



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS VEGETAIS FRENTE A
BIOFILMES DE *Aspergillus fumigatus*

Recife

2019

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS VEGETAIS FRENTE A
BIOFILMES DE *Aspergillus fumigatus***

Recife

2019

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS VEGETAIS FRENTE A
BIOFILMES DE *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Biodiversidade

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Oliane Maria Correia Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Alves, Adryelle Idalina da Silva

Potencial antifúngico de compostos vegetais frente a biofilmes de *Aspergillus fumigatus*/ Adryelle Idalina da Silva Alves – 2019.

76 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia de Magalhães

Coorientador: Antonio Fernando Morais de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2019.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Aspergilose 3. Resistência antifúngica I. Magalhães, Oliane Maria Correia de (orient.) II. Oliveira, Antonio Fernando Morais de (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 027

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS VEGETAIS FRENTE A
BIOFILMES DE *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Biodiversidade

Aprovada em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª Dr^ª Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^ª Ildnay de Souza Lima Brandão (Examinadora Externa)

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, e determinação para superar as dificuldades.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, ao Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), ao Laboratório de Bioquímica e Proteínas (BIOPROT), ao Hérbario Geral Mariz (UFP), ao Laboratório de Micologia Médica, Laboratório de Imunodiagnóstico e Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (LEAF) pela infraestrutura disponibilizada para realização dos experimentos.

À professora Oliane Maria Correia Magalhães pela orientação, oportunidade, apoio e confiança em mim depositada.

Ao professor Antônio Fernando Moraes de Oliveira pela orientação, apoio, incentivo e empenho dedicado a este trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Meus agradecimentos ao professor Marcos Antônio Barbosa de Lima pelo suporte no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores que fazem parte do Laboratório de Micologia Médica pelo conhecimento compartilhado que contribuiu diretamente com a minha formação acadêmica.

Meu imenso e sincero agradecimento aos meus amigos, a Franz de Assis Graciano Santos, Melyna Chaves Leite, Michelangelo Nunes da Silva, Tatiana Felix de Oliveira, Maria Audilene de Freitas e tantos outros, que tornaram esses dois anos de formação mais leves e felizes.

A todos os que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

“A melhor maneira de prever o futuro é
criá-lo”.

Alan Kay, 1971

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico dos compostos obtidos de *Libidibia ferrea* (Mar. ex Tul.) L. P. Queiroz, *Christiana africana* DC e *Sterculia foetida* Linn frente a biofilmes formados por *Aspergillus fumigatus*. Para o estudo, foram obtidos seis isolados, clínicos e ambientais, da Micoteca URM/UFPE que em estudos prévios, foram capazes de formar biofilmes *in vitro*. Dos compostos testados, o extrato etanólico de *L. ferrea* assim como suas frações hexânica e acetato de etila, não apresentaram atividade antifúngica frente as cepas testadas. No entanto, os óleos fixos obtidos de sementes de *C. africana* e *S. foetida* apresentaram atividade antifúngica frente as células planctônicas e sésseis de *A. fumigatus*, agindo em concentrações inibitórias mínimas de 1024µg/ml a 512µg/ml. Na análise fitoquímica dos compostos no extrato etanólico de *L. ferrea* foram detectados os ácidos elágico e gálico, quercetina e luteolina, enquanto os óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida* apresentaram os ácidos palmítico, linoleico, linolênico, malvático, estercúlico e esteárico, variando em concentração nas duas espécies. A descoberta do potencial antifúngico dos óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida* pode se tornar uma ferramenta promissora como alternativa terapêutica em casos de aspergilose causada por *A. fumigatus*.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Aspergilose. Resistência antifúngica.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the antifungal potential of the compounds obtained from *Libidibia ferrea* (Mar. ex Tul.) L. P. Queiroz, *Christiana africana* DC and *Sterculia foetida* Linn against biofilms formed by *Aspergillus fumigatus*. For the study, six clinical and environmental isolates from the URM/UFPE Micoteca were obtained, which in previous studies were able to form biofilms in vitro. Of the compounds tested, the ethanol extract of *L. ferrea* as well as its hexane and ethyl acetate fractions did not present antifungal activity against the tested strains. However, the fixed oils obtained from *C. africana* and *S. foetida* seeds presented antifungal activity against the planktonic and sessile *A. fumigatus* cells, acting at minimum inhibitory concentrations of 1024 μ g/ml to 512 μ g/ml. In the phytochemical analysis of the compounds in the *L. ferrea* ethanolic extract the ellagic and gallic acids, quercetin and luteolin were detected, while the fixed oils of *C. africana* and *S. foetida* presented palmitic, linoleic, linolenic, malarial, steric and stearic acids, varying in concentration in the two species. The discovery of the antifungal potential of the fixed oils of *C. africana* and *S. foetida* can become a promising tool as a therapeutic alternative in cases of aspergillosis caused by *A. fumigatus*.

Key-words: Medicinal plants. Aspergillosis. Antifungal resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 —	Aspectos microscópicos de <i>A. fumigatus</i> mostrando conidióforos provenientes de hifas de superfície, sinuosos, com paredes lisas e finas. Há a presença de vesículas piriformes, fiálides laterais e, conídios esféricos a sub-esferoidais, evidências características da espécie.....	19
Figura 2 —	Exemplar de <i>L. ferrea</i> evidenciando descamação do tronco.	37
Figura 3 —	<i>Cristiana Africana DC</i> . A) flores B) frutos.....	38
Figura 4 —	Exemplar de <i>Sterculia foetida Linn</i>	39
Figura 5 —	Sementes de <i>Sterculia Foetida Linn</i>	40
Figura 6 —	Cromatograma do extrato bruto de <i>Libidibia Ferrea</i> por L-CM-SM enumerados com o constituinte correspondente: 1. ácido gálico, 2. ácido elágico, 3. quercetina, e 4. Luteolina...	47
Figura 7 —	Cromatograma com os compostos no óleo fixo de <i>Christiana africana DC</i> por GC-FID. Os picos enumerados de acordo com a constituinte correspondente: 1. ácido palmítico, 2. ácido malválico, 3. ácido linoleico, 4. ácido oleico, 5. ácido linolênico, 6. Ácido esteárico e 7. ácido estercúlico, 6. ácido esteárico e 7. ácido estercúlico.	48
Figura 8 —	Cromatograma com os compostos no óleo fixo de <i>Sterculia foetida Linn</i> por GC-FID. Os picos enumerados de acordo com o constituinte correspondente: 1. ácido palmítico, 2. ácido malválico, 3. ácido linoleico, 4. ácido oleico, 5. ácido linolênico, 6. ácido e 7. ácido estercúlico.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 —	Biofilmes formados por <i>A. fumigatus</i> em 48 horas de incubação. ($p \leq 0,5$).....	55
Gráfico 2 —	Biofilmes tratados com o fármaco (Itraconazol) e óleos de <i>C. africana</i> e <i>S. foetida</i> por 24 h. ($p \leq 0,5$)	57
Gráfico 3 —	Biofilmes tratados com o fármaco (Itraconazol) e óleos fixo de <i>C. africana</i> e <i>S. foetida</i> por 48 h. ($p \leq 0,5$).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Análise dos constituintes químicos encontrados no cromatogramas de <i>Christiana africana</i> DC e <i>Sterculia foetida</i> Linn por GC-FID.....	51
Tabela 2 —	Perfil de sensibilidade antifúngica de culturas de <i>Aspergillus fumigatus</i> frente a Itraconazol e óleos fixos de <i>Christiana africana</i> DC, <i>Sterculia foetida</i> Linn e extrato bruto e frações de <i>Libidibia ferrea</i>	52
Tabela 3 —	Médias e desvio-padrão expressas para os tempos de tratamento nos biofilmes de <i>A. fumigatus</i> frente ao antifúngico e compostos vegetais nos períodos de 24 a 48 horas de exposição. ($p \leq 0,5$)...	59
Tabela 4 —	Médias e desvios-padrão expressas para os tempos de tratamento nos biofilme de <i>A. fumigatus</i> frente ao antifúngico e os óleos fixos de <i>Christiana africana</i> DC e <i>Sterculia foetida</i> Linn nos períodos de 24 a 48 horas de exposição.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Aspergilose pulmonar crônica
API	Aspergilose pulmonar invasiva
BDA	Ágar Batata Dextrose
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade ótica
DPCO	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
EPS	Exopolissacarídeo
FID	Cromatógrafo Gasoso Com Detector de Ionização de Chama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
MDR	Multi-drug resistance
MEC	Matriz extracelular
MIN	Minutos
MOPS	<i>(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)</i>
MTT	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Oxidase
OXIDASE	
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução Fosfato Salina
ROS	<i>Oxygen-reactive species</i>

RRP	Receptores de Reconhecimento Padrão
SADI	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
SNC	Sistema Nervoso Central
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
UFC	Unidade formadora de Colônia
UPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Performance Acoplada à Espectrometria de Massas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	<i>ASPERGILLUS FUMIGATUS (FRESENIUS 1863).....</i>	18
2.2	ASPERGILOSE.....	20
2. 2.1	Formas clínicas.....	21
2.2.1.1	Aspergilose broncopulmonar pulmonar alérgica (ABPA).....	21
2.2.1.2	Aspergiloma.....	22
2.1.1.3	Aspergilose pulmonar crônica (APC).....	23
2.1.1.4	Aspergilose pulmonar invasiva (API).....	24
2.2.2	Epidemiologia da aspergilose e espécies relacionadas	25
2.1.2	Patogênese da aspergiloses da aspergilose.....	26
2.1.2	Virulência.....	28
2.1.2.1	Biofilmes.....	29
2.1.2.1.2	Formação do biofilme.....	30
2.4.1.1.2	Matriz extracelular (MEC)	31
2.4.1.1.3	Mecanismo de resistência nos biofilmes.....	31
2.1.3	Tratamento da aspergilose e resistência antifúngica.....	32
2.3	COMPOSTOS VEGETAIS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA	34
2.3.1	<i>Libidibia ferrea (Mar. ex Tul.) L. P. Queiroz.....</i>	36
2.3.2	<i>Christiana africana DC.....</i>	37
2.3.3	<i>Sterculia Foetida Linn.....</i>	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	40
3.1.2.1	Obtenção do extrato aquoso e frações de <i>L. ferrea</i>	40
3.1.2.2	Extração dos óleos fixos de <i>C. africana</i> e <i>S. foetida</i>	41
3.1.3	Identificação dos componentes presentes nos compostos vegetais..	41
3.1.3.1	Análise do extrato por UPLC-MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas).....	40
3.1.3.2	Análise dos óleos fixos por cromatografia gasosa.....	42
3.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	42

3.3	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	43
3.3.1	Padronização do inóculo	43
3.3.2	Suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	43
3.4	FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES.....	44
3.4.1	Método de coloração MTT	44
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS COMPOSTOS VEGETAIS.....	45
4.2	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	51
4.3	FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES.....	55
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* é composto por fungos sapróbios, presentes no solo, no ar e em vegetação em decomposição. No entanto, esses fungos filamentosos também podem atuar como patógenos oportunistas causando a aspergilose, nomenclatura dada a um conjunto de doenças com patogenias diferentes entre si, causadas por *Aspergillus* spp. Dados recentes estimam que mais de 30 milhões de pessoas no mundo estão sob o risco de desenvolver aspergilose.

Dentre as espécies, *A. fumigatus* é a mais comumente encontrada em infecções. Seus esporos são inalados diariamente pelos seres humanos, em hospedeiros saudáveis, os mesmos são eliminados rapidamente pelas defesas do organismo. Contudo, em indivíduos imunocomprometidos, e sob determinadas condições do hospedeiro poderão desencadear uma série de manifestações clínicas, que vão desde um simples quadro alérgico a infecções invasivas graves (BEAUVAIS; LATGÉ 2015; VEERDONK et al., 2017; REICHERT-LIMA et al., 2018).

Um fator agravante em casos de infecções por *A. fumigatus* é sua reconhecida capacidade de desenvolver-se como uma comunidade multicelular, na qual as hifas são unidas por uma matriz extracelular hidrofóbica (MEC) é observada *in vitro* ou *in vivo*, em determinadas condições encontradas pelo fungo (BUGLI et al., 2012). Os biofilmes surgem como uma resposta adaptativa do fungo ao ambiente hostil que o cerca. Em infecções *in vivo*, estas estruturas típicas de biofilmes foram observadas principalmente no aspergiloma e aspergilose invasiva (FIORI et al., 2011).

O pilar de tratamento das formas clínicas da aspergilose se baseia no uso de antifúngicos da classe dos azólicos, tais como o voriconazol, itraconazol, posaconazol e, mais recentemente, isavuconazol. Estes antifúngicos são utilizados como primeira linha no tratamento e profilaxia da aspergilose. Entretanto, alguns estudos recentes vêm relatando resistência antifúngica a esta classe de fármacos frequentemente relacionada à resistência cruzada aos triazólicos usados na agricultura. Os casos de resistência associados aos azólicos entre *Aspergillus* spp. também reflete o aumento do uso de drogas profiláticas e a longos regimes de tratamento. O mecanismo associado a este tipo de resistência envolve modificação do gene *Cyp51A* e seu promotor, e foi detectado em isolados clínicos e ambientais de 22 países. Além disso, quando em biofilmes, os antifúngicos são menos efetivos, já que este fenótipo de crescimento atua impedindo a difusão de drogas agindo como uma barreira física (RAJENDRAN et al., 2015; PERLIN et al., 2017; FISHER et al., 2018).

O tratamento de infecções fúngicas tem se tornado um desafio, sendo assim cada vez mais pesquisadores tem demonstrado interesse em buscar alternativas terapêuticas que auxiliem ou até mesmo substituam o tratamento antifúngico utilizado usualmente, por novas drogas que sejam mais eficazes, seguras e econômicas. O Brasil, um país rico em diversidade vegetal, possui um grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas em novas tecnologias e serviços terapêuticos relacionados a medicamentos naturais que auxiliem no desfecho clínico positivo em uma gama de infecções (CARNEIRO et al., 2014).

Espécimes vegetais vem sendo utilizadas durante anos no tratamento de doenças em países do mundo inteiro. Dentre essas espécies a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) vulgarmente conhecida como jucá e pau-ferro, é uma planta da família Leguminosae comum nas regiões Norte e Nordeste do país. Essa espécie possui propriedades terapêuticas descritas ao longo dos anos, que incluem propriedades antiulcerogênica (NAKAMURA et al., 2002) anti-hipertensiva (CARVALHO et al., 2010), analgésicas e anti-inflamatórias (LIMA et al., 2012), alívio de tosse crônica e asma (BRAGA, 1976). Ademais, há estudos que constataram a atividade antifúngica do extrato etanólico de frutos de *L. ferrea* em biofilmes da cavidade oral para espécies de *Candida* e *Fusarium* (FERREIRA; SOARES, 2015).

