

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS  
COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DO TIMOL**

**THIAGO ANTONIO DE SOUSA CUTRIM**

**VILA VELHA**

**MARÇO/2020**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS  
COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DO TIMOL**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**THIAGO ANTONIO DE SOUSA CUTRIM**

**VILA VELHA**

**MARÇO/2020**

C989a      Cutrim, Thiago Antonio de Sousa  
Avaliação da atividade antifúngica de novos compostos  
triazólicos derivados do timol / Thiago Antonio de Sousa Cutrim  
– 2020.

71 f.; il.

Orientador: Rodrigo Scherer.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas),  
Universidade Vila Velha, 2020.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia. 2. Antimicóticos – Resistência. 3. Fungos.  
4. Doenças transmissíveis emergentes. I. Scherer, Rodrigo. II.  
Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.7045

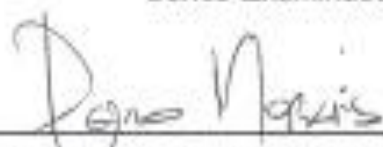
THIAGO ANTONIO DE SOUSA CUTRIM

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS  
COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DO TIMOL

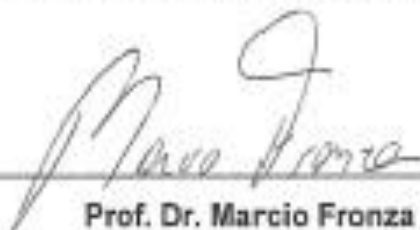
Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 05 de março de 2020.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Pedro Alves Bezerra Moraes (UFES)



Prof. Dr. Marcio Fronza (UVV)



Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)  
Orientador

“O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza. Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água? Essa virtude chegou ao conhecimento dos homens. O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas; e dela se serve para acalmar as dores e curá-las; o farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.”

(ECLESIÁSTICO 38, 4-8)

“A vitória mais bela que se pode alcançar é vencer a si mesmo.”

(SANTO INÁCIO DE LOYOLA)

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pai, DEUS filho e Deus espírito que são de Fontes de: ciência sabedoria e refúgio. A Santíssima Trindade, toda gratidão pelo dom da vida, proteção e mais uma vitória alcançada.

Aos meus pais Lúcia e Dionísio. Aos meus avós *in memorian* (Maria José, Claudia Cutrim e Antonio dos anjos). A minha madrinha e *in memorian* (Francisca Cleonice). Aos meus irmãos Arão, Moisés, Francisco sobrinho e Verônica. Aos meus cunhados Paulo Henrique, Ivane e Sonha. As minhas sobrinhas Letícia, Aryane e LÍlian. E toda minha família, muito obrigado pelo amor que sempre demonstraram e pela dedicação e seriedade na condução de minha formação.

Aos meus amigos: Eveline, Bento, Gleyciane, Helida, Dinara, Ildegarde, Jacqueline e Filipe, os quais foram grandes incentivadores para o ingresso na jornada acadêmica.

Aos meus amigos do grupo luz, André, Paulo e Sergio, meus irmãos e amigos gratidão, pela nossa irmandade e nossa união.

Aos meus eternos mestres Professores, Professores de ensino fundamental e médio: Marlene de Anatalia, Almeida Junior, Gilmar Reis. Professores de graduação: José de Jesus, Tânia Gaspar e Dinaura Maura Imado. Aos Professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas: Rodrigo Scherer, Maricelli Araujo, Marcio Fronza, Dominique Lenz, Vasquez, Thiago Melo e Denise Endringer. A todos os professores que me acompanham e acompanharam nessa jornada profissional, muito obrigado pelo esforço e empenhoso trabalho pela minha formação acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Scherer, que cordialmente me ajudou nesta etapa, e para mim é um exemplo de pai e profissional a ser seguido. Obrigado meu professor pelos ensinamentos, pela dedicação e pela atenção que sempre me

deu.

Ao apoio técnico cedido pelos laboratórios de microbiologia, química e cultura de células, nas pessoas de: Clarisse, Luciano, Prof. João Damasceno, Ana, Jean, Bianca, Lorena e Prof. Marcio Fronza.

A família laboratório 30. Nos últimos dois anos o laboratório 30 virou minha segunda casa, queria aqui agradecer aos colegas que encontrei nessa jornada. Agradeço à: Leandra e Fernando por sempre estarem ao meu lado sendo os meus segundos orientadores. Agradeço à: Mayara, Karla, Daniele, Natacha, Camila, Matheus, Mariana, Lian, Camila, Katiene, Bruna, Alyliane e Amanda. Família laboratório 30, muito obrigado pelo carinho, companheirismo, respeito, humanização e solidariedade.

E por fim, quero agradecer ao apoio financeiro concedido pelas agências de fomento CAPES e FAPES.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
2.1	O reino fúngico e suas características peculiares .....	16
2.1.2	As contribuições do reino fúngico para a natureza .....	16
2.1.3	A biologia estrutural da célula fúngica .....	16
2.2	Patógenos fúngicos em humanos, infecções graves emergentes: por que se preocupar? .....	18
2.2.1	Infecções fúngicas superficiais .....	19
2.2.2	Infecções fúngicas invasivas .....	19
2.3	Terapia Antifúngica .....	20
2.3.1	Infecções fúngicas são fáceis de tratar? .....	20
2.3.2	Derivados Azólicos: imidazólicos e triazólicos têm oferecido boas perspectivas para terapia antifúngica? .....	21
2.3.2.1	Mecanismo de ação dos azólicos .....	22
2.3.2.2	Gerações dos azólicos, avanços crescentes .....	23
2.3.2.3	Imidazólicos .....	23
2.3.2.3.1	Cetoconazol .....	23
2.3.2.4	Triazólicos .....	24
2.3.2.4.1	Itraconazol .....	25
2.3.2.5	Limitações do efeito azólico, falhas terapêuticas determinadas pelo avanço da resistência .....	26
2.3.2.6.1	Alteração ou perda por afinidade do azólico com a enzima alvo .....	29
2.3.2.6.2	Superexpressão da enzima alvo .....	30
2.3.2.6.3	Superexpressão dos transportadores de efluxo .....	30
2.3.2.6.4	Desvio na rota Biosintética do ergosterol, através da inativação do ERG3 (perda de função) e substituição por outros esteróis .....	31
2.3.2.7	Perspectivas futuras, por novos antifúngicos .....	31
2.4	A busca por antifúngicos, através de compostos derivados de produtos naturais .....	32
2.4.1	Definição de óleo essencial .....	33
2.4.2	Os Óleos essenciais e seus componentes antifúngicos .....	33
2.4.2.1	Timol .....	34
2.4.3	Estratégias de síntese de novas moléculas antifúngicas .....	35
2.4.3.1	Hibridização de compostos naturais, um novo caminho para terapia antifúngica .....	35
2.5	Síntese da Cicloadição .....	36
2.5.1	A Síntese de 1,2,3 triazóis derivados do timol .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	Geral .....	38
3.2	Específicos .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Síntese dos novos compostos triazólicos .....	39
4.2	Atividade antifúngica .....	41
4.2.1	Microrganismos .....	41
4.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	41

4.2.2.1	Ajuste e preparo de inóculo .....	42
4.2.2.2	Inoculação, preparo e leitura das placas .....	43
4.2.3	Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	44
4.2.4	Estudo da curva de morte .....	44
4.3	Teste da viabilidade celular in vitro .....	45
4.3.1	Células .....	45
4.3.2	Ensaio da citotoxicidade in vitro .....	46
4.3.3	Análise estatística .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1	Atividade antifúngica .....	47
5.1.1	Estudo Cinético da curva de morte, Time-kill .....	49
5.2	Teste da viabilidade celular .....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação do azólicos.....	22
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do cetoconazol. ....	24
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do itraconazol. ....	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de resistência azólica. (I) Perda da afinidade do azólico com a enzima alvo através de mutações genéticas no gene codificador ERG11 ou CYP51, (II) superexpressão dos genes codificadores da enzima alvo, (III) superexpressão de efluxo transportadores de drogas, (IV) desvio na síntese do ergosterol. ....	29
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do Timol.....	34
<b>Figura 6.</b> Curva da cinética de morte (time-kill) dos compostos 3g,3j TIM e ITZ frente ao <i>T.rubrum</i> . ABD (água batata dextrose). ....	45
<b>Figura 7.</b> Curva da cinética de morte (time-kill) dos compostos 3g,3j do timol e do ITZ frente ao <i>T.rubrum</i> . ....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Grupos antifúngicos com seus respectivos mecanismos de ação, as colunas indicam esta ordem: principais classes antifúngicas, medicamentos clínicos e mecanismos de ação.....21
- Tabela 2.** Novas moléculas triazólicas derivadas do timol, sintetizadas pela síntese de click chemistry.....40
- Tabela 3.** Avaliação da atividade antifúngica dos triazólicos derivados do timol, frente a *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*. ....47
- Tabela 4.** Teste da Viabilidade celular frente dos compostos 3g e 3j em cultura de células h1c1c7 (hepatócitos), fibroblasto (L929) e queratinócito (HaCat).52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABD- Ágar batata dextrose

ASD- Ágar sabourad dextrose

CFM-Concentração fungicida mínima

CIM-Concentração inibitória mínima

CLSI -Instituto de padrões clínicos e laboratórios

CMRVS- Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária

DMSO- Dimetilsulfóxido

ITZ- Itraconazol

M.M- Massa Molecular

MOPS- (3-Nmorpholine-propane sulfonicacid)

MTT (brometo de [3 (4,5 dimetil tiazol-2-il) -difeniltetrazolico]

R. -Radical

RPMI- “Roswell Park Memorial Institute”

UFC- Unidade Formadora de Colônias

## RESUMO

CUTRIM, THIAGO ANTONIO DE SOUSA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2020. **Avaliação da atividade antifúngica de novos compostos triazólicos derivados do timol.** Orientador: Rodrigo Scherer.

As infecções fúngicas emergiram, consideravelmente, por causa do aumento populacional de imunocomprometidos. Os azólicos, são os antifúngicos mais utilizados para o controle dessas infecções. Porém, a falha terapêutica tem caracterizado a ineficácia desses fármacos, devido ao desenvolvimento da resistência antifúngica. Diante disso, a busca por novas moléculas antifúngicas torna-se incessante. Sabe-se que o timol é um monoterpene natural, que exerce atividades biológicas incluindo as antifúngicas; e os anéis triazólicos são estruturas privilegiadas para síntese de novos compostos. Diante desse contexto, foi sintetizado nove novas moléculas 1,2,3 triazol derivadas do timol. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos antifúngicos dos novos triazóis derivados do timol, bem como avaliar a citotoxicidade em *in vitro*. As nove novas moléculas triazólicas foram sintetizadas através da síntese de química click, sendo denominadas de 3c-k (descrição química não definida). A atividade antifúngica, foi determinada contra cepas sensíveis de *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. Flavus* e *T. rubrum*, através do método de microdiluição em caldo descrito pelo protocolo M38-A2 do CLSI (2008, 2010), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O triazólico itraconazol e o timol foram utilizados como controles. Além disso, foram realizados os testes de determinação da concentração fungicida mínima (CFM), estudo da curva cinética de morte, e citotoxicidade *in vitro*. Os resultados obtidos através das avaliações antifúngicas demonstraram atividades para *T. rubrum* apresentando CIM de 3,1 µg/mL, CFM 6,25 µg/mL para a molécula 3j; CIM de 6,25 µg/mL, CFM de 12,5 µg/mL para a molécula 3g, e CIM de 25 µg/mL, CFM de 100 µg/mL para a molécula 3e. As novas moléculas 3c-k não apresentaram atividade para as demais cepas testadas (CIM > 100 µg/mL). A realização dos estudos cinéticos da curva de morte demonstrou reduções no crescimento entre 24-36h, determinando um efeito fungicida a partir das concentrações de 2xCIM das moléculas 3g e 3j. foi realizado o teste da viabilidade celular para o composto 3j, que apresentou IC<sub>50</sub> > 80 µg/mL para queratinócito. Por fim, apesar das moléculas apresentarem baixa eficácia comparada ao ITZ, notou-se um aumento de 20 vezes na potência do composto 3j (CFM de 6,25 µg/mL) em relação ao timol original (e CFM 125 µg/mL), concluindo que este composto é promissor para estudos futuros.

**Palavras-chave:** Timol. Compostos triazólicos. Atividade antifúngica. Fungos. Dermatófitos.

## ABSTRACT

CUTRIM, THIAGO ANTONIO DE SOUSA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, march de 2020. **Evaluation of the antigenic activity of new triazolic compounds derived from thymol.** Advisor: Rodrigo Scherer.

Fungal infections have arisen, considerably, due to the increased population of immunocompromised individuals. Azoles are the most extensively used antifungals to impede these infections. Notwithstanding, therapeutic failure has defined the ineffectiveness of these drugs, due to the development of antifungal resistance. Hence, the search for new antifungal molecules is incessant. It is well known that thymol is a natural monoterpene, which has biological activities including antifungal instruments; and triazole rings are privileged structures for the synthesis of new compounds. In this contexture, nine new 1,2,3 triazole molecules derived from thymol were synthesized. The aim of this study was to assess the antifungal effects of new thiazole-derived triazoles, as well as to evaluate cytotoxicity in vitro. The nine new triazolic molecules were synthesized through chemical click synthesis, being called 3c-k (chemical description not defined). The antifungal activity was determined against sensitive strains of *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. Flavus* and *T. rubrum*, using the broth microdilution method described by CLSI protocol M38-A2 (2008, 2010), to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The triazole itraconazole and thymol were used as controls. Besides, tests for determining the minimum fungicidal concentration (MFC), studying the kinetic curve of death, and in vitro cytotoxicity were carried out. The outcomes obtained through antifungal evaluations verified activities for *T. rubrum* presenting MIC of 3.1 µg / mL, MFC 6.25 µg / mL for the 3j molecule; MIC of 6.25 µg / mL, MFC of 12.5 µg / mL for the 3g molecule, and MIC of 25 µg / mL, MFC of 100 µg / mL for the 3e molecule. The new 3c-k molecules showed no activity for the other strains tested (MIC > 100 µg / mL). The kinetic studies of the death curve showed growth reductions between 24-36 h, determining a fungicidal effect from the 2xMIC concentrations of the 3g and 3j molecules. The cell viability test was performed for compound 3j, which showed an IC<sub>50</sub> > 80 µg / mL for keratinocytes. Ultimately, however the molecules have low effectiveness compared to ITZ, there was a 20-fold accretion in the potency of compound 3j (MFC of 6.25 µg / mL) compared to the original thymol (and MFC 125 µg / mL), concluding that this compound is promising for further and future studies.

**Keywords:** Thymol. Triazole compounds. Antifungal activity. Fungi. Dermatophytes.

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas emergiram consideravelmente e tornaram-se um problema de saúde pública mundial, por causa do aumento populacional de imunocomprometidos (FRIEDMAN e SCHWARTZ, 2019; SAI SARAN e AZIM, 2016; A. L. SANTOS, BRANQUINHA e KNEIPP, 2017). E apesar disso, essas infecções ainda são negligenciadas, associando-se a uma alta mortalidade, matando cerca de 1,6 milhões anualmente (BASSETTI et al., 2018; BONGOMIN et al., 2017; JANBON et al., 2019).

Essa incidência é evidenciada, porque a maioria dos patógenos fúngicos humanos são oportunistas, ou seja, vivem em comensalismo com hospedeiros, podendo provocar infecções graves (HADRICHI; AYADI, 2018). Além disso, ocasionalmente, os patógenos fúngicos ambientais invadem o organismo humano para desenvolver doenças (KIM, 2016); enfatizando que as infecções fúngicas provêm de duas fontes diferentes: o ambiente e o próprio hospedeiro, podendo variar de infecções fúngicas superficiais a infecções fúngicas invasivas (BRUNKE et al., 2016).

