



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE- UFCG**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE- CES**

**UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE-UAS**

**CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**JOSENILDO CÂNDIDO DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DE NEROLIDOL E ALFA-  
BISABOLOL SOBRE A SENSIBILIDADE DE *Trichophyton spp.* A GRISEOFULVINA**

**CUITÉ - PB**

**2019**

**JOSENILDO CÂNDIDO DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DE NEROLIDOL E ALFA-BISABOLOL SOBRE A SENSIBILIDADE DE *Trichophyton spp.* A GRISEOFULVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, *Campus Cuité*, como requisito indispensável para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira.

**CUITÉ – PB**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE

O48p Oliveira, Josenildo Cândido de.

Potencial antifúngico e modulador de nerolidol e alfa-bisabolol sobre a sensibilidade de *trichophyton spp.* a griseofulvina. / Josenildo Cândido de Oliveira. – Cuité: CES, 2019.

40 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2019.

Orientador: Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

1. Sesquiterpenos. 2. Antifúngicos. 3. Resistência microbiana. 4. Bombas de efluxo. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

**JOSENILDO CÂNDIDO DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DE NEROLIDOL E ALFA-BISABOLOL SOBRE A SENSIBILIDADE DE *Trichophyton spp.* A GRISEOFULVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité, como requisito indispensável para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em 04 de Junho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**




---

**Prof. Dr. Filipe de Oliveira Pereira**

**Orientador**

**(UAS/CES/UFCG)**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Francinalva Dantas de Medeiros**

**(UAS/CES/UFCG)**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Júlia Beatriz Pereira de Souza**

**(UAS/CES/UFCG)**

Dedico este trabalho a minha família, principalmente aos meus pais Maria do Céu e Antônio José, meus grandes pilares incentivadores.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir, amparar e fortalecer. Deus sempre me guiará. Permitindo-me a oportunidade de conhecer boas pessoas com as quais posso conviver e obter aprendizado que vai além dos aspectos acadêmicos, que auxilia diariamente no meu crescimento e desenvolvimento pessoal.

Agradeço imensamente a Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, por me possibilitar concluir minha formação acadêmica e profissional de maneira tão satisfatória, sendo agora parte de mais uma das minhas realizações pessoais.

Agradeço de maneira sincera ao meu bom amigo e exímio orientador, Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira por sua orientação, por sua dedicação e profissionalismo. Serei eternamente grato por ter possibilitado meu ingresso na pesquisa científica e por todo o ensinamento que me foi transmitido ao longo desse tempo.

Agradeço a todos que fazem parte do grupo GPFungos, por toda parceria durante a execução dos trabalhos para a conclusão desta pesquisa, não podendo deixar de citar meus amigos e companheiros de laboratório Anderson Vasconcelos, Gustavo Nunes, Islaine Lima, Hellen Pontes e César Costa entre outros.

Agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Francinalva Dantas de Medeiros e a Dr<sup>a</sup> Júlia Beatriz Pereira de Souza que aceitaram participar da minha banca de defesa de trabalho e que com certeza contribuirão para aperfeiçoamento do mesmo.

Agradeço a todos os professores da academia que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Sou imensamente grato a todos os meus familiares que sempre me auxiliaram e estiveram presente, especialmente aos meus pais Antônio José e Maria do Céu por toda perseverança, atenção e cuidado que demonstraram. Agradeço aos minhas queridas irmãs, Maria de Fatima e Maria José e ao meu irmão José Jaílson e ao meu querido cunhado Ivanildo Mariano por tomarem partido nessa minha trajetória.

Agradeço aos meus leais amigos José Roberto e Nadson Luan por todo o apoio e curiosidade que demonstraram.

**Muito obrigado!**

*Navegando para diversos portos pelo grande mar do ser, cada uma das coisas criadas se move segundo o instinto ingénito.*

*Dante Alighieri – A Divina Comédia*

## RESUMO

Dermatófitos é uma denominação dada a um grupo de fungos especializados em invadir e colonizar tecidos queratinizados como pele, cabelos e unhas de seres humanos e animais, causando as dermatofitoses ou *tineas*. As dermatofitoses apresentam distribuição global, sendo considerado um problema de saúde pública. Entre os dermatófitos *Trichophyton rubrum* é responsável pela maior incidência nos casos de *tinea pedis*, *tinea capitis* e *tinea unguium*. Com o número reduzido de classes de fármacos antifúngicos (azóis, alilaminas, griseofulvina) disponíveis no mercado e os crescentes fenômenos de resistências fúngicas têm-se buscado novas formas de implementar a terapia antifúngica. Posto isso, os produtos naturais como terpenos surgem como uma alternativa válida, tendo em vista que apresentam características antimicrobianas. Sesquiterpenos são produtos naturais encontrados em óleos essenciais que representam uma alternativa para superar mecanismos de resistência fúngica como a expressão de bombas de efluxo, e os efeitos indesejáveis da terapia convencional dos fármacos como a griseofulvina. Por isso, foi investigada a atividade antifúngica e moduladora da sensibilidade de  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol em *T. rubrum*, *T. interdigitale* H6 e *T. interdigitale*  $\Delta$ *mdr2* à griseofulvina. A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas-testes foi determinada por microdiluição. Posteriormente, o efeito das drogas-testes sobre a funcionalidade da membrana plasmática (liberação de  $K^+$ ) foi analisada. A CIM da griseofulvina foi determinada em concentrações subinibitórias dos sesquiterpenos ou clorpromazina (ensaio de modulação). Por fim, um estudo de associação foi realizado com a griseofulvina e os sesquiterpenos (*checkerboard*).  $\alpha$ -bisabolol foi mais potente que o nerolidol porque apresentou valores de CIM 32 vezes menores. Todos os fungos sensíveis a griseofulvina a partir de 8  $\mu$ g/mL. Com exceção da griseofulvina, todas as drogas-testes aumentaram a liberação de  $K^+$  ( $p < 0,05$ ), afetando a funcionalidade da membrana plasmática. O nerolidol modulou a sensibilidade à griseofulvina de todas as cepas e o  $\alpha$ -bisabolol modulou a sensibilidade apenas de *T. interdigitale* H6 e *T. interdigitale*  $\Delta$ *mdr2*. Neste estudo, observou-se que a clorpromazina não modulou a sensibilidade do fungo *T. rubrum* LM 4 a griseofulvina e pode ser devido a não expressão de proteínas transportadoras ABC, pois a clorpromazina é um reconhecido bloqueador de bombas de efluxo. Assim, é sugestivo que a modulação possivelmente não envolve interferência na atividade de transportadores ABC codificada pelo gene *mdr2*. Nerolidol e  $\alpha$ -bisabolol apresentaram sinergismo e aditividade, respectivamente, em associação com a griseofulvina. Finalmente, os resultados do presente estudo sugerem o uso potencial dos compostos  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol como agentes antifúngicos e moduladores da sensibilidade de *Trichophyton spp* a griseofulvina. Essas informações podem ser úteis para investigação visando aplicações clínicas do  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol no tratamento de dermatofitoses, especialmente em infecções por *T. rubrum*. No entanto, são indispensáveis mais estudos para o desenvolvimento de formulações e aplicações desses compostos na terapia antifúngica.

