}$ para para *T. coremiiforme*, 60 $\mu\text{g/mL}$ para *C. laurentii*, 60 – 125 $\mu\text{g/mL}$ para *C. carpophila* e 125 – 250 $\mu\text{g/mL}$ para *G. candidum*. Esses valores são menores do que o encontrado em nosso estudo, 1.024 $\mu\text{g/mL}$, mostrando mais uma vez uma maior

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA *IN VITRO* FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum* resistência da espécie fúngica utilizada neste estudo frente as substâncias antifúngicas testadas.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que, mesmo diante do perfil de resistência do micro-organismo utilizada no estudo, o (+)- α -pineno possui atividade contra as cepas de *Penicillium citrinum*, tornando-o candidato a pesquisas mais profundas a respeito do seu mecanismo de ação e atividade contra outras espécies fúngicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Bark. *Fitoterapia*, Milano, 72 (3), 2001, 286-287.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. **J. Agric. Food Chem.**, 49, 2001, 811–815.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; RUSSO, M.T.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 3073–3078, 2003.
- BRASIL (2009) **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de fungos de importância médica. Módulo VII. Brasília, DF.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: Lorian, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, pp. 739-787, 1991.
- COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143. 2004.
- COULADIS, M. CHINO, I.B.; TZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.). **Phytother. Res.**, 17, 152–154, 2003.

- O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
 IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*
- COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.
- DUARTE, L.A.; PAGNOCCAF.C.; SILVA, A.; LACAU, L.R.S. Susceptibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol por leveduras isoladas de *Cyphomyrmex transversus* (Emery). In: XXIV Congresso de Iniciação científica da Unesp, 2012, Rio Claro. **Anais XXIV Congresso de Iniciação científica da Unesp**, 2012..
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, 64 (8), 711-713, 1998.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, 11 (3), 137-147, 2000.
- HOLETZ, F.B.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97 (7), 1027-1031, 2002.
- HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, 110, 391-400, 2007.
- KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 7681–85, 2005.
- LEITE, A. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm. [online]**. 2007, vol.43, n.1 [cited 2016-05-10], pp.121-126. Available from:
 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000100015&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1516-9332.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000100015>.
- MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils PF *Colombian Lippia Alba* (Mill.) N.E. **Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104 (6): 878-884, 2009.
- NÓBREGA, F.M. Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae*. 2013. 65f. Monografia (Graduação em Farmácia) -**Universidade Federal da Paraiba**, João Pessoa.
- PAIVA, R.O. Avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sint ticas frente a fungos micotoxig nicos de interesse agropecuário. Tese (doutorado) – **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de**

O ENANTIÔMERO POSITIVO DO α -PINENO APRESENTA AÇÃO FUNGITÓXICA
IN VITRO FRENTE A CEPAS DE *Penicillium citrinum*

Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.

90 fl. Seropédica – RJ, 2013.

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

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

SAMSON, R.A; FRISVAD, J.C. *Penicillium subgenus Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Utrecht,**

Netherlands:Centraalbureau voor Schimmelcultures 49, 2004. p.201-241.

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

SILVA, A.C.R. et al. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, 17, 2012, 6305-6316.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*, v.55, p.313-315, 1984.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica** – volume 2. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 518p.

TABANCA, N. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 2007, 8430–8435.

YANG, Z. et al. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: Effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, 2011, 16, 1044–1054.

ANEXO E – Artigo submetido ao periódico Current Topics in Medicinal Chemistry (CTMC).

In Silico* and *In Vitro* Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum

Sávio Benvindo Ferreira*^a, Tassiana Barbosa Dantasa^a, Daniele de Figuerêdo Silva^a, Paula Benvindo Ferreira^a and Edeltrudes de Oliveira Lima^a,

^aPostgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Abstract: This increase in the prevalence of drug-resistant pathogens occurs at a time when the discovery and development of new antimicrobial agents occur slowly. In this context, the objective of this study was to investigate the antifungal activity of isoeugenol, a phenylpropanoid, by *in vitro* and *in silico* assays against *Penicillium citrinum* strains. For *in silico* analysis, the software PASS online, Molinspiration and Osiris were used. For the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicide Concentration (MFC) of isoeugenol and voriconazole were carried out using the broth microdilution technique. PASS online has shown that isoeugenol has the opportunity to present antiseptic, antifungal, antibacterial, antimycobacterial activities. Molinspiration showed that the phytoconstituent has good potential for oral bioavailability. In the analysis with the Osiris program, it was demonstrated that isoeugenol has low irritant and tumorigenic risk. The MIC of isoeugenol varied between 256 and 32 µg/mL, MIC₅₀ of 64 µg/mL and MIC₉₀ was 128 µg/mL. The MFC₅₀, MFC₉₀ and MFC of the isoeugenol for *P. citrinum* species were, respectively, 64, 256 and 518 µg/mL. After analysis, it was verified that the isoeugenol have bactericidal effect against the strains of *P. citrinum*. After these results, it is important to discover the mechanism of action involved in the antifungal action of the compound, as well as *in vitro* and *in vivo* toxicity tests. The abstract should not exceed 250 words for review papers summarizing the essential features of the article.

Keywords: Phenylpropanoids, isoeugenol, *in silico* analysis, antifungal activity, antimicrobial activity, bioavailability, toxicity.

1. INTRODUCTION

The great quantity and diversity of these secondary vegetable metabolites has been attracting the interest of researchers from different areas of science, who see in plants a promising source for the discovery of molecules with potential human use, with significant commercial value in the pharmaceutical, food, agronomic and cosmetic [1]. These studies are important for the discovery of compounds with biological activities, since their structural diversity of these substances is greater than that presented by most of the combinatorial strategies performed in heterocyclic compounds [2]. These characteristics give these compounds a greater possibility of becoming tools in the fight against diseases, among them microbial infections.

This possibility is very useful in view of the current scenario of effective drug shortages in the fight against fungal infections. Since the discovery of antimicrobial compounds in the 20th century, antimicrobial agents have substantially reduced the threat of infectious diseases. The use of these substances associated with improvements in sanitation, housing, food production and immunization programs has led to a dramatic reduction in human morbidity and mortality. However, due to several factors, including the inadequate use of antibiotics and the exchange of genetic resistance information among species of the most diverse

microorganisms, multiresistant strains are increasingly emerging [3-5].

This increase in the prevalence of drug-resistant pathogens occurs at a time when the discovery and development of new antimicrobial agents occur slowly [6]. Consequently, there is concern that in the near future it may be an increasing number of potentially intractable infections. To aid and direct research in this area, the computational analysis of the molecules are performed previously to select the candidates with greater probability of activity and less risk in the *in vivo* use. The use of computational tools, *in silico* study, brought more speed and efficiency in the development of new drugs.

The *in silico* drug discovery process involves the identification of the target of interest (receptor structure), the choice of compounds from inhibitor bases, evaluation of protein interaction with possible inhibitors, and calculation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of possible inhibitors [7]. Thus, *in silico* drug discovery implementations prove to be beneficial as they accelerated the progression of bringing a drug to the market by reducing the cost and time of production required to perform such *in vitro* screens [8,9]. In this context, the objective of this study was to investigate the antifungal activity of isoeugenol, a

phenylpropanoid, by *in vitro* and *in silico* assays against *Penicillium citrinum* strains.

2. ORIGIN AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS

Essential oils are made up of volatile organic substances present in various plant organs (leaves, barks, roots, fruits, and flowers) [10]. They are originated from the secondary metabolism of plants and have great importance as taxonomic markers in the different levels of hierarchy, including in the investigation of taxonomic, evolutionary and intraspecific problems [11,12]. Volatile oils obtained from different organs of the same plant may have chemical composition, physical-chemical characteristics and very different odors. As well as the chemical composition of a volatile oil, extracted from the same organ of the same vegetal species, can vary significantly, according to the time of collection, climatic and soil conditions. Therefore, the environment in which the plant develops and the type of crop also influence its chemical composition [1].

In plants, essential oils play important ecological roles, acting as chemical signals for the communication between species, protecting against pathogenic microorganisms, herbivores, attracting pollinating animals and seed dispersers, thus promoting the perpetuation of species and also contributing to the odor of leaves, flowers and fruits [40,41]. Among the chemical constituents of essential oils, we mainly have terpenes and phenylpropanoids, in addition to alkaloids and polyketides [15]. The formation of the essential oils compounds occurs from the chemical derivation of terpenoids, originating from mevalonic acid, or phenylpropanoids, derived from shikimic acid [16,1]. Although terpenes account for most of the components and occur much more often and abundantly, where the phenylpropanoids are present they provide an essential and significant oil taste and odor. Biogenetically, terpenoids and phenylpropanoids originate from different precursor metabolisms and are generated by completely different biosynthetic routes [17].

Phenylpropanoids are natural substances widely distributed in plants and constituted by an aromatic ring attached to a chain of three carbons and biosynthetically derived from the shikimic acid. Although they are not common constituents of essential plant oils, the essential oils of certain species contain abundant or significant proportions of such compounds. When they occur, their nature and properties significantly alter the sensory characteristics of the oil. These compounds play important roles in the plant as performing a satisfactory reproduction of the plant and in response to plant stress as light variation, mineral treatment and as a form of resistance to pests. The best known are eugenol, methyl eugenol, myristicina, elemicina, chavicol, methyl chavicol, dilapiol, anethole, estragol, apiol [17-20].

Biochemical pathways for the synthesis of phenylpropanoids, such as eugenol, isoeugenol and other similar compounds, are not fully elucidated. Previous studies have indicated that the initial stages of the biosynthetic pathway of these substances are shared with the lignin-lignan biosynthetic pathway until the formation stage of phenylpropenol (monolignol). Regardless of the steps to follow, the unusual nature of the reduction reaction to remove oxygen functionality in C-9 resisted elucidation,

largely due to lack of biochemical precedence. In addition, plant synthesis of isomeric forms of the product of such a reaction, for example eugenol and isoeugenol, adds another layer of biochemical complexity [21].

Isoeugenol belongs to a group of volatile compounds derived from plants, the phenylpropenes, which are biosynthesized from phenylalanine, and are slightly soluble in water and miscible with ethanol and ether [21-23]. It is a fragrant essential oil found in many different plants. It was extracted, mixed with eugenol and other volatiles of plants, calamus, salted, basil, ylang-ylang, cloves, tuberose, jonquil, nutmeg, tobacco, sandalwood, dill seeds, mace, gardenia, petunia and other flowers [24-27]. It is commercially produced by isomerization of eugenol, which occurs in oils isolated from clove, pepper, bay leaf and cinnamon [28]. Synthetic conversion involves the heating of eugenol with caustic potassium [29], with metals of group viii or its compounds, such as rhodium chloride [30] or with more ecological mgal hydrotalcite [31].