Outras duas espécies vegetais de origem tropical e subtropical de ocorrência no Brasil que possuem compostos biologicamente ativos contra alguns microrganismos, são a *Sterculia foetida* Linn e *Christiana africana* DC. (BRAGA et al., 2015). Oliva-de-java ou castanha-da-Índia como é conhecida vulgarmente a *Sterculia foetida* Linn, é uma árvore pertencente à família Malvaceae, gênero Sterculaceae e subfamília Sterculioideae comum em países da Europa, África e Ásia. Foi introduzida no Brasil para fins ornamentais, entretanto diversas partes desta planta são utilizadas na medicina popular por conter propriedades medicinais como efeitos diurético e anti-inflamatório (SHAMSUNDAR; PARAMJYOTHI, 2010; KALE et al., 2011). A *Christiana africana* DC. ou “Gargaúba” também faz parte da família Malvaceae. Caracteriza-se por ser uma árvore pequena, comum na África Central, América do Sul e Madagáscar. Esta espécie é comumente utilizada na medicina popular para o tratamento da hipertensão e infecções gastrointestinais (MICHALET et al., 2008).

Tendo em vista a capacidade de *A. fumigatus* de crescer em biofilmes, às vezes, até associados com outros microrganismos como bactérias. Assim como o aumento do número de casos de resistência ao arsenal antifúngico. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade

de inibição de biofilmes formados *in vitro* por *A. fumigatus* na presença de compostos obtidos de três espécies vegetais encontradas no Brasil.

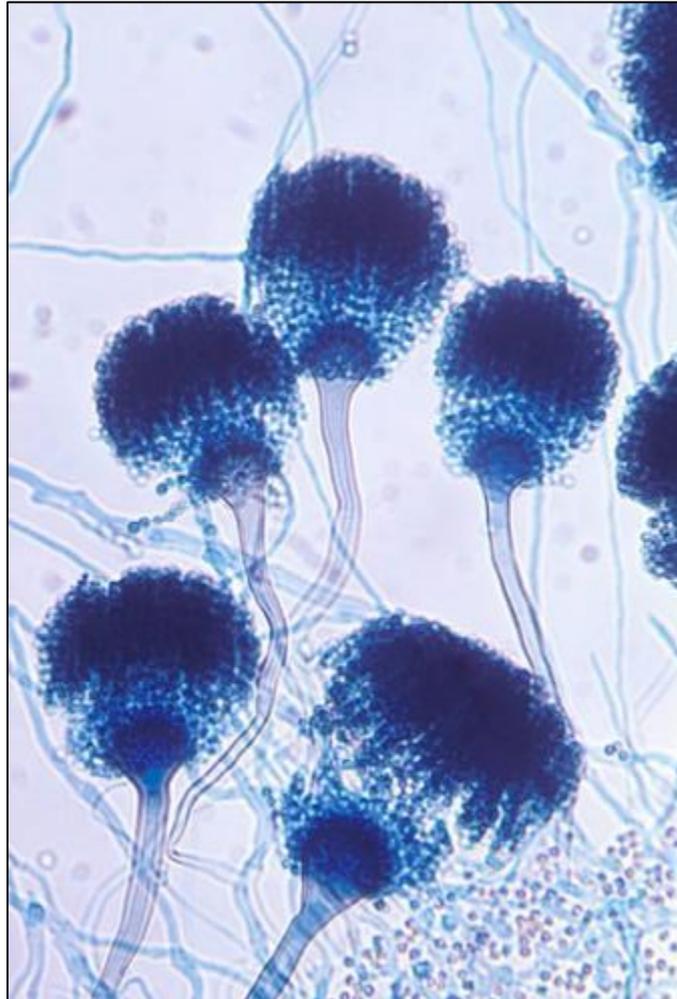
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPERGILLUS FUMIGATUS (FRESENIUS 1863)

Os fungos surgiram há mais de 1.500 milhões de anos e apenas 0,5% das espécies de fungos são consideradas patogênicas para humanos. Estes incluem patógenos agentes causadores de aspergilose, candidíase, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, micetomas, mucormicose e paracoccidioidomicose, entre outros. E apesar de, presente em centros médicos em todo o mundo, as infecções fúngicas tem sido até agora muito negligenciada. Sua incidência global é prejudicada pela falta de sistemas de vigilância nacional e suspeita fora de unidades especializadas, o que fez com que algumas delas fossem apenas recentemente reconhecidas. Entretanto, é fato que estão relacionadas com significativa morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Sendo as infecções fúngicas invasivas mais comuns atribuíveis a *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (ROEMER; KRYSAN, 2014; SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014; BONGOMIN et al., 2017; FISHER et al., 2018).

Aspergillus fumigatus pertence filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eutotiales*, família *Trichocomaceae*, e ao gênero *Aspergillus* que compreende mais 344 espécies, das quais apenas 20 delas são patogênicas ao homem e distribuídas nas seguintes seções: Fumigati, Flavi, Nigri, Terrei e Nidulante (SUGUI et al., 2014; GHAZAEI, 2017). A seção Fumigati é de grande interesse médico por conter mais de 11 espécies reconhecidos como agentes etiológicos de patologias, incluindo *A. fumigatus*. Nesta seção já foram descritas 63 espécies, embora algumas possivelmente sejam sinonímias de outras. A delimitação de espécies dentro desta seção depende de uma abordagem polifásica. Seus membros são caracterizados pela formação de um conidióforo com cabeças conidiais colunares em formas globosas e semi-globosas, fiálides unisseriadas e cadeias longas de conídios. Os conídios são geralmente verde-azulados ou verde pálido, hidrofóbicos com tamanho de 2 a 3,5µm de diâmetro (Figura 1) (SUGUI et al., 2014; LAMOTH et al., 2016). Fora do hospedeiro humano esses conídios são responsáveis pelo ciclo de vida assexual. Estes são produzidos nos conidióforos e em seguidas liberados no ar onde são inalados pelos seres humanos (BANDRES; SHARMA, 2018).

Figura 1 — Aspectos microscópicos de *A. fumigatus* mostrando conidióforos provenientes de hifas de superfície, sinuosos, com paredes lisas e finas. Há a presença de vesículas piriformes, fiáldes laterais e, conídios esféricos a sub-esferoidais, evidências características da espécie.



Fonte: Chowdhary; Sharma; Meis (2017).

Aspergillus fumigatus está amplamente distribuído utilizando inúmeros substratos orgânicos. Sua prevalência em infecções se deve principalmente essa capacidade de prosperar em quase todos os ambientes, assim como a rápida e eficiente germinação dos seus esporos, capacidade de crescimento em temperaturas elevadas e um metabolismo que responde à variação de fontes de nutrientes. Esse conjunto de outros fatores de virulência contribuem para a sua alta dispersão e quantidade significativa de esporos inalados diariamente. Este fungo, age causando infecções fúngicas conhecidas como Aspergilose geralmente em pessoas que possuem sistemas imunológicos comprometidos, como aqueles que possuem HIV/AIDS, neutropênicos, câncer, pacientes que foram submetidos a transplantes de órgãos sólidos ou

indivíduos com doenças pulmonares subjacentes (SUGUI et al., 2014; VERWEIJ et al., 2016; GHAZEI, 2017; VEERDONK et al., 2017).

Durante alguns anos *A. fumigatus* foi considerado o principal patógeno fúngico em casos de aspergilose, causando diversas doenças que cobrem uma ampla gama de manifestações clínicas, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Contudo, com o advento de técnicas de sequenciamento foram encontradas evidências genéticas que sugerem que *A. fumigatus* se trata na verdade, de um complexo que contém, espécies crípticas e morfologicamente idênticas. *A. fumigatus stricto sensu* representa o principal patógeno humano em quadros de aspergilose, entretanto, algumas outras espécies pertencentes ao complexo *A. fumigatus* *latus sensu*, foram reconhecidos como causas da forma invasiva da aspergilose em 3 a 6% dos casos documentados. Espécies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. calidoustus* e *A. nidulans* também são capazes de causar infecções. Todas estas consideradas espécies intimamente relacionadas. A descoberta desse complexo de espécies alterou a prevalência deste patógeno na última década. *A. fumigatus* costumava ser responsável por 90% das infecções. Entretanto, foi demonstrado que o complexo de espécies de *A. fumigatus stricto sensu* é responsável por aproximadamente 60% das infecções (LAMOTH et al., 2016; BLATZER; LATGÉ, 2017; CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; BANDRES; SHARMA 2018).

2.2 ASPERGILOSE

A aspergilose engloba um conjunto de infecções causadas por espécies do gênero *Aspergillus*, esse espectro pode variar de aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose pulmonar crônica, bronquite, aspergiloma e aspergilose invasiva. Sendo causadas principalmente por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. nidulans*. A aspergilose tem se tornado um problema crescente, com mais de 200 mil infecções fatais anualmente. E, ainda que avanços significativos em diagnóstico tenham sido realizados nos últimos anos, a taxa de mortalidade associada está relacionada intimamente com a forma clínica e a interação do patógeno com o sistema imune do hospedeiro, mas geralmente varia entre 28,5% e 50% em pacientes imunossuprimidos (FORTÓN et al., 2012; CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; VEERDONK et al., 2017; BANDRES; SHARMA, 2018).

A infecção se dá principalmente pela inalação de esporos de *Aspergillus* sp mas o desenvolvimento da doença requer fatores predisponentes do hospedeiro, como asma, doenças das vias aéreas (dilatação brônquica, fibrose cística), cavidades pulmonares pré-existentes

(tuberculose, sarcoidose), deficiência imunológica. A inalação de conídios por indivíduos imunocompetentes pode resultar em colonização não patogênica, entretanto, no paciente imunocomprometido provavelmente resultará no estabelecimento da doença (SUGI et al., 2015; CHABI et al., 2015).

2. 2.1 Formas clínicas

2.2.1.1 Aspergilose broncopulmonar pulmonar alérgica (ABPA)

A ABPA não é considerada uma doença invasiva e caracterizam-se por episódios de febre recorrente, tosse, infiltrados pulmonares e asma, que geralmente respondem ao tratamento com corticosteroide. Estima-se que ocorra em 2,5% pacientes com asma e pacientes com doença dependente de corticosteroide ou naqueles que expectoram tampões de muco ou demonstram bronquiectasias e/ou obstrução em exames de imagem de tórax devem ser suspeitos. Se tratada inadequadamente, o dano pulmonar permanente progride para fibrose (SALES, 2009; PAULUSSEN et al., 2016; MULDOON et al., 2017).

ABPA é uma reação complexa de hipersensibilidade, que ocorre em pacientes com asma (1 a 2%) ou fibrose cística (8–9%). O aumento dos sintomas das doenças subjacentes, é recorrente e, em alguns casos, se complica pelo surgimento de sintomas sistêmicos como febre, mal-estar, obstrução brônquica e/ou presença de tampões mucosos castanhos. Este último estando geralmente associado à rinosinusite fúngica alérgica caracterizada por sintomas comuns de sinusite, mas com presença à secreção nasal de cor escura (FORTÚN et al., 2012; BANDRES; SHARMA, 2018).

Os mecanismos por trás do surgimento de doenças alérgicas por estimulação antigênica crônica através de inalação dos esporos de *A. fumigatus* ainda permanece pouco elucidado. No entanto, estudos observaram por meio de análises moleculares que os principais alérgenos incluem proteases que estão envolvidas no processo de germinação e desenvolvimento de hifas no tecido pulmonar do hospedeiro (NAYAK et al., 2018).

Em casos de ABPA comumente não há colonização micelial, e assim que o paciente é removido da fonte ambiental há melhora clínica. O fungo cresce nas árvores brônquicas mais especificamente no lúmen, o que resulta em inflamação (bronquite) e assim, desencadeia uma resposta inflamatória alérgica mediada por IgE, levando à obstrução bronco-alveolar (BANDRES; SHARMA, 2018). Recentemente novos critérios diagnósticos foram propostos para casos de ABPA. Estes critérios incluem condições predisponentes como asma brônquica

ou fibrose cística, associada a outros critérios. Estes critérios obrigatórios de diagnóstico incluem positividade do teste cutâneo ou níveis elevados de IgE específica contra *A. fumigatus*, e níveis elevados de IgE total. Os outros três critérios são a presença de precipitações ou IgG anticorpos contra *A. fumigatus* no soro, opacidades pulmonares radiográficas consistentes com ABPA e contagem totais de eosinófilos maiores que 500 células em pacientes que não fazem uso de esteroides (PATTERSON et al., 2016; CHABI et al., 2015; MULDOON et al., 2017).

As diretrizes práticas sobre aspergilose recomendam que a triagem de APBA em pacientes com asma seja anual, sobretudo naqueles com exacerbações frequentes. As características radiográficas do tórax compatíveis com a ABPA podem ser transitórias (consolidações, nódulos, trilhos de opacidades/ opacidades em “dedo de luva”) ou permanentes (isto é, linhas paralelas e sombras de anel, bronquiectasia e fibrose pleuropulmonar). Para os achados radiológicos de tórax, uma tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) pode detectar melhor as características radiográficas da ABPA (PATTERSON et al., 2016; CHALBI et al., 2015; MULDOON et al., 2017).

2.2.1.2 Aspergiloma

O aspergiloma (bola fúngica) é um aglomerado composto por hifas, células inflamatórias, fibrina, muco e detritos de tecido dentro do parênquima pulmonar, em uma cavidade pré-existente geralmente no lobo superior, ou brônquio dilatado (SOUBANI, 2011). Este aglomerado está tipicamente cercado por um espaço aéreo, que geralmente se move com mudanças de posição. Este é um elemento chave, uma vez que a identificação do sinal do “crescente aéreo”, que equivale à cavitação do nódulo existente é às vezes mais eficaz que a radiografia convencional de tórax. O grau de preenchimento do pulmão a cavidade é variável, responsável por formas muito sólidas (pseudotumoral) e formas muito cavitárias. Indivíduos com risco de desenvolvimento de aspergiloma geralmente possuem cavitação, doença pulmonar cística, sarcoidose ou enfisema (CHABI et al., 2015; SEVILHA et al., 2017).

O quadro clínico do aspergiloma, também pode se desenvolver em hospedeiros imunologicamente competentes, mas para isso geralmente requer uma cavidade pré-existente, como as resultantes de uma tuberculose prévia. A sintomatologia varia, a maioria dos indivíduos é assintomática e, quando os sintomas existem, geralmente incluem tosse crônica e hemoptise, devido à ruptura dos vasos sanguíneos na parede da cavidade ocupada pelo fungo. O sangramento é frequentemente leve, mas a hemoptise pode não ser o que quando presentes indicam embolização da artéria onde o tratamento é realizado por meio ressecção cirúrgica. No

entanto, é importante destacar que hemoptise é uma complicação que pode ser fatal. Quando há a presença do aspergiloma há uma maior probabilidade de resistência ao tratamento com azólicos. Apesar das complicações, os aspergilomas permanecem estáveis na maioria dos casos, e podem até regredir de tamanho espontaneamente em cerca de 10% dos casos (RAMAGE et al., 2011; KOSMIDIS; DENNING, 2014; CHABI et al., 2015; SEVILHA et al., 2017).

2.1.1.3 Aspergilose pulmonar crônica (APC)

A APC foi reconhecida pela primeira vez como uma condição fatal em 1842, no Reino Unido, e o primeiro paciente documentado (1957) foi tratado com anfotericina (DENNING et al., 2015). Esta forma clínica como consequência da tuberculose ocorre em milhões de pessoas no mundo. Na maioria dos casos a APC pode ser sub-reconhecida como uma complicação de um quadro de tuberculose previamente tratada, e alguns deles os pacientes podem ser diagnosticados erroneamente como tendo recorrência desta, visto que as duas condições apresentam sintomas similares (KOSMIDIS; DENNING, 2014).