**Palavras-chave:** sesquiterpenos, antifúngicos, resistência microbiana, bombas de efluxo.



## ABSTRACT

Dermatophytes is a name given to a group of fungi specialized in invading and colonizing keratinized tissues such as skin, hair and nails of humans and animals, causing the dermatophytosis or *tinea*. Dermatophytosis has a global distribution and is considered a public health problem. Among the dermatophytes *Trichophyton rubrum* is responsible for the highest incidence in the cases of *tinea pedis*, *tinea capitis* and *tinea unguium*. With the reduced number of classes of antifungal drugs (azole, allylamine, griseofulvin) available in the market and the growing phenomena of fungal resistance, new ways of implementing antifungal therapy have been sought. Thus, natural products such as terpenes appear as a valid alternative, in view of their antimicrobial characteristics. Sesquiterpenes are natural products found in essential oils which represent an alternative to mechanisms of fungal resistance such as the expression of efflux pumps, and the undesirable effects of conventional drug therapy such as griseofulvin. Therefore, the antifungal and modulatory activity of the sensitivity of  $\alpha$ -bisabolol and nerolidol in *T. rubrum*, *T. interdigitale* H6 and *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$  to griseofulvin were investigated. The minimum inhibitory concentration (MIC) of test drugs was determined by microdilution. Subsequently, the effect of drug-testing on plasma membrane functionality ( $K^+$  release) was analyzed. The MIC of griseofulvin was determined at subinibitil concentrations of sesquiterpenes or chlorpromazine (modulation assay). Finally, an association study was performed with griseofulvin and sesquiterpenos (checkerboard).  $\alpha$ -bisabolol was more potent than nerolidol because it presented 32-fold lower MIC values. All fungi susceptible to griseofulvin from 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . With the exception of griseofulvin, all drug-tests increased the release of  $K^+$  ( $p < 0.05$ ), affecting the functionality of the plasma membrane. Nerolidol modulated the susceptibility to griseofulvin of all strains and  $\alpha$ -bisabolol modulated the sensitivity only of *T. interdigitale* H6 and *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$ . In this study, we observed that chlorpromazine did not modulate the sensitivity of the fungus *T. rubrum* LM 4 to griseofulvin and may be due to non-expression of ABC transporter proteins, since clopromazine is a recognized blocker of efflux pumps. Thus, it is suggestive that the modulation possibly does not involve interference in the activity of ABC transporters encoded by the *mdr2* gene. Nerolidol  $\alpha$ -bisabolol presented synergism and additivity, respectively, in association with griseofulvin. Finally, the results of our study suggest the potential use of  $\alpha$ -bisabolol and nerolidol compounds as antifungal agents and modulators of the sensitivity of *Trichophyton spp* to griseofulvin. This information may be useful for research aimed at clinical applications of  $\alpha$ -bisaolol and nerolidol in the treatment of dermatophytosis, especially in *T. rubrum* infections. However, further studies are needed for the development of formulations and applications of such compounds in antifungal therapy.

**Key words:** sesquiterpenes, antifungals, microbial resistance, efflux pumps.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação de colônias de <i>Trichophyton rubrum</i> cultivadas em ágar batata dextrose. a) Vista anterior, colônias macias e bancas b) Vista posterior, o meio assume coloração vinho.....	16
<b>Figura 2</b> – Morfologia do <i>Trichophyton rubrum</i> com hifas septadas hialinas e microconídios em gotas pequenas implantadas paralelamente na hifa (aumento 400x).....	17
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da Griseofulvina .....	20
<b>Figura 4</b> - Representação dos transportadores de cassetes de ligação de ABC ( <i>ATP-binding cassette</i> ) em dermatófitos.....	21
<b>Figura 5</b> - Estrutura química do $\alpha$ - bisabolol.....	22
<b>Figura 6</b> - Estrutura química do nerolidol .....	23
<b>Figura 7</b> - Taxa de liberação de íons $K^+$ de <i>Trichophyton rubrum</i> LM 4 na ausência (controle) e presença de SDS, griseofulvina, $\alpha$ -bisabolol e nerolidol.....	28

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de  $\alpha$ -bisabolol, nerolidol, griseofulvina e clorpromazina frente a dermatófitos.....27
- Tabela 2-** Valores de concentração inibitória mínima-CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de griseofulvina isolada e combinada com  $\alpha$ -bisabolol (1/4CIM), nerolidol (1/4CIM) e clorpromazina (1/4CIM) frente à dermatófitos.....30
- Tabela 3-** Efeitos das associações de griseofulvina e  $\alpha$ -bisabolol ou nerolidol frente à cepa de *Trichophyton rubrum* LM 4.....31

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ABD</b>	Ágar Batata Dextrose
<b>CES</b>	Centro de Educação e Saúde
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>UAS</b>	Unidade Acadêmica de Saúde
<b>UFCG</b>	Universidade Federal de Campina Grande
<b>°C</b>	Grau Célsius
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µg/mL</b>	Micrograma por Mililitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>%</b>	Percentual

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Dermatófitos e dermatofitoses.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Tratamento e resistência microbiana.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Considerações sobre produtos naturais.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Sesquiterpenos <math>\alpha</math>-bisabolol e nerolidol.....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Local da pesquisa.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Substâncias -teste.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Cepas fúngicas.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....</b>	<b>24</b>
<b>4.5 Liberação de <math>K^+</math> .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6 Estudo do efeito modulador da atividade antifúngica.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7 Estudo de associação entre drogas.....</b>	<b>25</b>
<b>4.8 Análises estatísticas.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses ou *tineas* são infecções fúngicas que acometem tecidos queratinizados como a pele, cabelos e unhas de seres humanos e animais, sendo o tipo de infecção mais prevalente em todo o mundo (GHELARDI et al., 2014). Os casos de dermatofitoses podem vir associados ao enfraquecimento dos fatores de imunidade, superdosagem de antibióticos e corticosteroides, principalmente em idosos e indivíduos imunocomprometidos. O principal agente causador de dermatofitose é *Trichophyton rubrum*, comumente associado à onicomicose, *tinea pedis* e *tinea corporis* crônicas e recorrentes (GHELARDI et al., 2014; BORAL et al., 2018).

Dentre as terapias disponíveis para o tratamento dessa infecção, destacam-se as alilaminas orais e tópicas, azóis, benzoxaboróis, ciclopirox e amorolfina e griseofulvina. Griseofulvina é indicada para tratar infecções fúngicas em humanos e animais, em seu modo de ação sabe-se que este composto liga-se à tubulina, interferindo na montagem dos microtúbulos fúngicos e inibindo a mitose (SCORZONI et al., 2017). Porém essas terapias convencionais podem apresentar efeitos adversos graves, além de possibilitar que fungos desenvolvam mecanismos de resistência (FLORES; BECK; DA SILVA, 2016).

As bombas de efluxo parecem ser o mecanismo mais comum de resistência em dermatófitos. Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) estão relacionados a diversos processos como absorção de nutrientes e efluxo de drogas, diminuindo sua concentração intracelular, resultando na pequena quantidade de fármaco no local de ação, estando assim intimamente envolvidos em mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (*MDR-multidrug resistance*) que por sua vez reflete em um elevado número de falhas terapêuticas (FUENTEFRÍA et al., 2017; BORAL et al., 2018).

Diante deste contexto, os produtos naturais surgem como uma fonte de moléculas com potencial atividade antifúngica ou moduladora da sensibilidade de fungos patogênicos. Entre essas moléculas, presentes em óleos essenciais de plantas aromáticas se destacam, pois são metabólitos secundários com relevante potencial antifúngico já relatado, assim como é o caso dos sesquiterpenos que estão entre esses componentes. Neste estudo, investigou-se a atividade antifúngica e moduladora de  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol sobre a sensibilidade de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* H6 e *Trichophyton interdigitale*  $\Delta$ mdr2 a griseofulvina.

Os produtos naturais  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol são sesquiterpenos, utilizados na indústria em diversas formulações e assim como os monoterpenos possuem estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentando volatilidade acentuada. Essa última característica, por

sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos (FELIPE; BICAS, 2017). O que também motivou essa pesquisa foi o fato dos terpenos também serem reconhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

✓ Investigar a atividade moduladora da resistência de cepas de dermatófitos a agentes antifúngicos usados na terapêutica clínica por sesquiterpenos.

### **2.2 Objetivos específicos**

✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos terpenos (-) -  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol e de griseofulvina frente às cepas ensaiadas.

✓ Avaliar o efeito dos sesquiterpenos e antifúngicos sobre a membrana plasmática da cepa ensaiada.

✓ Determinar a CIM dos antifúngicos na presença de concentrações subinibitórias de terpenos frente às cepas ensaiadas.

✓ Verificar o efeito da associação de cada sesquiterpeno com o antifúngico frente às cepas ensaiadas.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

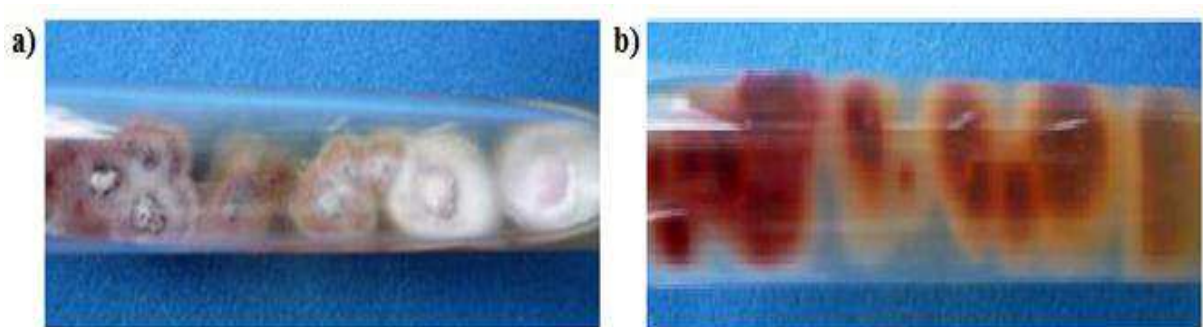
#### 3.1 Dermatófitos e dermatofitoses

Dermatófitos são um grupo de fungos patogênicos que causam doenças principalmente superficiais em humanos e outros mamíferos. As doenças que resultam de infecções por dermatófitos são conhecidas como *tineas* (WHITE et al., 2014). Os dermatófitos, pertencentes à família Arthrodermataceae, são fungos de estrutura filamentososa caracterizados por serem hialinos, septados, queratinofílicos e queratinolíticos, possuem a capacidade de invadir e colonizar tecidos queratinizados como unhas, pelos e estrato córneo causando principalmente infecções superficiais em decorrência de sua forte afinidade por queratina que representa uma fonte de nutrientes como carbono, nitrogênio e enxofre (DALLA LANA et al., 2016; MEZZARI et al., 2017). Os dermatófitos pertencem principalmente aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* e compreendem mais de 40 espécies (SEGAL; FRENKEL, 2015).