As infecções fúngicas superficiais limitam-se à camada externa do corpo, sendo chamadas de dermatofitoses (BOUCHARA, MIGNON; CHATURVEDI, 2017). Já, as infecções fúngicas invasivas manifestam-se em órgãos sólidos e/ou corrente sanguíneas, em indivíduos imunossuprimidos (KIM, 2016). O *Trychophyton rubrum* é o agente dermatófito mais comum em casos clínicos de dermatofitoses (ZHAN; LIU, 2017), enquanto agentes dos gêneros *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. são patógenos comumente identificados em casos de infecções fúngicas invasivas (KIM, 2016).

A via de tratamento para infecções fúngicas é restrita, isso é atribuível à natureza da célula fúngica que, como organismos eucarióticos, contêm poucos alvos

de drogas não compartilhados com hospedeiros humanos (ROEMER e KRYSAN, 2014). Por essas condições, as alternativas terapêuticas para infecções fúngicas resumem-se em quatro grupos antifúngicos: poliênicos, azólicos, equinocandinas alilaminas (KSIEZOPOLSKA; GABALDÓN, 2018). Os azólicos são bem evidenciados para o manejo terapêutico de infecções fúngicas, pois apresentam um espectro de ação fungistático/fungicida, provocando distúrbios na rota Biosintética do ergosterol, através da inibição da enzima (ERG11 ou CYP51) lanosterol -14 $\alpha$ -desmetilase (ALLEN et al., 2015; MONK et al., 2019).

Além disso, esses compostos demonstram um menor efeito citotóxico quando comparados a outros antifúngicos (ALLEN et al., 2015; MONK et al., 2019). Mas, apesar de toda potência antifúngica, esse cenário tornou-se obscuro, por causa da falha terapêutica caracterizada, predominantemente, pela resistência contra esses antifúngicos (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). A evolução da resistência antifúngica é um processo inevitável, pois mantém relação direta com a pressão seletiva, através do uso desordenado de antifúngicos clínicos e agrícolas (HENDRICKSON et al., 2019; SANGLARD, 2016). Isso ressalta a necessidade urgente de otimizar ou desenvolver novos compostos antifúngicos (NICOLA et al., 2018; REVIE et al., 2018; ROBBINS, CAPLAN e COWEN, 2017).

A falha terapêutica provocada pelo desenvolvimento da resistência fúngica tem levado à intensificação dos estudos envolvendo os compostos naturais para serem fortes aliados na busca por novos medicamentos (LOPES, PINTO, e SALGUEIRO, 2017; SCORZONI et al., 2016; ZIDA et al., 2017). Em face disso, cada vez mais moléculas sintéticas, derivadas de fontes naturais, estão em evidência para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (TARIQ et al., 2019). O Timol é um monoterpeno natural encontrado, majoritariamente, em óleos essenciais de

plantas, como o tomilho, o orégano e outras (KHAMENEH et al., 2019). Este monoterpreno apresenta atividades antifúngicas e, deste modo, pode ser indicado para a síntese de novas moléculas com efeito antifúngico (MARCHESE et al., 2016). Nesta busca pela atividade antifúngica, o anel 1,2,3-triazólico se apresenta-se com o farmacóforo anel triazol que permite o acoplamento de substituintes halogenados (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017).

A partir do conhecimento do potencial antifúngico ou antimicótico do Timol (MARCHESE et al., 2016) e indo ao encontro da busca por novas moléculas derivadas de compostos naturais que apresentem atividades antifúngicas (ABRÃO et al., 2015; HIPÓLITO et al., 2018; SALMAN, 2019; DE SOUZA et al., 2016), foram sintetizados, por meio de síntese do tipo *click chemistry*, uma série de compostos 1,2,3-triazólicos derivados do timol, para avaliação do efeito antifúngico contra patógenos humanos.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. O reino fúngico e suas características peculiares**

#### **2.1.2. As contribuições do reino fúngico para a natureza**

O reino *fungi*, contém diversos organismos que fazem contribuições significativas para apoiar a vida na terra. Os fungos são constituídos por células eucarióticas, sendo considerados como uns dos principais decompositores em biosistemas, (FISHER et al., 2012; SHARMA et al., 2019; ZHENG e WANG,2019). Embora, os fungos estejam abundantemente, presentes no ambiente (ZHENG e WANG, 2019),é no solo que eles exercem diretamente os seus papéis vitais, que vão desde a decomposição de detritos orgânicos (GUO et al., 2019; MAŠÍNOVÁ, YURKOV e BALDRIAN, 2018; SPATAFORA et al., 2017) até associações simbióticas com outros seres incluindo plantas e animais(FILLINGER e ANDERSON, 2019; MCCUTCHEON e LEKBERG, 2019; RODRIGUEZ e REDMAN, 2008).

Isso caracteriza os fungos como seres heterotróficos, degradam substratos de organismos vivos; e saprofíticos, porque consomem substratos orgânicos de organismos mortos. Essa obtenção de substratos advindas do hospedeiro fornece nutrientes importantes como: carbono, fósforo, e nitrogênio que regulam o funcionamento do metabólico da célula fúngica (CARRIS, LITTLE e STILES, 2012).

#### **2.1.3. A biologia estrutural da célula fúngica**

Além dos nutrientes essenciais, o próprio arcabouço estrutural da célula fúngica oferece condições importantes para o funcionamento vital e metabólico. Com estrutura eucariótica, a célula fúngica delimita-se basicamente em: núcleo, citoplasma,

membrana plasmática e parede celular. A membrana plasmática e a parede celular possuem componentes essenciais exclusivos dos fungos que são responsáveis pela vitalidade e viabilidade da CF (MONEY, 2016).

A parede celular envolve toda célula fúngica conferindo proteção mecânica, mantendo a forma celular, protegendo contra pressão osmótica intracelular e permitindo diversos processos morfogênicos, como crescimento celular, citocinese e desenvolvimento quanto a tipos especializados de células fúngicas. Os principais componentes da parede celular são (1-3)  $\beta$ -D-glucano (1-6)  $\beta$ -D-glucano e quitina e glicoproteínas (CORTÉS et al., 2019; GOW, LATGE e MUNRO 2017).

A membrana plasmática cumpre uma ampla gama de funções biológicas para manter a integridade da célula, incluindo captação seletiva de substâncias, transdução de sinal, modulação da polaridade e forma celular (SCHUBERTH e WEDLICHW-SÖLDNER 2015). No entanto, o ergosterol é um esterol específico da membrana plasmática, (responsável por várias funções incluindo modulações na fluidez e permeabilidade) cujo á biossíntese é realizada pelo complexo de enzimas CYP ou ERG (LIU et al., 2019; RODRIGUES, 2018)

Enzimas CYP's medeiam a rota Biosintética do ergosterol em células de fungos filamentosos, enquanto as ERG's em leveduras. Essa distinção é porque as células fúngicas estão divididas em dois tipos morfológicos: filamentosos e leveduriformes, a diferença entre tais é que os fungos filamentosos ou bolores possuem um conjunto de hifas verdadeiras, as quais formam o micélio e as leveduras contêm pseudo-hifas formada por uma célula mãe, ligada a gêmula ou broto, podendo ser única ou múltipla de acordo com a divisão (BUENO e SILVA 2014).

As características morfológicas estruturais da célula fúngica afetam diretamente a maneira como um patógeno fúngico humano escapa do sistema

imunológico e desenvolve a infecção (TREVIJANO-CONTADOR, RUEDA e ZARAGOZA, 2016). Nessa forma, a infecção fúngica é, por sua própria natureza, um processo interativo entre o patógeno e o hospedeiro. Uma vez que o patógeno estabelece contato físico com o hospedeiro, passando por uma série de mudanças no desenvolvimento que culminam na penetração e colonização do tecido humano (PIETRO e PÉREZ-MARTIM, 2016).

## **2.2. Patógenos fúngicos em humanos, infecções graves emergentes: por que se preocupar?**

Das 5 milhões de espécies fúngicas já identificadas (BLACKWELL, 2011), aproximadamente, 400 são consideradas patogênicas para humanos (TAYLOR, LATHA e WOOLHOUSE, 2001). Mas, apesar da infimidade no número de patógenos fúngicos, estudos recentes apontam que as infecções fúngicas não são raras, pois quase 1 bilhão de pessoas sofrem com infecções fúngicas superficiais e mais de 150 milhões de indivíduos são portadores de doenças fúngicas graves ou invasivas (BROWN et al., 2012; KIM, 2016).

Contudo, diante dessa constatação, ainda sim as infecções fúngicas são negligenciadas (BROWN et al., 2012; KIM, 2016), e levam a óbito cerca de 1,6 milhões de indivíduos todos os anos (BONGOMIN et al., 2017). Isso porque, é contínuo o aumento populacional de imunocomprometidos, e questões socioeconômicas e geoecológicas, associadas à falta de acesso básicos e cuidados com a saúde provocam atraso no diagnóstico de IF (CASADEVALL, 2018; ALMEIDA, RODRIGUES e COELHO, 2019; LOCKHART e GUARNER, 2019).

Assim, as infecções fúngicas afetam a vida de inúmeros indivíduos pelo mundo diversificando-se de superficiais ou dermatofitoses a invasivas ou sistêmicas,

as quais variam de leve assintomáticas a potencialmente fatal, uma vez que a maioria dos patógenos são oportunistas e provocam infecções devido a: comprometimentos no sistema imunológico, violações em barreiras físicas ou alterações na microbiota humana (PINALTO, 2016).

#### 2.2.1. Infecções fúngicas superficiais

As dermatofitoses são infecções fúngicas comuns em seres humanos, e acometem indivíduos por todo mundo (BOUCHARA, MIGNON e CHATURVEDI, 2017). Essas infecções são chamadas de tineas ou infecções superficiais estéticas. Porque os dermatófitos (agentes causadores de dermatofitoses) são antropofílicos, colonizam tecidos queratinizados (cabelo, pele e unha) e degradam a queratina para obter nutrientes como carbono e nitrogênio (GHELARDI et al., 2014).

Em geral as infecções fúngicas superficiais, são acometidas, por espécies do gênero *Trichophyton* ssp. Contudo, apesar desses agentes serem dermatófitos frequentes em casos clínicos de infecções fúngicas, eles podem potencializar esse tipo de infecção dependendo do sistema imunológico do hospedeiro (KHURANA, SARDANA e CHOWDHARY, 2019; LEE e PARK, 2015).

#### 2.2.2. Infecções fúngicas invasivas

As infecções fúngicas invasivas, provocam um forte impacto a saúde pública no mundo. Esse fato, proeminentemente, tem sido impulsionado pelo aumento de: imunocomprometidos, (indivíduos com o HIV/AIDS) e imunossuprimidos por quimioterapia (BADIEE e HASHEMIZADEH, 2014). Patógenos do gênero *Candida* ssp. e *Aspergillus* ssp. são isolados com maior frequência em casos clínicos de

infecções sistêmicas ( invasiva ), isto porque estes agentes estão espalhados pelo ambiente ou podem fazer parte da microbiota humana (WEBB et al., 2018).

No entanto, como são oportunistas podem provocar doenças graves através da colonização de órgãos sólidos ou disseminação na corrente sanguínea (WEBB et al., 2018). As infecções fúngicas estão aumentando principalmente em ambientes de cuidados intensivos, onde se encontra mais pacientes imunocomprometidos com doenças graves. Frente a isso o controle terapêutico por meios de tratamentos adequados para infecções fúngicas , é a solução mais viável para superar esse ônus oferecido a saúde global (GARBEE, PIERCE e MANNING, 2017).

## **2.3. Terapia Antifúngica**

### **2.3.1. Infecções fúngicas são fáceis de tratar?**

O tratamento por antifúngico é bem-sucedido, quando o fármaco demonstra um efeito potencialmente ampliado capaz de inibir o patógeno , incluindo efetivas relações farmacocinéticas e farmacodinâmicas como: frequência da administração, duração de tratamento e toxicidade (LEPAK, 2014). Isso provoca um desafio contínuo no desenvolvimento de compostos antifúngicos, representado por dificuldades significativas ao atingir seletivamente os fungos sem provocar danos às células dos hospedeiros mamíferos (LIU et al., 2016; ZHENG e WANG,2019), uma vez que os fungos são constituídos por células eucarióticas assemelhando-se evolutivamente às células dos possíveis hospedeiros (SCORZONI et al., 2017).

Por esse modo, as opções terapêuticas para infecções fúngicas são restritas e basicamente estão divididas por quatro classes: Poliênicos, Azólicos, Equinocandinas, Alilaminas (CAMPOY e ADRIO, 2017; FUENTEFRÍA et al., 2018;

NETT e ANDES, 2016), cujo alvo principal é atingir os componentes essenciais da membrana plasmática e parede celular responsáveis pelo funcionamento vital-metabólico da célula fúngica (CARMONA e LIMPER, 2017; SAHAR HASIM, 2019; WIEDERHOLD, 2018).

**Tabela 1.** Grupos antifúngicos com seus respectivos mecanismos de ação, as colunas indicam esta ordem: principais classes antifúngicas, medicamentos clínicos e mecanismos de ação.

Antifúngicos		
Classes Antifúngicas	Drogas	Mecanismo de Ação
Poliênicos	Anfotericina B	Inibidor da síntese de ergosterol principal componente da membrana plasmática
	Nistatina	
Azólicos	Cetoconazol	Inibidor da síntese de ergosterol principal componente de membrana plasmática
	Fluconazol	
	Itraconazol	
	Voriconazol	
Equinocandinas	Isavuconazol	Inibidor da 1,3- $\beta$ glucano, parede celular
	Caspofungina	
Alilaminas	Micafungina	Inibidor na síntese de ergosterol
	Terbinafina	

Fonte: KSIEZOPOLSKA; GABALDÓN, 2018.

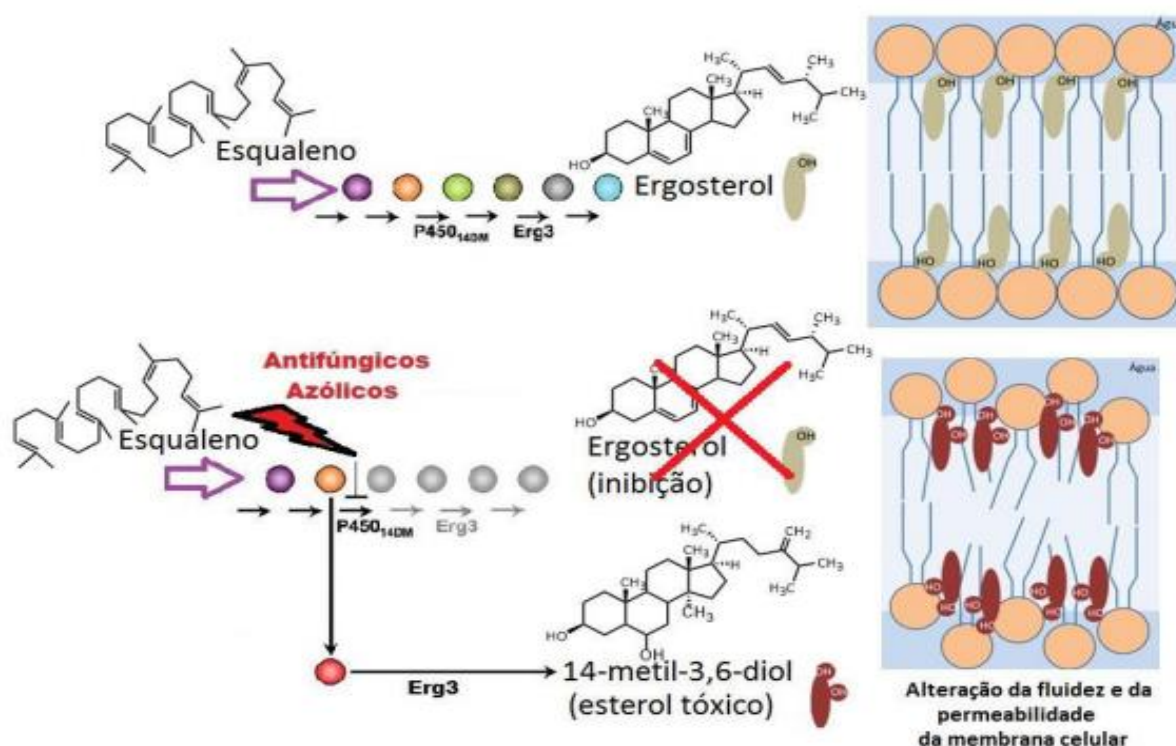
2.3.2. Derivados Azólicos: imidazólicos e triazólicos têm oferecido boas perspectivas para terapia antifúngica?