A forma crônica da aspergilose é a menos frequente, considerada uma doença localmente invasiva. A população afetada também é tipicamente distinta. Existe um grau de supressão imunológica nos pacientes crônicos e geralmente está relacionada com patologias pulmonares crônicas ou imunodeficiência leve, diabetes, insuficiência renal, com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e exposição a corticosteroides durante longos períodos de tempo e câncer pulmonar (CHABI et al., 2015; BANDRES; SHARMA, 2018).

As características clínicas da APC são inespecíficas e muitas vezes se sobrepõem a outras condições torácicas crônicas e infecções. Apesar disso, a febre e hemoptise podem ser encontradas, mas não são frequentes (SCHWEER et al., 2013; CHABI et al., 2015). Radiologicamente, a APC apresenta consolidações em exames de imagem geralmente acompanhada de bronquiectasia, acometendo frequentemente os lobos pulmonares superiores. O processo infeccioso do parênquima pulmonar devido à invasão local pelo fungo é indolente. Em contraste com a aspergilose pulmonar invasiva, a APC tem progressão lenta e leva semanas até meses, e a invasão vascular ou disseminação para outros órgãos é incomum (KOUSHA; SOUBANI, 2011; CHABI et al., 2015).

Em pacientes sintomáticos, ou naqueles com doença progressiva ou com declínio na função pulmonar, é recomendado o tratamento com antifúngicos. Embora os antifúngicos triazólicos sejam utilizados e recomendados como terapia de primeira linha, existem poucos dados de ensaios clínicos para suportar o seu uso, embora, a terapia com itraconazol oral tem

um impacto significativo na resposta clínica e radiológica após seis meses de tratamento. Outros antifúngicos, como o voriconazol e o posaconazol são alternativas aceitas para o tratamento, quanto ao isavuconazol há poucos dados até o momento sobre o seu uso (PATTERSON et al., 2016; MULDOON et al., 2017).

Recomenda-se que os pacientes sejam tratados por no mínimo seis meses, em alguns casos a terapia é requerida ao longo da vida. Mesmo assim, os pacientes devem passar por exames de imagem a cada três meses e seis meses após o início do tratamento (MULDOON et al., 2017).

2.1.1.4 Aspergilose pulmonar invasiva (API)

API é uma das mais graves infecções fúngicas invasivas, com alta taxa de mortalidade entre pacientes imunocomprometidos. Esse tipo de infecção também pode ser encontrado em pacientes criticamente doentes, especialmente pacientes com neutropenia por quimioterapia, transplante halogênico de medula óssea, mas também pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos, especialmente transplante de pulmão e em indivíduos com DPOC. A aspergilose pulmonar invasiva aumentou em pacientes com malignidades hematológicas nos últimos anos principalmente os que utilizam regimes quimioterápicos (KAYA et al., 2017). Visto que, o principal fator de risco é a neutropenia, cujo a incidência aumenta com sua duração e profundidade. Em pacientes com leucemia mieloblástica aguda a incidência da API foi estimada em 10% (BLANCHARD et al., 2018).

A sintomatologia desta forma clínica varia, no entanto, a tosse está presente na maioria dos casos. Há também a presença de febre sem melhora ao tratamento com antibióticos por mais de 72 horas, além disso, dificuldade respiratória e dispneia também podem estar presentes. É uma doença agressiva à invasão da parede brônquica e das arteríolas pelas hifas. Este crescimento angioinvasivo das hifas, a partir de um foco endobrônquico inicial resulta em hemorragias, trombose e necrose. Além desses sintomas dor torácica pode ocorrer durante a fase invasiva assim como a hemoptise, que pode ser grave em casos de perfuração arterial. Ao atingir os vasos ocorre a disseminação através da corrente sanguínea para outros órgãos.

Ao se disseminar, a API correlaciona-se com prognóstico ruim, e afeta órgãos como o fígado, olhos (endoftalmite), pele (aspergilose cutânea), coração (endocardite), rins e cérebro. A aspergilose no sistema nervoso central (SNC) pode ser encontrada em 40%-50% de pacientes com API. A invasão do SNC tem consequências extremamente graves e é quase sempre fatal em pacientes imunocomprometidos. Esta localização pode causar convulsões, infartos cerebrais,

hemorragia intracraniana, abscessos epidurais e meningite (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011; DESOUBEAUX et al., 2014; CHABI et al., 2015; SUGUI et al., 2014; BANDRES; SHARMA, 2018).

Esta forma da aspergilose deveria ser considerada como uma doença infecciosa emergente e devastadora em imunocomprometidos uma vez que as taxas de mortalidade associadas são altas (TACCONE et al., 2015). Montagna et al. (2013) avaliaram pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) no sul da Itália, através de um programa de vigilância por 18 meses envolvendo 18 UTIs, no estudo apenas 12 casos de API ocorreram em 5.561 pacientes, mas foi observado que a mortalidade entre esses pacientes foi de 60%.

O diagnóstico das diferentes formas de aspergilose tem se mostrado um grande desafio na prática médica. Isso se deve à natureza inespecífica de seus sinais clínicos, assim como a falta de um teste diagnóstico sensível e preciso que garanta um diagnóstico precoce. Além disso, o isolamento da forma patogênica de espécies de *Aspergillus* em indivíduos infectados é difícil. Por isso, há alguns critérios importantes que devem ser utilizados para o diagnóstico de API, como: a evidência clínica e radiológica de infecção do trato respiratório inferior; critérios biológicos incluindo avaliação microscópica direta, isolamento, cultura e identificação definitiva de *Aspergillus* de uma amostra clínica, ou evidência de testes imunológicos, sorológicos e/ou moleculares; características relacionadas ao paciente, como neutropenia ou febre persistente em pacientes de alto risco; e evidência histopatológica de infecção. A detecção de antígenos em amostras sorológicas é muito importante, uma vez que, estudos relataram que galactomanano pode ser detectado vários dias antes presença de sintomas clínicos, anormalidades radiográficas torácicas ou cultura positiva (CHABI et al., 2015; PAULUSSEN et al., 2016).

As diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (SADI) recomendam que o diagnóstico de API se baseie em evidências da presença do patógeno em exames histopatológicos/citológicos e de culturas de amostras de tecido ou líquido, até que ferramentas moleculares sejam mais amplamente utilizadas em laboratórios clínicos (PATTERSON et al., 2016).

2.2.2 Epidemiologia da aspergilose e espécies relacionadas

A distribuição global de espécies é um processo dinâmico, pode mudar por causa de fatores ambientais ou práticas clínicas. Na identificação dos fatores de risco é importante

medidas preventivas da doença e tratamento precoce em casos de suspeita de infecção (KAUFFMAN; GREGG, 2015; KAYA et al., 2017).

Segundo Paulussen et al. (2016) *Aspergillus fumigatus* é a principal espécie causadora de aspergilose sendo seguido por *A. flavus* e *A. niger*. Um estudo multicêntrico em centros de transplantes dos Estados Unidos, realizado entre 2001 e 2006, *A. fumigatus* foi o patógeno em 68 a 72% dos casos de API. *A. flavus* responsável por 10 a 17% casos, *A. terreus* corresponderam a 3 a 7%, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. ustus* foram as menos associadas a aspergilose pulmonar invasiva (KONTOYIANNIS et al., 2010).

Em alguns cenários, certas espécies de *Aspergillus* são mais predominantes que outras. Como o caso de *A. flavus* infectando frequentemente usuários de drogas intravenosas, e isso tem ocorrido devido ao hábito de filtrar heroína através de bolas de algodão, que frequentemente são contaminados com essa espécie. *A. nidulans* tem sido comum em pacientes com doença granulomatosa crônica, sendo geralmente uma causa comum de infecção invasiva. Já em centros pediátricos *A. fumigatus* e *A. flavus* têm sido frequentemente predominantes. Em crianças portadoras de doenças hematológicas *A. fumigatus* é a causa mais comum seguido por *A. flavus* e *A. terreus* (KAUFFMAN; GREGG, 2015; PANA et al., 2017).

Dados do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) estimam que 4,8 milhões de pessoas em todo o mundo possuam asma, e dentre estes 2,5% dos adultos possuem aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e que 1 a 15% dos pacientes com fibrose cística sofram com ABPA. Dos 4,8 milhões de pessoas que possuem ABPA, estima-se que 400 mil também possuam aspergilose pulmonar crônica (APC). Outros 1,2 milhões de pessoas são estimadas como APC como sequela de tuberculose, e mais de 70 mil pessoas são estimadas como portadoras de APC como uma complicação da sarcoidose. Estudos epidemiológicos realizados na Áustria e França apontaram uma alta incidência de API em pacientes com leucemia aguda (KOEHLER et al., 2017).

2.1.2 Patogênese da aspergilose

Os conídios de *A. fumigatus* estão dispersos no ambiente e são encontrados ao ar livre, ou seja, solo, detritos de plantas, e em ambiente internos, incluindo hospitais (TADI; SOUBANI, 2011). Estima-se que os seres humanos inalem algumas centenas de milhares de conídios por dia, alguns dos quais podem atingir os alvéolos pulmonares. *A. fumigatus* possui esporos que medem cerca de 2 a 3,5 µm de diâmetro o que facilita sua entrada nos pulmões.

Em indivíduos saudáveis, os conídios que atingem os alvéolos não são capazes de desencadear uma resposta imunológica. Uma vez que, o próprio órgão possui barreiras como o muco, estes por sua vez inativam os conídios, impedindo-os de germinar. Além disso, os cílios das células epiteliais os removem, em alguns casos estas células podem gerar pseudópodes e envolver esses esporos. Todavia, quando altas quantidades de esporos somados a fatores intrínsecos do hospedeiro, torna a exposição uma ameaça e, só então, há o desenvolvimento de uma resposta imunológica do hospedeiro (VAN DE VEERDONK et al., 2017; XU et al., 2017; CHALLA, 2018).

A eliminação dos conídios inalados ocorre por meio de células epiteliais presentes nas vias aéreas e por macrófagos alveolares residentes nos pulmões. Estes, por sua vez, reconhecem certos antígenos fúngicos na parede celular desencadeando uma resposta inflamatória que ocorre por meio de mediadores que promovem o recrutamento dos neutrófilos e a ativação da imunidade celular. O reconhecimento de *A.fumigatus* por receptores de reconhecimento padrão (RRP) ativa o complexo NADPH oxidase, que por sua vez ativa proteínas responsáveis pela autofagia dos patógenos fúngico dentro do fagossoma (VEERDONK et al., 2017; BANDRES; SHARMA, 2018; CHALLA, 2018).

Hillmann et al. (2015) demonstraram que *A. fumigatus* é capaz de evitar a predação por amebas no solo através de estratégias paralelas que também são usadas para fugir das respostas relacionadas a resposta imunológica inata. Uma dessas estratégias é a germinação intracelular, que resulta em lise do fagócito dentro do fagossoma. O complexo NADPH oxidase também é importante para as NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), em que neutrófilos liberam seu DNA para formar armadilhas extracelulares que são revestidos com peptídeos antimicrobianos (PAMPs). Além disso, os neutrófilos danificam as hifas através da liberação de ROS (espécies reativas de oxigênio) produzidas pelo complexo NADPH oxidase (VEERDONK et al., 2017).

A ação conjunta de componentes do sistema imunológico determina a eliminação de hifas e constituição da resposta imunológica em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, em indivíduos que não conseguem eliminar os conídios inalados, estes permanecem nos pulmões e podem germinar dando início os quadros clínicos de aspergilose (FORTÚN et al., 2012; VAN DE VEERDONK et al., 2017). O mesmo ocorre em pacientes que possuem alguma doença de base pulmonar, estes são altamente suscetíveis a este tipo de infecção porque os conídios inalados germinam eficientemente e, se adaptam a fisiologia do ambiente alterado. Em quadros nos quais prevalece a imunossupressão, como ocorre em indivíduos em tratamento de doenças

autoimunes ou malignidades, há uma maior incidência de aspergilose; visto que, na imunossupressão subjacente assim como na terapia com esteroides há uma disfunção macrofágica e neutrofílica e redução em número de neutrófilos (SUGUI, 2014; VEERDONK et al., 2017; KWON-CHUNG; BANDRES; SHARMA, 2018).

2.1.2 Virulência

A virulência de *A. fumigatus* é resultado de interações entre fatores do patógeno e o sistema imunológico do hospedeiro. Essas interações complexas são responsáveis pela termotolerância e integridade da parede celular, assim como a adesão a superfícies e produção de pigmentos. Além disso, várias enzimas estão envolvidas na evasão aos mecanismos imunológicos, absorção de nutrientes, sinalização de moléculas através da alteração da resposta metabólica a condições de estresse, e produção de toxinas (GHAZAEI, 2017).

Vários fatores de virulência foram identificados para diferentes espécies de *Aspergillus*. Dentre estes, as adesinas, pigmentos, enzimas hidrolíticas, como proteases, fosfolipases, ribonucleases, restringocina; catalases, superóxidos-dismutases, micotoxinas e metabolitos não proteicos de baixo peso molecular (RAKSHA; SINGH; URHEKAR, 2017).

A produção de metabólitos secundários por fungos, por exemplo, já é exaustivamente documentada. Dentre estas, a gliotoxina é um fator de virulência poderoso, sendo produzida principalmente por *A. fumigatus* e *A. terreus*, outras toxinas como as aflatoxinas são vistas principalmente em *A. flavus* (RAKSHA; SINGH; URHEKAR, 2017). A gliotoxina é metabólito secundário tóxico da classe das epipolitiiodrioxopiperazinas que são produzidas por várias espécies de fungos, á exemplo, o *Eurotium chevalieri*, *Gliocladium fimbriatum* e também algumas espécies de *Trichoderma* e *Penicillium* (SCHARF et al., 2011).

Essa toxina desempenha um importante papel na patogênese de fungos patogênicos. Estudos relataram que a gliotoxina é produzida *in vivo* em tecidos de animais infectados por *A. fumigatus* e foi recentemente encontrada no soro de pacientes com aspergilose invasiva (RAKSHA; SINGH; URHEKAR, 2017). O modo de ação primário da gliotoxina na virulência de *Aspergillus* está relacionado com a sua capacidade induzir apoptose em neutrófilos, macrófagos (CRAMER; RIVEIRA; HOHL, 2011). Além da gliotoxina, foi demonstrado que *A. fumigatus* também produz vários metabólitos tóxicos como a fumagilina, verruculogênio, pseurotina e fumiquinazolinas (GHAZEI et al., 2017).

Outro fator de virulência importante de *A. fumigatus* é sua notável produção e secreção de enzimas hidrolíticas, incluindo serinas e proteases, metaloproteinases, dipeptidilpeptidases

e fosfolipases. Estas contribuem facilitando a colonização dos pulmões e de outros tecidos estando fortemente relacionadas com a gravidade da infecção (LATGÉ et al., 2017).