Isougenol, as well as eugenol, are position isomers with respect to the C = C aliphatic bond. Few studies in the literature report the antifungal activity of this compound, since the great majority of reports address the antifungal activity of eugenol, which is present as a phytoconstituent in a large variety of essential oils, such as *Myristica fragrans* Houtt, *Cinnamomum verum* J. Presl, *Ocimum gratissimum* Forssk, *Ocimum basilicum* L. and *Eugenia caryophyllata* [32]. And its antibacterial, antimycotic, anti-inflammatory, anesthetic, antiseptic, antioxidant, antineoplastic and repellent properties have been proven [33].

However, several studies have demonstrated antifungal activity of phenolic compounds. Galucci et al. [34] tested carvacrol, thymol, ortho-cresol, meta-cresol, para-cresol, eugenol, creosol, guaiacol, vanillin, estragol, p-cymene and methyl eugenol against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*. They observed that the compounds with the highest anti-candida activity were carvacrol, thymol and eugenol.

Pizzolitto et al. [35] tested phenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, creosol, thymol, carvacrol, eugenol, isoeugenol and vanillin against *Aspergillus parasiticus*. In this assay, isoeugenol showed the lowest Minimum Inhibitory Concentration (MIC), followed by carvacrol and thymol. The compounds creosol, p-cresol, o-cresol, m-cresol, vanillin and phenol did not inhibit the growth of this species.

Another study verified the antifungal efficacy of 21 phenolic components of essential oils and plant substances against filamentous fungi of the genus *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Among the compounds, 15 presented an antifungal effect against these microorganisms. The phytoconstituents thymol, carvacrol and isoeugenol were evaluated as the most effective fronts of fungal strains [36].

The antifungal activity demonstrated by phenolic compounds has a characteristic action, based on their interaction with the plasma or mitochondrial membranes. Another action of these substances is based on a steric descriptor that could explain the possibility of some phenolic compounds being biotransformed in methylene quinones by *Candida* species, for example [34].

3. MATERIALS AND METHOD

3.1 Test substance and antifungal drugs

Isoeugenol, voriconazole and amphotericin B were purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The solutions were prepared at the time of the tests, dissolving them first in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 2% Tween 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil), and using sterile distilled water to perform the dilutions employed in the tests.

3.2 Culture mediums

The culture media RPMI-1640-L-glutamine (without sodium bicarbonate) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) and Sabouraud Agar Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) were used for evaluation of the antifungal activity). Culture media were prepared according to the manufacturer's instructions and sterilized by autoclaving at 121°C, 1 atm for 15 minutes.

3.3 Microorganisms

Strains of the filamentous fungus *Penicillium citrinum* of clinical and standard origin were used. The standard strain INCQS 40011 (National Institute of Quality Control in Health) used as reference came from the Mycology Laboratory Laboratory/Department of Pharmaceutical Sciences / CCS / UFPB. The strains of clinical origin (LM-02, LM-04, LM-08, LM-30, LM-145, LM-155, LM-157, LM-161, LM- are part of the Collection of the Laboratory of Microbiology. The strains were maintained on Sabouraud dextrose agar (ASD) at a temperature of 4 °C until the time of preparation of the inoculum for the tests.

3.4 Fungal inoculum

In order to prepare the inoculum, the fungal strains were inoculated in Sabouraud dextrose broth (CSD) and incubated at room temperature (28-30 ° C) for 3 to 5 days. After this period, an aliquot was seeded in Sabouraud Dextrose Agar and after the incubation period, a fungal suspension was adjusted and adjusted to a scale of 0.5 Mc Farland, which corresponds to approximately $1-5 \times 10^6$ CFU/mL [37].

3.5 In silico analysis

3.5.1 PASS online

The "Prediction of Activity Spectra for Substances" - PASS online is software designed to evaluate the overall biological potential of an organic molecule on the human organism, according to its structural arrangement. The probabilities provided by the program are generated by querying a database (www.way2drug.com/passonline) made up of other organic molecules with defined biological activity, thus providing simultaneous predictions of biological activities based solely on the chemical structure of the compound organic [38,39].

The spectrum of biological activities of a chemical compound is the set of different types of biological activities, which reflect the results of interaction of the compound with various biological entities. In this way, the online PASS provides several facets of the biological action of a compound, obtaining the indexes Pa (probability of being active) and Pi (probability of being inactive) by estimating

the categorization of a potential compound to belong to the subclass of active or inactive compounds, respectively [40].

3.5.2 Molinspiration

Molinspiration Molecule Viewer software (www.molinspiration.com) allows the perception of molecules using sophisticated Bayesian statistics, which combine the structures and properties of the representative active compound in the specific target with the structures of inactive molecules, to recognize characteristics of the substructure typical of the active molecules. This program is capable of evaluating the molecule providing several parameters, among them the ability to predict the probability of the compound to act on certain pharmacological targets [41,42].

In addition, the software is capable of reporting important physico-chemical parameters in predicting the theoretical oral bioavailability of the drug under study. These parameters are: total polar surface area (TPSA), partition coefficient (water / oil) - cLogP, molecular weight, number of hydrogen acceptors - nALH, number of hydrogen donors - nDLH [43,44].

To verify whether the compound can be planned for oral administration, an analysis based on the "Rule of Five" was performed, as described by Lipinski [45]. In this rule, if the molecule presents scores of at least 3 parameters meeting the requirements (TPSA <140 Å²; cLogP ≤ 5, molecular weight <500 daltons; nALH ≤ 10; nDLH ≤ 5), the molecule will theoretically present a good oral bioavailability.

3.5.3 Osiris

To verify the toxicity and theoretical pharmacokinetic parameters of isoeugenol, the compound was subjected to the *in silico* study of ADMET parameters (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) using the Osiris program. This online tool (www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html) is able to predict the toxicity of the substance by comparing its chemical structure with molecular fragments whose definite toxicity is found in a database. The results of toxicity are expressed as mutagenic, tumorigenic, irritability and effects on the reproductive system [43,44].

After analysis, the software provided the potential of druglikeness and drug-score that are related to topological descriptors, and other properties such as cLogP and molecular mass, in addition to theoretical analysis of mutagenic, tumorigenic, irritant and reproduction effects. The results obtained were then classified from a scale of 1 to 3, where: 1 means absence of toxicity, 2 moderate toxicity and 3 severe toxicity.

3.6 Antibacterial Activity assay

3.6.1 Minimum Inhibitory Concentration

For the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of isoeugenol and voriconazole, they were carried out using the broth microdilution technique [37]. Concomitantly, viability control of the strains tested (100 µL of the same doubly concentrated RPMI-1640 and 10 µL of the inoculum of each strain) was performed. In order to verify the interference of the emulsifying agents used in phytoconstituent dilution, a control was made in which 100

μL of RPMI-1640, DMSO (5%), Tween 80 (2%) and 10 μL of the suspension. A sterility control of the medium was also performed, where only 100 μL of RPMI-1640 was placed into wells without the fungal suspension.

The plates were aseptically closed and incubated at 25 ± 2 °C for 5 days for reading. Subsequently, the results were observed observing the change of the RPMI medium. MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting fungal growth visually verified by maintaining the original (pink) coloration of the medium. The assays were performed in triplicate.

3.6.2 Minimum Fungicide Concentration

After reading the CIM, aliquots of 20 μL of the supernatant from the wells where complete inhibition of fungal growth in the microdilution plates were observed were seeded on Sabouraud dextrose agar plates. Plates were incubated at 25 ± 2 °C for 5 days. CFM was considered the lowest concentration in which growth was less than 3 colonies (approximately 99 to 99.5% of death activity). The assays were performed in triplicate and the geometric mean was calculated [46].

3.7 Statistical analysis

Experiments will be performed in triplicate and expressed as the mean \pm standard error of the mean (e.p.m), using the Prisma 5.0 software.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1 *In silico* analysis

After analysis of the probable biological activities of isoeugenol through the online PASS, more than 522 activities with more than 30% of the probability of being active ($\text{Pa} > 30\%$) were obtained, of this total, 49 activities have a high probability of occurrence ($\text{Pa} > 70\%$). Among the 522 activities with a chance of being performed by isoeugenol, we highlight the antimicrobials: antiseptic (Pa : 0.571 and Pi : 0.009), antifungal (Pa : 0.492 and Pi : 0.032), antibacterial (Pa : 0.379 and Pi : 0.035), antimycobacterial (Pa : 0.478 and Pi : 0.022) and antihelminthic (Pa : 0.335 and Pi : 0.028), mainly against nematoda (Pi : 0.562 and Pa : 0.009).

These antimicrobial activities can be attributed to several characteristics of isoeugenol reported in the literature. Bhatia et al. [47] found that the antifungal activity of isoeugenol against strains of *Candida* spp. is due to the ability to inhibit H^+ pumping through plasma membrane ATPase and alteration of fungal membrane permeability. These data are supported by the results of the online PASS analysis, which demonstrates that the phytoconstituent has a considerable chance of exerting instability in the fungal plasma membrane as a membrane permeability potencilizer (Pa : 0.408 and Pi : 0.054) and membrane integrity antagonist (Pa : 0.316 and Pi : 0.105). These data support the hypothesis advocated by [48,49] that attribute to isoeugenol the destabilizing action of the fungal membrane due to its chemical structure.

This parameter relates the potential of hydrogen bonds of a particular molecule and is also a good predictor of drug transport properties across cell membranes, including uptake

into the intestine, in caco-2 cells that correspond to an important carcinoma cell of the human colon mimicking the gastrointestinal epithelium, blood-brain barrier and bioavailability. Volume calculation is based on contributing groups. The number of rotational bonds measures molecular flexibility, which is a good descriptor of drug absorption and bioavailability. TPSA has been shown to be an excellent descriptor for the characterization of drug absorption, including intestinal absorption, bioavailability and blood-brain barrier penetration. Another important feature for the bioavailability of a compound is the flexibility of the molecule, which may be associated with the number of rotatable bands nROTB, which corresponds to the number of single bonds, outside a ring, attached to a non-terminal atom. The prediction results for isoeugenol can be visualized in **Table 1**.

According to Veber et al [50], compounds with a TPSA less than or equal to 140 \AA^2 and a nROTB less than or equal to 10 presented a high probability of good oral bioavailability. Therefore, isoeugenol fits this profile, since the TPSA was 29.26 \AA^2 and the nROTB was 2, presenting a high probability of being used orally. These criteria are confirmed in practice, since amphotericin B has TPSA = 319.61, ie above 140 \AA^2 and its administration is restricted to intravenous parenteral use. However, irrigations in joints, urinary tract and intrathecal application can be made exceptionally [51]. To obtain the molecular parameters TPSA (area of the total polar surface of the molecule), hydrophobicity (MLogP) and the spatial volume (Vol), Molinspiration software was used. According to Verma (2012), MLogP is calculated as a sum of contributions based on molecular fragments and correction factors that are used to verify permeability across cell membranes.