O desenvolvimento de drogas à base de azol foi representado como um grande avanço na micologia médica, e têm servido à humanidade no combate e controle de infecções fúngicas, possuindo assim um amplo espectro de capacidade antifúngica (WANI et al., 2015), seus efeitos a célula fúngica são considerados fungistáticos e fungicidas (SHUKLA et al., 2016), ou seja, afetam no crescimento, inibem a proliferação da célula e eventualmente ocasionam a morte celular devido a

acumulação de esteróis tóxicos metilados na membrana plasmática (PRASAD, SHAH e RAWAL, 2016; SOUZA e AMARAL, 2017).

### 2.3.2.1. Mecanismo de ação dos azólicos

O alvo de inibição dos azólicos é a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase dependente do citocromo P450 (CYP51), que pode ser codificada pelo gene *ERG11* em leveduras, ou *Cyp51* em fungos filamentosos (EMAMI et al., 2019; SHARMA e CHOWDHARY, 2017). Mecanicamente, o nitrogênio básico do anel azólico liga-se ao ferro hêmico do citocromo P450, (KHURANA, SARDANA, e CHOWDHARY, 2019; SHALINI et al., 2011), em decorrência disso ocorre a inibição da enzima alvo, que converte o lanosterol em ergosterol (o principal esterol encontrado na parede celular fúngica) (ANTONISSEN e MARTEL, 2018; CAMPOY e ADRIO, 2017; KHURANA, SARDANA e CHOWDHARY, 2019; MONK et al., 2019).



**Figura 1.** Mecanismo de ação do azólicos.

Fonte: Adaptado de SHETH-SANTIAGO et al., 2015.

#### 2.3.2.2. Gerações dos azólicos, avanços crescentes

Os derivados azólicos, começaram a ser sintetizados em meados da década de 1960, como um dos derivados de imidazol N-substituído (SHUKLA et al. 2016). São compostos orgânicos, contém um anel heterocíclico de cinco membros com dois ou três átomos de nitrogênio (CARMONA e LIMPER, 2017; SOUZA e AMARAL, 2017), os quais dividem categoricamente a classe dos azólicos em dois grupos: imidazólicos e triazólicos, os imidazólicos possuem dois e triazólicos três átomos de nitrogênio respectivamente em sua estrutura química, conforme as figuras 3 e 4 (CROWLEY e GALLAGHER, 2014; SZAFRĄŃSKI, SŁAWIŃSKI, KĘDZIA e KWAPISZ, 2017).

#### 2.3.2.3. Imidazólicos

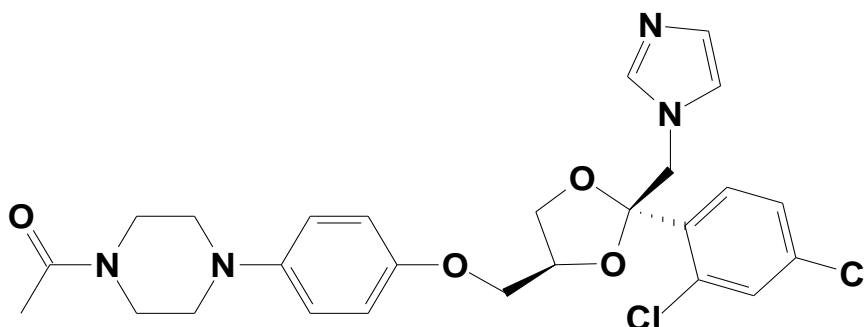
Os primeiros compostos imidazólicos, são conhecidos como azólicos de primeira geração (CHANG et al., 2017), são eficientes contra a grande maioria das IF (KUMAR; JHA, 2017). Atualmente, esses fármacos estão disponíveis em diferentes formulações incluindo: cremes, xampus, espumas, géis e loções, utilizados exclusivamente para o tratamento de dermatofitoses (HAFETI et al., 2019; HAY 2013, 2017). Um exemplo dos principais representantes desta classe é o cetoconazol (CTZ) (GUPTA; LYONS, 2015).

##### 2.3.2.3.1. Cetoconazol

O cetoconazol é um composto imidazólico, desenvolvido na década de 1970 como o primeiro antifúngico a ser administrado pela via oral com o objetivo de

tratar infecções fúngicas superficiais e invasivas, marcando um novo e excitante avanço no campo da micologia médica (GUPTA e LYONS 2015; SHANKAR, VISHNU TIWARI, MISHRA, SINGH e SHARMA, 2015). No entanto, em alguns países o uso oral foi suspenso devido a relações com alguns efeitos adversos como: irritações em pele, desregulações endócrinas e principalmente insuficiência hepática.

Isso porque o cetoconazol interage com enzimas do complexo CYP humano (CAMPOY e ADRIO, 2017; ELIAS et al., 2019; SAWANT e KHAN, 2017; SHUKLA et al., 2016). Assim, esses efeitos colaterais trazem à tona questões que discutem a segurança do cetoconazol. Onde recomenda restrições cautelares, suspendendo o tratamento para imunocomprometidos e compactando ao máximo em imunocompetentes (GUPTA; LYONS, 2015).



**Figura 2.** Estrutura química do cetoconazol.  
Fonte: Adaptada de SHULKLA et al., 2016.

#### 2.3.2.4. Triazólicos

O tratamento com fármacos imidazólicos tornou-se restrito por causa de efeitos colaterais, levando a substituição desses derivados por compostos de anel triazólico (NETT e ANDES, 2016), cuja ideia em síntese, oferece uma tendência potencializadora que amplia a especificidade da ligação ao citocromo P450 fúngico, melhora a solubilidade, reduz a ligação às proteínas plasmáticas e aumenta a

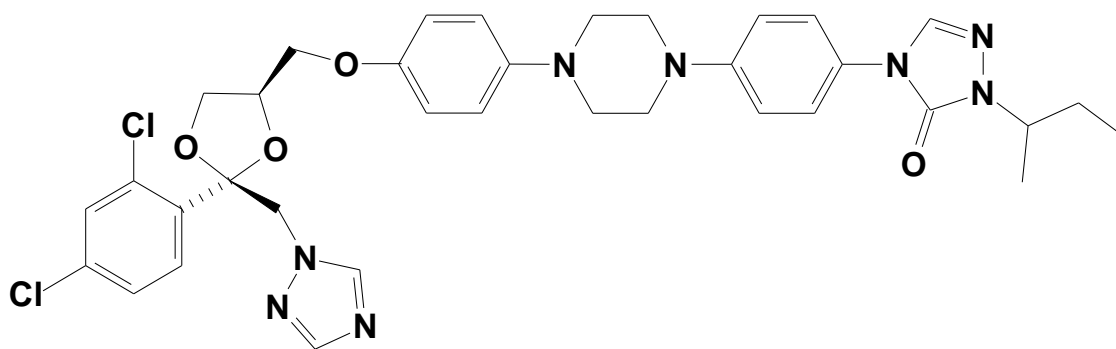
polaridade (NAMI et al., 2019). No geral, os triazólicos expressam um amplo espectro de ação com um painel de segurança melhorado, quando comparados á derivados imidazólicos (EMAMI, TAVANGAR, e KEIGHOBADI, 2017; NETT e ANDES, 2016).

Os triazólicos são classificados por primeira e segunda geração. Os triazólicos de primeira geração incluem Itraconazol (ITZ) e Fluconazol (FCZ), enquanto os Triazólicos de segunda geração Posaconazol (PCZ), Voriconazol (VCZ) e Isavuconazol (ISCZ), foram sintetizados com o propósito de melhorar a eficácia dos precursores descritos anteriormente (PEYTON, GALLAGHER e HASHEMZADEH, 2015).

#### 2.3.2.4.1. Itraconazol

O itraconazol é um agente similar e substituinte do cetoconazol, contém um painel de segurança melhorado (LIU et al., 2016). Foi indicado como um terapêutico de primeira escolha para infecções fúngicas invasivas, expressando um arsenal ativo contra: dermatófitos, algumas espécies de *Candida* intrinsecamente insensíveis ao fluconazol e fungos filamentosos como *Aspergillus* (LASS-FLÖRL, 2011). Assim, o itraconazol está disponível em forma de cápsulas, sendo administrado normalmente por via oral.

Nas últimas três décadas têm sido utilizado eficazmente como principal fármaco antidermatofítico (KHURANA, SARDANA, e CHOWDRARY, 2019). Embora seja pouco absorvido pelo trato gastrointestinal, associa-se por estas condições a alguns casos de intolerâncias gastrointestinais, déficits neurológicos e até cardiotoxicidade (ALLEGRA et al., 2017; STOTT e HOPE, 2017), requerendo assim, cuidados cautelosos em pacientes que fazem uso terapêutico com esse medicamento (DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, SÁNCHEZ NAVARRO e GARCÍA SÁNCHEZ, 2006).



**Figura 3.** Estrutura química do itraconazol.  
 Fonte: Adaptada de SHULKLA et al., 2016.

#### 2.3.2.5. Limitações do efeito azólico, falhas terapêuticas determinadas pelo avanço da resistência

O surgimento da resistência de patógenos fúngicos contra antifúngicos convencionais é o determinante principal da falha terapêutica e na atualidade está em ascensão contínua (NETT e ANDES, 2016; SANTOS et al., 2018). Isto porque os fungos têm a capacidade de adaptar-se rapidamente em ambientes novos e desafiadores, nessa adaptação eles superam o estresse induzido por compostos antifúngicos, desenvolvendo mutações ou ajustando a própria fisiologia celular (HOKKEN et al., 2019).

A resistência contra os antimicrobianos é um processo evolutivo, baseado na seleção natural em que microrganismos aumentaram sua capacidade de sobreviver e crescer na presença de drogas (CAMPOY; ADRIO, 2017). Entre as diferentes classes de antifúngicos, a resistência aos azólicos é mais evidente devido à sua natureza fungistática associada com fortes pressões seletivas ou uso indiscriminado de antifúngicos azólicos (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

Essa constatação é observada notoriamente pela redução da susceptibilidade *in vitro* ao azólico, e definida claramente, como um evento complexo, que requisita condições: intrínsecas (primárias) ou adquiridas (secundárias)

(GARCIA-RUBIO, CUENCA-ESTRELLA e MELLADO, 2017; HADRICH e AYADI, 2018; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A resistência intrínseca, é encontrada naturalmente em alguns fungos sem exposição prévia a droga, já se relaciona a constante exposição a droga como forma profilática e terapêutica (PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017.). Outro fato que determina a resistência adquirida é a associação com a provável exposição ambiental através do amplo uso de fungicidas na agricultura (VAEZI et al., 2017).

Os fungicidas agrícolas, tebuconazol, tetraconazol e meticonazol , exibem o mesmo mecanismo de ação dos azólicos clínicos, e, além disso, são aplicados desordenadamente por longos prazos, induzindo a mudanças fenotípicas e alterações no perfil de sensibilidade em fungos patogênicos, que podem vir da natureza portando uma resistência cruzada, adquirida previamente na agricultura pelo contato direto com agrotóxicos (BRILHANTE et al., 2019; GARCIA-RUBIO, CUENCA-ESTRELLA e MELLADO, 2017; MEIRELES et al., 2019).

O progresso da resistência intrínseca ou adquirida aos azólicos é preocupante, pois dificulta o manejo do tratamento, reduz a escolha de possíveis alternativas, e torna os isolados clínicos comumente pan-azólicos ou multiazol-resistentes. Embora os mecanismos promotores da resistência tenham sido elucidados através de técnicas moleculares e genéticas (PÉREZ-CANTERO, LÓPEZ-FERNÁNDEZ e GUARRO-ARTIGAS, 2019; HOKKEN et al., 2019).

A exposição contínua aos azólicos provoca estresse na célula fúngica, e estimula a proteína Hsp90 a qual desencadeia mecanismos de resistência como estratégias adaptativas (JENSEN, 2016). Segundo Sanglard (2016), Sanglard (2019) e Sharma e Chowdhary (2017), esses mecanismos, podem ser agrupados em pelo menos três princípios gerais que inclui: (a) alterações no alvo da droga, (b) diminuição

da concentração eficaz de drogas intracelular e (c) mecanismos compensatórios que diminuem a toxicidade da droga.

**a. Alterações no alvo da droga**

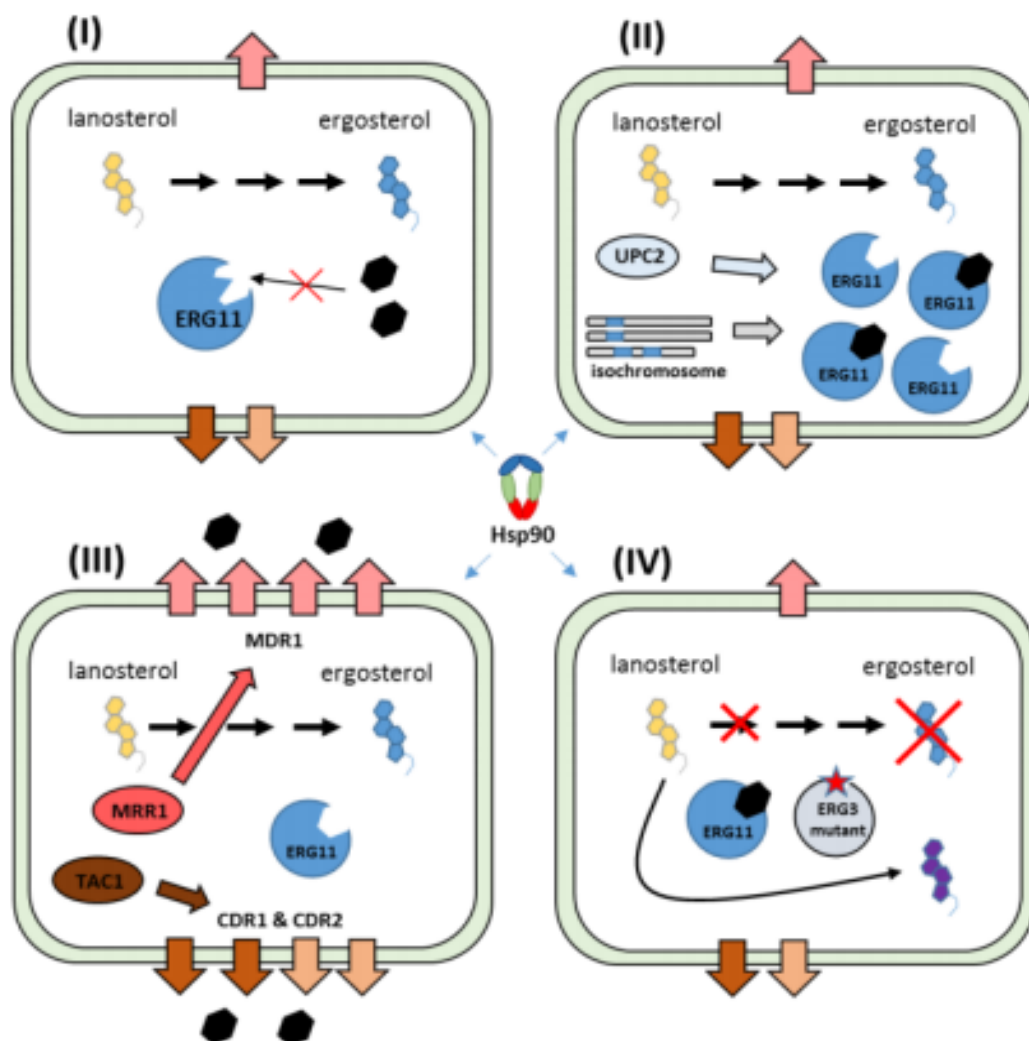
- Perda da afinidade do azólico com a enzima alvo através de mutações genéticas no gene codificador *ERG11* ou *CYP51*,

**b. Diminuição da concentração do medicamento, intracelular**

- Superexpressão dos transportadores de efluxo para drogas

**c. Mecanismos compensatórios que diminuem a toxicidade da droga**

- Superexpressão dos genes codificadores *ERG11* ou *CYP51*
- Desvio na via do ergosterol dependente, através da inativação do *ERG3* (perda de função) e substituição por outros esteróis.