2.1.2.1 Biofilmes

Aspergillus fumigatus é capaz de crescer e desenvolver-se como uma comunidade microbiana multicelular aderida a superfícies bióticas e abióticas. Em biofilmes, as hifas estão unidas pela MEC, formada principalmente por polissacarídeos. Esta forma de crescimento pode conferir ao patógeno a capacidade de colonizar diversos substratos, assim como resistir às defesas fagocíticas e ataques antimicrobianos. Os biofilmes correspondem a uma resposta adaptativa dos microrganismos às condições internas e externas do meio que os rodeia; assim eles sofrem alterações fisiológicas através de expressão diferencial de genes, que resultam em suas modificações estruturais (BUGLI et al., 2013; BOISVERT et al., 2016; GONZÁLEZ-RAMÍRES et al., 2016; GHAZEI, 2017).

Os biofilmes estão envolvidos em cerca de 30-80% das infecções fúngicas hospitalares. Quando relacionados a infecções, foi demonstrado que a CIM de drogas antifúngicas necessária para eliminar estruturas de biofilme de *A. fumigatus* é muito maior do que é exigida para combater as formas planctônicas do fungo, tanto em superfícies de poliestireno como em células epiteliais humanas. Estes agregados se formam principalmente em dispositivos médicos, como cateteres, válvulas e lentes. Podem também estar aderidos a superfícies bióticas, por exemplo, superfícies epiteliais ou dentárias; enquanto outras podem ser agregados microbianos livres que colonizam os compartimentos comprometidos do tecido (KAUR; SINGH, 2013; BOISVERT et al., 2016; GONZÁLEZ-RAMÍRES et al., 2016; VEERDONK et al., 2017).

Os biofilmes de *A. fumigatus* são formados estaticamente em condições de crescimento *in vitro* ou *in vivo*. Esta condição de crescimento já foi associada a forma clínica invasiva da aspergilose, frequentemente fatal em pacientes imunocomprometidos, bem como à forma aspergiloma. Sendo considerada por muitos autores como um dos mais importantes fatores de virulência na aspergilose pulmonar invasiva (API) e aspergiloma. Todavia também são formados durante outras infecções do trato respiratório, como em alguns casos de asma, fibrose cística, DPOC e aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) (KAUR; SINGH, 2013; VEERDONK et al., 2017; MANFIOLLI, et al., 2018).

2.1.2.1.2 Formação do biofilme

As espécies de *Aspergillus* possuem um ciclo de vida complexo com estágios distintos de desenvolvimento. O estabelecimento inicial da infecção fúngica por *A. fumigatus* ocorre pela adesão e posterior germinação dos conídios em superfícies de células do hospedeiro. Os esporos se aderem às superfícies, tanto bióticas quanto abióticas, através de vários mecanismos físicos e biológicos e interações complexas entre o fungo e células do hospedeiro (GRAVELAT et al., 2012).

Durante o processo de adesão são importantes propriedades físicas como hidrofobicidade, carga eletrostática e aspereza da superfície. A superfície dos conídios de *A. fumigatus* é hidrofóbica, principalmente pela presença de hidrofobinas na parede celular. A germinação do esporo tem início quando há uma ruptura da camada proteica hidrofóbica que reveste a parede que são essencialmente compostas de polissacarídeos. Os conídios perdem sua hidrofobicidade superficial progressivamente. Inicialmente há um ponto de germinação que irá resultar em formação de hifas, esse processo começa com a formação de um tubo germinativo, que possui a natureza hidrofílica em sua parede, favorecendo assim seu crescimento. A adesão as células do hospedeiro é um fator chave na patogênese da API e é necessária para a invasão e virulência na célula hospedeira. A aderência das hifas de *A. fumigatus* às células hospedeiras é mediada pela produção de um exopolissacarídeo, o galactosaminogalactano. Este processo envolve moléculas da superfície celular do fungo e as membranas das células do hospedeiro (RAMAGE et al., 2011; GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016; LATGÉ et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Mowat et al. 2007 demonstraram em seus estudos *in vitro* que entre o processo e adesão e germinação dos conídios duram aproximadamente 10 horas, em seguida há uma fase de delongamento antes que as hifas entrem em contato entre si e, só então formem uma monocamada em torno de 10 a 16 horas, seguida de maior complexidade estrutural nas próximas 4–8 horas de desenvolvimento. Em outro estudo, utilizando placas de microtitulação mostrou que a formação de biofilme de *A. fumigatus* em células epiteliais ocorre nas fases inicial (12 h), intermediária (48 h) e maturação (72 h). Em co-culturas de células epiteliais foi demonstrado que os biofilmes de *A. fumigatus* consistiam de hifas paralelas e cruzadas com uma estrutura heterogênea de MEC, estabelecidas em células epiteliais brônquicas humanas e apresentavam as mesmas fases de desenvolvimento (MUSZKIETA et al., 2013).

2.4.1.1.2 Matriz extracelular (MEC)

A MEC presente nos biofilmes de *A. fumigatus*, é composta por galactomanano, 1,3-glucanos, monossacarídeos, melanina, proteínas, polióis e melanina. Estudos recentes também detectaram a presença de eDNA. Técnicas de imunomarcção em proteínas mostraram a presença de dois antígenos principais, o dipeptidilpeptidase V, e catalase B, e um alérgeno, AspF1 além de hidrofobinas (KAUR; SINGH, 2013; MANFIOLLI et al., 2018).

Evidências sugerem que a MEC exerce funções estruturais para aumentar a densidade celular, controlar a desagregação e alterar as necessidades nutricionais, agindo como uma barreira física e química de proteção contra drogas antifúngicas e sistema imunológico do hospedeiro (REICHHARDT et al., 2015).

Na aspergilose invasiva as hifas são integradas de forma individual na MEC, no caso dos aspergilomas as hifas são incorporadas numa densa matriz extracelular. Sabe-se que a MEC aumenta em quantidade com a maturidade do biofilme em desenvolvimento. Estudos utilizando microscopia eletrônica em amostras aspergiloma de diferentes pacientes mostrou que biofilmes formados em aspergiloma possuem MEC mais espessa, o que não ocorre em casos de API. No aspergiloma as hifas mostram células vacuolizadas após 48 horas de infecção. Análises imunocitoquímicas revelaram ainda que, no aspergiloma, há a presença dos mesmos polissacarídeos encontrados na MEC produzida *in vitro* em culturas estáticas e aéreas, isto é, α -1,3 glucano, galactomanano e galactosaminogalactano, diferentemente da MEC dos biofilmes em API na qual não há presença de α -1,3 glucanos (KAUR; SINGH, 2013; MUSZKIETA et al., 2013).

2.4.1.1.3 Mecanismo de resistência nos biofilmes

A formação de biofilme de fungos em dispositivos médicos contribui diretamente para o desenvolvimento e falha terapêutica em infecções nosocomiais. Portanto, a persistência de infecções fúngicas ocorre devido à capacidade de um fungo para formar biofilmes visto que, representam um importante mecanismo de resistência. A terapia submetida para um biofilme estabelecido no hospedeiro geralmente requer a administração de concentrações tóxicas de antimicrobianos, e o tratamento recomendado inclui a remoção do dispositivo contaminado. No entanto, este é muitas vezes um processo difícil e dispendioso. Portanto, os biofilmes fúngicos são um importante problema clínico e econômico (KAUR; SINGH, 2013; GONZÁLES-RAMÍRES et al., 2016).

Estudos realizados Mowat et al. (2008) demonstraram que a CIM de agentes antifúngicos necessária para eliminar estruturas de biofilme é maior do que a necessária para matar as formas planctônicas do fungo, tanto em superfícies de poliestireno quanto em células epiteliais. Essa resistência dos biofilmes tem sido relatada como sendo fase-dependente, ou seja, há diferenças na suscetibilidade a drogas antifúngicas, onde é observada três fases de crescimento do biofilme (8, 12 e 24h). Os biofilmes mais jovens (8h) são significativamente mais suscetíveis que os intermediários (12h) e biofilmes maduros (20h) (RAMAGE et al., 2011).

Em biofilmes maduros, um fator importante que gera resistência é a MEC, que dificulta o acesso às drogas antifúngicas ou age diretamente na captura do medicamento. Visto que o conteúdo dessa matriz aumenta à medida que os biofilmes amadurecem, promovendo resistência às drogas durante as fases posteriores do crescimento do biofilme (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014).

Dentre as drogas antifúngicas, a anfotericina B, que age ligando-se aos esteróis da membrana levando a formação de poros e consequente extravasamento do material citoplasmático e posterior morte celular, vêm se demonstrado a mais eficaz contra todas as fases do crescimento de *A. fumigatus*, seguida pelas drogas voriconazol, caspofungina e itraconazol (KAUR; SINGH, 2013).

A resistência desenvolvida durante a formação dos biofilmes é um processo complexo que especificamente, incluem alterações ou até mesmo superexpressão de moléculas alvo, extrusão ativa através de bombas de efluxo, difusão, tolerância e densidade celular limitadas, que são todos os mecanismos caracterizados utilizados pelos fungos para combater os efeitos do tratamento antifúngico (RAMAGE et al., 2011).

2.1.3 Tratamento da aspergilose e resistência antifúngica

Um tratamento eficaz depende de inúmeros fatores, não apenas da escolha de uma terapia antifúngica. Em indivíduos imunocomprometidos, o conhecimento detalhado dos fatores de risco do hospedeiro, assim como doenças de base e concomitante infecções, grau e duração da imunossupressão são essenciais para o sucesso terapêutico e aumento da sobrevivência do paciente (SUGUI et al., 2014). Uma vez que, o surgimento de isolados resistentes que influencia na taxa de mortalidade entre os pacientes. Um estudo epidemiológico multicêntrico realizado em 22 hospitais de 19 países mostrou que a porcentagem de cepas resistentes, em

alguns centros, pode exceder 25% do número total de cepas analisadas, mas em outros a frequência não ultrapassou 0,2% (VAN DE VEERDONK et al., 2017).

As principais classes de drogas antifúngicas utilizadas para o tratamento da aspergilose são os triazólicos, poliênicos (anfotericina B) e as equinocandinas (PAULUSSEN et al., 2016; VAN DE VEERDOONK et al., 2017).

Os triazólicos, como o voriconazol e o posaconazol são os pilares do tratamento da aspergilose e são indicados como primeira linha de tratamento e profilaxia. Uma vez que são bem tolerados pelos pacientes e podem ser administrados por via oral. Estes agentes antifúngicos são fungistáticos, e tem como alvo ativo a enzima 14- β - demetilase, bloqueando a biossíntese do ergosterol e desestabilizando a membrana celular de células em crescimento. Entretanto, na última década foi observado um aumento da resistência entre isolados de *A. fumigatus* aos azólicos. A resistência adquirida aos azólicos como alterações no locus *Cyp51a*, tem sido cada vez mais comum e está associada à falha terapêutica, levando a taxas de mortalidade que se aproximam de 90% na Europa. Os dados sobre os padrões de resistência aos triazólicos incluem pacientes com aspergilose não invasiva que foram tratados com terapia azólica de longa duração e desenvolveram resistência adquirida após 1 a 30 meses de tratamento. Há estudos que relatam que 43% de isolados resistentes aos azóis não possuíam a mutação no gene *Cyp51A*, indicando a atuação de outros mecanismos de resistência. Sabe-se que *A. fumigatus* codifica bombas de efluxo e transportadores que são usados para defesa contra compostos tóxicos, e estes transportadores e bombas poderiam fornecer proteção cruzada contra os azólicos. Comumente descritos esses processos são mediados por bombas multirresistentes (MDR), que são envolvidos na extrusão ativa de moléculas antimicrobianas, incluindo azólicos (RAJENDRAN et al., 2011; MOYE-ROWLEY, 2015; RAJENDRAN et al., 2015; VAN DE VEERDOONK et al., 2017; REICHERT-LIMA et al., 2018).

Apesar de sua toxicidade, a anfotericina B ainda é utilizada em algumas infecções fúngicas e, embora formulações lipídicas apresentem toxicidade reduzida em comparação a formulação original, seu alto custo impede seu uso mais amplo. Essa droga interage com o ergosterol da membrana celular fúngica e produz poros que culminam em perda de eletrólitos e consequentemente lise e morte celular. Casos de resistência de *Aspergillus* para esse medicamento ainda não são bem compreendidos. No entanto, apesar da dificuldade de associar resultados *in vitro* aos desfechos clínicos, altos valores de CIM têm sido associados a desfechos desfavoráveis. Por ser uma droga fungicida, sua resistência geralmente envolve seleção de espécies inerentemente menos suscetíveis durante terapia, a resistência adquirida em espécies

sensíveis é rara. Dois mecanismos parecem estar envolvidos na resistência à anfotericina B, a diminuição da concentração de ergosterol na membrana celular devido a mutações na via de síntese e aumento da produção de catalases, que age protegendo a célula do estresse oxidativo causado pela droga (GONÇALVES et al., 2016; FISHER et al., 2018; REICHERT-LIMA et al., 2018).

A resistência aos antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções principalmente invasivas tem desafiado os profissionais de saúde. Essas drogas, são limitadas por interações medicamentosas, efeitos adversos graves e toxicidade que não permitem dose prolongada ou escalonamento de dosagem (WIEDERHOLD, 2017).

O aumento da emergência de resistência registrado nas últimas décadas, reduz o já limitado repertório de agentes antifúngicos disponíveis contra aspergilose, necessitando, assim, desenvolver novos tratamentos alternativos, como a produção de novos compostos, com viés antifúngico, a partir de espécimes vegetais (DICHTL et al., 2014; MAVRIDOU et al., 2015). Uma fonte importante de novos compostos são os óleos fixos, compostos lipídicos extraídos de sementes vegetais, que são úteis principalmente para as indústrias alimentícia e farmacêutica (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005). Diversas plantas que já são conhecidas e utilizadas medicinalmente em diferentes países do mundo, hoje são, uma fonte de poderosos compostos (SATISH, 2008).

2.3 COMPOSTOS VEGETAIS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA

A fitoterapia é uma antiga prática do ser humano que usa plantas para restabelecer a saúde por meio da extração de metabólitos de produtos naturais ou derivados. Mesmo quase esquecida há algumas décadas, tem se tornado cada vez mais intensa no mundo civilizado nos últimos anos. Isso graças ao avanço da medicina moderna que tem proporcionado uma verdadeira busca por novas drogas. O Brasil, como o país de maior biodiversidade do planeta possui um grande potencial para pesquisa utilizando espécies de plantas (PORTS et al., 2013; ALVES et al., 2014).

De acordo com a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, planta medicinal é toda planta ou partes da mesma, que contenham substâncias ou classes de substâncias responsáveis por sua ação terapêutica. Ainda segundo o órgão, há uma confusão entre a população em geral, que confunde fitoterapia com uso de plantas medicinais (ANVISA, 2010). O medicamento fitoterápico é aquele obtido exclusivamente de matérias-primas de origem

vegetal, com qualidade constante e reprodutível, com os riscos e eficácia conhecida através de estudos etnofarmacológicos, documentações técnicas científicas e/ou ensaios clínicos (SANTOS et al., 2011).

Em contraste, o uso de plantas medicinais é geralmente empírico, e simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos. Sua utilização no tratamento e na cura de enfermidades é tão antiga quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). Em outras partes do mundo, em países europeus como a Alemanha, consome-se metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa, cerca de US\$ 3,5 bilhões do total de US\$ 7 bilhões, em valores de 1997, onde plantas medicinais são utilizadas pela população para tratar resfriados, gripe, doenças do trato digestivo ou intestinal, dores de cabeça, insônia, úlcera estomacal, nervosismo, bronquite, doenças de pele, fadiga e exaustão (VEIGA JR; PINTO, 2005). Os fitoterápicos representam uma parcela significativa no mercado de medicamentos e, globalmente, o setor movimenta bilhões por ano. Contudo, no Brasil não há dados oficiais atualizados, embora, estima-se que esse mercado movimente cerca de US\$ 160 milhões por ano (CARNEIRO et al., 2014).