The TPSA is calculated by the methodology published by Ertl, Rohde and Selzer [41] as being the addition of contributions of the molecular fragments, being considered polar fragments of O and N. Nevertheless, the results corroborate with the conclusions of Veber et al. [50]. Still supporting the authors above, the analysis of voriconazole showed the TPSA in the value of 76, 73, less than 140 \AA^2 . This drug made it possible to adapt to the different therapeutic needs of patients with fungal infections, since it is available in pharmaceutical forms for oral (Vfend®) and intravenous administration, coinciding with their TPSA and nROTB values [52].

MLogP is the measure of hydrophobicity, ie it is the ability of a substance to interact with cell membranes. Molecules with high values of MLogP have a higher hydrophobicity and, consequently, better transport through membranes. Thus, isoeugenol presented MLogP of 2.38, a higher value than those of antifungal agents used in clinical practice, such as amphotericin and voriconazole, once again showing a positive criterion for its bioavailability.

Next, the probability of isoeugenol of being bound to certain pharmacological targets was investigated, which may help to understand how the molecule develops its biological activity as well as its toxic effects. For this, Molinspiration software was used which provides a probability of the compound to bind to cellular structures, that is, values less than or equal to 1 indicate the substance has great chances of interacting with the structure analyzed.

Table 1: Theoretical analysis of the physico-chemical properties of isoeugenol obtained by the software Molinspiration

Compound	Physical and Chemical Properties ^a					
	TPSA	nON	MlogP	nV	nROTB	Vol
Isoeugenol	29,46	2	2,38	0	2	161,59
Voriconazole	76,73	6	1,49	0	5	285,11
Amphotericin	319,61	18	-2,49	3	3	865,48

^aTPSA: total polar surface area; nON: Interaction O / NH O-HN; nV: violation number; nROTB: rotation number; Vol: volume.

The isoeugenol drug likeness was calculated considering the MlogP (partition coefficient), molecular weight, number of heavy atoms, number of hydrogen acceptors, number of hydrogen donors, number of violations, number of rotational bonds and molecular volume. The bioactivity of the phytoconstituent was verified by calculations of the activity index of GPCR ligands, ion channel modulator, nuclear receptor ligands, kinase inhibitor and enzyme inhibitor with the help of software [41].

In **Table 2** it can be observed that isoeugenol presented all parameters of activity binding to GPCR, ion channel modulator, nuclear receptor ligand, kinase inhibitor, protease inhibitor and enzyme inhibitor negative.

verified in the data presented in Table 2. The EI score (amphotericin B enzyme inhibition) was -2.59, well below voriconazole, and in agreement with its mechanism of action. Similar to amphotericin B, isoeugenol also showed all of its negative parameters. This may aid in the investigation of the mechanism of action of the phytoconstituent, which may act in the same way as amphotericin B.

Posteriorly, the molecular properties of isoeugenol, based on molecular descriptors using Lipinski's rule of five, were calculated in the Molinspiration Online Property Calculation Toolkit (<http://www.molinspiration.com/>) software, as can be seen in **Table 3**.

Table 2: Probability of interaction with pharmacological targets calculated using the software Molinspiration

Compound	"Drug-likeness" ^a					
	GPCRL	ICM	KI	NRL	PI	EI
Isoeugenol	-1,02	-0,53	-1,06	-0,7	-1,35	-0,51
Voriconazole	0,23	0,17	0,14	-0,22	0,02	0,19
Amphotericin B	-3,06	-3,53	-3,59	-3,45	-2,45	-2,95

^a"Drug-likeness": probability of interaction of the compound with the pharmacological target; GPCRL: GPCR ligand; ICM: ion channel modulator; KI: kinase inhibitor; NRL: nuclear receptor binder; PI: protease inhibitor; EI: enzymatic inhibitor.

Voriconazole was introduced in clinical use in 1995 [53], was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States in May 2002 [54]. This drug maintains the general properties of the azoles, that is, it inhibits the sterol-14- α -demethylase enzyme, but it blocks more strongly the ergosterol synthesis of the filamentous fungi, for which it becomes fungicidal [55]. Thus, the mechanism of action of the antifungal agent coincides with the Enzyme Inhibition (EI) data of 0.19 presented by the drug in the analysis by the software.

The mechanism of antifungal action of amphotericin B does not involve enzymatic inhibition, but rather the interaction with ergosterol of fungal membranes [56]. This is

This analysis was done through the Lipinski rule of five that establishes some relevant structural parameters for the theoretical prediction of the oral bioavailability profile, which is aggregated to the absorption and permeability of possible drugs and depends on five parameters: (1) number of groups hydrogen bonding acceptors (nALH) less than or equal to 10; (2) number of donor hydrogen bonding groups (nDLH) less than or equal to 5; (3) molecular mass (MM) less than or equal to 500 g / mol; (4) octanol-water partition coefficient (mlogP) less than or equal to 5; (5) total polar surface area (TPSA) less than or equal to 140 Å². Molecules that violate more than one of these rules may have problems with bioavailability.

Table 3: Theoretical analysis of the physico-chemical properties of isoeugenol required for theoretical oral bioavailability compared to the standards of the "Rule of Five" Lipinski – Molinspiration

Substance	Scores for Bioavailability Assessment ^a				
	TPSA	nDLH	nALH	Da	cLogP
Isoeugenol	29,46	1	2	164.20	2.33
Voriconazole	76,73	1	6	349,32	1,49
Amphotericin B	319,61	18	12	924,09	0,32
Standard of the "Rule of Five" Lipinski	≤ 140	≤ 5	≤ 10	≤ 500	≤ 5

^aTPSA: total polar surface area; nDLH: Number of hydrogen donors; nALH: Number of hydrogen acceptors; Da: Molecular weight; cLogP: Partition coefficient water: oil.

According to the results obtained in Molinspiration by Lipinski's "Rule of Five" [45], it was possible to verify that isoeugenol has a good theoretical oral bioavailability, since all physicochemical parameters evaluated for this molecule presented within of the cut-off point established by the Lipinski "Rule of Five" (Table 3). In contrast, amphotericin violated 4 of the 5 rules, which in practice matches its major use intravenously rather than orally.

Mutagenic, tumorigenic, irritant and on reproduction effects were evaluated, besides the pharmacological potential in the parameter "drug-score", which is a parameter that combines the values obtained from drug-likeness, MLogP, solubility, molar mass and toxicological risks in a single value. The program is ideal for the design of chemical structures, estimating physical-chemical and biological properties with a good degree of reliability and calculating

Table 4: Probability of interaction of isoeugenol / antifungal agents with pharmacological targets calculated through Osiris software

Compounds	"Drug score" ^a						
	cLogP	S	D-L	D-S	nALH	nDLH	Da
Isoeugenol	2.33	-2.24	-3.96	0.10	2.00	1.00	164.20
Voriconazole	1.47	-3.23	4.08	0.84	6.00	1.00	349.32
Amphotericin B	0,32	-5,07	-0,13	0,27	18	12	924,09
Itraconazole	5,15	-7,3	7,61	0,07	12	0	705,64

nDLH: Number of hydrogen donors; nALH: Number of hydrogen acceptors; Da: Molecular weight; cLogP: Partition coefficient water: oil.

For the analysis of the theoretical toxicity and pharmacokinetic parameters of isoeugenol, an *in silico* study of the ADMET parameters (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) was carried out with the help of the Osiris Property Explorer tool. The software involves a database of commercially available drugs and commercially available compounds (Fluka) which uses a non-pharmacological data set to evaluate the frequency of occurrence of each fragment in the individual structure.

extra parameters such as drug-score, which verifies the probability of the molecule becoming a commercial drug. The analyzes were performed compared to 3,300 commercial drugs and 15,000 chemical substances.

In this study we determined the potential of druglikeness and drug-score that are related to topological descriptors, besides molecular mass, number of donor/acceptor of hydrogen, among others (Table 4). The drug-score values

between 0.1 and 1.0 indicate that the molecule evaluated contains groups frequently found in commercial drugs.

As verified in the results, isoeugenol presented the drug-score lower than voriconazole and amphotericin. This parameter is a measure of the potential of the compound to meet the criteria of a possible drug candidate. Despite this, isoeugenol can not be ruled out as a possible drug, since itraconazole, an antifungal agent used in the clinical routine, presents this same parameter in a lower value than isoeugenol. Thus, the choice of a molecule for studies of biological activities and safety should not take into account only one parameter.

periphery of male mice exposed to isoeugenol by gavage for 3 months.

Thus, the potential toxic risk of the phytoconstituent does not apply in practice, which qualifies isoeugenol as a potential molecule for the development of an antifungal drug.

4.2 Antibacterial activity assay

With the increasing variety of antifungal drugs currently available, the *in vitro* test is being used more frequently to select ideal antifungal agents [58]. Reports of *in vitro* susceptibility testing generally include both Minimum