**Figura 4.** Mecanismos de resistência azólica. (I) Perda da afinidade do azólico com a enzima alvo através de mutações genéticas no gene codificador ERG11 ou CYP51, (II) superexpressão dos genes codificadores da enzima alvo, (III) superexpressão de efluxo transportadores de drogas, (IV) desvio na síntese do ergosterol. Fonte: JENSEN, 2016.

#### 2.3.2.6.1. Alteração ou perda por afinidade do azólico com a enzima alvo

A modificação ou alteração da enzima, alvo promove o funcionamento normal da rota biossintética do ergosterol mesmo na presença do antifúngico, representando um dos mecanismos de resistência mais comuns. A redução ou falha na ligação do antifúngico ao local ativo de inibição é elucidada claramente como mutações pontuais no gene codificador da enzima ERG11 ou CYP51, resultando em substituições de aminoácidos ou modificações em cadeias peptídicas, as quais remodelam, estruturalmente, o canal de acesso ao ligante azólico que se torna

limitado ao conectar-se ao ferro hémico da enzima alvo (GUEGAN e GANGNEUX, 2017; PRASAD, SHAH e RAWAL, 2016).

#### 2.3.2.6.2. Superexpressão da enzima alvo

A superexpressão do alvo de inibição pode também conferir a resistência. Isso ocorre devido: (i) ganho de função no fator transcricional Upc2 que induz a superexpressão do gene ERG11 para espécies de *Candida* (FLOWERS et al., 2012), e (ii) duplicações nas regiões promotoras (TR34, TR46 / Y121F / T289A e TR53) do gene CYP51. Essas mutações excedem oito vezes a mais a produção de enzima alvo que por consequência diminui a eficácia azólica intracelular (SHARMA e CHOWDHARY, 2017).

#### 2.3.2.6.3. Superexpressão dos transportadores de efluxo

Um mecanismo de resistência encontrado em muitas espécies de fungos, é a capacidade de excretar compostos antifúngicos através da superexpressão de bombas transportadoras de efluxo (HOKKEN et al., 2019). As Bombas transportadoras de efluxo são intrínsecas à homeostase celular da linha de base, e operaram em taxa constante, realizando o transporte de nutrientes essenciais, algumas expulsam seletivamente os antibióticos e antifúngicos como também excretam vários compostos químicos. As glicoproteínas da bomba de efluxo têm a capacidade de remover os medicamentos acumulado na célula em detrimento da energia (NATESAN et al., 2013).

Nesse modo, a resistência ocorre quando mesmo na presença da droga a atividade da bomba de efluxo permite que o organismo cresça e funcione

fisiologicamente normal (NATESAN et al., 2013). Isso acontece, porque o aumento da expressão gênica promove a produção de glicoproteínas da bomba de efluxo, resultando no aumento exacerbado no transporte de antifúngicos para fora da célula (PRASAD, 2015, 2019).

#### 2.3.2.6.4. Desvio na rota Biosintética do ergosterol, através da inativação do ERG3 (perda de função) e substituição por outros esteróis.

Um quarto mecanismo menos comum, é descrito como o desvio na rota Biosintética do ergosterol (em leveduras como *Candida*) através da inativação ou perda de função do ERG3, isto favorece alternativas que biosintetizam esteróis substituintes do ergosterol. Quando o ERG11 é inibido, pelo efeito azólico outra proteína, o ERG6, medeia uma via alternativa que transforma o lanosterol em 14 $\alpha$ -metilado, esterol tóxico para o crescimento celular. Mas, isso envolve o ERG3, que quando desativado induz à biossíntese de esteróis adequados para viabilidade celular (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013).

Assim a célula fúngica produz uma membrana desprovida de ergosterol, mas contendo outros esteróis, que são viáveis para o crescimento celular. Neste modo o efeito azólico é contornado, por perder a eficácia não inibindo a rota Biosintética do ergosterol, conceituada pelo funcionamento normal da CF mesmo na presença da droga (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; LUNA-TAPIA, BUTTS e PALMER, 2018).

#### 2.3.2.7. Perspectivas futuras, por novos antifúngicos

Embora os azólicos sejam eficazes contra a maioria dos patógenos fúngicos, as infecções pan-azol-resistentes provocam um forte impacto clínico no

mundo, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (GARCIA-RUBIO, MONTEIRO, MELLADO, 2018). O desenvolvimento de fármacos para tratar indivíduos com infecção fúngica é uma prioridade continua frente a desvantagem dos antifúngicos azólicos existentes (PARENTE-ROCHA et al., 2017; PRISTOV, 2019; VAN DAELE et al., 2019).

Com isto, novos avanços importantes foram feitos na descoberta de alvos para antifúngicos; no entanto, são necessários muitos anos desde a descoberta até o uso clínico (CORTÉS et al., 2019). Por esse motivo, a otimização de moléculas já existentes e o desenvolvimento de novas formulações como terapias alternativas são importantes o aumento das opções de escolha durante o controle terapêutico de IF (SCORZONI et al., 2017)

#### **2.4. A busca por antifúngicos, através de compostos derivados de produtos naturais**

Uma alternativa amplamente utilizada como opção profilática e terapêutica para o controle de infecção fúngica são os derivados de produtos naturais advindos de plantas, pois a própria natureza oferece recursos vastos que fornecem altas taxas de acerto durante o tratamento de várias doenças provocadas por patógenos fúngicos (ALDHOLMI et al., 2019; SANTOS et al., 2018; SCORZONI et al., 2016). Isto porque, os óleos essenciais extraídos de plantas (folhas, flores, raízes ou cascas), possuem compostos naturais valiosos que servem como fortes coadjuvantes para o manejo de infecções fúngicas (D'AGOSTINO et al., 2019; PEDROSO et al., 2019).

#### 2.4.1. Definição de óleo essencial

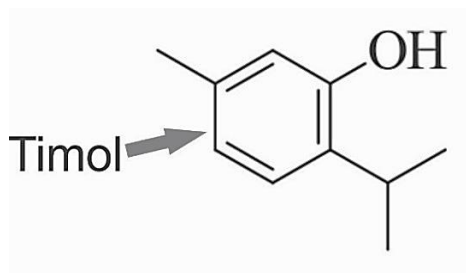
Segundo a RDC nº 02/07 da Agência Nacional de Segurança de vigilância sanitária (ANVISA, 2007), os óleos essenciais são definidos como produtos odoríferos, geralmente de composição complexa, obtidos a partir de uma matéria-prima vegetal definida botanicamente, por arrastamento a vapor, destilação a seco ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento. Aproximadamente 30.000 plantas podem ser utilizadas para produzir óleos essenciais e mais de 150 tipos diferentes de óleos estão inseridos no mercado. Conhecidos há centenas de anos, são utilizados comumente em muitos campos, como indústria de alimentos, perfumaria, produtos de limpeza, medicina tradicional e aroma terapia ( DE GROOT e SCHMIDT, 2016).

#### 2.4.2. Os Óleos essenciais e seus componentes antifúngicos

A avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais vem sendo realizada ao longo dos anos, a fim de identificar novos compostos potentes que demonstrem atividades antifúngicas promissoras (ALDHOLMI et al., 2019; D'AGOSTINO et al., 2019; GEWEELY et al., 2019; WIŃSKA et al., 2019), isso porque, esses óleos essenciais são constituídos por compostos orgânicos voláteis com peso baixo molecular os quais possuem uma natureza altamente lipofílica capaz de perturbar a membrana celular , e levar morte da célula fúngica (CHOUHAN, SHARMA e GULERIA, 2017; DHIFI et al., 2016; NAZZARO et al., 2017).

Esses compostos pertencem a diversas classes ou famílias, divididas categoricamente em terpenos e não terpenos, a classe dos terpenos, predominam-se em maioria dentre todos os compostos majoritários de óleos essenciais, seus

derivados funcionais incluem: hidrocarbonetos, alcoóis, éteres, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas e fenóis. Em proporções menores, encontram-se os compostos não terpênicos incluindo os derivados de fenilpropano ou fenilpropanoides. Um exemplo composto terpenos que apresenta atividades antifúngicas é o timol (DHIFI et al., 2016; FELIPE e BICAS, 2017).



**Figura 5.** Estrutura química do Timol.

#### 2.4.2.1. Timol

O timol é um composto volátil monoterpeneo fenólico (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O), encontrado principalmente no óleo essencial de plantas da família Lamiaceae, como orégano ou tomilho (LEMOS et al., 2017). Esse composto apresenta fortes propriedades biológicas incluindo antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (BELATO et al., 2018; MARCHESE et al. 2016). O interesse na formulação de fármacos antifúngicos à base de timol deve-se a vários estudos que avaliaram o potencial terapêutico deste composto para o tratamento de patógenos fúngicos (SALEHI et al., 2018; ZUZARTE et al., 2013).

Jafri e Ahmad (2019), Sharifzadeh et al. (2018) avaliaram o efeito potencial que o timol exibe contra estirpes resistentes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* á antifúngicos como fluconazol, como também interagem sinergicamente com essa droga. Essa interação do timol a antifúngicos triazólicos, potencializa o efeito de susceptibilidade, provendo sucesso na terapia antifúngica, dando

possibilidades a síntese de novos compostos (SHARIFZADEH et al., 2018).

### 2.4.3. Estratégias de síntese de novas moléculas antifúngicas

#### 2.4.3.1. Hibridização de compostos naturais, um novo caminho para terapia antifúngica

Os compostos naturais são eficazes durante o tratamento de doenças infecciosas, tendo grandes promessas como fonte de novos agentes antimicrobianos incluindo antifúngicos (KHAMENEH et al., 2019). E como tal, espera-se que esses compostos se tornem cada vez mais importantes frente a evolução da resistência (DAVISON e BRIMBLE 2019; GENILLOUD, 2019). Isso porque, os compostos naturais possuem ligantes covalentes que podem ser fundidos em estruturas de antifúngicos já existentes.

O anel triazólico, é uma estrutura antifúngica privilegiada porque contém um esqueleto conjugado com elementos farmacóforos, o qual permite o acoplamento a outros compostos por meio da hibridização molecular (JHA e KUMAR, 2019). A síntese de moléculas híbridas é vista como uma estratégia útil e promissora para desenvolver novos fármacos, porque pode reduzir os efeitos colaterais e superar a resistência adquirida por medicamentos convencionais.

Uma vez que esses compostos, contêm dois ou mais domínios farmacóforos diferentes que otimizam o efeito da droga (BOZOROV, ZHAO e AISA, 2019; SHAVETA, MISHRA e SINGH, 2016). Com isto várias moléculas híbridas contendo do compostos naturais ligados a triazólicos estão sendo conhecidas como fortes candidatas a fármacos para serem utilizadas durante o tratamento de várias doenças, incluindo aquelas causadas por microrganismos resistentes como os PFH (ANUSIONWU, ADERIBIGBE, e MBIANDA, 2018; XU, ZHAO, e LIU, 2019;

ZHANG,2019)

## **2.5. Síntese da Cicloadição**

A síntese de triazólicos derivados de compostos naturais tornou-se uma forte alternativa na produção de novos fármacos terapêuticos (DHEER, SINGH e SHANKAR, 2017; TEIXEIRA et al., 2018). Em geral, essas moléculas são sintetizadas através da reação da cicloadição ou click- chemistry que é conhecida como uma moda sustentável porque acontece entre alcino terminal e uma azida orgânica catalisados por metais (GOMES et al., 2019; WANG et al., 2016). Assim, alguns estudos indicam que moléculas sintetizadas a partir da síntese de click-chemistry demonstram um potente efeito antifúngico (LI et al., 2016; TANG et al., 2015).

### **2.5.1. A Síntese de 1,2,3 triazóis derivados do timol**

Evidências mostram que novas as triazólicas, sintetizadas pela síntese de click- chemistry oferecem um bom caminho para superar a resistência antimicrobiana e antifúngica. No entanto, esse efeito antimicrobiano ou antifúngico pode ser otimizado por um CN (ALDHOLMI et al., 2019). Recentemente, Santos et al. (2019) avaliaram o efeito da atividade antimicobacteriana de novos 1,2,3 triazóis derivados do eugenol, Santosh et al. (2018) relataram o efeito antimicrobiano de novos 1,2,3 triazóis derivados de chalconas.

Diante desses estudos, observa-se que tais compostos contêm em sua estrutura química o anel heterocíclico 1,2,3 triazol, que segundo, Dheer, Singh, e Shankar (2017) é uma estrutura sequencial (com três átomos de nitrogênio) que possui densidade rica em elétrons e dota de uma enorme variedade de andaimes, que

servem para síntese de novos compostos. Neste modo, sabendo que o anel heterocíclico 1,2,3 triazol é uma estrutura valiosa para síntese de novos compostos, e que o timol é um monoterpene fenólico que exerce diversas atividades biológicas. Sintetizou-se novas moléculas 1,2,3 triazóis derivadas do timol por meio da síntese de química click para avaliação da atividade antifúngica frente a patógenos fúngicos humanos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar os efeitos antifúngicos de novas moléculas triazólicas sintetizadas a partir do timol, bem como avaliar a citotoxicidade em cultura de células in vitro.

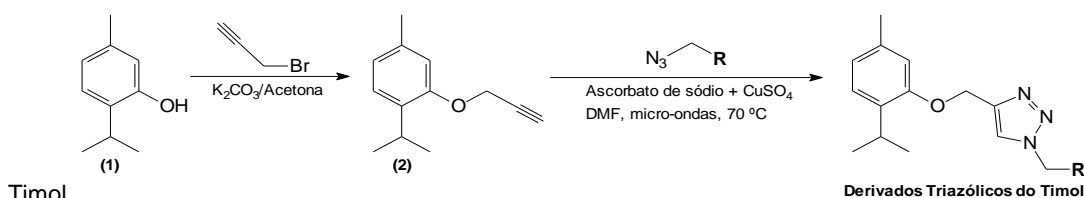
#### **3.2. Específicos**

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima;
- Comparar a CIM das novas moléculas triazólicas com os triazólicos convencionais.
- Avaliar e discutir as possíveis relações das atividades antifúngicas com a estrutura química das novas moléculas
- Estudar a cinética do tempo de morte dos patógenos fúngicos testados em concentrações de inibição das novas moléculas triazólicas
- Avaliar a citotoxicidade das novas moléculas triazólicas em culturas de células, em fibroblastos, queratinócitos e hepatócitos

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Síntese dos novos compostos triazólicos

As moléculas foram sintetizadas na Universidade Federal do Espírito Santo (Alegre, ES). A síntese das novas moléculas triazólicas, a partir do timol, ocorreu em apenas três etapas, usando a ideia da reação de ciclo adição química “click” na última etapa originando nove compostos 1,2,3 triazóis derivados do timol, conforme Esquema 1.