Assim como os fitoterápicos, os óleos fixos vegetais também são produtos notáveis da indústria química e farmacêutica. A produção mundial de ácidos graxos obtidos da hidrólise de gorduras e óleos vegetais totaliza milhões de toneladas por ano. Estima-se que a produção mundial de ácidos graxos a partir da hidrólise de gorduras e óleos vegetais totaliza cerca de 4 milhões de toneladas por ano e forma a maior proporção de matéria-prima para a indústria química (COUTINHO, 2013).

Os óleos vegetais são produtos do metabolismo vegetal, encontrados principalmente em sementes e, constituem a principal fonte de energia no processo relacionado a germinação. Estes óleos, diferentemente dos óleos essenciais, são ricos em ácidos graxos mono- e poli-insaturados, com ligações duplas carbono-carbono disponíveis para modificações químicas e estruturais por meio de processos oxidativos (ALMEIDA et al., 2012).

Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, são biologicamente ativos, isto é, têm ação fungicida, inseticida, citotóxica, antiviral, tranquilizante, analgésica, dentre outras. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial ou

fixo de plantas medicinais pode constituir-se em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas e até patógenos humanos (ROZWALKA et al., 2008).

Dentre os espécimes vegetais, *Libidibia ferrea* (Mar. ex Tul.) L. P. Queiroz, *Christiana africana* DC e *Sterculia Foetida* Linn tem atraído atenção de pesquisadores em todo o mundo por suas propriedades medicinais e rica composição em compostos biologicamente ativos. *L. ferrea* pertence à família Leguminosae-Caesalpininoideae sendo amplamente utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de asma e tosse, além disso, possui propriedades antiulcerogênicas, analgésicas e anti-inflamatórias cientificamente comprovadas (MARREIRO et al., 2015). *C. africana* e *S. foetida* são representantes da família Malvaceae e óleos obtidos a partir de suas sementes são ricos em ácidos graxos insaturados, e possuem diversas atividades biológicas como atividade inseticida, antifúngica, antitumoral, antibiótica e antiviral (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; BRAGA et al., 2015; OLIVEIRA; LEHN, 2015).

2.3.1 *Libidibia ferrea* (Mar. ex Tul.) L. P. Queiroz

Libidibia ferrea é uma árvore pertencente à família Leguminosae-Caesalpininoideae amplamente distribuída na região nordeste do Brasil, sendo popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá. Sua altura pode chegar a oito metros, de copa arredondada e ampla, seu tronco mostra-se geralmente tortuoso de superfície lisa casca lisa e acinzentada, descamante, revelando a entrecasca verde (Figura 2) (PEDROSA et al., 2016; LIMA, 2012). É geralmente encontrada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Possui madeira muito resistente, sendo comumente utilizada na construção civil, para carpintaria, silvicultura urbana, paisagismo e recuperação de áreas degradadas (MATOS et al., 2015).

Na medicina popular é utilizada no tratamento de problemas bronco-pulmonares, distúrbios gastrointestinais, diabetes, doenças renais e distúrbios inflamatórios. Estudos indicam que *L. ferrea* possui propriedades antiulcerogênicas, anti-inflamatória, efeito quimiopreventivo do câncer, antioxidantes e atividades hepatoprotetoras e sendo assim *L. ferrea* vem sendo amplamente utilizada para fins terapêuticos (PEDROSA et al., 2016; GUERRA, 2017). Além disso, um estudo etnoveterinário realizado por Monteiro et al., 2011 observou que na Amazônia, os frutos de *L. ferrea* em infusão no álcool, são utilizados para tratar feridas cutâneas, e a infusão na água ou xarope são usados tratamento da tosse de animais de estimação. Em análise fitoquímica, foi demonstrado que os frutos e vagens de *L. ferrea*

apresentam cumarinas, flavonóides, saponinas, esteróides e taninos (PEDROSA *et al.*, 2016). Outras partes também foram caracterizadas contendo terpenos assim como outras substancias polissacarídeas que são responsáveis por suas propriedades biológicas (FERREIRA; SOARES, 2015). Ports *et al.* (2013) constataram uma grande quantidade compostos fenólicos nas folhas de *L. ferrea* e seus constituintes químicos (ácido gálico e quercitinas).

Figura 2 – Exemplar de *L. ferrea* evidenciando a descamação do tronco.



Fonte: O autor (2019).

L. ferrea tem se mostrado uma espécie rica em compostos biologicamente ativos e devido ao seu reconhecido potencial etnomedicinal, o Ministério da Saúde incluiu-a na lista de espécies de plantas medicinais de importância relevante para o Sistema de Saúde Brasileira (GUERRA, 2017).

2.3.2 *Christiana africana* DC

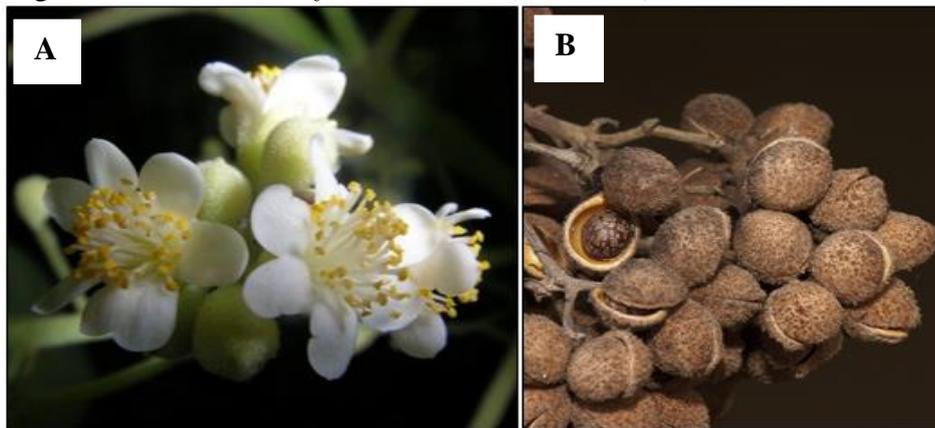
Christiana africana DC, popularmente conhecida como “Gargaúba” é amplamente distribuída na África, Madagascar, Tanzânia, Angola e América do Sul. No Brasil, é comumente encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do país, nos domínios da Amazônia e Floresta Atlântica. Em Pernambuco, é encontrada apenas na Zona da Mata. A espécie era

classificada como pertencente à família Tiliaceae, que foi posteriormente incluída na família Malvaceae (MICHALET et al., 2008; BARBOSA, 2016).

É utilizada na medicina popular para o tratamento de hipertensão (MICHALET et al., 2008). Três compostos cardiotônicos foram isolados de sua madeira e casca. Além disso, em alguns países da América Central infusões de suas cascas são utilizadas para tratar doenças gastrointestinais e gonorreia (LOUPPE et al., 2008).

C. africana é uma árvore de pequeno e médio porte que pode atingir até 14 metros de altura. Na inflorescência, é típica a presença de um olho parecido com umbel axilar ou terminal, com muitas flores e um pedúnculo com brácteas filiformes como demonstrado na Figura 3A. Seus frutos são pequenos e elipsoides de superfície peluda e de coloração castanho-claro a castanho-escuro (LOUPPE et al., 2008) (Figura 3B).

Figura 3 — *Cristiana Africana DC.* A) flores B) frutos.



Fonte: Banco de Dados de Plantas Tropicais, Ken Fern. tropical.theferns.info (2019).

2.3.3 *Sterculia Foetida Linn.*

Sterculia foetida é uma planta tropical pertencente ao gênero Sterculiaceae. Originalmente é uma planta nativa da África Oriental, Índia, Malásia e Austrália, adaptada a ambientes tropicais e subtropicais, que foi introduzida no Brasil para fins ornamentais. Conhecida popularmente como “Chichá” tem porte arbóreo, sendo utilizada principalmente na arborização de praças e parques em várias regiões do país (BARBOSA; 2016)

Sterculia foetida é uma árvore de grande porte, reta, de folha caduca que cresce até 40 metros de altura e, com os ramos dispostos em verticilos horizontalmente (Figura 4) e tem uma vida média de mais de 100 anos (ONG et al., 2013). Essa espécie apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, atividade broncodilatadora, antibacteriana, hemolítica e antifúngica.

Presença de vários constituintes como esteroides, fenóis, saponinas, proteínas e aminoácidos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos e taninos cardiotônicos foram identificados por fitoquímica (SACRAMENTO et al., 2016). Essa espécie tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido às suas propriedades medicinais. As oleaginosas “Chichá” são comestíveis, sendo frequentemente usadas para cozinhar. O teor de óleo das sementes é rico em ácidos graxos e está associado à várias propriedades biológicas, incluindo antifúngicas, antibióticas, antivirais, atividade antitumoral (BRAGA et al., 2015).

Figura 4 — Exemplar de *Sterculia foetida* Linn.



Fonte: Banco de Dados de Plantas Tropicais, Ken Fern. tropical.theferns.info (2019).

As partes desta planta como sementes (Figura 5), folhas, casca possuem valor medicinal considerável. Suas folhas são utilizadas em infusões como fitoterápicos como diurético, rapiante e como repelente de insetos. Em Gana, África do Sul, o óleo das sementes de *S. foetida* é extraído em pequena escala, para ser utilizado para o tratamento de coceiras e outras doenças de pele em forma de pasta (KALE et al., 2011).

Com base em alguns estudos é possível perceber que muitas formas de terapia com *S. foetida* foram desenvolvidos. Estas plantas medicinais são de importância imprescindível em regiões onde os serviços de saúde médicos de saúde modernos não estão disponíveis ou não são facilmente acessíveis (VENKATESWARA RAO et al., 2015).

Figura 5 — Sementes de *Sterculia Foetida* Linn



Fonte: Banco de Dados de Plantas Tropicais, Ken Fern. tropical.theferns.info (2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material botânico (folhas) de *Libidibia ferrea* foram coletadas nos arredores da *Destilaria Miriri Alimentos e Bioenergia S/A* (S 6°57'48.1" WO 35°08'28.1"), no município de Santa Rita- PB, Brasil. A exsicata de nº 84. 282 encontra-se arquivada no *Herbário Geraldo Mariz* (UFP), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

Os óleos fixos extraídos de sementes de *Christiana africana* DC e *Sterculia foetida* Linn, foram cedidos pelo Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. As sementes foram coletadas no campus da UFPE. As exsicatas das duas espécies de Malvaceae de nº 73.912 e 75.204 correspondentes a *C. africana* e *S. foetida* respectivamente, também se encontram no Herbário UFP.

3.1.2 Obtenção dos compostos vegetais

3.1.2 Obtenção do extrato aquoso e frações de *L. ferrea*

Para a obtenção do extrato aquoso, as folhas de *L. ferrea* foram submetidas à extração a frio sucessivamente com etanol/água 70% (p/v). A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida, e o extrato etanólico obtido, foi liofilizado fornecendo 48 g de extrato bruto. Em

seguida para a obtenção das frações, 10 g do extrato bruto liofilizado foi submetido a separação líquido/líquido em solventes de polaridade crescente (hexano e acetato de etila) para a obtenção das frações de acordo com os métodos descritos por Santin et al. (2014).

Por fim, os principais grupos de metabólitos presentes no extrato e óleos fixos foram identificados através de métodos cromatográficos e espectrometria de massas (Wagner e Bladt, 1996).

3.1.2.2 Extração dos óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida*

A extração dos óleos fixos das sementes de *C. africana* e *S. foetida* foi realizada em Extratora Automática (Modelo ASE 350 Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), utilizando n-hexano à temperatura constante de 40° C, pressão de 1500 psi e fluxo de volume de 60%. As extrações foram realizadas em células de extração de 100 mL com tempo estático de extração de 3 min, seguida de lavagem em solvente e purga com nitrogênio gasoso. Por fim, o solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida (ALVES, 2009).

3.1.3 Identificação dos componentes presentes nos compostos vegetais

3.1.3.1 Análise do extrato por UPLC-MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas)

Para a identificação dos constituintes presentes no extrato aquoso de *L. ferrea* foi realizada uma cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas, a mesma foi realizada com um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7 µm. As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de MeOH, 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B), que foram bombeadas a uma vazão de 0,3 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (98% A/ 2% B) foi mantida por 0,25 min. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 min, mantendo-se em 99% de B por um min, seguida da imediata diminuição para 2% de B, onde foi mantida até 11 min. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40°

C e o auto injetor a 10° C. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa *single quadrupolo* SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 3,5 Kv, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450 ° C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx™ (Waters).

3.1.3.2 Análise dos óleos fixos por cromatografia gasosa

Antes de realizar a cromatografia, foi realizada uma hidrólise e transesterificação dos óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida* conforme o método ISO 5509 (1978) com modificações. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMGAs) foram quantificados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID) modelo GC-2010 Plus e auto injetor AOC-20i (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada uma coluna capilar ZB-5HT (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (Phenomenex, Allcrom) nas seguintes condições: temperatura inicial da coluna 135° C (1 min); taxa de aquecimento de 3° C/min até 215° C; 215° C (20 min); as temperaturas do injetor e detector foram 230° C e 240° C, respectivamente. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste (0,59 mL/min). O volume de injeção foi de 2 µL e a razão split 1:100. Os EMAGs foram identificados em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 7820A, Waldbroon, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas (Agilent Technologies 5975C, Waldbroon, Alemanha) utilizando coluna capilar HP5MS (5% fenil-metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemanha). Os espectros de massa obtidos foram comparados com o banco de dados Wiley 229 (Wiley, New York) e a NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 08). Os EMAGs foram identificados pela comparação com tempos de retenção de padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco FAME mix C4-C24, Bellefonte, PA, USA). A quantidade relativa dos EMAGs foi determinada pela área integrada de cada pico e expressa em porcentagem da área total de todos os picos (BARBOSA, 2016).

3.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Foram obtidas da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), seis isolados de *Aspergillus fumigatus* (URM 5643, URM 5698, URM

5992, URM 6562, URM 6573, URM 6577), caracterizadas como produtores de biofilme em ensaio *in vitro*. Para controle de qualidade a cepa ATCC® (*American Type Culture Collection*) 204305 foi inserida no teste. Por fim, as culturas de *A. fumigatus* foram mantidas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) à temperatura de 28°C ±2 °C.

3.3. SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

3.3.1. Padronização do inóculo

Culturas de *A. fumigatus* foram semeadas em tubos de ensaio contendo BDA e incubados por 14 dias a 35 ° C. Após esse período, os conídios foram coletados pela adição de 5 mL de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, contendo Tween 20 na concentração de 0,025% (v/v). E o inóculo ajustado para 0.09 a 0.13 de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Modelo Genesys 10S, Thermo Scientific) a 530nm.