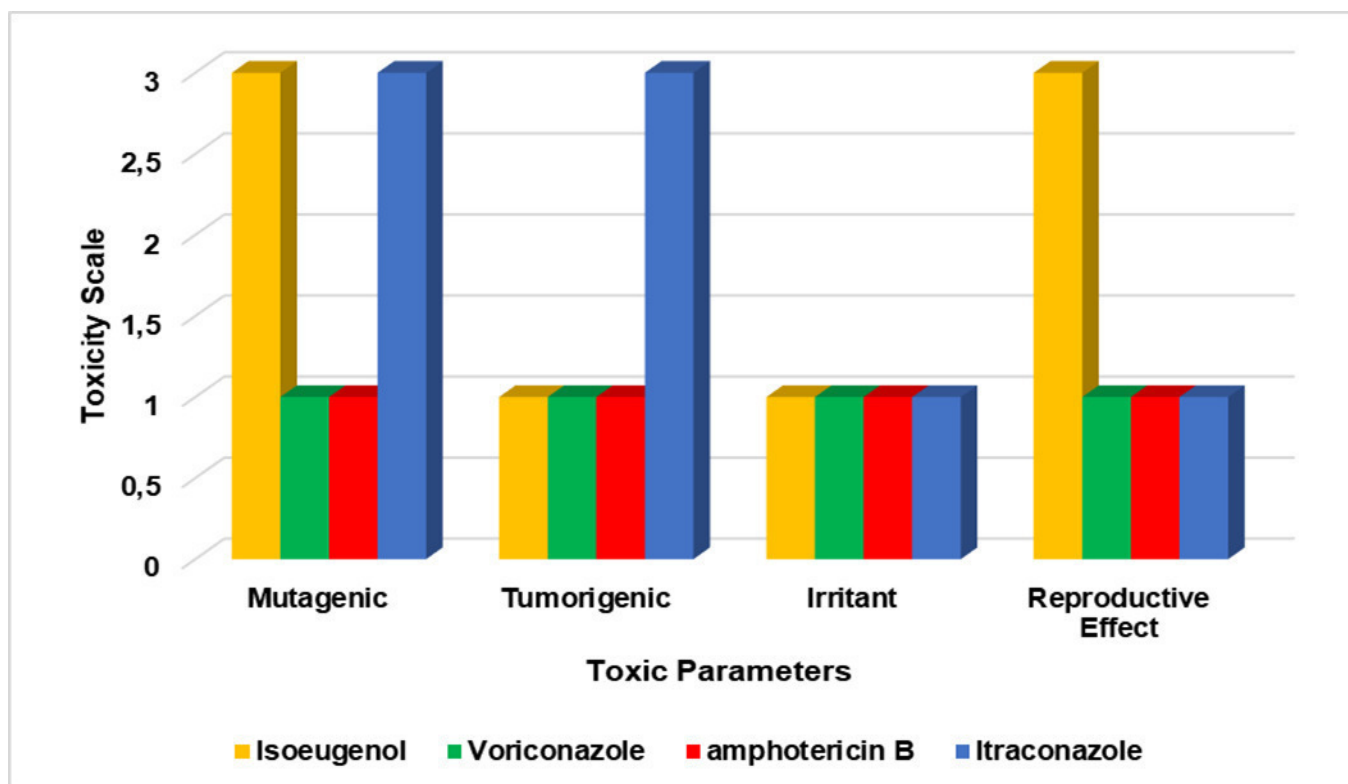


Fig. 1- Risk of toxicity of isoeugenol compared to standard antifungals calculated using the Osiris Property Explorer program.

In addition to this information, the software also estimated the risks of side effects through the analysis of pharmacological parameters: mutagenic, tumorigenic, irritant and reproductive effects (**Fig. 1**). The results were classified according to a scale of 1 to 3, where: 1 means absence of toxicity, 2 moderate toxicity and 3 severe toxicity. These toxicological prediction analyzes were performed in a comparative manner with toxic fragments of more than 3,000 commercial drugs.

As shown in **Fig. 1**, isoeugenol presents a high risk of developing mutagenic and reproductive effects and absence of toxicity in developing irritant and tumorigenic effects. The mutagenic and reproductive risk of isoeugenol prompted by the software does not corroborate with data published by the National Toxicology Program [57]. The authors concluded that isoeugenol was not mutagenic in trials with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, did not induce chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells, did not increase the frequency of micronucleated red blood cells

Inhibitory Concentration and Minimum Fungicidal Concentration (Lethal) (CFM). In this way, the MIC and isoeugenol CFM were determined individually for *P. citrinum*, standard and clinical strains, and the results were grouped in **Table 5**. The CIM of isoeugenol varied between 256 and 32 $\mu\text{g/mL}$, being the highest MIC value for the LM-21 strain and the lowest value for the LM-02, LM-03, LM-08, LM-155, LM-157 and LM-161.

Pizzolitto et al. [35] also screened strains of the filamentous fungus *Aspergillus parasiticus* using the phytochemicals: thymol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, creosol, m-Creosol, p-Creosol, o-Cresol and phenol. In this study, they found that isoeugenol had a MIC of 206 $\mu\text{g/mL}$, which was lower than those found in the other compounds tested, showing its potency against the microorganism, including carvacrol. This result corroborates the MIC values obtained in this study, since the highest MIC value for *Penicillium citrinum* was 256 $\mu\text{g/mL}$.

In a research developed by Peixoto et al. [59] investigated the action of the essential oil of *Laurus nobilis*

Table 5 - Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration values for isoeugenol and voriconazole against *Penicillium citrinum* strains.

<i>P. citrinum</i> Strains	Isoeugenol ($\mu\text{g/mL}$)		Voriconazole ($\mu\text{g/mL}$)		*C1	**C2
	MIC	MFC	MIC	MFC		
INCQS 40011	64	64	256	+	+	-
LM-02	32	64	64	128	+	-
LM-03	32	64	0,5	2	+	-
LM-04	256	512	+	+	+	-
LM-08	32	64	0,5	+	+	-
LM-30	128	256	8	16	+	-
LM-145	64	128	32	32	+	-
LM-155	32	64	64	64	+	-
LM-157	32	64	1	4	+	-
LM-161	32	64	2	8	+	-
LM-171	64	64	2	8	+	-
LM-278	64	128	256	+	+	-

* C1 - Control of microbial growth: wells containing RPMI-1640 broth, DMSO (5%), Tween 80 (2%) and the inoculum of each strain, in the absence of the phytoconstituent or antifungal. ** C2 - Culture medium sterility control: Wells containing RPMI-1640 broth, DMSO (5%), Tween 80 (2%), in the absence of the phytoconstituent or antifungal. (-): inhibition of fungal growth. (+): presence of fungal growth.

Linnaeus, popularly known as laurel, against species of *Candida* spp. In their results, they found the MIC value of 500 $\mu\text{g/mL}$ for the microorganisms tested. Since said essential oil is composed of isoeugenol, corresponding to 53.5% of its composition, it can be considered, taking into account the appropriate proportion, that the expressed value bears similarity to the MIC value of isoeugenol found in this study.

same concentration, did not present the same result. Although the authors used a different methodology and eugenol, isoeugenol isomer, the result obtained was similar to that found in this study, since the MIC was 256 $\mu\text{g/mL}$.

Zabka and Pavela [36] evaluated the efficacy of individual phenols, 13 compounds, and their acids, 8 substances, totaling 21 phytochemicals against a group of six important toxinogenic and pathogenic fungi of the genus

Table 6 - MIC₅₀, MIC₉₀, MFC₅₀ and MFC₉₀ values of isoeugenol and voriconazole for *Penicillium citrinum* strains.

Microorganism	Isoeugenol ($\mu\text{g/mL}$)				Voriconazole ($\mu\text{g/mL}$)			
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC ₅₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC ₅₀	MFC ₉₀
<i>P. citrinum</i>	64	128	64	256	4	>1024	8	256

In another study by Vázquez et al. [60], the inhibitory effect of eugenol and thymol on *P. citrinum* strains NRRL 2274 and 2269 was evaluated. Plates containing yeast extract agar at different concentrations of the phytochemicals were inoculated with *P. citrinum* and, after the incubation time, the diameters of the CFUs formed were measured. They found that 200 $\mu\text{g/mL}$ eugenol was able to completely inhibit the growth of the microorganism, whereas thymol, in the

Fusarium, *Penicillium* and *Aspergillus*. The substances tested include isoeugenol. This compound had a MIC ranging from 236 - 301 $\mu\text{g/mL}$ for the genus *Aspergillus*, 351-609 $\mu\text{g/mL}$ for the genus *Fusarium* and 482 - 489 $\mu\text{g/mL}$ for the genus *Penicillium*. This latter value differs from that found in this study, since the tested species were different, thus possessing a distinct sensitivity profile.

Despite this, isoeugenol is versatile, as it has an inhibitory action against fungi of different genus.

The MIC value found for isoeugenol against the strains of *P. citrinum* in this study was 256 µg/mL. Given this result, we can classify the substance as a strong inhibitor, since, according to Aligiannis et al. [61], MIC results will be considered as: strong inhibitors, if the value is up to 500 µg/mL; moderate inhibitors if the value found is between 600 and 1,500 µg/mL; and weak inhibitors if the value is above 1,600 µg/mL.

Complementing the MIC determination, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values for isoeugenol were also obtained, as can be seen in **Table 6**. These concentrations are defined as the minimum inhibitory concentrations capable of inhibiting the growth of 50% and 90% of the fungal strains tested, respectively. In this study, the value for isoeugenol of MIC₅₀ was 64 µg/mL and MIC₉₀ was 128 µg/mL, that is, very close values.

Already the MIC₉₀ of isoeugenol was smaller than all the other 10 phenolic compounds tested.

In view of the results found, although the studies use different species and genera, the MIC and MIC₉₀ values found are similar to those determined in this study. This fact demonstrates a certain homogeneity in the antifungal behavior of isoeugenol against the pathogenic fungi reported in the literature.

With the calculation of the MIC, MIC₅₀ and MIC₉₀, we can classify the resistance profile of *P. citrinum* strains against phytoconstituent strains. According to the classification proposed by Nascente et al. (2003), when MICs of the sample <MIC₅₀, intermediate sensitivity (I), when the MIC of the sample is MIC₉₀ and resistant (R), when the MIC of the sample is >MIC₉₀. Using these conditions, we found that in this study 11 strains (91.67%) were sensitive and 1 (8.33%), the strain LM21, was resistant to isoeugenol. After the MIC of isoeugenol was found for the

Table 7 - MFC/MIC ratio of isoeugenol and voriconazole against *Penicillium citrinum* strains.

<i>Penicillium citrinum</i> Strains	Isoeugenol (µg/mL)		Voriconazole (µg/mL)	
	MFC/MIC	Effect	CFM/CIM	Effect
INCQS 40011	64/64 = 1	Fungicide	>4	Fungistatic
LM-02	64/32 = 2	Fungicide	128/64 = 2	Fungicide
LM-03	64/32 = 2	Fungicide	2/0,5 = 4	Fungistatic
LM-4	512/128 = 2	Fungicide	+	ND*
LM-08	64/32 = 2	Fungicide	>4	ND*
LM-30	256/128 = 2	Fungicide	16/8 = 2	Fungicide
LM-145	128/64 = 2	Fungicide	32/32 = 1	Fungicide
LM-155	64/32 = 2	Fungicide	64/64 = 1	Fungicide
LM-157	64/32 = 2	Fungicide	4/1 = 4	Fungistatic
LM-161	64/32 = 2	Fungicide	4/1 = 2	Fungicide
LM-171	64/64 = 1	Fungicide	8/2 = 4	Fungicide
LM-278	128/64 = 1	Fungicide	>4	Fungistatic

+: There was growth in the wells at concentrations above 4xCIM. ND: Unable to set.

Another study also calculated the MIC of isoeugenol, but for different species of the genus *Penicillium*. According to the data obtained by Zabka and Pavela [36], the MIC₅₀ for *P. brevicompactum* and *P. expansum* species were 86 and 71 µg/mL, respectively. Xie et al. [62] evaluated the structure-activity relationship of eugenol derivatives, including isoeugenol, and cinnamaldehyde against pathogenic fungi in agriculture: *Rhizoctonia solani* (ATCC 36124) and *Fusarium oxysporum* (ATCC 37438). They observed that isoeugenol had a MIC₅₀ for *R. solani* of 33.1 µg/mL and 97.2 µg/mL for *F. oxysporum*. In the study carried out with several natural phenolic compounds against *Aspergillus parasiticus*, it was observed that isoeugenol had MIC₅₀ and MIC₉₀ at 83.74 µg/mL and 182.26 µg/mL, respectively. MIC₅₀ of isoeugenol was the lowest of most phytochemicals, with only thymol and carvacrol being 58.6 and 60.09 µg/mL, respectively.

strains of *P. citrinum*, the Minimum Fungicide Concentration (MFC), as well as MFC₅₀ and MFC₉₀, were determined. MFC₅₀, MFC₉₀ and MFC were considered the lowest concentration capable of causing 50%, 90% and 99.9% reduction of colony forming units after incubation time in the initial inoculum.