**Esquema 1.** Síntese de química click das moléculas triazólicas derivadas do timol.

Uma mistura reacional contendo timol (1) (0,05 g; 3,3 mmol) e carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (5 mmol) em acetona (4 mL) foi agitada a 0 °C, por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado brometo de propargila (33 mmol) à mistura reacional, sendo agitados à temperatura ambiente por 4 horas, levando à formação do alquino derivado do timol (2). Após a evaporação do solvente, o material foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (70-230) como fase estacionária e hexano: acetato de etila ou hexano: éter como eluente (BABU, et al., 2006; THANH, et al., 2019)

Em um tubo para micro-ondas (10 mL), procedeu-se uma reação click, utilizando-se ascorbato de sódio (5,2 mg, 0,027 mmol) e sulfato de cobre II 0,1 M (81 µL, 0,0081 mmol), para gerar o catalisador de cobre II in situ, em solução de dimetilformamida (DMF - 2 mL). Em seguida, adicionou-se o alquino (0,05 g; 0,27

mmolL) e as azidas comerciais (1,08 mmolL). A mistura foi aquecida a 70 °C, por 10 minutos, no reator de micro-ondas (150W), e depois resfriou-se até temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente, cada sólido residual, contendo os derivados triazólicos de timol, foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (acetato de etila: hexano 7:3) (AMBLARD, CHO e SCHINAZI,2009; ARAGÃO-LEONETI et al.,2010; TRUJILLO et al., 2019).

**Tabela 2.** Novas moléculas triazólicas derivadas do timol, sintetizadas pela síntese de click chemistry.

Novos triazóis			
Molécula	M.M	Rendimento	Substituinte
TIM	150,22	-	-
3c	385,07	34,3%	Br- <i>m</i>
3d	375,15	63,0%	CF <sub>3</sub> - <i>m</i>
3e	385,07	92,0%	Br- <i>o</i>
3f	365,17	4,9%	COOH- <i>p</i>
3g	337,17	39,8%	OCH <sub>3</sub> - <i>o</i>
3h	337,17	63,0%	OCH <sub>3</sub> - <i>p</i>
3i	366,16	83,7%	NO <sub>2</sub> - <i>o</i>
3j	366,16	42,4%	NO <sub>2</sub> - <i>m</i>
3k	337,17	39,3%	OCH <sub>3</sub> - <i>m</i>

M.M (massa molecular)

Os grupos substituintes inseridos no anel triazólico, podem influenciar na potência das atividades biológicas por que:

a) O Bromo é um grupo volumoso, orientador do tipo orto/para do anel aromático, mas é desativador deste anel aromático.

b) O grupo metoxila (OCH<sub>3</sub>) é orientador do tipo orto/para do anel aromático, sendo ativador deste anel aromático.

c) O grupo Nitro (NO<sub>2</sub>) é orientador do tipo meta do anel aromático, sendo também desativador deste anel aromático.

d) O grupo carboxila (COOH) é orientador do tipo meta do anel aromático, sendo desativador deste anel aromático.

Essas ativações/desativações do anel aromático influenciam na nuvem eletrônica, o que pode relacionar-se a atividade biológica. Além disso, ressalta-se que o tamanho dos grupos também pode influenciar na potência atividade biológica testada.

## **4.2. Atividade antifúngica**

### **4.2.1. Microrganismos**

Os microrganismos escolhidos para trabalho foram: *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (INCQS 40182), *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 (INCQS 40014) (ambos da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS- cedidos pela FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ); *Trichophyton rubrum* CCT 5506 (obtido do Instituto André Tossello, Campinas, SP) *Candida albicans* ATCC 10231.

### **4.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Os testes de susceptibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com os documentos de referência M27-A3 e M38-A, do Instituto de Padrões Clínicos de Laboratório. As soluções de antifúngicos foram preparadas sem dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídas em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) tamponado com MOPS (3-Nmorpholine-propane sulfonic acid), a fim de obter concentrações finais de 0,03 a 16 µg/mL para ITZ; 0,97 a 500 µg/mL para TIM e 0,195 a 100 µg/mL para as novas moléculas em microplacas de 96 poços.

#### 4.2.2.1. Ajuste e preparo de inóculo

O preparo do inóculo foi realizado seguindo os passos dos protocolos (CLSI 2008, 2010) os quais preconizam as seguintes etapas:

a. Repique dos microrganismos.

a.i Os microrganismos foram repicados em tubos estéreis com ágar batata-dextrose (ABD) ou ágar saubourad-desxtrose (ASD), sob temperaturas de incubação de: 35°C para *Candida* spp. Durante 24h; 30°C para *Trychophyton* spp. entre 15 a 20 dias; 35°C para *Aspergillus* spp. no intervalo de 5 a 7 dias.

b. Preparo das suspensões em solução salina a 0,85%.

b.i As suspensões com solução salina, foram preparadas em um volume de 5mL. Para decantação das hifas de *Aspergillus* e macroconídios de *T.rubrum*, adicionou-se 10µL de tween 40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na suspensão, aguardando precipitação nos seguintes tempos: 5 mim para *Aspergillus* e de 15 a 20 minutos para *T.rubrum*. Passado esse tempo aliquotou-se o sobrenadante para ajustar a suspensão. As suspensões de *Candida* foram preparadas somente em solução salina 0,85% ou água estéril.

c. Ajuste das suspensões por meio do método espectrofotométrico, sob um comprimento de onda de 530 nm para as densidades óticas (DO) de absorbância e transmitância.

ci A absorbância para fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. varia de 0,09 a 0,13. Já transmitância, varia de 65% a 70% para dermatófitos filamentosos como *Trychophyton* spp. (REZAEI-MATEHKOLAEI et al., 2018); e de 85% a 90% para leveduras como *Candida* spp.

#### 4.2.2.2. Inoculação, preparo e leitura das placas

Uma solução trabalho foi preparada para determinar a concentração final de inóculo na microplaca. Assim diluiu-se o inóculo ajustado, em caldo RPMI-1640 tamponado com MOPS, sob uma proporção de 1:50 para obter concentração final de  $0,4 - 5 \times 10^4$  UFC/mL para *Aspergillus* e  $1 - 3 \times 10^3$  UFC/ML para *T.rubrum*. Para *Candida* a solução trabalho foi preparada através da diluição de 1:50 em água estéril ou solução salina a 0,85%, seguida por uma diluição de 1:20 em RPMI-1640 para alcançar uma concentração final de  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  CFU/mL.

Passado a etapa de preparo das soluções trabalho, deu-se início ao preparo das microplacas de 96 poços seguindo a seguinte ordem: no poço controle positivo foi adicionado 100 µL de RPMI-1640 + 100 µL de solução trabalho. Nos poços testes, foram adicionados 100 µL do antifúngico em diferentes concentrações diluído em RPMI-1640 + 100 µL da solução trabalho. No poço controle negativo foi adicionado 100 µL de RPMI-1640 com DMSO < 2%. O valor da CIM foi determinado após 48h (para *Candida* / *Aspergillus*) e 96h (para *Trychophyton*) de incubação a 35°C por meio de leitura visual.

A menor concentração que resultou inibição completa do crescimento do microrganismo comparado com o controle positivo (microrganismo sem a droga) foi considerada a CIM (concentração inibitória mínima). Os resultados foram validados com as cepas padrões (*Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16193, *Trichophyton rubrum* CCT 5506 e *Candida albicans* ATCC 10231). Os experimentos foram realizados em duplicatas (CLSI, 2008, 2010).

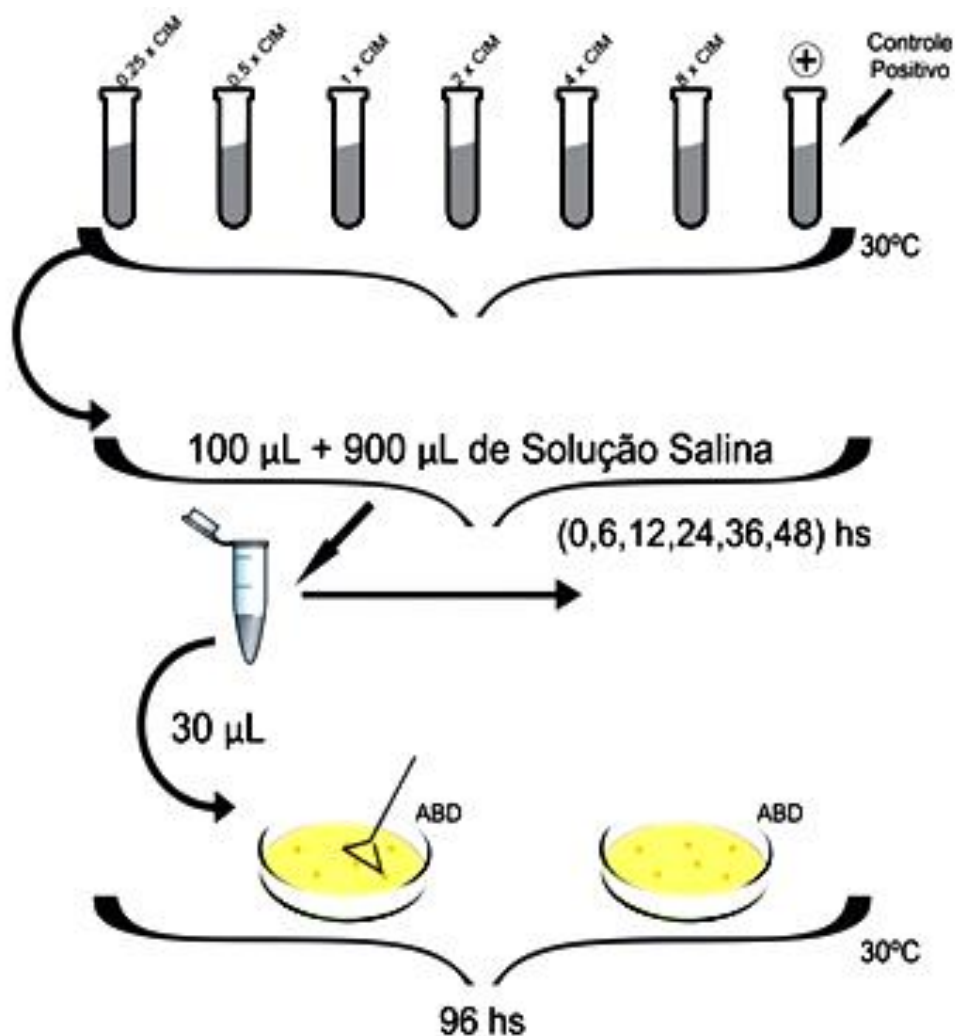
#### 4.2.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O teste da determinação da CFM foi realizado, seguindo o protocolo de Espinel-Ingroff, Fothergill, Peter e Rinaldi (2002). Transferindo 20 µL dos poços da microdiluição em caldo, referenciando os valores de CIM, 2xCIM e 4xCIM, à placa de cultura com ASD e incubada a 35°C por 48 h para *Candida* e *Aspergillus* e 96h para *T.rubrum*. A CFM foi definida em cima da menor concentração que não mostrou crescimento visual após a incubação ou rendeu menos que 3 UFC (Unidades Formadoras de Colônias), onde considera-se que houve morte de aproximadamente 99% a 99,5% dos patógenos fúngicos humanos (VAN DIJCK et al., 2018).

#### 4.2.4. Estudo da curva de morte

O ensaio foi realizado utilizando as adaptações de Ghannoum et al. (2013) ao método descrito por Klepser et al. (1998). As Suspensões dos microrganismos testes (*Trychophyton rubrum*) foram ajustadas de acordo com o protocolo CLSI 2008, para obter uma concentração final de inóculo correspondente a  $1-3 \times 10^3$  UFC/mL em caldo RPMI junto às concentrações testes (0,25xCIM, 0,5xCIM, CIM, 2XCIM, 4xCIM e 8xCIM) dos antifúngicos itraconazol, timol (1) e das novas moléculas. Um controle positivo sem a presença de droga foi preparado.

Em momentos predeterminados (0, 6, 12, 24, 36 e 48h), uma amostra de 100 µL foi removida das concentrações testes e diluída em 900 µL de solução salina. Em seguida, uma alíquota de 30 µL de cada diluição foi semeada placas de ABD. Os testes foram realizados em duplicatas, conforme é demonstrado na Figura 7. As contagens de colônias foram determinadas após 4 dias (96 h) de incubação a 30°C. Uma curva de time-kill foi plotada para o número log<sub>10</sub> de conídios / mL versus tempo.



**Figura 6.** Curva da cinética de morte (time-kill) dos compostos 3g,3j TIM e ITZ frente ao *T.rubrum*. ABD (ágar batata dextrose).

### 4.3. Teste da viabilidade celular in vitro

#### 4.3.1. Células

As células escolhidas foram células de hepatócitos h1c1c7, fibroblastos L929, e queratinócitos Hacat, adquiridas pelo BCRJ (banco de células do rio de janeiro, RJ).

#### 4.3.2. Ensaio da citotoxicidade in vitro

A atividade citotóxica das novas moléculas triazólicas foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (brometo de [3- (4,5 dimetil tiazol-2-il)-difeniltetrazólico]) proposto por Mosmann (1983). Resumidamente, L929, h1c1c7 e HaCat foram adicionados em microplacas de 96 poços a uma concentração final de  $7 \times 10^4$  células/mL. Após incubação por 18h, as células foram expostas a diferentes concentrações dos novos compostos triazólicos (derivados timol nas concentrações de 1-100 µg/mL), determinadas com base nos resultados das CIM obtidas pelo ensaio de microdiluição em caldo e incubadas por 24 h.

Após a incubação, 100 µL de MTT (1 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubados por mais 2 h. Em seguida, 100 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazana. O ITZ e TIM foram utilizados como controles positivos. A absorbância de formazana púrpura, proporcional ao número de células viáveis, foi medida a 595 nm utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, Sunnyvale, CA). Os experimentos foram realizados em duplicatas.

#### 4.3.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para determinar diferença significativa entre as médias ( $p < 0.05$ ), utilizando o software Biostat 5.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Atividade antifúngica

A avaliação do efeito antifúngico dos compostos 3c-k, foi determinada, frente a estirpes sensíveis de *C.albicans*, *A.fumigatus*, *A.flavus* e *T.rubrum* através dos testes de CIM e CFM conforme é demonstrado através da Tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação da atividade antifúngica dos triazólicos derivados do timol, frente a *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*.

Atividade antifúngica									
Mol.	Subst	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.flavus</i>		<i>T.rubrum</i>		<i>C. albicans</i>	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
TIM	-	<b>62.5</b>	250	250	250	<b>31.25</b>	<b>125</b>	125	125
3c	Br- <i>m</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
3d	CF <sub>3</sub> - <i>m</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
3e	Br- <i>o</i>	>100	-	>100	-	<b>25</b>	100	100	-
3f	COOH- <i>p</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
3g	OCH <sub>3</sub> - <i>o</i>	>100	-	>100	-	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>	>100	-
3h	OCH <sub>3</sub> - <i>p</i>	>100	-	>100	-	50	100	>100	-
3i	NO <sub>2</sub> - <i>o</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
3j	NO <sub>2</sub> - <i>m</i>	>100	-	>100	-	<b>3.125</b>	<b>6.25</b>	>100	-
3k	OCH <sub>3</sub> - <i>m</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
ITZ	-	<b>0.5</b>	1	<b>0.5</b>	0,5	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>0.25</b>	<b>0.5</b>

Resultados expressos em µg/mL; CIM (concentração inibitória mínima); CFM (concentração fungicida mínima); (-) composto não demonstrou atividade, CFM não definida. Mol. (Molécula); Subst. (substituente).