3.3.2. Suscetibilidade antifúngica *in vitro*

O método utilizado foi baseado nas condições descritas no documento M38-A2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Como antifúngico padrão, foi utilizado o intraconazol em concentrações de 0,03 a 16 µg/mL preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e, concentrações variando de 2 a 1024 µg/mL do extrato de *L. ferrea* e suas frações assim como para os óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida*. Para o teste foram preparadas suspensões padronizadas dos conídios diluídas (1:50) em meio RPMI 1640, obtendo-se uma concentração final de 0,4x10⁴ a 5x10⁴ UFC/mL. Em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Suíça) foram dispostos 100 µL de cada uma das diluições da droga padrão e extratos testados nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 µL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 µL do inóculo previamente padronizado, como descrito anteriormente, foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas.

A CIM foi definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 100% o crescimento para os compostos vegetais.

3.4 FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES

As culturas de *A. fumigatus* foram cultivadas em BDA a 37°C por cinco dias. Os conídios foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5ml de PBS, pH 7,2 contendo Tween 20 na concentração de 0,025% (v/v), e ajustado o inóculo para 1×10^5 células em meio RPMI 1640 (Sigma) tamponado com HEPES (Gibco®) em espectrofotômetro a 570 nm (MOWAT et al., 2007).

Os biofilmes foram produzidos em placas de microtitulação de fundo chato (96 poços), pela adição de 200 µl da suspensão celular padronizada em cada orifício por cada período de tempo determinado (24 e 48 horas), incubado a 35°C. Em cada intervalo de tempo, o meio de cultura foi removido dos orifícios e as células lavadas três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (MOWAT et al., 2007).

O itraconazol e os compostos vegetais (extrato bruto e os óleos fixos) foram preparados e diluídos como descrito anteriormente e distribuídos nos orifícios contendo biofilme, crescido em 48 horas, e incubados a 35°C. Orifícios contendo biofilme sem tratamento e orifícios apenas com meio RPMI foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

As CIMs foram determinadas como 50 a 90% de redução do metabolismo comparado com o controle não tratado utilizando o ensaio de redução de MTT.

3.4.1 Método de coloração MTT

Os isolados foram semeados em Ágar Batata Dextrose (BDA) por cinco dias a 35° C, e suas suspensões em meio RPMI Medium 1640 tamponado com HEPES (Gibco®) foram ajustadas para concentração de 10^5 células/mL. Posteriormente, 100 µL foram adicionadas em poços das placas de poliestireno contendo 96 poços, sendo mantidas a 35° C por 48 horas.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de 1- (4,5-Dimethylthiazol-2- yl) -3,5- diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical, St. Louis, MO), no qual 20 µL, na proporção de 5 µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22 µm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação. As placas foram incubadas na ausência de luz à temperatura de 35° C, por 18 horas. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200 µL de isopropanol (FREMOSIER et al., 1999; BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2006). As placas foram mantidas em repouso por 15 min e em seguida foram transferidos 100 µL do conteúdo de cada poço para

nova placa de microtitulação, afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 570 nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram representados pelas médias e desvio padrão de três replicatas. Para apresentação gráfica e a avaliação estatística dos dados experimentais, dependendo da finalidade do experimento e natureza dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e/ou teste de Tukey, para múltiplas comparações. Foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, USA). Valores de P (p-values) menores que 0,05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS COMPOSTOS VEGETAIS

Na análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. ferrea* por UPLC-MS foi detectada a presença de polifenóis totais, incluindo os ácidos gálico e elágico, e flavonóides, como a quercetina e luteolina (Figura 6). A presença dos ácidos gálico e elágico no extrato aquoso das folhas de *L. ferrea* também foi constatada por Ueda et al. (2002) nos frutos. Port et al. (2013) também demonstraram a presença de compostos fenólicos em suas folhas e Costa et al. (2015) com extratos hidroalcoólicos do caule, casca e folhas mostraram também a presença de flavonóides, e outros compostos como saponinas, taninos, cumarinas e esteróis.

Diversos estudos descreveram as propriedades antimicrobianas de *L. ferrea*. A maioria destes realizados com o extrato bruto, sendo detectado alto conteúdo de polifenóis com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antiulcerogênicas e quiopreventivas.

Ueda et al. (2002) já haviam descrito a presença de ácido gálico e elágico nos frutos de *L. ferrea*. Outros estudos fitoquímicos dos extratos hidroalcoólicos do caule, casca e folhas mostraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas e esteróis (COSTA et al., 2015).

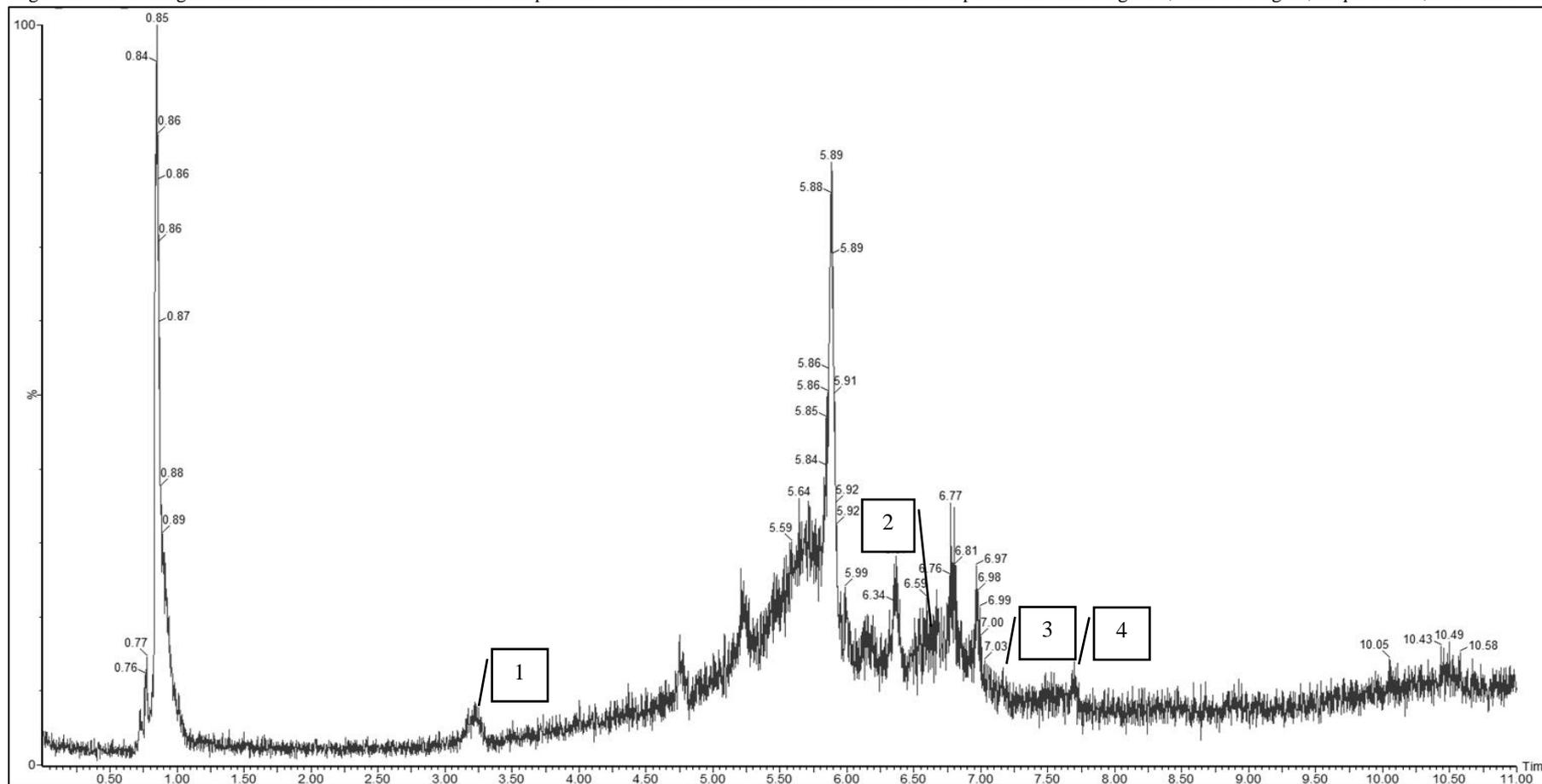
Em nosso estudo foi observado a presença de polifenóis, incluindo polifenóis totais, ácido gálico e ácido elágico, e flavonóides, como a quercetina e luteolina. Confirmando estudos

anteriores nos quais esses componentes foram identificados em extratos obtidos em diferentes partes de *L. ferrea*.

Na identificação dos constituintes químicos dos óleos fixos extraídos de sementes de *C. africana* e *S. foetida* por cromatografia gasosa, foi demonstrado a presença de ácidos graxos em diferentes concentrações para cada espécie. Nos cromatogramas de *C. africana* (Figura 7) e *S. foetida* (Figura 8) foram detectados ácidos palmítico, linoleico, oleico, esteárico, malválico, linolênico e estercúlico.

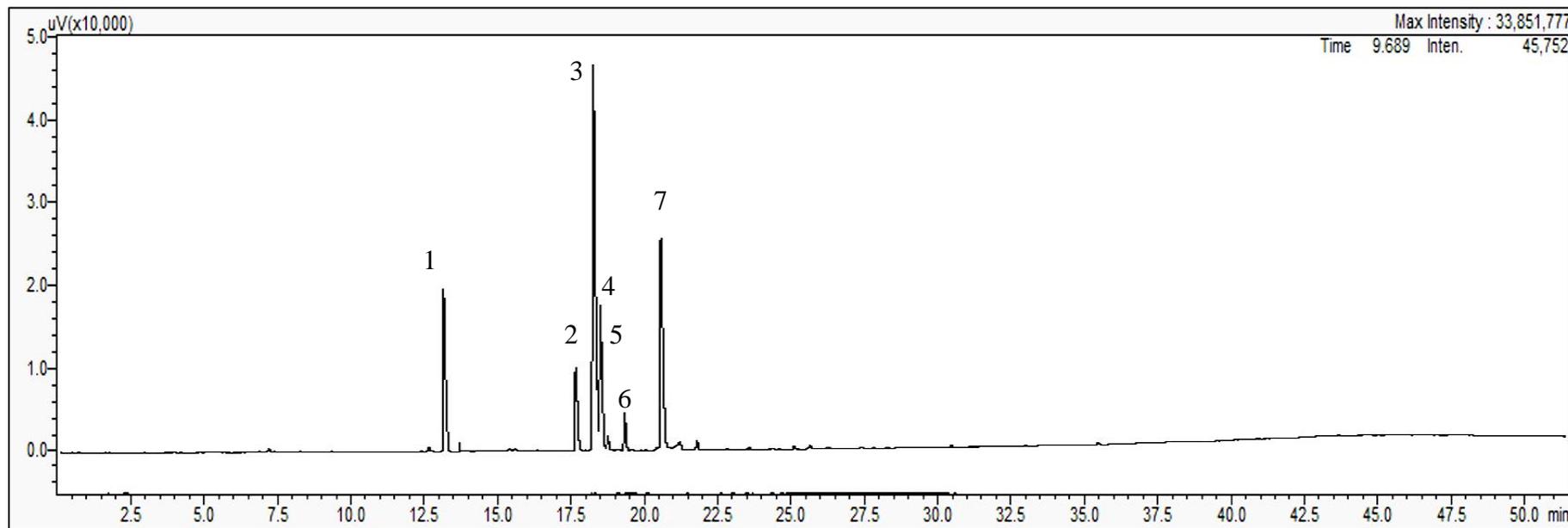
Estudos detectaram que óleos fixos extraídos de sementes de *S. foetida* contém 71,8% de ácido estercúlico e proporções menores de ácidos oleico, linoleico e ácidos graxos saturados. Estes consistem principalmente de ácido mirístico, palmítico e esteárico (KALE et al., 2011). Em nosso estudo apenas o ácido mirístico não foi encontrado.

Figura 6 — Cromatograma do extrato bruto de *Libidibia Ferrea* por LCM-SM enumerados com o constituinte correspondente: 1. ácido gálico, 2. ácido elágico, 3. quercetina, e 4. Luteolina.



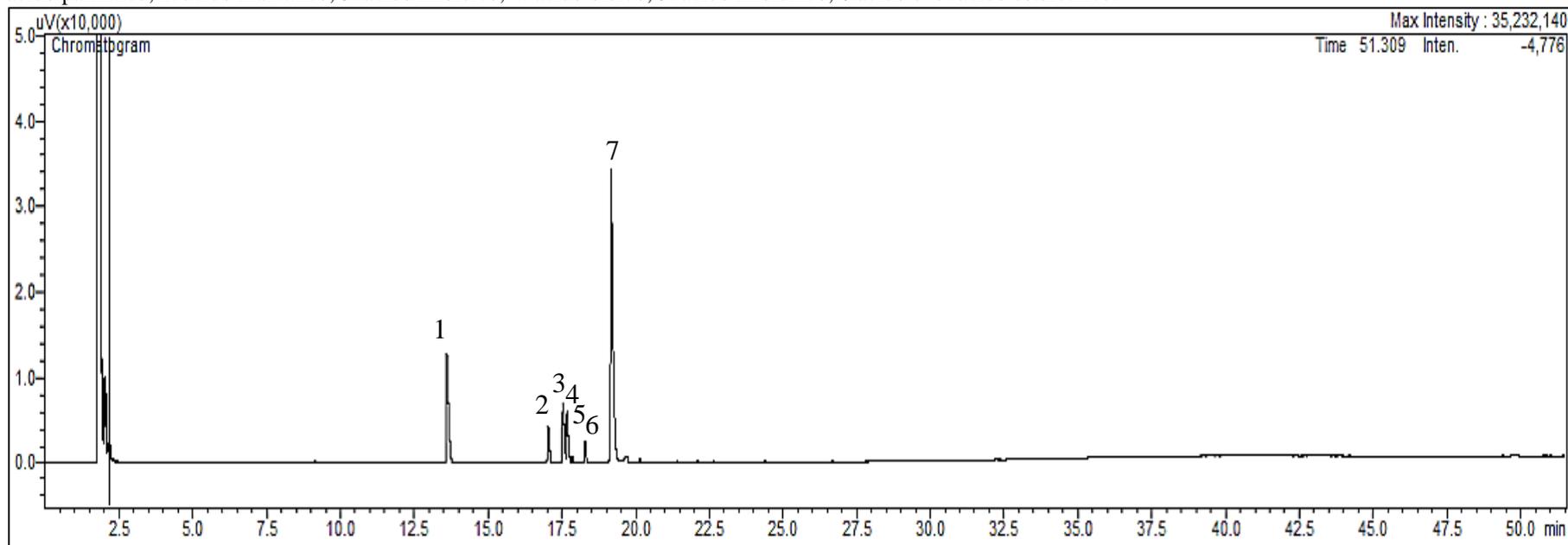
Fonte: O autor (2019).

Figura 7— Cromatograma com os compostos no óleo fixo de *Christiana africana* DC por GC-FID. Os picos enumerados de acordo com a constituinte correspondente: 1. ácido palmítico, 2. ácido malvático, 3. ácido linoleico, 4. ácido oleico, 5. ácido linolênico, 6. Ácido esteárico e 7. ácido estercúlico, 6. ácido esteárico e 7. ácido estercúlico.



Fonte: O autor (2019).