As observed in **Tables 5** and **7**, it can be observed that isoeugenol had a fungicidal effect for 8 strains (66.67%) at the concentration of 64 µg/mL, 10 strains (83.33%) at the concentration of 128 µg/mL, for 11 strains (91.67%) at the concentration of 256 µg/mL and for the 12 strains (100%) at the concentration of 518 µg/mL. Thus, the MFC₅₀, MFC₉₀ and MFC of the isoeugenol for *P. citrinum* species were, respectively, 64, 256 and 518 µg/mL.

There is a dearth of data in the literature that show the determination of MFC of isoeugenol, which highlights the

contribution that this work will bring with valuable information on this phytoconstituent and also reveals the need for further research on the compound and its bioactivities. However, Peixoto et al. [59] tested the essential oil of *Laurus nobilis* (laurel), which has as its major compound isoeugenol (53.5%) in *Candida* spp. and found a MFC ranging from 250-500. This result resembles those obtained in this study, despite being carried out with different species and substances.

Regarding MFC, we can observe that the results showed that among the tested strains 16.67% presented MFC equivalent to MIC of isoeugenol and 83.37% presented MFC equivalent to MIC of the phytoconstituent. After obtaining these data, it was possible to classify the nature of the antifungal effect of isoeugenol and variconazole for *P. citrinum*. According to Siddiqui et al. [63], the effect of a compound is considered fungistatic if the MFC/MIC > 4 ratio is fungicidal if the MFC/MIC < 4. Applying this condition, isoeugenol can be considered to have a bactericidal effect against the strains of *P. citrinum*, since all MFC/MIC ratios for all 12 strains tested were lower than 4 (**Table 7**).

In order to prove that the results obtained in the experiments refer only to the substances used without interference, the controls of viability of the strains, medium sterility and solvent interference were performed. The results showed that the solvents did not interfere in the activity performed by the substances tested and that the strains used in the assays were viable.

CONCLUSION

According to the results obtained in the *in vitro* and *in silico* investigation of the antifungal and toxicological effects of isoeugenol, it can be concluded that isoeugenol presented probability of antimicrobial action, including antifungal action, with high probability of the molecule to act structurally in the fungal plasma membrane. The phytoconstituent still presented parameters of bioavailability compatible with drugs that can be administered orally in the *in silico* study and theoretically exhibited reproductive and mutagenic toxicological risk. In the *in vitro* study, its antifungal action against strains of *Penicillium citrinum* was confirmed.

In view of this, new studies should be carried out to investigate the mechanism of action used by isoeugenol to present its antifungal effect.

LIST OF ABBREVIATIONS

ADMET - Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity
 ANVISA - Sanitary Surveillance Agency
 ASD - Sabouraud Agar Dextrose
 ATCC - American Type Culture Collection
 CCLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
 CFM - Minimum Fungicide Concentration
 MIC - Minimum Inhibitory Concentration
 CSD - Sabouraud Dextrose Broth
 Da - Molecular weight
 DMSO-Dimethyl sulfoxide
 EI - Enzyme inhibitor

M.E.M. - Mean standard error
 GPCRL - G protein coupled receptor ligand
 IRRI - Potential irritant
 KI - Kinase Inhibitor

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the collaborators and technicians of the Federal University of Paraíba for assisting in the development of the research, and the Coordination of Superior Level Staff Improvement for the financial support of the study support.

REFERENCES

- [1] Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.
- [2] Harvey, W. Nonsystematic Backtracking Search. PhD thesis, Stanford University, 1995.
- [3] Mulvey, M.R.; Simor, A.E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should be? CMAJ, 2009, v.180, p.371-372.
- [4] Andersson, D.I.; Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nature Review Microbiology, 2010, v.8, p. 260-71.
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO Health, Geneva: <http://www.who.int/en>, 2010. Acesso em outubro de 2016.
- [6] Spellberg, B.; Guidos, R.; Gilbert, D.; Bradley, J.; Boucher, H.W.; Scheld, W.M.; Bartlett, J.G.; Edwards, J.Jr. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases, 2008, v.46, p.155-64.
- [7] Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009, v.13, n.2, p.238-248.
- [8] Moroy, G.; Martiny, V. Y.; Vayer, P.; Villoutreix, B.O.; Miteva, M.A. Towards *in silico* structure-based ADMET prediction in drug discovery. Drug Discov Today, 2012;17(1-2):44-55.
- [9] Aniyery, R.B.; Gupta, A.; Singh, P.; Khatri, C.; Pathak, A. Synthesis, characterization, biological activities and computational anticancer study of Dibutylbis [(2-isopropyl-5-ethylcyclohexyl) oxy] stannane. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2015; 8: 957-63.
- [10] Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol, 2004, v.35, p.275 - 280.
- [11] Gonçalves, L. A.; Barbosa, L. C. A.; Azevedo, A. A.; Casali, V. W. D.; Grayer, R. J.; Chase, M. W.; Simmonds, M. S. J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie de Pflanzen". Biochemical Systematics and Ecology, 1999, v.27, p.369-393.
- [12] Trigo, J. R.; Leal, I. R.; Matzenbacher, N. I.; Lewinsohn, T. M. Chemotaxonomic value of pyrrolidine alkaloids in southern Brazil Senecio (SENECIONEAE: ASTERACEAE). Biochemical Systematics and Ecology, 2003, v. 31, p. 1011-1022.
- [13] Taiz, L.; Zeiger, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz, L.; Thierens, H.; Vral, A. The micronucleus assay in radiation accidents. Roma, Annali dell' Istituto Superiore di Sanità, 2009, v. 45, n. 3, p. 260 - 264.
- [14] Maraschin, M.; Vepoorte, R.. Engenharia do metabolismo secundário. Brasília, Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 1999, v. 23, p. 24-28.
- [15] De Sousa, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. Molecules, 2011, v. 16, n. 3, p. 2233-2252.

- [16] Guenther, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: The Essential Oils, 4.ed.v.4. New York: Van Nostrand, **1977**.
- [17] Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F.; Sangwan, R. S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, **2001**, v. 34, p. 3–21.
- [18] Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, **2004**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902.
- [19] La Camera, S. et al. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological reviews*, **2004**, v. 198, n. 1, p. 267-284.
- [20] Vogt, T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, **2010**, v. 3, n. 1, p. 2-20.
- [21] Koeduka, T.; Louie, G. V.; Orlova, I.; Kish, C. M., Ibdah, M.; Wilkerson, C. G.; Bowman, M. E.; Baiga, T. J.; Noel, J. P.; Dudareva, N., Pichersky, E. The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages. *Plant J*, **2008**, 54, 362-374.
- [22] The Merck Index. 11th ed. (S. Budavari, Ed.), p. 813. Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, **1989**.
- [23] Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, **2006**, 311, 808-811.
- [24] Wynder, E. L.; Hoffmann, D. Tobacco and Tobacco Smoke: Studies in Experimental Carcinogenesis, p. 389. Academic Press, New York, **1967**.
- [25] Opdyke, D. L. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet. Toxicol*, **1975**, 13 (Suppl.), 683-923.
- [26] Demole, E.; Demole, C.; Enggist, P. A chemical investigation of the volatile constituents of East Indian sandalwood oil (*Santalum album* L.). *Helv. Chim. Acta*, **1976**, 59, 737-747.
- [27] Hattori, R.; Murake, S.; Yoshida, T. Chemical composition of the absolute from gardenia flower. *Agric. Biol. Chem*, **1978**, 42, 1351-1356.
- [28] Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. (A. Osol, Ed.), p. 1001. Mack Publishing Company, Easton, PA, **1980**.
- [29] Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 14th ed. (R.J. Lewis, Sr., Ed.), p. 625. John Wiley & Sons, Inc., New York, **2001**.
- [30] Cerveny, L.; Krejčikova, A.; Marhoul, A.; Ruzika, V. Isomerization of eugenol to isoeugenol—Kinetic studies. *React. Kinet. Catal. Lett*, **1987**, 33, 471-476.
- [31] Kishore, D.; Kannan, S. Isomerization of eugenol and safrole over MgAl hydrotalcite, a solid base catalyst. *Green Chem*, **2002**, 4, 607-610.
- [32] Kamatou, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, **2012**, 17.
- [33] Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, **2007**, v. 30, p. 374-381.
- [34] Gallucci, M. N.; Carezzano, M. E.; Oliva, M. M.; Demo, M. S.; Pizzolitto, R. P.; Zunino, M. P.; Zygadlo, J. A.; Dambolena, J. S. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J. Appl. Microbiol*, **2004**, 116, 795–804.
- [35] Pizzolitto, R.P.; Barberis, C.L.; Dambolena, J.S.; Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Magnoli, C.E.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A.; Dalcero, A.M. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *J. Chem*, **2015** doi: 10.1155/2015/547925.
- [36] Zabka, M.; Pavela, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **2003**, *Chemosphere*, 93(6):1051-6.
- [37] CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. **2002**.
- [38] Chand, B. Structure-Bioactivity-Relationships and Crystallographic Analysis of Secondary Interactions in Pregnane-Based Steroids. *J. Chem. Crystallogr*, **2011**, v.41, n.12, p.1901-1926.
- [39] Khurana, N.I.; Mohan, P.S.; Gajbhiye, A.; Goel, R.K. PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. *European Journal of Pharmacology*, **2011**, 662:1-3, 22-30.
- [40] Srinivas, N.; Sandeep, K.S.; Anusha, Y.; Devendra, B.N. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. *International Invention Journal Biochemistry Bioinformatics*, **2014**.
- [41] Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J.Med.Chem*, **2000**, 43, 3714-3717.
- [42] Gupta, A.; Aniyery, R.B.; Pathak, A. *In silico* pharmacological and *in vitro* biological study of novel organotinorsorbate. *Int J Pharm Sci Res*, **2017**, 8:10, 4201-4212.
- [43] Ursu, O.; Oprea, T.I. Model-Free Drug-Likeness from Fragments. *J. Chem Inf. Model*, **2010**, 50:8, 1387-1394.
- [44] Ursu, O.; Rayan, A.; Goldblum, A.; Oprea, T.I. Understanding drug-likeness. *Wiley Interdiscip. Rev.-Comput. Mol. Sci*, **2011**, 1:5, 760-781.
- [45] Lipinski, C.A. Drug discovery today. *Technologies*, **2004**, 1:1, 337-341.
- [46] Espinel-Ingroff, A. In vitro activity of the new triazole voriconazol (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol*, **1998**, 36, 198–202.
- [47] Bhatia, R.; Shreaz, S.; Khan, N.; Muralidhar, S.; Basir, S.F. et al. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *J Basic Microbiol*, **2011**, 51:1-9.
- [48] Sikemma, J.; De Bont, J.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Ver*, **1995**, 59:201–222.
- [49] Gill, A.; Holley, R. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol*, **2006**, 108, 1–9.
- [50] Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D.; Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, **2002**, 45:12, 2615-2623.
- [51] Tolins, J.P.; Raj, L. Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat: protective effect of calcium channel blockade. *J. Am. Soc. Nephrol*, **1991**, 2, 98–102.
- [52] Quindós, G. et al. In vitro antifungal activity of voriconazole: New data after the first years of clinical experience. *Rev. Iberoam. Micol*, **2007**, 43, 3, 198-208.
- [53] Kontoyiannis, D.P.; Mantadakis, E.; Samonis, G. Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. *J. Hosp. Infect*, **2003**, v.53, n.4, p. 243-258.
- [54] Naithani, R.; Kumar, R. Voriconazole. *Indian Pediatr*, **2005**, v.42, n.12, p. 1207- 1212.
- [55] Martínez, R. An update on the use of antifungal agents. *J. Bras. Pneumol*, **2006**, v. 32, n.5, p. 449-460, 2006.
- [56] MANDELL, G. L.; Petri Jr JA. Fármacos antimicrobianos. In: Goodman LS, Gilman A. As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana, **1996**, p.777-89.
- [57] National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, **2010**, v.551, p.1-178.
- [58] Galgiani, J.N. Antifungal susceptibility tests. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **1987**, v.31, p.1867-1870.
- [59] Peixoto, I.R.; Rosalen, P.L.; Ferreira, G.L.S.; Freires, I.A.; Carvalho, F.G.; Castellano, L.R.; Castro, R.D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, **2017**, v.73, p.179–185.
- [60] Vázquez, B. I.; Fente, C.; Franco, C. M.; Vázquez, M. J.; Cepeda, A. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiol*, **2001**, v.67, p.157-163.
- [61] Aligianis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, **2001**, v. 49, n. 9, p. 4.168-4.170.
- [62] Xie, Y.; Huang, Q.; Wang, Z.; Cao, H.; Zhang, D. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenolderivatives against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, **2017**, 97, 388–394.
- [63] Siddiqui, F.; Krishna, S.K.; Tandon, P.K.; Srivastava, S. Arsenic accumulation in *Ocimum* spp. and its effect on growth and oil constituents. *Acta Physiol Plant*, **2013**, v.35, p.1071–1079, doi: 10.1007/s11738-012-1145-1.