Com base em sua ecologia, os dermatófitos foram divididos em três grupos, como zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, dependendo de seu habitat primário e sua afinidade pelo hospedeiro (DE AGUIAR PERES et al., 2010). As espécies antropofílicas parasitam preferencialmente seres humanos, e por isso são os mais frequentes agentes causadores das dermatofitoses incluindo *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis* e onicomicose, e raramente infectam animais, podemos citar como exemplos de espécies antropofílicas os fungos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans* (CORDEIRO, 2015). As espécies zoofílicas são patógenos associados a animais e, ocasionalmente, infectam humanos, estas espécies zoofílicas incluem *Microsporum canis*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum* (WHITE et al., 2014). Enquanto os dermatófitos geofílicos, incluindo a espécie *Microsporum gypseum* estão naturalmente presente no solo e ocasionalmente infectam animais, estão relacionados a materiais queratinizados, podendo ser detritos de fontes de animais mortos encontrados no solo como cascos, chifres, pelos e penas presentes no ambiente, acredita-se que os dermatófitos zoofílicos e antropofílicos evoluíram de origem geofílica, sendo os dermatófitos antropofílicos o grupo mais especializado (CAFARCHIA et al., 2013; HAYETTE; SACHELI, 2015). É de grande importância reconhecer a qual microssistema o dermatófito pertence bem como a identificação correta de espécies e estirpes, pois tal fato está relacionado com a resposta do organismo hospedeiro ao parasita, sendo crucial para estabelecer programas eficazes para controlar e prevenir a infecção e estabelecer terapias antifúngicas precisas (CAFARCHIA et al., 2013; CORDEIRO, 2015).

*Trichophyton rubrum* é o um fungo antropofílico que possui ampla distribuição, sendo reconhecido como principal agente etiológico de dermatofitose principalmente lesões na pele e unhas. Em relação a morfologia, no exame direto do material clínico observa-se a presença de hifas septadas hialinas, muitas vezes artrosporadas. As colônias possuem crescimento que varia de lento a moderado, alcançando o completo amadurecimento em torno de 14 dias, suas colônias são de coloração branca de aspecto cotonoso (algodão), tornando-se posteriormente aveludadas, já o reverso da colônia apresenta pigmentação avermelhada púrpura, podendo ser observadas diferentes tonalidades de castanho (**Fig. 1**). É possível observar que os seus microconídios são clavados ou piriformes, com aproximadamente 2-3 por 3-5  $\mu\text{m}$  de tamanho disposto ao longo das hifas e produzem raros macroconídios (**Fig. 2**) (GRÄSER et al., 2000 ; RODRIGUES, 2007; CORDEIRO, 2015).

**Figura 1-** Representação de colônias de *Trichophyton rubrum* cultivadas em ágar batata dextrose. a) Vista anterior, colônias macias e bancas b) Vista posterior, o meio assume pigmentação rubro ou cor vermelha.



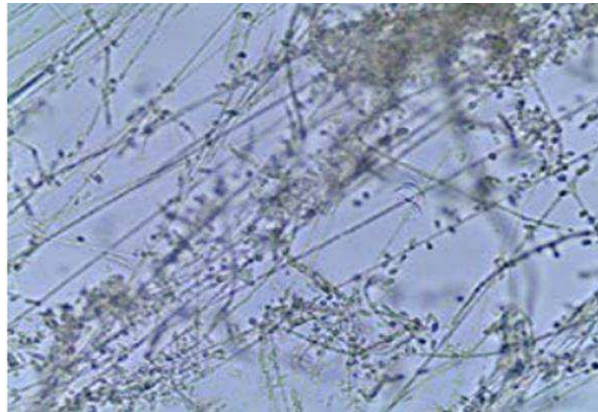
Fonte: OLIVEIRA, 2014.

A patogênese dos dermatófitos consiste em três etapas cruciais e específicas para estabelecimento da infecção, são elas: adesão, invasão e resposta imune, dos quais ainda são poucos os avanços e muito resta a ser esclarecido (URIBE; CARDONA-CASTRO, 2013).

Os dermatófitos não fazem parte da microbiota normal da pele, eles normalmente se desenvolvem na parte morta do tecido queratinizado do estrato córneo, dentro e ao redor do cabelo e nas unhas, dito isso, o contato inicial entre o elemento fúngico e a camada do estrato córneo torna-se um evento de suma importância tanto no estabelecimento quanto no início da infecção, nestes tecidos queratinizados o crescimento está associado à produção de hifas e artroconídios, por sua vez essas características são determinantes e representam um recurso importante e útil para o diagnóstico (HAYETTE; SACHELI, 2015). Estudos mostraram que a

aderência dos esporos aos tecidos do hospedeiro é dependente do tempo, seguida da germinação e subsequente invasão do estrato córneo em hifas em crescimento e em múltiplas direções (URIBE; CARDONA-CASTRO, 2013). Os dermatófitos possuem a capacidade de produzir uma variedade de proteases, por sua vez, essas proteases hidrolisam queratina, colágeno e elastina, fornecendo os nutrientes necessários para o seu crescimento e metabolismo, além de facilitar a expansão e invasão de dermatófitos nos tecidos, por isso as proteases são consideradas o principal fator de virulência de dermatófitos. (YUE et al., 2015).

**Figura 2-** Morfologia do *Trichophyton rubrum* com hifas septadas hialinas e microconídios em gotas pequenas implantadas paralelamente na hifa (aumento 400x)



Fonte: OLIVEIRA, 2014.

Diversos estudos epidemiológicos apontam as infecções fúngicas superficiais como um grande problema de saúde pública, chegando à afeta de 20 a 25% da população mundial. Estima-se que 30 a 70% dos indivíduos adultos são portadores assintomáticos desses patógenos e que a incidência de tais infecções aumentam ao passo que a idade avança (LEITE et al., 2014). As infecções podem ser classificadas de acordo com a localização anatômica da lesão, utilizando a denominação *tinea* para todas as dermatofitoses, seguida do sítio anatômico onde se localiza a infecção, as modalidades dermatofíticas mais relevantes são: *tinea corporis*, lesões na pele, *tinea cruris* localizada na região inguinal, *tinea capitis* a do couro cabeludo, *tinea pedis* nos pés, *tinea manuum* nas mãos, *tinea barbae* da barba do homem adulto, *tinea faciae* na face da criança e mulher e a *tinea unguium* conhecida como *tinea* das unhas ou onicomicose (MEZZARI et al., 2017).

As dermatofitoses acarretam implicações importantes nos custos de saúde de hospitais e comunidades, especialmente em países pobres em desenvolvimento, onde as micoses aparecem endemicamente. Entre as dermatofitoses *tinea pedis* e *tinea unguium* são as mais

prevalentes ambas são geralmente causadas por *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*, com prevalências de aproximadamente 80% e 20%, respectivamente (SOARES et al., 2014; LOPES; PINTO; SALGUEIRO, 2016; YAMADA et al., 2017).

Esses fungos de modo geral, apresentam um caráter cosmopolita e com perfis epidemiológicos variados com relação a fatores regionais, estacionais, de faixa etária, frequência de contato com animais, condições higiênico-sanitárias e exposição a locais públicos, sendo prevalentes em países de clima tropical e subtropical (DALLA LANA et al., 2016). A transmissão das dermatofitoses pode ocorrer por contato direto com animais e humanos infectados ou indireto por fômites contaminados, sendo que a inoculação direta através da pele não intacta ocorre principalmente em pacientes com algum grau de comprometimento do seu estado imunológico (DE AGUIAR PERES et al., 2010; URIBE; CARDONA-CASTRO, 2013). O uso de fármacos antimicrobianos, imunossupressores e citostáticos bem como o surgimento da AIDS tem sido relatado como fatores para o aumento da incidência de dermatofitoses (SILVEIRA-GOMES et al., 2013).