Os melhores resultados de inibição foram verificados nas moléculas 3e, 3g e 3j frente ao *T.rubrum*. Tais resultados podem estar associados a posição do grupo ligado anel aromático em relação ao anel triazólico (DHEER, SINGH, e SHANKAR, 2017). Diante disto, observou-se, que os grupos Br (3e) e a metoxila (3g) na posição *orto* aumentaram a atividade, quando comparado aos similares nas posições *meta* (3c) e *para* (3h). Já o 3j (grupo NO<sub>2</sub>-*m*) provavelmente, por diminuir fortemente a densidade eletrônica do anel aromático, apresentou um melhor resultado quando

comparado a 3i e 3k.

Em relação à CIM e CFM de 3j, percebe-se que os valores encontrados se assemelharam aos valores de CIM obtidos no estudo de Srinivas et al. (2017), que avaliou a atividade antifúngica de moléculas híbridos triazol-pirazol, frente ao mesmo agente *T.rubrum* (CIM 3,1 µg/mL). Além disso, observa-se que a molécula 3j apresentou um efeito de CFM 20 vezes mais potente que o TIM de origem. Esse resultado se conflui aos relatos descritos por Martelli e Giacomini (2018), onde se enfatiza que a junção de compostos naturais a anéis heterocíclicos triazólicos otimiza o efeito antimicrobiano e antifúngico.

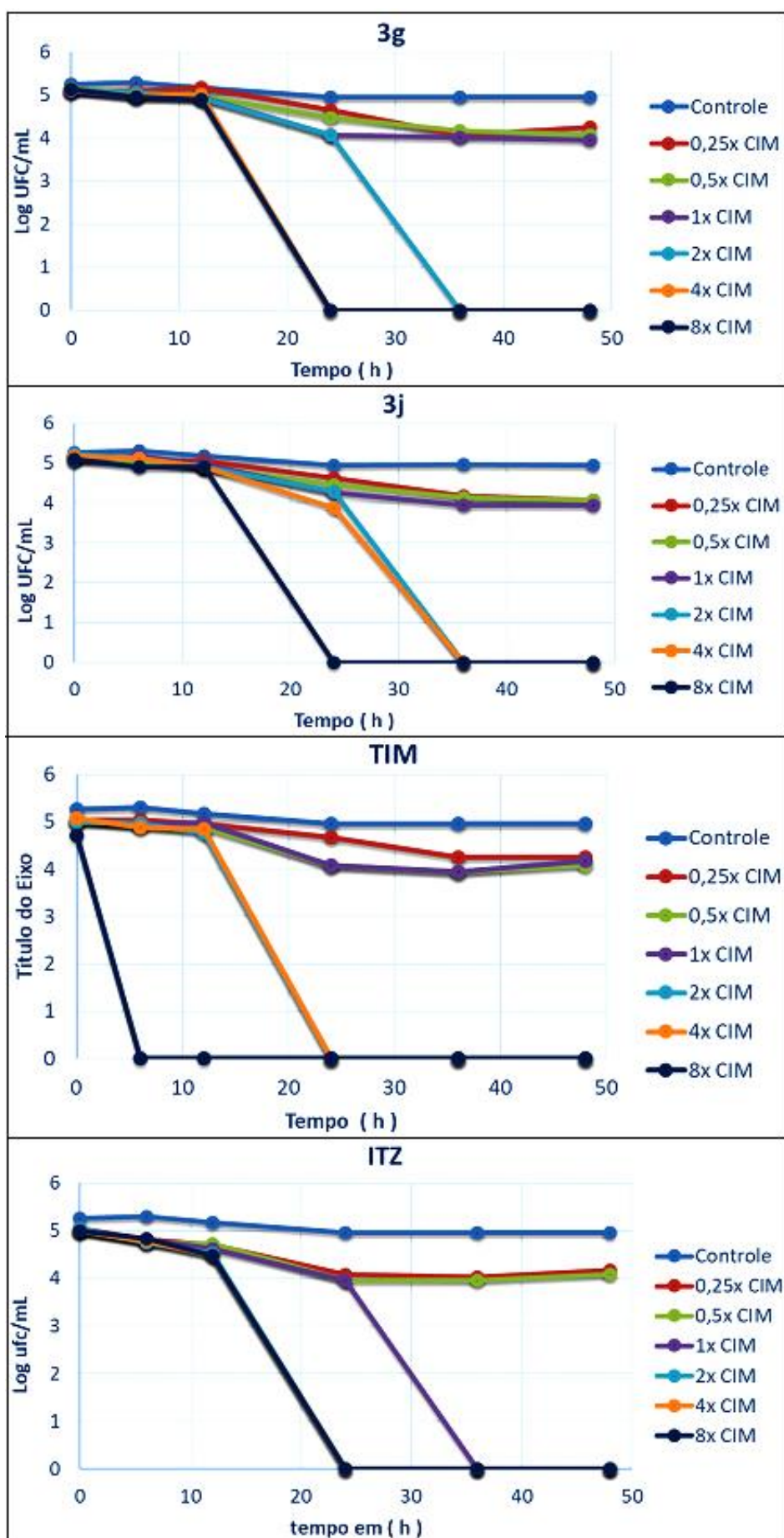
Outro fato observado, é que CIM da molécula 3j quando confrontada a dados descritos na literatura, é mais potente do que o antifúngico convencional fluconazol frente ao *T.rubrum* (CIM > 8 µg/mL) (ALLAHDADI et al., 2019; NI et al., 2018). Recentemente, Teng et al. (2018) determinaram o efeito antifúngico de naftininas derivadas floroglucinol contra a *T.rubrum*, onde a menor CIM<sub>50</sub> foi de 3,05 µg/mL. Resende et al. (2018) avaliou o efeito antifúngico de uma série xantonas derivadas de liquens, no qual a menor CIM diante de *T.rubrum* foi de 8 µg/mL. Quando se confronta a CIM das moléculas avaliadas nos estudo de Teng et al. (2018) e Resende et al. (2018) com a CIM 3j frente ao *T.rubrum*, observa-se que 3j é mais potente, embora essas moléculas comparadas tenham classes antifúngicas diferentes. Ressaltando assim, que 3j apresenta efeitos propícios para terapia antidermatofítica já que CIM definida foi em 100% inibição.

As moléculas 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j e 3k, quando testadas frente aos outros patógenos (*C. albicans*, *A. fumigatus* e *A. flavus*) não apresentaram atividade antifúngica (CIM de > 100µg/mL). Isso Pode estar relacionado a uma possível resistência intrínseca desses microrganismos a esses compostos, mesmo sendo cepas sensíveis (CARAMALHO et al., 2017).

Como na Tabela 3 é demonstrado que, a CIM do itraconazol frente a *T. rubrum* apresentou efeito fungicida, e a CIM/CFM das moléculas 3j e 3g mostraram otimização diante do TIM origem, foi realizado o estudo cinético da curva de morte para confirmar a ação fungistática /fungicida ao longo tempo.

#### 5.1.1. Estudo Cinético da curva de morte, Time-kill

O estudo cinético da curva de morte avaliou o efeito de ação dos compostos 3g, 3j, itraconazol e timol frente ao *T. rubrum*. Demonstrando redução no crescimento partir de 24h, indicando efeitos fungistáticos e fungicidas, conforme expresso na Figura 7.



**Figura 7.** Curva da cinética de morte (time-kill) dos compostos 3g,3j do timol e do ITZ frente ao *T.rubrum*.

O efeito fungistático, foi constatado através das CIM dos compostos 3g (CIM de 6,25 µg/mL;) e 3j (CIM de 3,125 µg/mL;) revelando que ao longo do tempo houve apenas diminuições no número de colônias. Já o efeito fungicida, foi confirmado a partir da CFM de 3g (CFM de 12,5 µg/mL) e 3j (CFM de 6,25 µg/mL). As quais correspondem a concentração de 2xCIM.

Diante disto observa-se que o composto 3g revelou efeito dose dependente a partir da CFM (2xCIM), demonstrando similaridade ao itraconazol . O efeito fungicida de 3j assemelha-se aos resultados obtidos por Hazirolan et al. (2013) que Comparou *in vitro* a atividade fungicida / fungistática do voriconazol itraconazol fluconazol e posaconazol contra *Trichosporon asahii*, demonstrando que o efeito da CIM pode ser fungistático em 24h; mas essa atividade torna-se fungicida à medida que o tempo e a concentração de incubação são aumentados, até atingir a diminuição máxima do log (em relação ao número de UFC/mL).

Quando é confrontado, os valores de inibição dos compostos 3j e 3g ao timol controle, constata-se que os efeitos fungistáticos são similares, demonstrando redução no crescimento a partir de 24h. Já o efeito fungicida de 3j e 3g é mais tardio do que o timol original, pois atinge diminuição total do log em 36h, enquanto o timol atinge em 24h. Diante deste fato destaca-se que o timol otimizou o efeito antifúngico, mas não reduziu o tempo de morte dos novos compostos.

## **5.2. Teste da viabilidade celular**

Os ensaios de citotoxicidade são utilizados como forma de triagem para detectar se o composto ativo do medicamento teste exibe efeitos citotóxicos (ADAN; KIRAZ; BARAN,2016). Como os compostos de anel triazólico já são conhecidos por expressar algumas atividades citotóxicas, principalmente a células hepáticas

(KUMAR;JAIN, 2016). A viabilidade celular foi avaliada através do teste de citotoxicidade (MTT), em células de: hepatócitos (h1c1c7), fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCat) expostas as moléculas 3g e 3j, conforme é demonstrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Teste da Viabilidade celular frente dos compostos 3g e 3j em cultura de células h1c1c7 (hepatócitos), fibroblasto (L929) e queratinócito (HaCat).

Molécula	Atividade Citotóxica IC <sub>50</sub>		
	h1c1c7	L929	HaCat
<b>3j</b>	41,2± 0,4c	68,4± 1,2c	84,3 ± 4,3b
<b>TIM</b>	61,5 ± 1,4b	88,9 ± 2,5a	67,5± 5,5c
<b>ITZ</b>	95,9± 1,0a	83,7± 1,9b	115,7± 2,2a

Resultados expressos em (µg/mL). Letras diferentes entre colunas representam diferenças significativas entre as substâncias (p <0,05).

Observa-se que a molécula 3j apresenta IC<sub>50</sub> de 84,3 µg/mL para queratinócitos (HaCat), sendo significativamente superior (p < 0,05) ao valor de citotoxicidade do timol original. Diante deste fato, pode se afirmar que a CIM de 3j (3,125 µg/mL) contra *T. rubrum* é uma concentração segura e não oferece um efeito de citotoxicidade para queratinócitos. Como os queratinócitos são células do estrato córneo, o resultado de 3j encontrado nesse estudo é superior aos resultados obtidos por Gao Ye et al. (2019) que avaliaram a atividade citotóxica dos compostos híbridos de moxifloxacinamida-1,2,3-triazol-istina em células CHO (células de tecido epitelial) onde o melhor resultado apresentou IC<sub>50</sub> < 64 µg/mL.

Para os outros tipos de células, a molécula 3j demonstrou uma citotoxicidade, significativamente (p < 0,05), menos tolerável em relação a citotoxidade dos queratinócitos. Apresentando IC<sub>50</sub> de: 41,2 µg/mL para hepatócito (h1c1c7) e 68,4 µg/mL para fibroblasto (L929). Mas, apesar disso ressalta-se que o efeito citotóxico de 3j para HaCat, é menos tolerável quando comparado ao itraconazol.

No entanto, embora o itraconazol apresente boas interações com células do extrato córneo (HaCat IC<sub>50</sub> 115,7 µg/mL). Outros antifúngicos convencionais, ainda demonstram um perfil citotóxico desfavorável apesar de serem utilizados amplamente como agentes tópicos, um exemplo disso é o cetoconazol (GUPTA;LYONS, 2015). Isso enfatiza necessidade de se investigar 3j quanto a citotoxicidade *in vivo*, interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, já que essa molécula demonstra toxicidade tolerável para células do extrato córneo (Queratinócitos).

## 6. CONCLUSÕES

Da avaliação antifúngica dos compostos triazólicos derivados do timol (3c-k), conclui-se que:

- As moléculas 3g e 3j apresentaram as melhores atividades antifúngicas contra o dermatófito *T.rubrum*, onde 3j demonstra um efeito de CFM 20 vezes a mais potente do que o timol de origem (CIM 31,2 µg/mL e CFM de 125 µg/mL). Provavelmente, os grupos radicais dessas moléculas influenciaram na otimização.
- A CIM de 3j é superior a CIM do fluconazol, de acordo com relatos descritos na literatura, no entanto esses compostos ainda são menos eficazes do que o itraconazol.
- A ação fungicida de 3g é dose dependente atinge diminuição total do log em 24h e apresenta similaridade ao itraconazol.
- A atividade citotóxica de 3j demonstra um perfil é tolerável para queratinócito, revelando IC<sub>50</sub> de 84,3 µg/mL.
- Por fim, o 3j é promissor para estudos futuros, já que este composto pode ser um candidato a fármaco antidermatofítico de uso tópico.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, P. H. O.; PIZI, A. R. B.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. C.; FREGNAN, A. M.; SILVA, F. N.; COELHO, L. F. L.; MALAQUIAS, L. C. C.; DIAS, A. L. T.; DIAS, D. F.; VELOSO, M. P.; CARVALHO, D. T. Synthesis and Biological Evaluation of New Eugenol Mannich Bases as Promising Antifungal Agents. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 86, n. 4, p. 459-65, 2015.
- ADAN AYSUN; YAĞMUR KIRAZ; YUSUF BARAN. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 17, n. 14, 2016.
- ALDHOLMI, M.; MARCHAND, P.; OURLIAC-GARNIER, I.; LE PAPE, P.; GANESAN, A. A Decade of Antifungal Leads from Natural Products: 2010–2019. *Pharmaceuticals*, v. 12, n. 4, p. 2010–19, 2019.
- ALLAHDADI, M.; HAJIHOSSEIN, R.; KORD, M.; RAHMATI, E.; AMANLOO, S.; DIDEHDAR, M. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility Profile of Dermatophytes Isolated from Scalp Dermatophyte Carriage in Primary School Children in Arak City, Center of Iran. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2019.
- ALLEGRA, S.; FATIGUSO, G.; DE FRANCIA, S.; FAVATA, F.; PIRRO, E.; CARCIERI, C.; DE NICOLÒ, A.; CUSATO, J.; DI PERRI, G.; D'AVOLIO, A. Pharmacokinetic Evaluation of Oral Itraconazole for Antifungal Prophylaxis in Children. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 44, n. 11, p. 1083–88, 2017.
- ALLEN, D.; WILSON, D.; DREW, R.; PERFECT, J. Azole Antifungals: 35 Years of Invasive Fungal Infection Management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 13, n. 6, p. 787-98, 2015.
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB): 1–5, 2019.
- AMBLARD, F., J. H. CHO, AND R.F. SCHINAZI, Cu (I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1, 3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry. *Chemical reviews*, v. 109, n. 9, p. 4207-4220, 2009.
- ANTONISSEN; GUNTHER; AN MARTEL. Antifungal Therapy in Birds: Old Drugs in a New Jacket. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, v. 21, n. 2, p. 355–77, 2018.
- ANUSIONWU; CHIOMA, G.; BLESSING, A.; ADERIBIGBE; XAVIER, Y.; MBIANDA. Hybrid Molecules Development: A Versatile Landscape for the Control of Antifungal Drug Resistance: A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 6, p. 450–64, 2018.
- ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper (I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron*, v. 66, n.

49, p. 9475-9492, 2010.

BABU, K. S.; BABU, T. H.; SRINIVAS, P. V.; KISHORE, K. H.; MURTHY, U. S. N.; RAO MADHUSUDANA, J. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 16, n. 1, p. 221-224, 2006.

BADIEE; PARISA; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic Invasive Fungal Infections: Diagnosis & Clinical Management. *Indian Journal of Medical Research*, v. 139, p. 195–204, 2014.