SÁVIO BENVINDO FERREIRA <saviobenvindo@gmail.com>

MOL2NET International Conference Series on Multidisciplinary Sciences - 2017

SÁVIO BENVINDO FERREIRA <saviobenvindo@gmail.com>

1 de dezembro de 2017 11:17

Para: humberto gonzález-díaz <gonzalezdiazh@yahoo.es>

Dear Dr. Humberto Gonzalez-Diaz,

Following its orientation, after forwarding the communications to MOL2NET 2013, I am enclosing the manuscript entitled "*In Silico* and In Vitro Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum*", according to the CTMC template. For the first time the in silico analysis is performed and the antifungal action of isoeugenol is determined. This new information will help with further studies to elucidate and possibly develop a new antimicrobial drug. I await confirmation of receipt and analysis of the manuscript.

Sincerely yours,

[Texto das mensagens anteriores oculto]

--

Sávio Benvindo Ferreira*Farmacêutico**Especialista em Análises Clínicas**Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração de Farmacologia**Doutorando no PGPNSB na área de concentração de Farmacologia***Manunscript.doc**

294K



SÁVIO BENVINDO FERREIRA <saviobenvindo@gmail.com>

MOL2NET International Conference Series on Multidisciplinary Sciences - 2017

humberto gonzález-díaz <gonzalezdiazh@yahoo.es>

16 de dezembro de 2017 19:47

Responder a: humberto gonzález-díaz <gonzalezdiazh@yahoo.es>

Para: SÁVIO BENVINDO FERREIRA <saviobenvindo@gmail.com>

The manuscript is under analysis, it will be part of one special issue.

No we have 2 out of 5 papers necessary, as soon as we joint all the issues

we are going to submit it for publication altogether.

Sincerely yours

González-Díaz H., IKERBASQUE Professor,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-2797>

(1) Dept. of Organic Chemistry II, Faculty of Science and Technology,
University of the Basque Country UPV/EHU, 48940, Leioa, Biscay, Spain.

(2) IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011, Bilbao, Spain.

De: SÁVIO BENVINDO FERREIRA <saviobenvindo@gmail.com>**Para:** humberto gonzález-díaz <gonzalezdiazh@yahoo.es>**Enviado:** Sábado 16 de diciembre de 2017 19:25**Asunto:** Re: MOL2NET International Conference Series on Multidisciplinary Sciences - 2017

Dear Dr. Humberto Gonzalez-Diaz,

I would like to know if the manunscript sent on 12/02/2017 was received and was also analyzed for publication.

Sincerely yours,

2017-12-01 14:16 GMT-03:00 humberto gonzález-díaz <gonzalezdiazh@yahoo.es>:

Dear Benvindo

Thank you for your interesting submission.

Please, revise your document many tables and figures seem to be floating and moved from their original place. Please, send also a pdf file to avoid this problem.

In addition, you need to insert a short review section 1-2 pages between the introduction and the discussion of results

In this section you need to review previous papers about the synthesis and assay of other compounds with activity against

You need to include also in this review a discussion of the paper

Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. Vázquez BI, Fente C, Franco CM, Vázquez MJ, Cepeda A. *Int J Food Microbiol.* 2001 Jul 20;67(1-2):157-63.

We are prepared to recommend your paper for acceptance if you carry out all these changes properly.

Sincerely yours

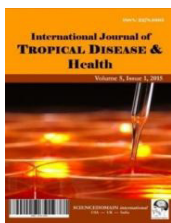
González-Díaz H., IKERBASQUE Professor,

[Texto das mensagens anteriores oculto]

[Texto das mensagens anteriores oculto]

[Texto das mensagens anteriores oculto]

ANEXO F – Artigo publicado no periódico International Journal of TROPICAL DISEASE & Health.



**International Journal of TROPICAL DISEASE
& Health**

10(2): 1-9, 2015, Article no.IJTDH.19210
ISSN: 2278-1005

SCIENCEDOMAIN international
www.sciencedomain.org



Antifungal Activity of Phytochemicals against Samples of *Penicillium*

Tassiana Barbosa Dantas^{1*}, Sávio Benvindo Ferreira¹, Lilian Sousa Pinheiro¹,
Camilla Pinheiro de Menezes¹, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra¹,
Janiere Pereira de Sousa¹ and Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Program of Postgraduate in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraiba, Paraiba, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors TBD and EOL did the study design, wrote the protocol and analyses of study. Authors TBD, LSP, CPM, FQSG and JPS did the processing samples while the literature searches were done by authors TBD and SBF. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/IJTDH/2015/19210

Editor(s):

(1) Ken-ichiro Inoue, Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Japan.

Reviewers:

(1) Anonymous, Oregon State University, USA.

(2) N. Murugalatha, Department of Applied Sciences and Humanities, Quantum School of Technology, Uttarakhand, India.
Complete Peer review History: <http://sciencedomain.org/review-history/10166>

Original Research Article

Received 30th May 2015
Accepted 2nd July 2015
Published 14th July 2015

ABSTRACT

Aims: The incidence of fungal infections has increased over the last ten years and fungi of the genus *Penicillium* can be found in various substrates and affect immunocompromised people, hospitalized patients, many animals and plants, as well as compromise the quality of air indoors. The current situation of indiscriminate use of antibiotics and the consequent resistance of microorganisms to conventional antimicrobial therapy has been stimulating researchers to seek alternative sources of antimicrobial compounds, among them the medicinal plants. The tendency of getting phytochemicals from extracts, fractions, fixed or essential oils obtained from plant species is currently observed. In this context, the present study aims to evaluate the in vitro antifungal activity of seven phytochemicals (geraniol, carvacrol, thymol, linalool, p-cymene, terpinolene and citral) against twelve samples of *Penicillium*.

Place of Study: Laboratory tests were carried out at the Mycology Laboratory Department of Pharmaceutical Sciences, located in the Health Sciences Center (CCS) of the Federal

*Corresponding author: Email: saviobenvindo@gmail.com;

University of Paraíba (UFPB).

Methodology: Firstly, screening was carried out to find the phytochemical with the best activity by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution technique. Following, the tests were proceeded with thymol to determine of minimum fungicidal concentration (MFC).

Results: Through analysis of results, it is observed that carvacrol, thymol and citral showed the best activities of the samples of *Penicillium* studied. The MIC values were 256 mg / mL, for carvacrol and citral, and 128 mg / mL, for thymol (compound showed better results). The thymol had its MIC 90 established at 128 mg / mL, inhibiting, at this concentration, 92% of the tested samples. Analyzing compared to MIC and MFC, it was observed that thymol presented CFM values similar to CIM values for 1/3 of the samples, showing also values greater than 1024 mg / mL for only two samples. The CFM value ranged from 128 µg/ml to 1024 µg/ml.

Conclusion: The thymol is a promising new possibility among the products with antifungal activity against *Penicillium*, however if the performance is needed further studies, deeper, about their mechanism of action and toxicity, as well as in vivo tests, aiming a possible application therapy.

Keywords: Antifungal activity; phytochemicals; *Penicillium*; thymol.

1. INTRODUCTION

The incidence of fungal infections has increased over the last ten years [1]. Airborne fungi use the atmospheric air as a mean of dispersal [2]. Inhalation of airborne fungi spores by man can in some cases lead to the development of complications in the respiratory tract, such as asthma and rhinitis [3]. In addition, airborne fungi can cause sometimes fatal infections in immunocompromised individuals, which are called opportunistic infections [4,5].

Among airborne fungi, the genus *Penicillium* deserves mention, it is one of that has the largest number of species and it can be found in various substrates [6]. Fungal infections by *Penicillium marneffe* ranks third in Thailand in relation to opportunistic infections in patients with HIV [7].

The indiscriminate use of antibiotics by the general population has led to a complex framework of resistance of microorganisms to conventional antimicrobial therapy, what may be a relevant factor in the emergence of difficult control infectious diseases and has stimulated researchers to seek alternative sources of antimicrobial compounds, among them the medicinal plants [8].