*T. rubrum* é o dermatófito de incidência global, causa *Tinea ungueal*, *Tinea pedis* e *Tinea corporis*, com rara invasão aos cabelos (RODRIGUES et al., 2012 ; DALLA LANA et al., 2016). Dados obtidos por meio de estudos epidemiológicos confirmaram que em países europeus houve o aumento da prevalência de *Tinea unguium*, bem como a predominância do papel de *T. rubrum* (VENA et al., 2012)

### **3.2 Tratamento e resistência microbiana**

As dermatofitoses podem ser tratadas com formulações de uso oral e tópico que pertencem principalmente às famílias dos fármacos azólicos e alilaminas. As associações dessas formas de tratamento irão depender de fatores relacionados ao perfil de sensibilidade do fungo, o sítio acometido, a extensão da lesão, entre outros fatores. As formulações tópicos de azóis compreendem principalmente os fármacos: miconazol, clotrimazol, econazol, cetoconazol e tioconazol, além das alilaminas representadas pelos fármacos terbinafina e butenafina que geralmente são suficientes para tratar a dermatofitose numa fase inicial, já o uso de antifúngicos orais são recomendados em dermatofitose extensas, crônicas ou quando o uso de uma formulação tópica não é viável (LOPES; PINTO; SALGUEIRO, 2016). A associação das duas formas é usada geralmente para os casos ainda mais complicados, crônicos ou para os portadores de *Tinea unguium* e *Tinea capitis* (MINNEBRUGGEN et al., 2010).

Dentre as classes de antifúngicos utilizados atualmente quatro grupos atuam na membrana celular, são eles, azóis, polienos, alilaminas e derivados de morfolina, todos interagindo com o ergosterol, porém cada uma dessas classes de fármacos antifúngicos exibe um mecanismo da ação singular que resulta na depleção de ergosterol na membrana celular fúngica, seus alvos de inibição são as enzimas: 14 $\alpha$ -desmetilase (azóis), esqualeno epoxidase (alilaminas), 14- $\alpha$ -redutase e 7,8- $\alpha$ -isomerase (derivados de morfolina), e os polienos que atuam ligando-se ao ergosterol, acarretando a formação de poros na membrana plasmática (MENDES, 2015; LOPES; PINTO; SALGUEIRO, 2016). No entanto, alguns agentes se destacam na utilização clínica para o tratamento das dermatofitoses, entre os quais existem os fármacos imidazólicos como cetoconazol e os compostos triazólicos, a exemplo do itraconazol e fluconazol; a terbinafina e a griseofulvina (FERNÁNDEZ-TORRES; INZA; GUARRO, 2003).

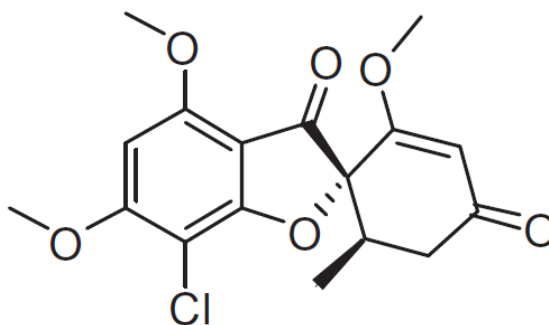
A griseofulvina é um produto natural isolado inicialmente de *Penicillium griseofulvum* e utilizado para tratar infecções fúngicas em seres humanos e animais (LIÉBY-MULLER et al., 2015). Os microtúbulos são polímeros de dímeros de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina que formam um esqueleto celular altamente organizado em todas as células eucarióticas, a griseofulvina tem sido identificada como um ligante de tubulina que interrompe a polimerização e a dinâmica dos microtúbulos (**Fig. 3**). Foi também relatado que o fármaco inibe a síntese de RNA e de DNA pelo fungo (GOLAN et al., 2009; PETERSEN et al., 2016). A griseofulvina se acumula preferencialmente em células precursoras de queratina, onde é fixada, e aumenta a resistência dessa proteína ao ataque de fungos queratinolíticos, quando ela foi testada topicamente não atingiu satisfatoriamente a área infectada da unha, embora seja capaz de formar uma barreira fungistática que impede o avanço do fungo patogênico (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2010).

Os fungos desenvolvem mecanismos de resistência para neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos de todas as classes de antifúngicos principalmente pelos seguintes mecanismos gerais: a diminuição da concentração efetiva do fármaco; alterações do alvo do fármaco; modificações do metabolismo para desviar os efeitos tóxicos exercidos por alguns agentes antifúngicos; superexpressão da molécula alvo; inativação dos fármacos, podendo haver o envolvimento de vários desses mecanismos na resposta do micro-organismo aos fármacos (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Estudos indicam que no processo de resistência existem vários mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos dentre os quais é possível citar as modificações moleculares nas enzimas alvo dos fármacos, alta expressão de bombas de efluxo e alteração na permeabilidade ou captação da droga. Esse tipo de mecanismos de adaptação depende de

diversos de fatores como a cepa, o fármaco utilizado e as condições ambientais (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; DE AGUIAR PERES et al., 2010).

**Figura 3:** Estrutura química da Griseofulvina



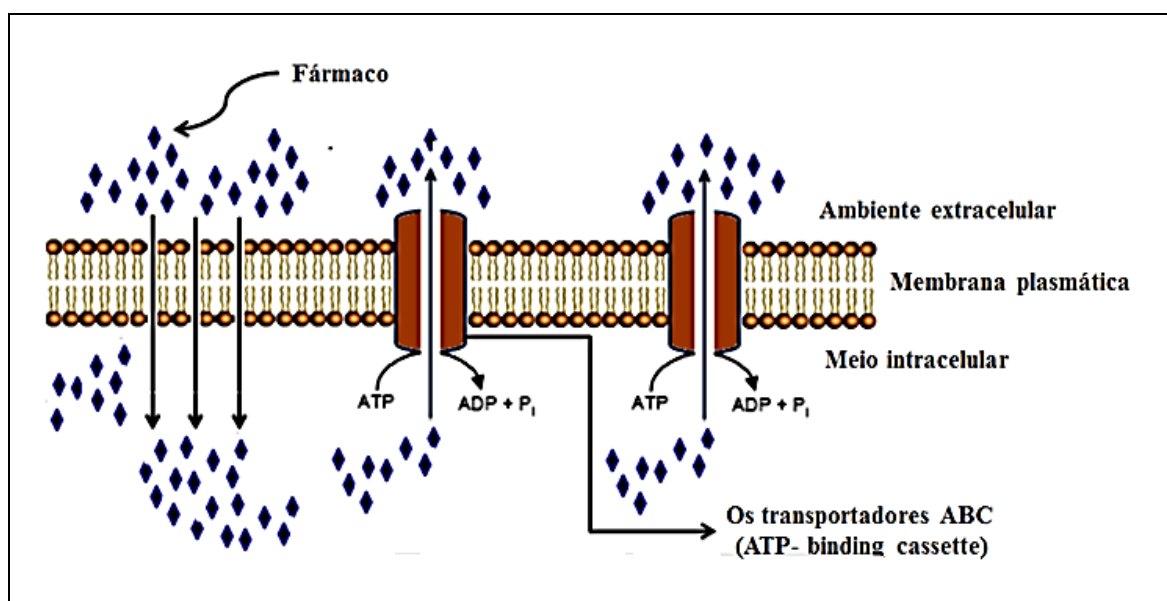
Fonte: LIÉBY-MULLER et al., 2015

A literatura relata que os transportadores de cassetes de ligação de ABC (*ATP-binding cassette*) estão envolvidos em uma variedade de processos como absorção de nutrientes, patogênese e bombeamento de efluxo de fármacos (MARTINS et al., 2016). Temos como exemplo que o principal mecanismo molecular de resistência de *T. rubrum* aos compostos azólicos cetoconazol, itraconazol e fluconazol é a expressão de bombas de efluxo que atuam reduzindo o acúmulo das drogas no ambiente intracelular (MARANHÃO et al., 2009; DE AGUIAR PERES et al., 2010). As bombas de efluxo são expressas em todas as células, conferindo proteção às células contra os efeitos tóxicos de diversos agentes antifúngicos. De modo geral, uma determinada bomba possui a capacidade de reconhecer uma grande diversidade de substratos baseadas em suas propriedades físicas, em razão disso, as bombas de efluxo desempenham um papel significativo nos mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012).