Figura 8— Cromatograma com os compostos no óleo fixo de *Sterculia foetida* Linn por GC-FID. Os picos enumerados de acordo com o constituinte correspondente: 1. ácido palmítico, 2. ácido malválico, 3. ácido linoleico, 4. ácido oleico, 5. ácido linolênico, 6. ácido e 7. ácido estercúlico.



Fonte: O autor (2019).

Estudos demonstraram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados em *S. foetida* (ONG et al., 2013; RAJASEKHARREDDY; RANI, 2014). Nossos resultados corroboram os obtidos por outros autores como Bindhu et al. (2011) que relataram que o óleo de *S. foetida* contém ácidos graxos ciclopropênico (54%), estercúlico (44,3%) e ácido malvático (10,2%), assim como o ácido oleico (1,0%) e linoleico (11%).

Os ácidos ciclopropênicos, como o malvático e estercúlico detectados no óleo de *S. foetida* e *C. africana* são compostos sintetizados por espécies de plantas da família Malvaceae (BINDHU et al., 2011). Entretanto, *S. foetida* apresentou uma concentração maior de ácido estercúlico que *C. africana*, o contrário aconteceu com ácido malvático (Tabela 1).

Estes ácidos agem inibindo a acil-dessaturase de ácidos graxos em vários organismos e possivelmente, age pelo mesmo processo em fungos (SCHMLD; PATTERSON, 1988). Quando incorporados em culturas contendo o fungo fitopatogênico, *Ustilago maydis*, causaram alterações morfológicas logo após a germinação do esporo. Além disso, esporos tratados com estes ácidos mostraram irregularidades da parede celular, além de inibir a extensão hifal de *Rhizoctonia solani* e dessaturação de ácidos graxos de *Fusarium oxysporum* prejudicando o desenvolvimento fúngico (LIM, 2012). Outro componente encontrado, o ácido linoleico, se caracteriza como um ácido graxo poliinsaturado, e é reconhecido por sua atividade antifúngica também contra fungos fitopatogênicos (POHL et al., 2011).

Óleos extraídos de sementes de *S. foetida* e *C. africana* possuem ácidos graxos ciclopropênicos, em sua composição que apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas (RAJASEKHARREDDY; RANI, 2014). A atividade antifúngica dos ácidos cicloprênicos já foi demonstrada contra espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Mucor rouxianus*, mas alguns são essencialmente inativos contra fungos não filamentosos tais como *Candida albicans* (SALAUN, 1999). Outro ácido graxo, como o linoleico também apresenta atividade antifúngica relatada (KABARA et al., 1972).

Tabela 1— Análise dos constituintes químicos encontrados no cromatogramas de *Christiana africana* DC e *Sterculia foetida* Linn por GC-FID.

Composto	Fórmula química	Tempo de retenção (min)		Área		Altura do pico		Concentração (%)	
		<i>C. africana</i>	<i>S. foetida</i>	<i>C. africana</i>	<i>S. foetida</i>	<i>C. africana</i>	<i>S. foetida</i>	<i>C. africana</i>	<i>S. foetida</i>
1. Ácido palmítico	C 16:0	13.594	13.601	47051.5	60574.1	10506.6	12744.0	1.512.462	1.849.569
2. Ácido malválico	C 18:1	17.002	17.029	23586.0	18021.8	5315.1	4331.5	758.168	550.275
3. Ácido linoleico	C 18:2	17.445	15.528	128750.2	29655.7	28601.1	6987.9	4.138.654	905.501
4. Ácido oleico	C 18:1	17.633	17.667	34745.5	24851.2	8363.4	6031.8	4.138.654	7.588
5. Ácido linolênico	C 18:2	17.829	17.846	2420.8	2116.2	843.6	692.9	0.77816	0.64616
6. Ácido esteárico	C 18:0	18.263	18.280	7669.5	8715.0	2360.2	2437.6	246.435	266.103
7. Ácido estercúlico	C 19:1	19.191	19.166	66868.5	183571.4	13632.7	34111.5	2.149.477	5.605.136

Fonte: O autor (2019).

4.2 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de seis isolados de *A. fumigatus* estocados na Micoteca URM/UFPE e a ATCC (*American Type Culture Collection*), frente ao antifúngico comercial (Itraconazol), e compostos vegetais (óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida*, extrato bruto e frações hexânica e acetato de etila de *L. ferrea*) segundo a metodologia de microdiluição em caldo, conforme estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade antifúngica de culturas de *Aspergillus fumigatus* frente a Itraconazol e óleos fixos de *Christiana africana* DC, *Sterculia foetida* Linn e extrato bruto e frações de *Libidibia ferrea*.

Culturas	Itraconazol (0,03 – 16 µg/mL)	<i>C. africana</i> (2 –1024 µg/mL)	<i>S. foetida</i> (2 – 1024 µg/mL)	<i>L. ferrea</i> e frações (2–2048 µg/mL)
URM 5643	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
URM 5698	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
URM 5992	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
URM 6562	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
URM 6573	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
URM 6577	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A
ATCC® 205304	0,03 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL	S/A

S/A= sem atividade.

O valor de CIM para o itraconazol foi de 0,03 µg/mL para todos os isolados, sendo, portanto, todos sensíveis a este fármaco. Para os óleos fixos de *C. africana* a CIM foi de 512 µg/mL e *S. foetida* a variação de CMI foi de 512 a 1024 µg/mL. O extrato bruto de *L. ferrea* assim como para suas frações não foi detectado inibição de crescimento fúngico nas concentrações testadas (2 a 2048 µg/mL).

Apesar de não apresentar atividade frente aos isolados de *A. fumigatus*, ensaios farmacológicos pré-existentes com os extratos obtidos de sementes de *L. ferrea* demonstraram

atividade inibitória contra alguns microrganismos, como *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*, assim como potencial anti-inflamatório e atividade cicatrizante. Sua atividade antifúngica também já foi descrita anteriormente contra *A. niger*, *Colletotrichium lindemuthianum*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium pallidoroseum*, *Mucor* sp., *Neurospora* sp., *Penicillium herguei*, *Phomopsis* sp., *Phytiumoli gandrums*, *Thanatephorus cucumeris* e *Trichoderma viride* (CAVALHEIRO et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2015).

O itraconazol, antifúngico da classe dos azólicos, agiu na menor concentração testada em todos os isolados. Apesar disso, a resistência a essa classe de droga vem sendo relatada em vários países. As taxas de resistência aos azólicos variam amplamente entre os centros médicos em todo o mundo. Estudos epidemiológicos de vigilância global revelam que 3,2% dos isolados de *A. fumigatus* são resistentes a um ou mais antifúngicos azólicos. No entanto, tem se observado uma variação nessa taxa de resistência, onde em alguns estudos observam-se altas taxas de resistência deste patógeno enquanto outros autores relatam taxas inferiores a 1% (PERLIN et al., 2017; DERNADI et al., 2018). A maioria dos relatos de resistência em isolados de *A. fumigatus* tem origem nos países europeus, podendo ser atribuída ao uso generalizado de fungicidas agrícolas à base de azólicos. E, apesar de *A. fumigatus* não ser um fungo fitopatógeno, sua ampla distribuição geográfica o expõe a estes fungicidas, que tem por finalidade agir contra fungos como *Fusarium*, *Mycosphaerella* e *A. flavus*, mas que também apresentam atividade contra *A. fumigatus* no seu habitat e, por conseguinte a exposição é inevitável (MEIS et al., 2016; CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; PERLIN et al., 2017).

A resistência a azólicos em isolados clínicos de *A. fumigatus* foram relatados em quase todos os países do mundo. No Brasil, um estudo realizado durante 2000–2012 relatou uma taxa de resistência aos azólicos de cerca de 3,5% em cepas de *A. fumigatus* (GONÇALVES, 2017). Contrariando estes resultados, em nosso estudo, não foi observado resistência das cepas testadas frente ao itraconazol, e, o mesmo inibiu o crescimento fúngico na menor concentração testada (0,03µg/mL). Negri et al. (2017) avaliaram a resistência aos azólicos em 221 isolados de *A. fumigatus* obtidos de amostras clínicas de pacientes internados em centros médicos de quatro cidades brasileiras entre 1998 e 2017. Em seus resultados também não foi detectado resistência dos isolados contra os azólicos.

Outro estudo brasileiro realizado por Denardi et al. (2018) avaliou o perfil de suscetibilidade de 105 cepas clínicas e ambientais de *A. fumigatus* frente a anfotericina B,

azólicos e equinocandinas. No estudo 52% dos isolados clínicos e 50% dos ambientais foram sensíveis ao itraconazol.

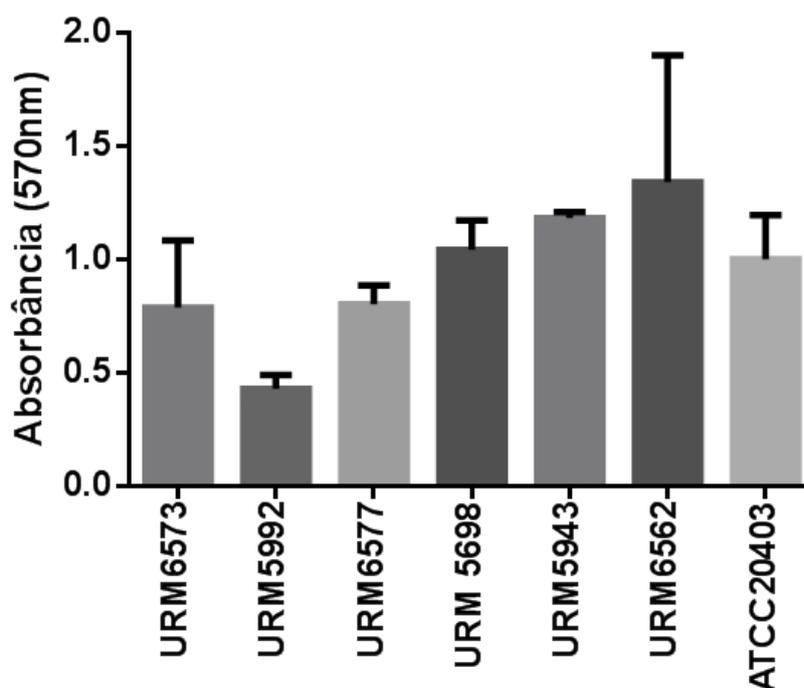
Segundo Meis et al. (2016) a resistência a esta classe de antifúngico é frequentemente associada ao resultado de mutações no gene *cyp51A*. Entretanto, outras mutações pontuais específicas, como a substituição de aminoácidos G54, M220, I266, S297 e L98H em combinação com uma repetição em tandem na região promotor também podem ser possíveis causas de resistência aos triazólicos (ZHANG et al., 2017). Gonçalves et al. (2017) alertaram para o fato de que apesar de alguns estudos relatarem casos de resistência aos azólicos frente a *Aspergillus* em seis continentes, pouco se sabe sobre sua real frequência globalmente, principalmente porque a maioria dos centros médicos não realiza testes de sensibilidade rotineiramente.

4.3 FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES

Todos os isolados, clínicos (URM 6562, URM 6573, URM 6577) e ambientais (URM 5943, URM 5992, URM 5698), assim como o isolado ATCC® 203405 de *A. fumigatus* mostraram-se capazes de formar biofilme *in vitro* como demonstrado no Gráfico 1.

Há alguns anos, a maioria dos estudos realizados visavam entender a fisiologia e virulência de *Aspergillus* por meio de seu crescimento em meio líquido, e sob agitação. Entretanto, em todas as infecções por *Aspergillus*, bem como sobre um substrato sólido, *A. fumigatus* cresce como uma colônia formada por hifas multicelulares dispostas em multicamadas, embebidas em uma matriz extracelular, característica típica dos biofilmes (BEAUVIS; LATGÉ, 2015). Logo, diversos estudos desde então se dedicaram a avaliar a formação de biofilmes por *A. fumigatus*. Mowat et al. (2007) avaliaram as diferentes fases de crescimento de seus biofilmes e, Loussart et al. (2010) a composição dos biofilmes. Em nossos resultados, houve diferença significativa entre os biofilmes formados *in vitro* pelos isolados testados ($p \leq 0,5$), reafirmando a notável capacidade de formação *in vitro* destes agregados por *A. fumigatus*.

Gráfico 1– Biofilmes formados por *A. fumigatus* em 48 horas de incubação. ($p \leq 0,5$).



Fonte: O autor (2019).

A. fumigatus causa infecções graves em humanos e sua virulência correlaciona-se com o crescimento e ramificações de suas hifas. A formação de biofilmes por esse patógeno fúngico é uma resposta adaptativa ao hospedeiro humano e/ou ambiente externo, que contribui diretamente com o insucesso terapêutico e aumento do número de casos de resistência (HOKKEN et al., 2019).

A resistência antifúngica em casos em que há formação de biofilmes *in vitro* ou *in vivo* é cada vez mais comum, e muitas vezes requer a remoção do substrato infectado. Os mecanismos de resistência antifúngica em fungos são complexos. Estes incluem mutações no gene Cyp51A, bombas de efluxo, calcineurina ativada pela via de sinalização Hsp90 e, presença de eDNA (RAJENDRAN et al., 2015).

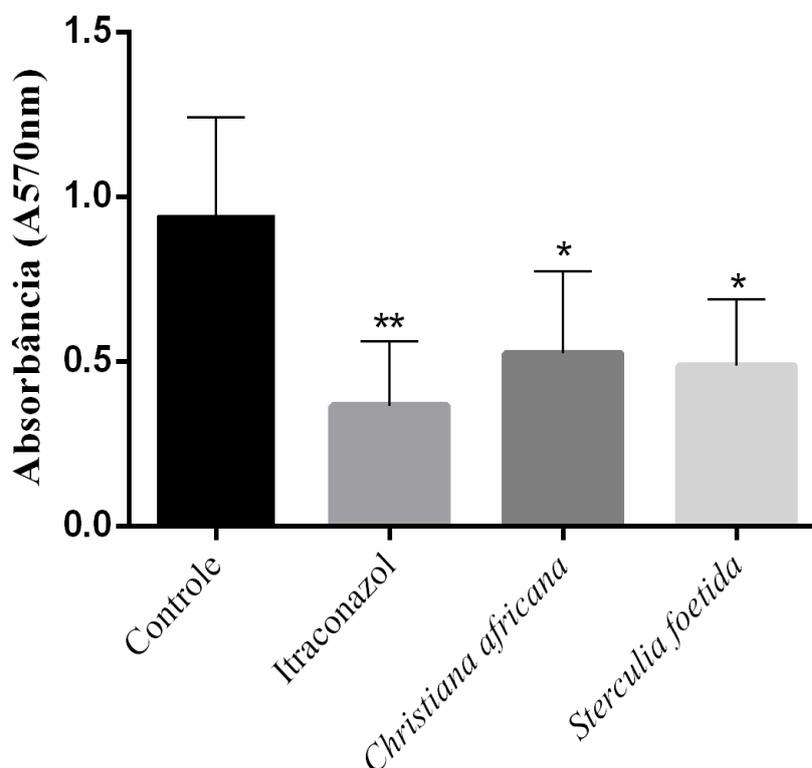
Em nosso estudo, para o tratamento dos biofilmes formados, foram utilizados apenas os compostos que demonstraram atividade antifúngica frente os isolados. Sendo assim, os biofilmes formados foram tratados após 48 horas de incubação com o itraconazol e óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida*, com concentração acima das CMI's obtidas no teste de microdiluição em caldo para esses compostos.