The plants provide an important source of new biologically active compounds [9-11] containing a number of substances that can be used to treat different infectious diseases [12], for which reason they have been intensively studied to find compounds more effective and less toxic.

The term phytochemical relates to chemical compounds, non-nutritive, which naturally occur

in plants and exhibit biological activity [13]. Studies involving phytochemicals are of great importance, because they facilitate the utilization of individual components, instead of a mixture like in essential oils, giving more predictability and probably less collateral effects.

Several studies point to the various activities of phytochemicals, which are: antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, cardioprotective, anti-hemorrhagic, hepatoprotective, antitussive, antitumor, immunostimulating, anticancer, antiviral, among other [14-32]. Among these, some studies attribute considerable antimicrobial activity to phytochemicals commonly found in plants belonging to the family Lamiaceae.

These findings prompted the investigation of the antifungal profile of seven phytochemicals commonly found in plants of the Lamiaceae family (geraniol, carvacrol, thymol, linalool, P-cymene, terpinolene and citral) against different samples of *Penicillium* by microbiological screening. The aim of the present work was to investigate the antifungal activity of phytochemicals, choosing among them that which showed the best antifungal profile for an after in-depth study of its fungicidal and/or fungistatic effects against samples of *Penicillium*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Phytochemicals and Synthetic Antifungal

The phytochemicals (geraniol, carvacrol, thymol, linalool, P-cymene, terpinolene and citral) and

amphotericin B (standard drug) were acquired from Sigma-Aldrich®. All them were dissolved in 2% Tween 80 (INLAB®) and up to 10% dimethyl sulfoxide – DMSO (MERCK®) in sterile distilled water to obtain 1,024 µg/mL solutions [33].

2.2 *Penicillium* Samples

For testing of antifungal activity were selected and used twelve samples of *Penicillium* previously isolated from the ambient air of a food dry industry and morphologically identified by the Mycology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraiba. The samples were maintained on Sabouraud Dextrose Agar - SDA (DIFCO®) at room temperature (28° to 30°C) and under refrigeration (4°C).

2.3 Inoculum

Stock inoculums of samples of *Penicillium* were prepared from 10-day cultures in SDA at 28°C to induce sporulation. Fungal colonies were covered with 5 mL of sterile saline solution (NaCl 0.85% w/v), the surface gently scraped with a sterile loop and the resultant mixture of fungal units was then transferred to a sterile tube. After heavy particles were allowed to settle for 3 to 5 min, the upper homogeneous suspension was collected and vortexed for 15 s. The turbidity of the final inoculum was standardized according to a McFarland scale 0.5 tube and adjusted to a fungal population of 10⁶ colony former units (CFU). The confirmation of inoculum quantification was done by plating 0.01 mL of inoculum suspension in SDA. The dishes were incubated at 28°C and examined daily for the presence of fungal colonies which were counted as soon as growth became visible [34,35].

2.4 Antifungal Activity Screening

Initially, microbiological screening was performed with the phytochemicals (geraniol, carvacrol, thymol, linalool, P-cymene, terpinolene and citral) at a concentration of 1,024 µg/mL. Microbiological screening was performed based on the broth microdilution technique [33,36,37,38].

Sterile 96-U-shaped-well microplates were used and each well of the plates contained 100 µL of Sabouraud dextrose broth - SDB (DIFCO®). Then, 100 µL of the products (1,024 µg/mL) were individually added to each line of wells, so that

each line of wells corresponded to a phytochemical tested. Finally, 10 µL of fungal inoculum of each strain of *Penicillium* were added to wells, so that each column corresponded to a strain. The microplates were incubated at 28°C being selected those phytochemicals who showed better inhibition profile visual growth of microorganisms after seven days incubation. Negative control (without drugs) was performed to confirm the viability of the sporangiospores. Sensitivity control for Tween 80 and DMSO was also performed.

Phytochemicals that showed better activity were subsequently selected, which were evaluated for their potential antifungal activity from a concentration of 1,024 to 4 µg/mL, in order to determine their MIC [39].

2.5 Determination of MIC and MFC

Broth microdilution bioassay was used to determine MIC of thymol, carvacrol, citral and amphotericin B against samples of *Penicillium* [40,41]. For this, sterile 96-U-shaped-well microplates and caps were used. The 96-well dishes were prepared by dispensing 100 µL of double concentrated Sabouraud dextrose broth-SDB (Difco®) into each well. A 100 µL volume of double concentrated products was placed into the first wells, to obtain a concentration of 1,024 µg/mL in them. Next, serial twofold dilutions in culture medium were prepared to obtain concentrations ranging from 1,024 to 4 µg/mL. The last well contained 100 µL of broth inoculated with fungal inoculums to confirm cell viability (viability control). Finally, 10 µL of fungal inoculum of each strain were added to wells, so that each column corresponded to one of the twelve samples. All the dishes were aseptically sealed then mixed on a plate shaker (300 rpm) for 30 seconds, incubated at 28°C and read after 5 days of incubation. The MIC values were determined by visual inspection of the growth inhibition of each well compared with that of the control (without drugs) well. Sensitivity control for Tween 80 and DMSO was also performed. The MIC was determined from three independent experiments and was defined as the lowest drug concentration that showed absence of growth or complete fungal growth inhibition (100% inhibition) compared with that of the control (without drugs) well.

Under the same conditions, it was also used the product chlorine sanitizer Tecsa Clor®- TC (SERQUIMICO LTDA., São Paulo, SP, Brazil),

composed of stabilized chlorine dioxide 5%. The TC was prepared in the same concentrations used to the phytochemicals (1,024-4 µg/mL) and furthermore in the concentration recommended by the manufacturer for obtaining the fungicide effect (50 ppm).

The MFC was determined for the phytochemical that showed stronger antifungal activity and for amphotericin B. After determining the MIC, 10 µL were subcultured from each well that showed complete inhibition (100% or an optically clear well) on SDA plates. The plates were incubated at 28°C for five days, and the MFC was the lowest concentration that showed either no growth or fewer than three colonies [42-45]. The MFC was determined from two independent experiments on different occasions.

2.6 Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± S.E.M. Statistical analysis for the study of the effects of the phytochemical on mycelial growth and spore germination was performed to determine statistically significant differences (P <0.05) employing analysis of variance (one-way ANOVA), followed by the Bonferroni post-test. For this, the implementation of statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 for Windows, San Diego, California, USA.

3. RESULTS AND DISCUSSION

At 1,024 µg/mL, the concentration of phytochemicals used in the screening, it was found that carvacrol, citral and thymol showed the best activity on the investigated samples of *Penicillium* (Table 1), having been observed, for all three phytochemicals, growth of only one strain among those tested (Pen 9).

After initial screening, in which carvacrol, thymol and citral showed better results in inhibiting the growth of samples of *Penicillium*, we proceeded to a new screening, this time with the MIC determination of selected phytochemicals. To this end, carvacrol, thymol and citral were tested at concentrations ranging from 1024 to 4 µg/mL, with concomitant control of viability of samples, sterility of broth and interference of solvents DMSO and Tween 80 in the results.

The MIC values found were 256 µg/mL, for carvacrol and citral, and 128 µg/mL, for thymol, what triggered interest in further study of the antifungal action of thymol. These results were compatible with the findings of other authors [16,18,46,47,48].

Studies with microencapsulation of thymol and carvacrol to evaluate the potential use of these agents as antimicrobials in food packaging showed the action of thymol and carvacrol was

Table 1. Antifungal activity of phytochemicals against samples of *Penicillium*- microdilution technique

Microorganisms	Phytochemicals (1,024 µg/mL)							Strain control
	geraniol	carvacrol	thymol	linatool	p-cymene	citral	terpinolene	
<i>Penicillium</i> Pen 2	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 3	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 7	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 8	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 9	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 10	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 11	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 12	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> Pen 13	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> LM 28	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> LM 63	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> LM 120	-	-	-	+	+	-	+	+

(+): Microbial growth in culture medium (-): Absence of microbial growth

evaluated against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, yielding MICs ranging from 125 to 250 µg/mL for thymol and 75-375 µg/mL for carvacrol [46]. Trials with various essential oils against *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* showed that the growth of these microorganisms was completely inhibited by oils of oregano, thyme and marjoram in relatively low concentrations, 85-300 µg/mL, thymol being pointed out as the main component of oregano oil and carvacrol as a major component of oils of thyme and marjoram [47].

In a study using the disk diffusion method, thymol showed antimicrobial activity against 23 different genera of bacteria with inhibition zones ranging from 25.8 to 53.1 mm [48]. In other study designed to evaluate the inhibitory activity of thymol on the formation and maturation of biofilms of *Candida albicans*, thymol significantly interfered by reducing the formation and maturation of the biofilm [18]. In partial agreement with this study, using the methods of broth dilution, disk diffusion and microatmosfera, found in his work that thymol showed the best antifungal activity against *Aspergillus niger*, among the phytochemicals tested (thymol, carvacrol and eugenol), based on the study of MICs [16].

Given that thymol showed the best result in microbiological screening, it is justified the choice

to continue the investigation of its antifungal activity. After determination of the MIC, the fungicidal effect of thymol was investigated. The MFC values of thymol varied from 128 to 1,024 µg/mL and the MFCs of this phytochemical corresponded to MIC or 2 × MIC for a half of the samples of *Penicillium* (Table 2). The Amphotericin B, standard antifungal used as control, showed MIC of 128 µg/mL, concentration in which 100% of samples were inhibited. Whereas the sanitizing control Tecsa clor[®], showed MIC greater than 1024 µg/mL for 75% of samples of *Penicillium*, that were resistant to the product at tested concentrations.

Research indicate a compound with MIC ranging from 50 to 500 µg/mL as having optimal antimicrobial activity, and attribute moderate activity to compounds which have a variation of 500 to 1500 µg/mL in MIC. Thus, according to these parameters, it can be stated that thymol showed an optimal antimicrobial activity [49].

Other authors have tested the antimicrobial activity of thymol, finding satisfactory results, consistent with the findings of this study. Thymol was tested against strains of *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*, finding MIC values ranging between 300 and 500 µg/mL [50]. Previous studies reported MIC values of 62-250 µg/mL for thymol on strains of *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* [51]. Another study found thymol MICs values

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of thymol, amphotericin B and Tecsa clor[®] and minimal fungicidal concentration (MFC) of thymol and amphotericin B in samples of *Penicillium sp.*

Strain <i>Penicillium</i>	Thymol (µg/mL)		Amphotericin B (µg/mL)		Tecsa clor [®] (µg/mL)	Control of strain	Sterility control
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC		
Pen 2	128	1024	128	1024	NF*	+	-
Pen 3	128	1024	128	NF*	NF*	+	-
Pen 7	128	128	128	128	512	+	-
Pen 8	128	128	128	128	NF*	+	-
Pen 9	256	NF*	128	128	NF*	+	-
Pen 10	128	128	128	128	1024	+	-
Pen 11	128	512	128	128	1024	+	-
Pen 12	128	1024	128	128	NF*	+	-
Pen 13	128	128	128	256	NF*	+	-
LM28	128	NF*	128	NF*	NF*	+	-
LM63	128	256	128	512	NF*	+	-
LM120	128	256	128	512	NF*	+	-

Note: *NF: not found- the value is greater than the highest concentration tested, 1024µg/mL; +, fungal growth

of 15-250 µg/mL on strains of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* [52].