Duas grandes classes de bombas de efluxo são comuns em fungos e ambas estão localizadas na membrana citoplasmática são elas: a família de transportadores do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*) que são proteínas integrais de membrana (ATPases), altamente conservadas, que utilizam a energia oriunda do ATP (trifosfato de adenosina) para transportar diversos tipos de substratos diferentes pela membrana contra seu gradiente eletroquímico (Fig.4) e a família de transportadores do tipo MFS, bombas de transporte secundário que utilizam o gradiente eletroquímico (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; MARTINS, 2015). Como exemplo é relatado na literatura que linhagens de *Trichophyton rubrum* expostas a diferentes classes de antifúngicos induziram aumento dos níveis de

transcrição de mRNA para os genes *mdr1* e *mdr2*, que codificam transportadores ABC em dermatófitos conferindo mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (FACHIN et al., 2006 ; MARTINEZ-ROSSI et al., 2018).

**Figura 4-** Representação dos transportadores de cassetes de ligação de ABC (*ATP-binding cassette*) em dermatófitos.



Fonte: Autor da pesquisa

Uma estratégia que contribui para o entendimento dos mecanismos de resistência dos fungos aos fármacos é a análise do perfil de expressão dos genes que codificam para os transportadores e que podem inclusive posteriormente, ser utilizados como alvos para novos fármacos com ação antifúngica (MARTINS, 2015).

### 3.3 Considerações sobre produtos naturais

O emprego de produtos naturais e seus derivados constituem uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novas moléculas terapêuticas, envolvendo a participação das diversas áreas da ciência (NEWMAN; CRAGG, 2007). As plantas aromáticas constituem um grupo de vegetais proeminentes e durante as últimas décadas vem recebendo uma atenção substancial a diversos estudos focando as plantas medicinais em um esforço para identificar novos agentes antifúngicos bem como agentes capazes de inibir mecanismos de resistência complexos como as bombas de efluxo (TEGOS et al., 2011).

Os óleos essenciais vegetais que são geralmente a mistura complexa de compostos naturais, polares e não polares ocorrem amplamente na natureza com uma diversidade de estruturas terpênicas e são geralmente responsáveis pelo aroma distinto e sabor (PARK et al.,

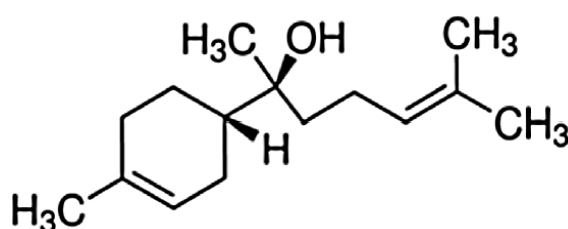
2009). Em geral, os constituintes dos óleos essenciais são terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (aldeído, álcool, fenol, metoxi derivados, entre outros) e terpenóides (isoprenoides), mas vale salientar que tanto o aroma inerente quanto a atividade antimicrobiana de cada um dos componentes estão relacionados normalmente com a estrutura química, a concentração em que os compostos estão presentes e as interações entre eles que afetam as suas propriedades bioativas (AVILA-SOSA et al., 2012; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os terpenos são a classe mais comum de compostos químicos encontrados em óleos essenciais e são constituídos de unidades de isopreno (várias unidades de base de 5 carbono,  $C_5$ ). Os óleos essenciais consistem principalmente de monoterpenos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), que são hidrocarbonetos com a fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ . Os diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) existem em óleos essenciais em baixa concentração (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

### 3.4 Sesquiterpenos $\alpha$ -bisabolol e nerolidol

O (-) -  $\alpha$ -Bisabolol é um pequeno álcool sesquiterpênico monocíclico oleoso (**Fig. 5**) com uma massa molecular de 222,37 g/mol ( $C_{15}H_{26}O$ ). Isolado a partir do óleo de uma variedade de plantas como *Matricaria chamomilla*, *Eremanthus erythropappus* e *Salvia runcinata* (DE MEIRELES et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016; SOUZA; SOUZA; MORAES, 2016).

**Figura 5:** Estrutura química do  $\alpha$ - bisabolol



Fonte: BARRETO et al., 2016.

Por causa de suas propriedades olfativas e farmacológicas, têm sido amplamente empregado na indústria em diversos produtos dermatológicos e cosméticos (ROTTINI et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016). Várias atividades farmacológicas e biológicas do  $\alpha$ -bisabolol foram relatadas demonstrando assim o seu um forte potencial terapêutico como antimicrobiano

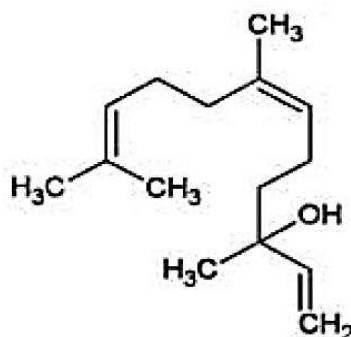


(FORRER et al., 2013), antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2015), analgésico e anti-inflamatório (BARRETO et al., 2016).

Devido à baixa toxicidade associada ao bisabolol, a *Food and Drug Administration* (FDA) promoveu seu uso como ingrediente ativo em vários produtos comerciais, sendo considerado seguro e não alergênico é usado em cosméticos, fragrância e produtos terapêuticos tais como formulações dermatológicas, cosméticos decorativos, shampoos, limpadores, antiperspirantes, protetores solares e fragrâncias finas (DE MEIRELES et al., 2015; MELO et al., 2017).

Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) (**Fig. 6**), também conhecido como peruvicol é um álcool sesquiterpênico alifático ( $C_{15}H_{26}O$ ) é um componente presente em óleos essenciais de muitas plantas como *Piper gaudichaudianum*, *Piper clausenianum*, *Baccharis dracunculifolia* e *Melaleuca leucadendra* (SPEROTTO et al., 2013; SILVA et al., 2014; DE MEIRELES et al., 2015; PADALIA et al., 2015; CHAN et al., 2016).

**Figura 6** - Estrutura química do Nerolidol



**Fonte:** ABDEL-RAHMAN; ALANIZ; SALEH, 2013

Além de ser isolado de óleos essenciais de várias flores e plantas nerolidol pode também ser produzido industrialmente a partir de acetona e acetileno (BALDISSERA et al., 2016). Algumas das atividades biológicas e farmacológicas do nerolidol são relatadas como antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária, Antiúlcera e potenciador da penetração da pele (BALDISSERA et al., 2016; CHAN et al., 2016). Além de outras importantes como atividade inseticida (SAKHANOKHO et al., 2013), nematocida (ABDEL-RAHMAN; ALANIZ; SALEH, 2013), antinociceptiva e anti-inflamatória (FONSÊCA et al., 2016).

## **4. MATERIAL E METODOLOGIA**

### **4.1 Local da pesquisa**

O trabalho de pesquisa foi desenvolvido nos Laboratório de Bioquímica e de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, ambos pertencentes Unidade acadêmica de saúde do CES/UFPG.

### **4.2 Substâncias-teste**

Os sesquiterpenos  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol a griseofulvina e a clorpromazina foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Brasil). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100  $\mu$ L dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024  $\mu$ g/mL. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar concentrações inferiores utilizando o próprio meio RPMI 1640.

### **4.3 Cepas fúngicas**

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas as seguintes cepas: *Trichophyton rubrum* LM 4, obtida da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba (Brasil); *Trichophyton interdigitale* H6 (ATCC MYA-3108) e seu derivado  $\Delta$ *mdr2* que foi obtido por um método de inativação (FACHIN et al., 2006). Ambas foram cedidas pelo Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Brasil). As cepas fúngicas foram inicialmente cultivadas em ágar batata dextrose (Difco<sup>®</sup>) a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %) e agitadas levemente. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 520 nm para um valor de 70-72% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente  $0,5 - 5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (SANTOS; BARROS; HAMDAN, 2006; CLSI, 2008).

### **4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

A determinação da CIM das substâncias-teste foi realizada pela técnica de microdiluição (SANTOS; HAMDAN, 2005; CLSI, 2008). Em cada linha da placa, foram adicionados 100  $\mu$ L das substâncias-teste duplamente concentradas diluídas em RPMI 1640.

Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as substâncias-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração usada para a solubilização das substâncias acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades.

#### **4.5 Liberação de $\text{K}^+$**

A concentração de íons potássio ( $\text{K}^+$ ) livres no inóculo fúngico foi mensurada após sua exposição às CIM das substâncias-teste a 28°C. Após o período de incubação (24h), a concentração de  $\text{K}^+$  extracelular foi medida por procedimentos de turbidimetria usando Kits de dosagem de  $\text{K}^+$  (Doles®, Goiânia, Brazil), em espectrofotômetro UV 5100. Experimentos controle sem as substâncias-teste foram realizados de forma semelhante. Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% foi usado como com posto referência capaz de induzir liberação de  $\text{K}^+$  (SOUZA et al., 2010).