BASSETTI, M.; CARNELUTTI, A.; PEGHIN, M.; AVERSA, F.; BARCHIESI, F.; GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; SANGUINETTI, M.; TORTORANO, A. M.; MONTAGNA, M. T.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; DENNING, D. W. Stimated Burden of Fungal Infections in Italy. *Journal of Infection*, v. 76, n. 1, p. 103–6, 2018.

BELATO, K. K. et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Thymol Verified in Murine Macrophages (RAW 264.7) after Antimicrobial Analysis in Candida Albicans, Staphylococcus Aureus, and Streptococcus Mutans. *Journal of Functional Foods*, v. 40, p. 455–60, 2018.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany*, v. 98, n. 3, p. 426–38, 2011.

BONGOMIN, F.;GAGO, S.;OLADELE, R.; DENNING, D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 4, 2017.

BOUCHARA, J. P.;MIGNON,B.;CHATURVEDI, V. Dermatophytes and Dermatophytoses: A Thematic Overview of State of the Art, and the Directions for Future Research and Developments. *Mycopathologia*,v. 182, n. 1–2, p. 1–4, 2017.

BOZOROV;KHURSHED; ZHAO, J.;AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-Containing Hybrids as Leads in Medicinal Chemistry: A Recent Overview. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 27, n. 16, p. 3511–31, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Brasília, DF: ANVISA, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, S. P.; SALES, J. A.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Exposure of Candida Parapsilosis Complex to Agricultural Azoles: An Overview of the Role of Environmental Determinants for the Development of Resistance. *Science of the Total Environment*, n.650, p. 1231–38, 2019.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 165, 2012.

- BRUNKE; SASCHA; MOGAVERO, S.; KASPER, L.; HUBE, B. Virulence Factors in Fungal Pathogens of Man. *Current Opinion in Microbiology*, n. 32, p. 89-95, 2016.
- BUENO, D. J.; SILVA, J. O. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. ed., Elsevier, 2014.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. n. 133, p. 86–96, 2017.
- CARAMALHO, R.; TYNDALL, J. D. A.; MONK, B. C.; LARENTIS, T.; LASS-FLÖRI, C.; LACKNER, M. Intrinsic Short-Tailed Azole Resistance in Mucormycetes Is Due to an Evolutionary Conserved Aminoacid Substitution of the Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. *Scientific REPOrTS*, v. 7, p. 1-10, 2017.
- CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H; Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clinics in Chest Medicine*, v. 38, n. 3, p. 393–402, 2017.
- CARRIS, L.M; LITTLE C. R.; STILES, C. M. Introduction to Fungi What Is a Fungus? *Plant Health Instructor*, 2012.
- CASADEVALL, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. *Pathogens and Immunity*, v. 3, n. 2, p. 183, 2018.
- CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M.; CHEN, Y. L. New Facets of Antifungal Therapy. *Virulence*, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, v. 4, n. 3, 2017.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications*, 2.ed., v. 28, n. 14, 2008.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. *A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications*, 3. ed., v. 28, n. 15, 2010.
- CORTÉS, J. C. G. CURTO, M. Á.; CARVALHO, V. S. D.; PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. The Fungal Cell Wall as a Target for the Development of New Antifungal Therapies. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 6, 2019.
- D'AGOSTINO, M.; TESSE, N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. *Molecules*, v. 24, n. 20, 2019.
- DAVISON, E. K.; BRIMBLE M. A. Natural Product Derived Privileged Scaffolds in Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, n. 52, p. 1–8, 2019.
- DE GROOT, A. C.; SCHMIDT, E. Essential Oils, Part I: Introduction. *Dermatitis*, v. 27,

n. 2, p. 39–42, 2016.

DE SOUZA, T. B.; BRITO, K. M.; SILVA, N. C.; ROCHA, R. P.; DE SOUZA, G. F.; DUARTE, L. P.; COELHO, L. F.; DIAS, A. L.; VELOSO, M. P.; CARVALHO, D. T.; DIAS, D. F. New Eugenol Glucoside-Based Derivative Shows Fungistatic and Fungicidal Activity against Opportunistic *Candida Glabrata*. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 87, n. 1, p. 83–90, 2016.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal Attributes of 1,2,3-Triazoles: Current Developments. *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 30-54, 2017.

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. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DOMÍNGUEZ-GIL, H. A.; SÁNCHEZ NAVARRO, A.; GARCÍA SÁNCHEZ, M. J. Therapeutic Drug Monitoring of Itraconazole and the Relevance of Pharmacokinetic Interactions. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, n. 7, p. 97–106, 2006.

DOS SANTOS, T.; COELHO, C. M.; ELIAS, T. C.; SIQUEIRA, F. S.; NORA, E. S. S. D.; CAMPOS, M. M. A.; SOUZA, G. A. P.; COELHO, L. F. L.; CARVALHO, D. T. Synthesis and Biological Evaluation of New Eugenol-Derived 1,2,3-Triazoles as Antimycobacterial Agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society. J. Brasz. Chem. Soc.*, v. 30, n. 7, p. 1425-1436, 2019.

ELIAS, R.; BENHAMOU, R. I.; JABER, Q. Z.; DOROT, O.; ZADA, S. L.; OVED, K.; PICHINUK, E.; FRIDMAN, M. Antifungal Activity, Mode of Action Variability, and Subcellular Distribution of Coumarin-Based Antifungal Azoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 179, p. 779-790, 2019.

EMAMI, S.; GHOBADI, E.; SAEDNIA, S.; HASHEMI, S. M. Current Advances of Triazole Alcohols Derived from Fluconazole: Design, in Vitro and in Silico Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 170, p. 173–94, 2019.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; PETER, J.; RINALDI, M.G.; WALSH, T. J. Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents For. *Society*, v. 40, n. 9, p. 3204–8, 2002.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, Aromas e a Química Dos Compostos Naturais. *Química Nova na Escola*, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FILLINGER, R. J.; ANDERSON, M. Z. Seasons of Change: Mechanisms of Genome Evolution in Human Fungal Pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 70: 165–74, 2019.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health. *Nature*, n. 484, p. 186–94, 2012.

FLOWERS, S. A.; BARKER, K. S.; BERKOW, E. L.; TONER, G.; CHADWICK, S. G.; GYGAX, S. E.; MORSCHHÄUSER, J.; ROGERS, P. D. Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida Albicans*. *Eukaryotic Cell*, v. 11, n. 10, p. 1289–99, 2012.

FRIEDMAN, D. Z.P.;SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 3, 2019.

FUENTEFRIA, A. M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. K.; DE ANDRADE, S. F. Antifungals Discovery: An Insight into New Strategies to Combat Antifungal Resistance. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.

GAO, F.; YE, L.; KONG, F.; HUANG, G.; XIAO, J. Design, Synthesis and Antibacterial Activity Evaluation of Moxifloxacin-Amide-1,2,3-Triazole-Isatin Hybrids. *Bioorganic Chemistry*, v. 91, 2019.

GARBEE, D. D.; PIERCE, S. S.; MANNING J. Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, v. 29, n. 1, p. 67–79, 2017.

GARCIA-RUBIO, R.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs*, v. 77, n. 6, p. 599-613, 2017.

GARCIA-RUBIO, R.; MONTEIRO, M. C.; MELLADO, E. Azole Antifungal Drugs: Mode of Action and Resistance. *Reference Module in Life Sciences*, 2018.

GENILLOUD, O. Natural Products Discovery and Potential for New Antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, n. 51, p. 81–87, 2019.

GEWEELY, N. S.; AFIFI, H. A.; IBRAHIM, D. M.; SOLIMAN, M. M. Efficacy of Essential Oils on Fungi Isolated from Archaeological Objects in Saqqara Excavation, Egypt. *Geomicrobiology Journal*, v. 36, n. 2, p. 148–68, 2019.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; VERMA, A.; PLAUM, S.; FLEISCHER JR., A.; HARDAS, B. In Vitro Antifungal Activity of Naftifine Hydrochloride against Dermatophytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 9, p. 4369–72, 2013.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; GUEYE, S. A.; SALVETTI, S.; SENSEI, S.; BULGHERONI, A.; MAILLAND, F. Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors To Cause Resistance or Cross-Resistance in *Trichophyton Rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2825-9, 2014.

GOMES, R. S.; JARDIM, G. A. M.; CARVALHO, R. L.; ARAUJO, M. H.; SILVA JÚNIOR, E. N. Beyond Copper-Catalyzed Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition: Synthesis and Mechanism Insights. *Tetrahedron*, v. 75, n. 27, p. 3697–3712, 2019.

GOW, N. A. R.; LATGE, J.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 3, 2017.

- GUEGAN, H.; GANGNEUX, J. P. Résistance Aux Azolés Chez Aspergillus. *Journal des Anti-Infectieux*, v. 19, n. 3–4, p. 110–18, 2017.
- GUO, A.; ZHAO, Z.; ZHANG, P.; YANG, Q.; LI, Y.; WANG, G. Linkage between Soil Nutrient and Microbial Characteristic in an Opencast Mine, China. *Science of the Total Environment*, n. 671, p. 905–13, 2019.
- GUPTA, A. K.; LYONS, D. C. A. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole.” *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 19, n. 4, p. 352–57, 2015.
- HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of Antifungal Susceptibility: Review of Literature. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 28, n. 3, p. 574–584, 2018.
- HATEFI, A.; RAHIMPOUR, E.; GHAFOURIAN, T.; MARTINEZ, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; JOYBAN, A. Solubility of Ketoconazole in N-Methyl-2-Pyrrolidone + Water Mixtures at T = (293.2 to 313.2) K. *Journal of Molecular Liquids*, n. 281, p. 150–55, 2019.
- HAY, R. Superficial Fungal Infections. *Medicine (United Kingdom)*, v. 45, n. 11, p. 707–10, 2013.
- HAZIROLAN, G.; CANTON, E.; SAHIN, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S. Head-to-Head Comparison of Inhibitory and Fungicidal Activities of Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Posaconazole, and Isavuconazole against Clinical Isolates of Trichosporon Asahii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 10, p. 4841–47, 2013.
- HENDRICKSON, J. A.; HU, C.; AITKEN, S. L.; BEYDA, N. Antifungal Resistance: A Concerning Trend for the Present and Future. *Current Infectious Disease Reports*, v. 21, n. 12, 2019.
- HIPÓLITO, T. M. M.; BASTOS, G. T. L.; BARBOSA, T. W. L.; DE SOUZA, T. B.; COELHO, L. F. L.; DIAS, A. L. T.; RODRÍGUEZ, I. C.; DOS SANTOS, M. H.; DIAS, D. F.; FRANCO, L. L.; CARVALHO, D. T. Synthesis, Activity, and Docking Studies of Eugenol-Based Glucosides as New Agents against Candida Sp. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 92, n. 2, p. 1514–24, 2018.
- JAFRI, H.; AHMAD, I. Thymus Vulgaris Essential Oil and Thymol Inhibit Biofilms and Interact Synergistically with Antifungal Drugs against Drug Resistant Strains of Candida Albicans and Candida Tropicalis. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 29, 4. ed., 2019.
- JANBON, G.; QUINTIN, J.; LANTERNIER, F.; D'ENFERT, C. Studying Fungal Pathogens of Humans and Fungal Infections: Fungal Diversity and Diversity of Approaches. *Microbes and Infection*, v. 21, n. 5–6, p. 237–45, 2019.
- JENSEN, R. H. Resistance in Human Pathogenic Yeasts and Filamentous Fungi: Prevalence, Underlying Molecular Mechanisms and Link to the Use of Antifungals in Humans and the Environment. *Danish medical journal*, v. 63, n. 10, p. 1–34, 2016.

JHA, A.; KUMAR, A. Anticandidal Agent for Multiple Targets: The next Paradigm in the Discovery of Proficient Therapeutics/Overcoming Drug Resistance. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 22, p. 2955–74, 2019.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V. et al. Review on Plant Antimicrobials: A Mechanistic Viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 8, n. 1, 2019.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal Resistance in Dermatophytes: Recent Trends and Therapeutic Implications. *Fungal Genetics and Biology*, 2019.

KIM, J. Y. Human Fungal Pathogens: Why Should We Learn? *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 145–48, 2016.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 5, p. 1207–12, 1998.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÓN, T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in Candida Opportunistic Pathogens. *Genes*, v. 19, n. 9, 2018.

KUMAR, A.; JHA, A. Anticandidal Agents. *Academic Press*, San Diego: Ed. Elsevier, 2017.

KUMAR, D.; JAIN, S. K. A. Comprehensive Review of N-Heterocycles as Cytotoxic Agents. *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 38, p. 4338–94, 2016.

LASS-FLÖRL, C. Triazole Antifungal Agents in Invasive Fungal Infections: A Comparative Review. *Drugs*, v. 71, n. 18, p. 2405–19, 2011.

LEE, W. S.; PARK, S. Y. Deep Dermatophytosis Induced by Trichophyton Rubrum. *Korean Journal of Dermatology*, v. 53, n. 8, p. 666–67, 2015.

LEMO, M. F.; LEMO, M. F.; PACHECO, H. P.; GUIMARÃES, A. C.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Seasonal Variation Affects the Composition and Antibacterial and Antioxidant Activities of Thymus Vulgaris. *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 543–48, 2017.

LEPAK, A. J.; DAVID R. A. Antifungal Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 5, p. 121–34, 2014.

LI, X.; LIU, C.; TANG, S.; WU, Q.; HU, H.; ZHAO, Q.; ZOU, Y. Synthesis, in Vitro Biological Evaluation, and Molecular Docking of New Triazoles as Potent Antifungal Agents. *Archiv der Pharmazie*, v. 349, n. 1, p. 42–49, 2016.