In another study that evaluated the activity of thymol nanospheres against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and observed that free thymol showed a MIC ranging from 10 to 156 µg/mL and MBC ranging 156 - 313 µg/mL, whereas the encapsulated thymol was less effective with MIC values of 10-313 µg/mL and MBC values of 156-1250 µg/mL [53]. Researchers Studies evaluated the activity of thymol on seven species of fish pathogenic bacteria (*Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum*) and found that thymol showed MIC and MBC values ranging from 10 to 320 µg/mL [54]. While other investigation used the essential oil (EO) of *Thymus vulgaris* and its constituents thymol and p-cymene, in order to determine their antifungal activity against *Rhizopus oryzae*, this study revealed that the MIC of thymol and EO ranged 128-512 µg/mL, since the MFC ranged from 512-1024 µg/mL for the EO and 128-1024 µg/mL for thymol [55]. Studied the activity of thymol on various bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* and *Staphylococcus aureus*) and fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderma viride* and *Candida albicans*), getting through microdilution broth and MIC, MBC/MFC values and found that for bacteria MIC values ranged from 10-100 µg/mL and MBC ranged from 50 to 150 µg/mL, as for fungi MIC and MFC values ranged from 10 to 50 µg/mL [56].

Macromolecules whose functionality is related to growth, survival, virulence or cellular morphogenesis are pointed out as promising targets for new antifungal agents [57]. Thus, thymol is considerate as having a promising antifungal activity.

4. CONCLUSION

Among the tested phytochemicals, thymol showed the best results. The thymol is a promising new possibility among the products

with antifungal activity against *Penicillium*, however if the performance is needed further studies, deeper, about their mechanism of action and toxicity, as well as in vivo tests, aiming a possible application therapy.

CONSENT

All the authors declare that no consent was obtained for this study.

ETHICAL APPROVAL

It is not applicable.

ACKNOWLEDGEMENTS

The all professionals involved in the study and the Federal University of Paraíba for supporting research and the Higher Education Personnel Improvement Coordination, CAPES, for the financial support for research.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology, 10^a Ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
2. Trabulsi LB, Alterthum F. Microbiology. 5^a ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
3. Mezzari A, Perin C, Júnior SA, Bern LA, Gesu GD. Airborne fungi and sensitization in atopic individuals in Porto Alegre, RS, Brazil. Rev. Assoc. Med. Bras. São Paulo. 2003;49(3).
4. Sidrim JJ, Moreira JL. Clinical and laboratory fundamentals of medical mycology. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
5. Wanke B, Lazéra MS, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2000;95 (Suppl. I):153-158.
6. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall; 1997.
7. Ranjana KH, Priyokumar K, Singh TJ, Gupta CC, Sharmila L, Singh PN, Charkrabarti A. Disseminated *Penicillium marneffe* Infection: among HIV-infected

- patients in Manipur State, India. *J Infect* 2002;45(4):268-271.
8. Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia* 2001;72:286-287.
 9. Nakamura CV, Ishida K, Faccin LC, Filho BP, Cortez DA, Rozental S. In vitro *Microbiol.* 2004;155(7):579–586.
 10. Oliveira DR, Leitão GG, Santos SS, Bisso HR, Lopes D, Alviano CS, Alviano DS, Leitão SG. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2006,108(1):103-108.
 11. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 2006;6(39):1-8.
 12. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine* 2010;17(13): 1057-1060.
 13. Anjorin TS, Salako EA, Makun HA. Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. InTech. 2013. Accessed 5 July 2013. Available:<http://www.intechopen.com/book/s/mycotoxin-and-food-safety-in-developingcountries/control-of-toxigenic-fungi-and-mycotoxins-with-phytochemicals-potentialsand-challenges>" title="Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges">Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges.
 14. Ayoola GA, Coker HA, Adesegun SA. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Trop J Pharm Res.* 2008;7(3): 1019-1024.
 15. Araújo-Júnior JX, Oliveira MS, Aquino PG. A phytochemical and ethnopharmacological review of the Genus *Erythrina*. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. New York: InTech. 2012;538. Available:<http://www.intechopen.com/book/s/phytochemicals-a-global-perspective-of-theirrole-in-nutrition-and-health>" title="Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.
 16. Available:<http://www.intechopen.com/book/s/phytochemicals-a-global-perspective-of-theirrole-in-nutrition-and-health>" title="Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.
 17. Bouddine L, Louaste B, Achahbar S. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(76):14083-14087.
 18. Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 2007;50(6):502–506.
 19. Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicro Ag.* 2008;31:472–477.
 20. Canuto KM, Silveira ER, Bezerra AM. Phytochemistry, Pharmacology and Agronomy of Medicinal Plants: *Amburana cearensis*, an Interdisciplinary Study. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*. New York: InTech. 2012;538. Available:<http://www.intechopen.com/book/s/phytochemicals-a-global-perspective-oftheir-role-in-nutrition-and-health>" title="Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.
 21. Combrincka S, Regniera T, Kamatoub GP. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Ind Crop Prod.* 2011;33(2):344–349.
 22. Irkin R, Korukluoglu M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *J Med Food.* 2009;12(1):193–197.
 23. Krishnaiah D, Nithyanandam R, Sarbatly R. Phytochemical constituents and activities of *Morinda citrifolia* L. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemicals- A global perspective of their role in nutrition and health*. New York: InTech 2012;538. Available:<http://www.intechopen.com/book/s/phytochemicals-a-global-perspective-of-theirrole-in-nutrition-and-health>" title="Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.

- Perspective of Their Role in Nutrition and Health. (Accessed 20 June 2013)
24. Kumar JK, Prasad AG, Richard SA. In vitro Antioxidant activity and preliminary phytochemical analysis of medicinal Legumes. *J Pharmaceut Res.* 2012;5(6): 3059-3062.
 25. Maisuthisakul, P. Phenolic Constituents and Antioxidant Properties of some Thai Plants. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.* New York: InTech. 2012;538.
Available:<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-theirrole-in-nutrition-and-health>
title="Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. (Accessed 20 June 2013)
 26. Marei GI, Rasoul MA, Abdelgaleil SA. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pest Biochem Physiol.* 2012;103:56–61.
 27. Naithani R, Huma LC, Holland LE. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(11):1106-33.
 28. Efouet N, Pépin A. Phytochemicals from *Beilschmiedia anacardioides* and their biological significance. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.* New York: InTech. 2012;538.
Available:<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health>
title="Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health">Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. (Accessed 20 June 2013)
 29. Riju A, Sithara K, Nair SS. *In silico* screening major spice phytochemicals for their novel biological activity and pharmacological fitness. *J Bioequiv Availab.* 2009;1:063-073.
 30. Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace RJ. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology.* 2012;158:2870–2877.
 31. Wang L, Chen J, Xie H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of adlay varieties. *J Agric Food Chem.* 2013;61(21): 5103–5113.
 32. Yang JL, Liu LL, Shi YP. Phytochemicals and biological activities of *Gentiana* species. *Nat Prod Commun.* 2010;5(4): 649-64.
 33. Yousuf M, Aslam K, Wani BA. In vitro antibacterial activity and phytochemical studies of methanolic extract of leaves of *Hypericum perforatum* L. growing wild in Kashmir Himalaya. *Asian J Plant Sci Res.* 2012;2(4):414-420.
 34. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: Lorian V. *Antibiotics in laboratory medicine.* 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkiam; 1991.
 35. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Analysis.* 2000;11(3):137-147.
 36. Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1917-1920.
 37. Koneman EW, Allen SD, Dowel JR VR, Sammers HM. *Microbiological Diagnosis Text and Atlas.* 2nd ed. Medical Editorial Panamericana. São Paulo: Panamericana; 1993.
 38. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Méd.* 1998;64(8):711-713.
 39. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Analysis.* 2000;11(3):137-147.
 40. Allegrini J, Bouchberg MS, Maillols H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et applications in microbiologia. *Society Pharmacy Montpellier.* 1973;33(1):73-86.
 41. Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Sokmen M, Agar G, Ozer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 2004;15(7):549-557.
 42. Moreira AC, Lima EO, Souza EL, Van Dingenen MA, Trajano VN. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential Oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. *Braz J Microbiol.* 2007;38(1):33-38.
 43. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ. Testing conditions for determination of, minimum fungicidal concentrations of new and established

- antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3204-3208.
44. Pereira FO, Wanderley PA, Viana FA, Lima RB, Sousa FB, Lima EO. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. Braz J Microbiol. 2011;a42(1):233-242.
 45. Pereira FO, Wanderley PA, Viana FAC, Lima RB, Sousa FB, Santos SG, Lima EO. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. Braz J Pharm Sci 2011;b47(1).
 46. Trajano VN, Lima EO, Souza EL, Travassos AE. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* thumb leaves on coalho chesse contaminating microorganisms. Ciênc Tecnol Aliment. 2010;30(4):1001-1006.
 47. Guarda A, Rubilar JF, Miltz J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. Int J Food Microbiol. 2011;146:144–150.
 48. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection. 2003; 22(1):39-44.
 49. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants. J Appl Microbiol. 2000;88:308–316.
 50. Sartoratto A, Machado AL, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MC, Rehder VL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 2004;35:275-280.
 51. Tippayatun P, Chonhenchob V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. Nat Sci. 2007;41:319-323.
 52. Mathela CS, Singh KK, Gupta VK. Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. Acta Pol Pharm. 2010;67(4):375-380.
 53. Mohammed MJ, Al-Bayati FA. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds. Phytomedicine. 2009;16:632–637.
 54. Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. Int J Pharm. 2012;434(1–2):360-365.
 55. Heo GJ, Kim CH, Park SC, et al. Antimicrobial activity of thymol against pathogenic gram-negative bacteria of fishes. Philipp J Vet Med. 2012;49(2):103-106.
 56. Mota KS, Pereira FO, Oliveira WA. et al. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. Molecules. 2012;17:14418-14433.
 57. Giweli A, Džamic AM, Sokovic M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. Molecules. 2012;17:4836-4850.
 58. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: Mechanisms of action. Trends in Microbiology. 2003;11:272–279.

© 2015 Dantas et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://sciencedomain.org/review-history/10166>