#### **4.6 Estudos do efeito modulador da atividade antifúngica**

Para avaliar se as substâncias-teste modulam a ação dos antifúngicos frente às cepas testadas, foi empregado o método proposto por Coutinho et al. (2008). Os valores de CIM de griseofulvina foram determinados na ausência e na presença de concentrações subinibitórias dos sesquiterpenos (1/4CIM) ou clorpromazina (1/4CIM), pela técnica de microdiluição. A clorpromazina foi usada como um controle positivo, por se um inibidor de bomba de efluxo. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a determinação da CIM.

#### **4.7 Estudos de associação entre drogas**

O efeito da associação do  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol com o antifúngico foi determinado pela técnica de *checkerboard*, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato. Diluições das soluções das substâncias-teste (1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) foram feitas em RPMI 1640. Após isto, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de um determinado antifúngico (griseofulvina) foi adicionada nos poços da placa no sentido vertical e, em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de uma determinada diluição de terpeno foram adicionados no

sentido horizontal da placa, ambas com concentrações ajustadas. Por fim, foram adicionados 100  $\mu$ L do inóculo diluído 1:50 em RPMI 1640. Desta maneira, foram obtidas misturas de diversas concentrações de ambas as substâncias. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura das CIMs. Na perspectiva de avaliar a atividade das associações de substâncias, o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado através da soma: CIFA + CIFB, onde A representa o terpeno e B as drogas comerciais. O CIFA = CIMA combinado/CIMA sozinho, enquanto que o CIFB = CIMB combinado/CIMB sozinho. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo ( $< 0,5$ ), aditividade ( $0,5-1,0$ ), indiferença ( $> 1,0$  e  $< 4,0$ ) ou antagonismo ( $> 4,0$ ) (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

#### **4.8 Análise estatística**

Os experimentos para determinar a CIM foram feitos em triplicata e os resultados expressos em valores modais, dado que os resultados obtidos foram os mesmos nas repetições. Os resultados do ensaio de liberação de  $K^+$  foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A avaliação estatística destes resultados foi feita empregando-se o teste t não pareado para determinar diferenças significantes, quando um valor de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade das cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum* LM 4, *T. interdigitale* H6 e *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$ , foram determinados os valores de CIM para os sesquiterpenos  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol, bem como para os fármacos griseofulvina e clorpromazina. O  $\alpha$ -bisabolol foi mais potente que o nerolidol, porque apresentou valores de CIM menores (32 vezes). A cepa *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$  foi a mais sensível entre as cepas ensaiadas. Para griseofulvina e clorpromazina foram observadas as seguintes CIM 8  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , que se mantiveram constantes para as três cepas fúngicas avaliadas (**Tab. 1**). Não houve inibição do crescimento fúngico pelo DMSO e todas as cepas cresceram na ausência de fármacos, confirmando a viabilidade dos fungos.

**Tabela 1**– Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de  $\alpha$ -bisabolol, nerolidol, griseofulvina e clorpromazina frente a dermatófitos.

CEPAS	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )*			
	$\alpha$ -bisabolol	Nerolidol	Griseofulvina	Clorpromazina
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 4	16	512	8	0,5
<i>Trichophyton interdigitale</i> H6	16	512	8	0,5
<i>Trichophyton interdigitale</i> $\Delta mdr2$	8	256	8	0,5

\*Valor modal de três experimentos.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

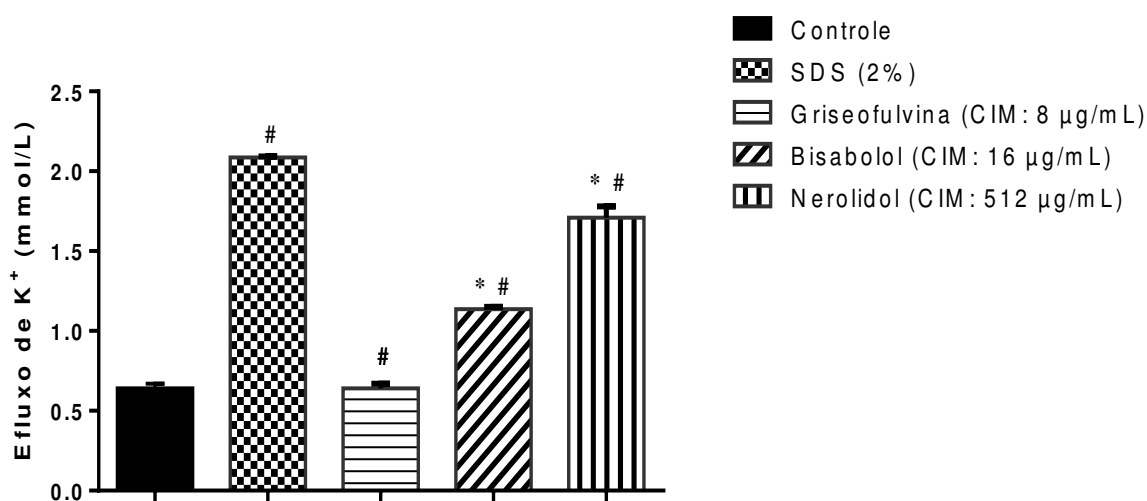
Novas buscas por terapias complementares e alternativas são motivadas por um crescente número de cepas de patógenos resistentes aos medicamentos, aumento da população imunocomprometida e as limitações das drogas disponíveis, como é o caso dos óleos essenciais que são considerados agentes antimicrobianos naturais alternativos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; FAJINMI et al., 2018). O desenvolvimento lento de agentes antifúngicos se deve ao fato de que os fungos são eucarióticos, com estreita relação evolutiva

com os hospedeiros humanos, o que dificulta a busca de alvos antifúngicos, diante disso os óleos essenciais são apontados como um dos grupos mais promissores de compostos naturais para o desenvolvimento de agentes antifúngicos mais seguros (SHIN; LIM, 2004; SCORZONI et al., 2017).

A literatura relata a atividade antifúngica *in vitro* do  $\alpha$ -bisabolol contra as cepas: *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. canis*, bem como relatos da atividade antifúngica do nerolidol possuindo ação contra dermatófitos como *T. mentagrophytes* e contra *M. gypseum* (SPEROTTO et al., 2013; CHAN et al., 2016; LOPES; PINTO; SALGUEIRO, 2016). No entanto, são poucos os relatos de sua atividade sobre linhagens de *T. rubrum*.

Considerando o potencial antifúngico destas substâncias, partiu-se para determinar seus efeitos sobre a funcionalidade da membrana plasmática realizando o ensaio de liberação de  $K^+$ . Em relação ao teste de efluxo de potássio, obtivemos como resultado que os sesquiterpenos  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol interferiram na funcionalidade da membrana plasmática (**Fig.7**), pois ambos induziram uma maior perda de  $K^+$  em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Ambos os sesquiterpenos e griseofulvina induziram uma menor liberação de  $K^+$  em relação ao agente de lise celular SDS 2% ( $p < 0,05$ ). Contudo, entre os sesquiterpenos o nerolidol demonstrou ser mais potente que o  $\alpha$ -bisabolol ( $p < 0,05$ ). O efeito da griseofulvina sobre a membrana foi semelhante ao controle (ausência de substâncias), com valor  $p > 0,05$ .

**Figura 7** - Taxa de liberação de íons  $K^+$  de *Trichophyton rubrum* LM 4 na ausência (controle) e presença de SDS, griseofulvina,  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol.



\* Comparado com o controle ( $p < 0,05$ ), # comparado com o SDS (2%) ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação ao ensaio de efluxo de potássio, a literatura nos informa que os íons potássio ( $K^+$ ) possuem uma concentração maior no ambiente intracelular que no extracelular, dessa forma uma interferência na membrana seria evidenciada pela detecção do aumento de componentes intracelulares ( $K^+$ ) liberados no ambiente externo. Com base nessa informação, comprovou-se que  $\alpha$ -bisabolol e o nerolidol interferem na funcionalidade da membrana celular de *T. rubrum* LM 4. Compostos sesquiterpênicos, como o nerolidol, possuem alta hidrofobicidade que permitem a penetração mais fácil através da membrana plasmática e sítios intracelulares (CHAN et al., 2016). De fato, óleos essenciais e seus componentes provocam danos a membranas de micro-organismos, colapso da bomba de prótons, granulação do citoplasma e quebra da cadeia de transporte de elétrons (FAJINMI et al., 2018).