LIU, J. F.; XIA, J. J.; NIE, K. L.; WANG, F.; DENG, L. Outline of the Biosynthesis and

- Regulation of Ergosterol in Yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 7, p. 1–8, 2019.
- LIU, L.; BELLOO, A.; DRESSER, M. J.; HEALD, D.; KOMJATHY, S. F.; O'MARA, E.; ROGGE, M.; STOCH, S. A.; ROBERTSON, S. M. Best Practices for the Use of Itraconazole as a Replacement for Ketoconazole in Drug-Drug Interaction Studies. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 56, n. 2, p. 143–51, 2016.
- LIU, N. A.; WANG, C.; SU, H.; ZHANG, W.; SHENG, C. Strategies in the Discovery of Novel Antifungal Scaffolds. *Future Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 12, p. 1435–54, 2016.
- LOCKHART, S. R.; GUARNER, J. Emerging and Reemerging Fungal Infections. *Seminars in Diagnostic Pathology*, v. 36, n.3, p. 177–81, 2019.
- LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis? *Mycopathologia*, v. 182, n. 1–2, p. 143–67, 2017.
- LUNA-TAPIA, A.; BUTTS, A.; PALMER, G. E. Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity in *Candida Albicans*: Azole Resistance or Merely Trailing Growth? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* v. 63, n. 1, p. 1–11, 2018.
- MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and Antifungal Activities of Thymol: A Brief Review of the Literature. *Food Chemistry*, v. 210, p. 402–414, 2016.
- MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial Activity of Eugenol and Essential Oils Containing Eugenol: A Mechanistic Viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.
- MARGRIET, W.J.H.; ZWAAN, B.J.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Facilitators of Adaptation and Antifungal Resistance Mechanisms in Clinically Relevant Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 132, 2019.
- MARTELLI, G.; GIACOMINI, D. Antibacterial and Antioxidant Activities for Natural and Synthetic Dual-Active Compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 158, p. 91–105, 2018.
- MAŠÍNOVÁ, T.; YURKOV, A.; BALDRIAN, P. Forest Soil Yeasts: Decomposition Potential and the Utilization of Carbon Sources. *Fungal Ecology*, v. 34, p. 10–19, 2018.
- MCCUTCHEON, J. P.; LEKBERG, Y. Symbiosis: Fungi as Shrewd Trade Negotiators. *Current Biology*, v. 29, n. 12, p. R570–572, 2019.
- MEIRELES, L. M.; ARAUJO, M. L.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; SCHERER, R. Change in the Clinical Antifungal Sensitivity Profile of *Aspergillus Flavus* Induced by

- Azole and a Benzimidazole Fungicide Exposure. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 95, n. 2, p. 171-178, 2019.
- MONEY, N. P. Fungal Cell Biology and Development. In *The Fungi: Third Edition*, Elsevier Inc., p. 37–66, 2016.
- MONK, B. C.; SAGATOVA, A. A.; HOSSEINI, P.; RUMA, Y. N.; WILSON, R. K.; KENIYA, M. V. Fungal Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase: A Target for next-Generation Antifungal Design. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1868, n. 3, p. 140-206, 2019.
- NAMI, S.; AGHEBATI-MALEKI, A.; MOROVATI, H.; AGHEBATI-MALEKI, A. Current Antifungal Drugs and Immunotherapeutic Approaches as Promising Strategies to Treatment of Fungal Diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 110, p. 857–68, 2019.
- NATESAN, S. K.; LAMICHCHANE, A. K.; SWAMINATHAN, S.; WU, W. Differential Expression of ATP-Binding Cassette and/or Major Facilitator Superfamily Class Efflux Pumps Contributes to Voriconazole Resistance in *Aspergillus Flavus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 76, n. 4, p. 458–63, 2013.
- NAZARRO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 4, 2017.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 51–83, 2016.
- NI, T.; PANG, L.; CAI, Z.; DING, Z.; HAO, Y.; LI, R.; YU, S.; CHAI, X.; WANG, T.; JIN, Y.; ZHANG, D.; JIANG, Y. Design, Synthesis, and in Vitro Antifungal Evaluation of Novel Triazole Derivatives Bearing Alkynyl Side Chains. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 23, n. 5, p. 576-585, 2018.
- NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P.; PAES, H. C.; FERNANDES, L.; COSTA, F. F.; KIOSHIMA, E. S.; ABADIO, A. K. R.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. Antifungal Drugs: New Insights in Research & Development. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 195, p. 21-38, 2018.
- PARENTE-ROCHA, J. A.; BAILÃO, A. M.; AMARAL, A. C.; TABORDA, C. P.; PACCEZ, J. D.; BORGES, C. L.; PEREIRA, M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. *Mediators of Inflammation*, v. 2017, p. 1-16, 2017.
- PEDROSO, R. S.; BALBINO, B. L.; ANDRADE, G.; DIAS, M. C. P. S.; ALVARENGA, T. A.; PEDROSO, R. C. N.; PIMENTA, L. P.; LUCARINI, R.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H.; CARVALHO, M. T. M.; MIRANDA, M. L. D.; PIRES, R. H. In Vitro and In Vivo Anti- *Candida* Spp. Activity of Plant-Derived Products. *Plant (Basel)*, v. 8, n. 11 p. 1–17, 2019.

PÉREZ-CANTERO, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L.; GUARRO-ARTIGAS, J.; CAPILLA, J. Update and Recent Advances on Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 1, 2019.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The Global Problem of Antifungal Resistance: Prevalence, Mechanisms, and Management. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole Antifungals: A Review. *Drugs of Today*, v. 51, n. 12, p. 705–18, 2015.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, A. J. New Horizons in Antifungal Therapy. *Journal of Fungi*, v. 2, n. 4, p. 10–12, 2016.

PIETRO, A. D.; PÉREZ-MARTIM, J. Editorial. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 57, 2016.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: Ramos J., Sychrová H., Kschischo M. (eds) *Yeast Membrane Transport. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Cham, v. 892, p. 327–248, 2016.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to Azoles and Echinocandins Worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 792–98, 2019.

SHANKAR, R.; TIWARI, V.; MISHRA, C. P.; SINGH, C. K.; SHARMA, D.; JAISWAL, S. In.: Pharmaceutical and Nano Sciences formulation and evaluation of nanoemulsion for solubility. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*, v. 4, n. 6, p. 365–78, 2015.

RESENDE, D. I. S. P.; PEREIRA-TERRA, P.; INÁCIO, A. S.; COSTA, P. M.; PINTO, E.; SOUSA, E.; PINTO, M. M. M. Lichen Xanthonas as Models for New Antifungal Agents. *Molecules*, v. 23, n. 10, 2018.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. *Current Opinion in Microbiology*, v. 45, p. 70-76, 2018.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; KHODAVAISY, S.; ALSHAHNI, M. M.; TAMURA, T.; SATOH, K.; ABASTABAR, M.; SHOKOOHI, G. R.; AHMADI, B.; KORD. M.; TAGHIPOUR, S.; MAKIMURA, K.; BADALI, H. In Vitro Antifungal Activity of Novel Triazole Efinaconazole and Five Comparators against Dermatophyte Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 5, 2018.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual Review of Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 753–75, 2017.

RODRIGUES, M. L. The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio*, v. 9, n. 5, p. 1–5.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 Million Years of Evolution and Some Plants Still Can't Make It on Their Own: Plant Stress Tolerance via Fungal Symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 5, p. 1109–14, 2008.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 5, 2014

SAEED, E.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An Overview of Azoles Targeting Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase for Antileishmanial Therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 135, p. 241–59, 2017.

HASIM, S.; COLEMAN, J. Targeting the Fungal Cell Wall: Current Therapies and Implications for Development of Alternative Antifungal Agents. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 8, p. 869–83, 2019.

SARAN, P. S.; AZIM, A. Risk Factors for Early Invasive Fungal Disease in Critically Ill Patients. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, v. 20, n. 12, p. 750, 2016.

SALEHI, B.; MISHRA, A. P.; SHUKLA, I.; SHARIFI-RAD, M.; CONTRERAS, M. D. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FATHI, H.; NASRABADI, N. N.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, J. Thymol, Thyme, and Other Plant Sources: Health and Potential Uses. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 9, p. 1688–1706, 2018.

SALMAN, S. M. Triazoles with Long Chain Alkyl Groups as a Potential Biological Compounds. *International Journal of Research in Marketing*, v. 10, n. 3, p. 2334–41, 2019.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in Medicine*, v. 3, n. 11, p. 1–10, 2016.

\_\_\_\_\_. Finding the Needle in a Haystack: Mapping Antifungal Drug Resistance in Fungal Pathogen by Genomic Approaches. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2019.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; KNEIPP, L. F. Fungal Infections: A Veritable Worldwide Problem. *J Infectious Disease Med Microbiol*, v. 1, n. 1, p. 1, 2017.

SANTOS, G. C. O.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; CARTÁGENES, M. S. S.; FILHO, A. K. D. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; MONTEIRO, C. A. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–23, 2018.

SANTOSH, R.; SELVAM, M. K.; KANEKAR, S. U.; NAGARAJA, G. K. Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antioxidant Studies of Some Heterocyclic Compounds from Triazole-Linked Chalcone Derivatives. *ChemistrySelect*, v. 3, n. 23,

p. 6338–43, 2018.

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent Advances in Delivery of Antifungal Agents for Therapeutic Management of Candidiasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1478–90, 2017.

SCHUBERTH, C.; WEDLICH-SÖLDNER, R. Building a Patchwork - The Yeast Plasma Membrane as Model to Study Lateral Domain Formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1853, n. 4, p. 767–74, 2015.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; SINGULANI, J. L.; SILVA, A. C. A. P.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Searching New Antifungals: The Use of in Vitro and in Vivo Methods for Evaluation of Natural Compounds. *Journal of Microbiological Methods*, v. 123, p. 68–78, 2016.

SCORZONI, L.; SILVA, A. C. A. P. E.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; MELO, W. C. M. A.; OLIVEIRA, H. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; MEDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*, eCollection 2017, p. 8-36, 2017.

SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P. K. Advances in Synthetic Approach to and Antifungal Activity of Triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 7, p. 668–677, 2011.

SHARIFZADEH, A.; KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; SHIRZADI, H. 2018. Potential Effect of 2-Isopropyl-5-Methylphenol (Thymol) Alone and in Combination with Fluconazole against Clinical Isolates of *Candida Albicans*, *C. Glabrata* and *C. Krusei*. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 28, n. 2, p. 294–99, 2018.

SHARMA, C.; CHOWDHARY, A. Molecular Bases of Antifungal Resistance in Filamentous Fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, n. 5, p. 607-616, 2017.

SHARMA, J.; ROSIANA, S.; RAZZAQ, I.; SHAPIRO, R. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.

SHAVETA, S. M.; SINGH, P. Hybrid Molecules: The Privileged Scaffolds for Various Pharmaceuticals. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 124, p. 500–536, 2016.

SHUKLA, P. K.; SINGH, P.; YADAV, R. K.; PANDEV, S.; BHUNIA, S. S. Past, Present, and Future of Antifungal Drug Development. In *Topics in Medicinal Chemistry*, Springer Verlag, v. 29, p. 125–167, 2016.

SOUZA, A. C. O.; AMARAL, A. C. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. *Frontiers in Microbiology*, v.8, n. 336, p. 1–13, 2017.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, p. 1-13, 2013.

SPATAFORA, J. W.; AIME, M. C.; GRIGORIEV, I. V.; MARTIN, F.; STAJICH, J. E.; BLACKWELL, M. The Fungal Tree of Life: From Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 5, 2017.

SRINIVAS, A.; S., M.; KARTHIK, P.; REDDY, D. K. V. Synthesis, Nematicidal and Antifungal Properties of Hybrid Heterocyclics. *Acta Chimica Slovenica*, v. 64, n. 4, p. 1030–1041, 2017.

STOTT, K. E.; HOPE, W. W. Therapeutic Drug Monitoring for Invasive Mould Infections and Disease: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, p. i12–18, 2017.

SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIN, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E.F. CYP51: Is It a Good Idea? *Revista Virtual de Quimica*, v. 7, n. 2, p. 539–575, 2015.

TANG, H.; WU, J.; ZHANG, W.; ZHAO, L.; ZHANG, Y. H.; SHEN, C. W. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Non-Azole Derivatives as Potential Antifungal Agents. *Chinese Chemical Letters*, v. 26, n. 9, p. 1161-1164, 2015.

TARIQ, S.; WANI, S.; RASOOL, W.; SHAFI, K.; BHAT, M. A.; PRABHAKAR, A.; SHALLA, A. H.; RATHER, M. A. A Comprehensive Review of the Antibacterial, Antifungal and Antiviral Potential of Essential Oils and Their Chemical Constituents against Drug-Resistant Microbial Pathogens. *Microbial Pathogenesis*, v. 134, 2019.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WHOOHOUSE, M. E. J. Risk Factors for Human Disease Emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1411, p. 983–89, 2001.

TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMAN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and Leishmanicidal Activity of Eugenol Derivatives Bearing 1,2,3-Triazole Functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.

TENG, X.; WANG, Y.; GU, J.; SHI, P.; SHEN, Z.; YE, L. Antifungal Agents: Design, Synthesis, Antifungal Activity and Molecular Docking of Phloroglucinol Derivatives. *Molecules*, v. 23, n. 12, 2018.

THANH, N. D.; HAI, D. S.; BICH, V. T. N.; HIEN, P. T. T.; DUYN, N. T. K.; MAI, N. T.; DUNG, T. T.; VAN, H. T. K.; TOAN, V. N.; TOAN, D. N.; DANG, L. H. Using Sodium Hydride and Potassium Carbonate as Bases in Synthesis of Substituted 2-Amino-4-aryl-7-propargyloxy-4H-chromene-3-carbonitriles. *Current Organic Synthesis*, v. 16, n. 3, p. 423-430, 2019.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Seminars in Cell & Developmental Biology Fungal Morphogenetic Changes inside the Mammalian Host.

TRUJILLO, M.; HULL-CREW, C.; OUTLAW, A.; STEWART, K.; TAYLOR, L.; GEORGE, L.; DUENSING, A.; TRACEY, B.; SCHOFFSTALL, A. Green Methodologies for Copper (I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions: A Comparative Study. *Molecules*, v. 24, n. 5, p. 973, 2019.

VAEZI, A.; FAKHIM, H.; JAVIDNIA, J.; KHODAVAISY, S.; ABTAHIAN, Z.; VOJOODI, M.; NOURBAKHS, F.; BADALI, H. Pesticide Behavior in Paddy Fields and Development of Azole-Resistant *Aspergillus Fumigatus*: Should We Be Concerned? *Journal De Mycologie Médicale*, v. 28, n. 1, p. 59-64, 2017.

VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J.; MERCIER, T.; HECKE, S. V.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal Drugs: What Brings the Future? *Medical Mycology*, v. 57, p. S328–43, 2019.

VAN DIJCK, P.; SJOLLEMA, J.; CAMMUE, B. P.; LAGROU, K.; BERMAN, J.; D'ENFERT, C.; ANDES, D. R.; ARENDRUP, M. C.; BRAKHAGE, A. A.; CALDERONE, R.; CANTÓN, E.; COENYE, T.; COS, P.; COWEN, L. E.; EDGERTON, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; FILLER, S. G.; GHANNOUM, M.; GOW, N. A. R.; HASS, H.; JABRA-RIZK, M. A.; JOHNSON, E. M.; LOCKHART, S. R.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; MAERTENS, J.; MUNRO, C. A.; NETT, J. E.; NOBILE, C. L.; PFALLER, M. A.; RAMAGE, G.; SANGIARD, D.; SANGUINETTI, M.; SPRIET, I.; VERWEIJ, P. E.; WARRIS, A.; WAUTERS, J.; YEAMAN, M. R.; ZAAT, S. A. J.; THEVISSSEN, K. Methodologies for in Vitro and in Vivo Evaluation of Efficacy of Antifungal and Antibiofilm Agents and Surface Coatings against Fungal Biofilms. *Microbial*, v. 5, n. 7, p. 300–326, 2018.

WANG, C.; KHLEF, D.; KAHLAL, S.; SAILLARD, J. Y. Metal-Catalyzed Azide-Alkyne 'Click' Reactions: Mechanistic Overview and Recent Trends. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 316, p. 1–20, 2016.

WANI, M. Y.; AHMAD, A.; SHIEKH, R. A.; AL-GHAMDI, K. J.; SOBRAL, A. J. F. N. Imidazole Clubbed 1,3,4-Oxadiazole Derivatives as Potential Antifungal Agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 15, p. 4172–4180, 2015.

WEBB, B. J.; FERRARO, J. P.; REA, S.; KAUFUSI, S.; GOODMAN, B. E.; SPALDING, J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, n. 8, p. 2–9, 2018.

WIEDERHOLD, N. P. The Antifungal Arsenal: Alternative Drugs and Future Targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 51, n. 3, p. 333–39, 2018.

WIŃSKA, K.; MACZKA, W.; TYCZKO, J.; GRABARCZYK, M.; CZUBASZEK, A.; SZUMNY, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 1–21, 2019.

XU, Z.; ZHAO, S. J.; LIU, Y. 1,2,3-Triazole-Containing Hybrids as Potential Anticancer Agents: Current Developments, Action Mechanisms and Structure-Activity Relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 183, 2019.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide.” *Mycopathologia*, v. 182, n. 1–2, p. 77–86, 2017.

ZHANG, B. Comprehensive Review on the Anti-Bacterial Activity of 1,2,3-Triazole Hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 168, p. 357–72, 2019.

ZHENG, Y. Z.; WANG, S. Advances in Antifungal Drug Measurement by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, v. 491, p. 132–45, 2019.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; QUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUENDÉ, R. T. Substances Naturelles Actives Sur Candida Albicans, Sources de Nouveaux Médicaments Antifongiques : Revue de La Littérature. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2017.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M. T.; BENZARTI, A.; MARONGIU, B.; MAXIA, A.; PIRAS, A.; SALGUEIRO, L. Antifungal and Anti-Inflammatory Potential of Lavandula Stoechas and Thymus Herba-Barona Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 97–103, 2013.