O lipídeo ergosterol é o principal componente da membrana celular fúngica e contribui para uma variedade de funções celulares, tais como fluidez e integridade da membrana, sendo imprescindível para manter a função adequada das enzimas ligadas à membrana (CAMPOY; ADRIO, 2017). Em um estudo realizado por Pauli (2006), o mesmo sugere que  $\alpha$ -bisabolol tem um mecanismo de ação comum a vários antifúngicos que atuam inibindo a formação de um esterol fúngico, neste estudo fundamentado em uma comparação entre a estrutura química do  $\alpha$ -bisabolol e do zimosterol que obteve como resultado a inibição da biossíntese do ergosterol, o autor sugeriu que  $\alpha$ -bisabolol interferiu no primeiro passo específico do fungo na biossíntese de ergosterol ao bloquear a formação de fecosterol a partir do zimosterol. No presente estudo não foi realizada uma análise nem a quantificação da produção de ergosterol pelos fungos na presença das substâncias-testes, mas percebeu-se os seus efeitos sobre a membrana celular por meio do ensaio de efluxo de potássio.

Em sua pesquisa Romagnoli et al, (2015) relacionam as alterações nos microtúbulos dinâmicos observados em uma amostra de *M. gypseum* como possível mecanismo antifúngico do  $\alpha$ -bisabolol que dependendo da concentração poderia afetar desde o envoltório nuclear até a parede celular. Já em relação nerolidol o estudo realizado por Park et al, (2009) com diversos terpenos evidenciaram perda da integridade da membrana, destruição e desorganização de organelas no citoplasma em hifas da espécie *T. mentagrophytes*. De fato, espera-se que estruturas presentes na membrana plasmática tenham suas funções comprometidas como é o caso das bombas de efluxo que conferem resistência a múltiplos fármacos, por isso foi realizado o ensaio de modulação.

No ensaio de modulação, foi possível observar que o nerolidol foi capaz de modular a sensibilidade dos fungos à griseofulvina, pois houve uma forte diminuição da CIM na presença de nerolidol. Ressaltamos também que o  $\alpha$ -bisabolol não modulou a sensibilidade de

*T. rubrum* LM4 à griseofulvina. Tanto o  $\alpha$ -bisabolol como o nerolidol foram capazes de modular a sensibilidade da cepa *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$ , mesmo esta não expressando transportador ABC (**Tab. 2**). A clorpromazina foi usada como ferramenta farmacológica (bloqueadora de bombas de efluxo) e modulou a sensibilidade de *T. interdigitale* H6.

Assim, a atividade de proteínas de membranas como os transportadores ABC pode ser interferida por  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol, por isso investigou-se a atividade em cepas fúngicas que expressam e não expressam estes genes como *T. interdigitale* H6 e *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$ , respectivamente.

**Tabela 2-** Valores de concentração inibitória mínima-CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de griseofulvina isolada e combinada com  $\alpha$ -bisabolol (1/4CIM), nerolidol (1/4CIM) e clorpromazina (1/4CIM) frente a dermatófitos.

CEPAS	CIM isolada ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM combinada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		$\alpha$ -bisabolol	Nerolidol	Clorpromazina
<i>T. rubrum</i> LM 4	8	8	0,5	8
<i>T. interdigitale</i> (H6)	8	1	1	2
<i>T. interdigitale</i> ( $\Delta mdr2$ )	8	1	1	8

\*Valor modal de três experimentos.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Neste estudo, observou-se que a clorpromazina não modulou a sensibilidade do fungo *T. rubrum* LM 4 a griseofulvina e pode ser devido a não expressão de proteínas transportadoras ABC, pois a clopromazina é um reconhecido bloqueador de bombas de efluxo. Nerolidol e  $\alpha$ -bisabolol modularam a sensibilidade das cepas *T. interdigitale* H6 e *T. interdigitale*  $\Delta mdr2$ , assim, é sugestivo que a modulação possivelmente não envolve interferência na atividade de transportadores ABC codificada pelo gene *mdr2*.

A fenotiazina é um composto tricíclico e seus derivados como clorpromazina são amplamente usados clinicamente como compostos antipsicóticos e anti-histamínicos, são



potenciais inibidores do transporte de  $K^+$  e canais de  $Ca^{2+}$  (PULE et al., 2015). O mecanismo mais provável é que além da interferência no potencial de membrana, é que haja também uma interferência na geração de energia dependente de cálcio pela hidrólise de ATP e, portanto, inibição da atividade de bombas de efluxo (VARGA et al., 2017; KAPP et al., 2018). Posto isso, a literatura relata possuírem a capacidade de inibir as bombas de efluxo da MDR em algumas cepas de bactérias, além de serem utilizadas como ferramentas farmacológicas para identificar indiretamente o envolvimento de bombas de efluxo na resistência fúngica.

Na busca para tentar entender melhor como se deu esta interação entre os sesquiterpenos e a griseofulvina, foi realizado o estudo de associação. Utilizou-se a cepa *T. rubrum* LM 4, a fim de verificar quais os tipos de relações existem entre estes compostos e o fármaco. A griseofulvina quando combinada com nerolidol baixou sua CIM em 8x quando comparada a sua CIM isolada. Enquanto que o  $\alpha$ -bisabolol diminuiu o valor de CIM da griseofulvina em 4x. O resultado desta associação mostrou que nerolidol apresentou interação sinérgica com a griseofulvina; e  $\alpha$ -bisabolol exibiu uma interação aditiva (**Tab. 3**).

**Tabela 3.** Efeitos das associações de griseofulvina e  $\alpha$ -bisabolol ou nerolidol frente a cepa de *Trichophyton rubrum* LM 4.

Drogas	CIM	CIM	ICIF (Tipo de interação)
	Isolada	Combinada	
Griseofulvina	8	1	0,25 (Sinergismo)
Nerolidol	512	64	
Griseofulvina	8	2	0,75 (Aditividade)
$\alpha$ -bisabolol	16	8	

CIM, concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ); ICIF, índice da concentração inibitória fracionada.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Devido a relatos da resistência de patógenos, a falta de novas classes de fármacos ou diferentes alvos moleculares, combinações de substâncias podem ser consideradas uma estratégia para terapia, posto que recentemente, as combinações de produtos naturais e antimicrobianos foram estudadas e relatam aumentar a atividade dos antibióticos clássicos (SOARES et al., 2014; REUK-NGAM et al., 2014).

A terapia combinada traz inúmeros benefícios, tais como: diferentes mecanismos atuando juntos permitem direcionamento complementar dentro das células fúngicas; expansão do espectro de ação; possível atividade fungicida associando agentes fungistáticos; reduz a toxicidade ou os efeitos colaterais do fármaco e evita ou procrastina o surgimento de cepas resistente (REUK-NGAM et al., 2014; FUENTEFRIA et al., 2017) Os compostos nerolidol e  $\alpha$ -bisabolol apresentaram sinergia e aditividade respectivamente com a griseofulvina, esses são resultados satisfatórios que lançam novas perspectivas para auxiliar no tratamento das dermatofitoses.

Apesar de muitos óleos essenciais e componentes isolados demonstrarem efeito antifúngico observado através de testes *in vitro* e *in vivo* o que sugere que são úteis para o tratamento de dermatofitoses, geralmente, sua atividade antifúngica é leve se comparada com a terapia tradicional, sendo que muitos compostos possuem apenas o efeito fungistáticos e altas concentrações são necessárias para a atividade fungicida (SHIN; LIM, 2004). No entanto, uma possibilidade viável é a combinação de fármacos, uma vez que moléculas naturais com atividade antifúngica que são descritas como tendo atividade sinérgica *in vitro* com antifúngicos tradicionais, reduzem a concentração de ambas as substâncias, sugerindo que a combinação de produtos naturais com antifúngicos sintéticos resultará provavelmente numa terapia mais eficaz que pode contribuir para reduzir a toxicidade e se tornar uma alternativa para o tratamento (SCORZONI et al., 2017).

Frequentemente os estudos com associações entre os fármacos antifúngicos e produtos naturais indicam que a associação entre terpenos e antifúngicos apresentam resultados favoráveis. Em pesquisa Ahmad, Khan e Manzoor, (2013) relataram a sinergia do timol e do carvacrol com fluconazol em *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol sensibilizando as células fúngicas para o fármaco e diminuindo o seu efluxo pelas bombas de efluxo *Cdr1* e *Mdr1*. Segundo Sharifzadeh et al, (2017) a associação do mentol com itraconazol e nistatina mostrou-se eficaz frente a cepas de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Em relação à atividade dos terpenos contra dermatófitos, foi verificado o sinergismo do citronelol e geraniol associados ao cetoconazol contra *T. soudanense* e *T. schoenleinii* (SHIN; LIM, 2004). Até o presente momento não há relatos de estudos na literatura associando os compostos  $\alpha$ -bisabolol ou nerolidol com o fármaco griseofulvina.

## 6 CONCLUSÃO

Os sesquiterpenos  $\alpha$ -bisabolol e nerolidol exibiram atividade antifúngica e moduladora da sensibilidade de cepas de *Trichophyton* spp à griseofulvina, afetando a funcionalidade da membrana plasmática. A modulação possivelmente não envolve interferência na atividade do transportador ABC codificada pelo gene *mdr2*. Verificamos que o nerolidol apresentou interação sinérgica com a griseofulvina, enquanto o  $\alpha$ -bisabolol exibiu uma interação aditiva. Possivelmente, a interferência na funcionalidade da membrana plasmática pode ter auxiliado nos efeitos positivos das associações entre os sesquiterpenos e a griseofulvina.

Essas informações podem ser úteis para investigação visando aplicações clínicas do  $\alpha$ -bisaolol e nerolidol no tratamento de dermatofitoses, especialmente em infecções por *T. rubrum*. Entretanto, fazem-se necessários a realização de mais estudos sobre o tema a fim de aprofundar e desenvolver novos conhecimentos, buscando aplicações desses compostos naturais em formulações que visem complementar a terapia antifúngica.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 1, p. 16-22, 2013.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 103-110, 2015.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, 2013.
- AVILA-SOSA, R. et al. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International journal of food microbiology**, v. 153, n. 1, p. 66-72, 2012.
- BALDISSERA, M. D. et al. Nerolidol nanospheres increases its trypanocidal efficacy against *Trypanosoma evansi*: New approach against diminazene aceturate resistance and toxicity. **Experimental parasitology**, v. 166, p. 144-149, 2016.
- BARRETO, R. S. et al. Evidence for the involvement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl.(Lamiaceae) essential oil and (-)- $\alpha$ -bisabolol, its main compound, in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 191, p. 9-18, 2016.
- BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92-107, 2018.
- CAFARCHIA, C. et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 336-351, 2013.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.
- CHAN, W. K. et al. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.
- CORDEIRO, L. V. Perfil Epidemiológico de Dermatofitoses Superficiais em Pacientes Atendidos em um Laboratório da Rede Privada de João Pessoa-PB. **Monografia** (Graduação) – UFPB/CCS, - João Pessoa, 2015.
- CORREA-ROYERO, J. et al. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

COUTINHO, H. D. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008.

CSLI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A**. v. 22, n. 16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America, 2002.

DALLA LANA, D. F. et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical & Biomedical Research**, v. 36, n. 4, 2016.

DE AGUIAR PERES, N. T. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 657-67, 2010.

DE MEIRELES, A. L. P. et al. Heteropoly acid catalyzed cyclization of nerolidol and farnesol: Synthesis of  $\alpha$ -bisabolol. **Applied Catalysis A: General**, v. 502, p. 271-275, 2015.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

FACHIN, A. L. et al. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1093-1099, 2006.

FAJINMI, O. O. et al. Antifungal activity of the volatiles of *Agathosma betulina* and *Coleonema album* commercial essential oil and their effect on the morphology of fungal strains *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*. **South African Journal of Botany**, 2018.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* activities of the new antifungal drug erbeconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5209-5211, 2003.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FLORES, F.C.; BECK, R.C.R.; DA SILVA, C. B. Essential oils for treatment for onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 9-15, 2016.

FONSÊCA, D. V. et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 14-22, 2016.

FORRER, M. et al. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a gram-positive bacterium associated with halitosis. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 1, p. 10-16, 2013.

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2017.

GHELARDI, E. et al. Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2825-2829, 2014.

- GOLAN, D. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Guanabara Koogan, 2009.
- GRÄSER, Y. et al. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3329-3336, 2000.
- HAYETTE, M. P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.
- KAPP, E. et al. Small molecule efflux pump inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: a rational drug design perspective. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 18, n. 1, p. 72-86, 2018.
- LEITE, D. P. et al. Dermatophytosis in military in the central-west region of Brazil: literature review. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 65-74, 2014.
- LEWIS, R. E. et al. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonismo between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345-351, 2002.
- LIÉBY-MULLER, F. et al. Synthesis and activities towards resistant cancer cells of sulfone and sulfoxide griseofulvin derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 10, p. 2078-2081, 2015.
- LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis?. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 143-167, 2016.
- MARANHÃO, F. C. A. et al. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 163-168, 2009.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1108, 2018.
- MARTINS, M. P. et al. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 7, p. 605-610, 2016.
- MARTINS, M. P. Expressão Comparativa de Genes em Dermatófitos durante o Processo de Interação com Moléculas do Hospedeiro e em Resposta a Agentes Antifúngicos. **Tese (Doutorado em Genética)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- MELO, L. T. et al. (-)- $\alpha$ -Bisabolol reduces orofacial nociceptive behavior in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 2, p. 187-195, 2017.
- MENDES, N. S. Análise global do perfil transcricional e splicing alternativo no dermatófito *Trichophyton rubrum* exposto à doses subinibitórias de ácido undecanóico. **Tese (Doutorado em Genética)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- MEZZARI, A. et al. Prevalência de Micoses Superficiais e Cutâneas em Pacientes Atendidos Numa Atividade de Extensão Universitária. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 21, n. 2, p. 151-156, 2017.

- MINNEBRUGGEN, G. V. et al. A general overview on past, present and future antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, p. 22-32, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.
- OLIVEIRA, J. C. Um Guia para o Laboratório de Micologia Médica. Diagnóstico Micológico por Imagens, 2014.
- PADALIA, R. C. et al. The essential oil composition of *Melaleuca leucadendra* L. grown in India: A novel source of (E)-nerolidol. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 224-227, 2015.
- PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 290-296, 2009.
- PAULI, A.  $\alpha$ -Bisabolol from Chamomile– A specific ergosterol biosynthesis inhibitor?. **International Journal of Aromatherapy**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 2006.
- PETERSEN, A. B. et al. Strategies for improving the solubility and metabolic stability of griseofulvin analogues. **European journal of medicinal chemistry**, v. 116, p. 210-215, 2016.
- PULE, C. M. et al. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 17-26, 2015.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- REUK-NGAM, N. et al. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. **BioMed research international**, v. 2014, p.1-8, 2014.
- RODRIGUES, E. R. Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* E drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão proteica. **Dissertação**. Universidade de Ribeirão Preto, 104p. 2007.
- RODRIGUES, E. R. et al. *Pothomorphe umbellata*: antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 3, p. 265-269, 2012.
- ROMAGNOLI, C. et al. A multi-target approach toward the development of novel candidates for antidermatophytic activity: Ultrastructural evidence on  $\alpha$ -bisabolol-Treated *Microsporum gypseum*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11765-11776, 2015.
- ROTTINI, M. M. et al. In vitro evaluation of (–)  $\alpha$ -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 148, p. 66-72, 2015.
- SAKHANOKHO, H. F. et al. Chemical composition, antifungal and insecticidal activities of *Hedychium* essential oils. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4308-4327, 2013.
- SAMPAIO, T. L. et al. Nephroprotective effects of (–)- $\alpha$ -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1843-1852, 2016.

SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 98-101, 2006.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.

SEGAL, E. ; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in microbiology**, v. 166, n. 7, p. 564-569, 2015.

SHARIFZADEH, A. et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 390-396, 2017.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp.* **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1289-1296, 2004.

SILVA, M. P. N. et al. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793-3803, 2014.

SILVEIRA-GOMES, F. et al. Dermatophytosis diagnosed at the Evandro chagas institute, Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 443-446, 2013.

SOARES, L. A. et al. Anti-*Trichophyton* activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare*L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 137, p. 308–311, 2010.

SOUZA, F. C. B.; SOUZA, R. F. B.; MORAES, Â. M. Incorporation and release kinetics of alpha-bisabolol from PCL and chitosan/guar gum membranes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 453-467, 2016.

SPEROTTO, A. R. M. et al. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum Kunth* essential oil and its major compound nerolidol. **Food and chemical toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.

TEGOS, G. P. et al. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 13, p. 1291-1302, 2011.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of food science**, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014.

UGHACHUKWU, P. O.; UNEKWE, P. C. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. **Annals of Medical and Health Sciences Research**. v. 2, n. 2, p 191-198, 2012.



URIBE, M. P.; CARDONA-CASTRO, N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. **CES Medicina**, v. 27, n. 1, p. 67-76, 2013.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VARGA, B. et al. Possible biological and clinical applications of phenothiazines. **Anticancer research**, v. 37, n. 11, p. 5983-5993, 2017.

VENA, G. A. et al. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 207- 213, 2012.

WHITE, T. C. et al. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 8, p. a019802, 2014.

YAMADA, T. et al. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00115-17, 2017.

YUE, X. et al. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 532, 2015.