O antifúngico comercial (Itraconazol) assim como os óleos fixos de *S. foetida* e *C. africana* investigados, reduziram significativamente os biofilmes formados pelos seis isolados e a ATCC[®]205304 de *A. fumigatus* após 24 horas de exposição conforme demonstrado no Gráfico 2.

Apesar de diversos estudos tratarem da dificuldade de tratamento dos biofilmes pelos antifúngicos convencionais, em nosso estudo, o antifúngico comercial (Itraconazol) foi capaz de reduzir atividade celular em biofilmes de *A. fumigatus* com CMI de 16µg/mL. Os óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida* agiram em concentração de 1024µg/mL.

A ação dos azólicos contra biofilmes de *A. fumigatus* demonstra que este fármaco é eficaz contra *A. fumigatus*. Entretanto, vale ressaltar que foram tratados biofilmes maduros (48 h), Rajendram et al. (2011) em seus estudos já haviam demonstrado que o tratamento de biofilmes é fase-dependente e que se tivéssemos biofilmes tratados em tempos diferentes não obteríamos o mesmo resultado. Além disso, para nossos estudos foi utilizada uma concentração alta de itraconazol, que talvez na prática clínica não seja ideal, devido a problemas de toxicidade. No mais, não se deve ignorar os crescentes casos de resistência a este fármaco. Um estudo brasileiro, realizado por Denardi et al. (2018) encontrou uma taxa de 20–25% de resistência a itraconazol em isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* o que é alarmante, considerando os fatos que triazólicos são a primeira linha de tratamento para aspergilose.

Gráfico 2 – Biofilmes tratados com o fármaco (Itraconazol) e óleos de *C. africana* e *S. foetida* por 24 h. ($p \leq 0,5$).



Fonte: O autor (2019).

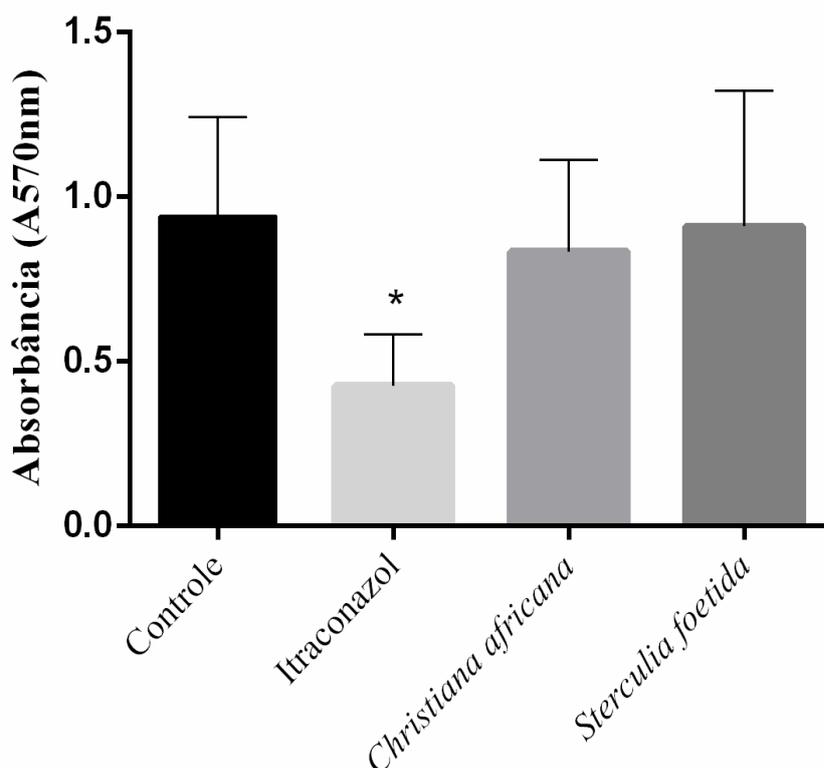
Os óleos fixos de *S. foetida* e *C. africana* reduziram o metabolismo celular de *A. fumigatus* em concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas de exposição (Gráfico 3). Para o Itraconazol não houve diferença significativa entre os tempos de tratamento (Tabela 3). Apesar de diversos estudos discorrerem sobre a dificuldade nos tratamentos de biofilmes, e o aumento nos casos de resistência aos azólicos, em nosso estudo, o Itraconazol foi capaz de reduzir o metabolismo celular dos biofilmes formados por *A. fumigatus*.

Dados recentes mostram que *A. fumigatus* possui plasticidade fenotípica que o permite sobreviver quando exposto ao Itraconazol. Este patógeno se adapta à presença do antifúngico, e estudos já identificaram 25 potenciais transportadores de efluxo de drogas que potencialmente ajudam o fungo a sobreviver exportando itraconazol para fora da célula (HOKKEN et al., 2019). Um tipo de *bombas de efluxo* comum em biofilmes de *A. fumigatus* são as *MDR (AfuMDR)*, que demonstraram estar associadas ao aumento da resistência ao itraconazol. Supõe-se que essas bombas sejam ativadas à medida que o biofilme se desenvolve para regular a homeostase e pela exposição a compostos antifúngicos

(RAJENDRAN et al., 2011). Além disso, há um aumento na atividade da bomba de efluxo no biofilme maduro em comparação com biofilmes jovens. Um modo adicional de ação para polienos e azóis é a produção de altos níveis de oxidantes reativos (ROSs) que induz a apoptose das células fúngicas. Entretanto nos biofilmes, também há aumento na capacidade de remoção de ROS, por meio de antioxidantes que pode ser responsável por um aumento da resistência do biofilme às drogas (BEAUVIS; LATGÉ, 2015).

A taxa de emergência da resistência a antifúngicos é maior que o ritmo de descoberta de novos compostos antifúngicos. Sendo assim, testamos dois óleos fixos extraídos de duas espécies não convencionais. Os óleos fixos reduziram foram capazes de reduzir a atividade celular dos biofilmes formados por *A. fumigatus*.

Gráfico 3 — Biofilmes tratados com o fármaco (Itraconazol) e óleos fixos de *C. africana* e *S. foetida* por 48 h. ($p \leq 0,5$).



Fonte: O autor (2019).

Com relação aos tempos de tratamento, é possível perceber que houve diferença quanto ao tempo de exposição dos mesmos, onde foi observada uma maior redução no metabolismo celular em 24 horas de exposição (Tabela 3). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os biofilmes tratados entre os óleos frente os biofilmes formados pelos isolados testados (Tabela 4).

Tabela 3 — Médias e desvio-padrão expressas para os tempos de tratamento nos biofilmes de *A. fumigatus* frente ao antifúngico e compostos vegetais nos períodos de 24 a 48 horas de exposição. ($p \leq 0,5$).

Tempo	Itraconazol	<i>C. africana</i>	<i>S. foetida</i>
24 horas	0,3657 ($\pm 0,1949$) ^{aA}	0,5250 ($\pm 0,2489$) ^{aA}	0,4872 ($\pm 0,2024$) ^{aA}
48 horas	0,4736 ($\pm 0,1519$) ^{aA}	0,8338 ($\pm 0,2790$) ^{bB}	0,9104 ($\pm 0,4109$) ^{bB}

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas e médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A ação dos óleos fixos sugere um perfil fungicida em células sésseis de *A. fumigatus*. Entre os dois compostos não houve diferença com relação ao tempo ou ação antifúngica, frente os isolados testados. Os óleos de *C. africana* e *S. foetida* agiram de forma similar frente os isolados, no entanto, sua ação foi maior nas 24 horas de exposição. Após esse período, a análise estatística demonstrou a recuperação de metabolismo celular.

S. foetida e *C. africana* possuem atividade antifúngica relatada em estudos anteriores. Esta atividade está fortemente relacionada com a presença de ácidos graxos saturados e insaturados detectados através da análise fitoquímica. Os ácidos graxos ciclopropênicos, possuem atividade antifúngica reconhecida cientificamente. Embora os outros ácidos presentes nas duas espécies, como o oleico já vem sendo descrito como um potencial efeito antifúngico (YANG et al., 2016).

Contudo, não há estudos que relatem a atividade antifúngica de extratos ou oleaginosas de *C. africana* e *S. foetida*, frente a biofilmes formados por *Aspergillus* spp. Em nossos achados os óleos das duas espécies foram eficazes no tratamento dos biofilmes, evidenciando a importância de estudos que investiguem o potencial terapêutico de compostos obtidos a partir de espécimes vegetais contra esses patógenos humanos.

Tabela 4 — Médias e desvios-padrão expressas para os tempos de tratamento nos biofilmes de *A. fumigatus* frente ao antifúngico e os óleos fixos de *Christiana africana* DC e *Sterculia foetida* Linn nos períodos de 24 a 48 horas de exposição.

Culturas	24 Horas (Média ± DP)			48 Horas (Média ± DP)		
	Itraconazol (16 µg/mL)	<i>C. africana</i> (1024 µg/mL)	<i>S. foetida</i> (1024 µg/mL)	Itraconazol (16 µg/mL)	<i>C. africana</i> (1024 µg/mL)	<i>S. foetida</i> (1024 µg/mL)
URM 5943	0,367 (± 0,120) ^{aAB}	0,601 (± 0,024) ^{abABC}	0,442 (± 0,102) ^{aAB}	0,414 (± 0,047) ^{aA}	0,529 (± 0,168) ^{abA}	1,030 (± 0,342) ^{bA}
URM 5698	0,331 (± 0,092) ^{aAB}	0,470 (± 0,039) ^{abABC}	0,472 (± 0,289) ^{abAB}	0,307 (± 0,061) ^{aA}	0,939 (± 0,244) ^{bcAB}	1,055 (± 0,292) ^{cAC}
URM 5992	0,148 (± 0,070) ^{aB}	0,163 (± 0,128) ^{aC}	0,259 (± 0,061) ^{aA}	0,350 (± 0,033) ^{aA}	0,549 (± 0,214) ^{aA}	0,267 (± 0,055) ^{aB}
URM 6562	0,510 (± 0,285) ^{aAB}	0,756 (± 0,307) ^{aAB}	0,805 (± 0,597) ^{aB}	0,605 (± 0,385) ^{aA}	1,334 (± 0,142) ^{bB}	1,570 (± 0,325) ^{bC}
URM 6573	0,689 (± 0,053) ^{aA}	0,887 (± 0,124) ^{aB}	0,691 (± 0,141) ^{aAB}	0,681 (± 0,049) ^{aA}	0,942 (± 0,384) ^{aAB}	0,835 (± 0,081) ^{aA}
URM 6577	0,134 (± 0,105) ^{aB}	0,489 (± 0,086) ^{abABC}	0,475 (± 0,301) ^{abAB}	0,353 (± 0,054) ^{abA}	0,851 (± 0,190) ^{bAB}	0,582 (± 0,076) ^{abAB}
ATCC 205304	0,380 (± 0,146) ^{aA}	0,309 (± 0,105) ^{aAC}	0,267 (± 0,136) ^{aA}	0,281 (± 0,009) ^{aA}	0,692 (± 0,091) ^{abA}	1,035 (± 0,111) ^{bA}

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas e médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Fonte: O autor (2019).

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa podemos concluir que:

- Quercetina, luteolina, ácido gálico e ácido elágico são constituintes do extrato de *Libidibia ferrea*;
- Os ácidos linolênico, esteárico, estercúlico e malvático são constituintes químicos de óleos de *Sterculia foetida* Linn e *Christiana africana* DC;
- O itraconazol inibiu o crescimento de todas as cepas de *Aspergillus fumigatus*;
- *Aspergillus fumigatus* não é inibido pela ação do extrato etanólico, frações hexânica e acetato de etila de *Libidibia ferrea*;
- Os óleos fixos de *Sterculia foetida* Linn e *Christiana africana* DC apresentam atividade antifúngica frente a isolados de *Aspergillus fumigatus*, sendo citados pela primeira vez.
- Itraconazol e os óleos fixos de *Sterculia foetida* Linn e *Christiana africana* DC são capazes de tratar biofilmes formados *in vitro* por *Aspergillus fumigatus*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Natalia; OLIVEIRA, Paola; ARRUDA, Eduardo José; LIMA, Denis; BEATRIZ, Adilson. Síntese de 1,2,4 trioxolanos a partir de óleos vegetais para aplicações farmacêuticas e veterinárias. **The electronic Journal of Quimical**, v. 4, n. 12, 2012.

ALVES, Aline de Cristo Soares; MORAES, Cid Aimbiré Santos; DE FREITAS, Guilherme Barroso Langoni; ALMEIDA, Durinezio Jose de Almeida. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 593-606. 2014.

BANDRES, Maria; SHARMA, Sandeep. *Aspergillus Fumigatus*. **Treasure Island**, p. 1-12. 2018.

BEAUVAIS, Anne; LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus* biofilm in vitro and in vivo. **Microbiol Spectrum**, v. 3, n. 4, p. 0017-2015. 2015.

BINDHU, C; REDDY, J. R. C; RAO, B. V. S. K; RAVINDER, T; CHAKRABARTI, Pradosh; KARUNA, M. S. L; PRASAD, R. B. N. Preparation and Evaluation of Biodiesel from *Sterculia foetida* Seed Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 5, p. 891–896. 2011.

BLANCHARD, Eloide; GABRIEL, Frederic; JEANNE-LEROYER, Camille; SERVANT, Vincent; DUMAS, Pierre-Yves. *Aspergillose* pulmonaire invasive. **Revue Des Maladies Respiratoires**, v. 35, n. 2, p. 171–187. 2018.

BLATZER, Michael; LATGÉ, Jean-Paul. Metal-homeostasis in the pathobiology of the opportunistic human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, 152-159. 2017.

BOISVERT, Andree-Anne; CHENG, Matthew P.; SHEPPARD, Don; NGUYEN, Dao. Microbial Biofilms in Pulmonary and Critical Care Diseases. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 13, n. 9, p. 1615-23. 2016.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita O; DENNING, David. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal Of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 1-29. 2017.

BRAGA, Renato. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 2ª edição. São Paulo: Três Press, 1976. p. 45-46.

BUGLI, Francesca; POSTERARO, Brunella; PAPI, Massimiliano; TORELLI, Ricardo; MAIORANA, Alessandro; STERBINI, Francesco Paroni; POSTERARO, Patrizia; SANGUINETTI, Maurizio; DE SPIRITO, Marco. In Vitro Interaction between Alginate Lyase and Amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* Biofilm Determined by Different Methods. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1275-1282. 2012.

CARNEIRO, Fernanda Melo; SILVA, Maria José Pereira; LEONARDO Luiz Borges; ALBERNAZ, Lorena Carneiro; COSTA, Joana Darc Pereira. Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75. 2014.

CARVALHO, Adriana; MENEZES, Igor; ANTONIOLLI, Angelo; SANTOS, Marcio. Efeito do Tratamento Crônico com Extrato Aquoso de *Caesalpinia ferrea* e *Chrysobalanus icaco* na Reatividade Vascular de Ratos Diabéticos. **Lat. Sou. J. Pharm**, v. 29, n. 5, p. 845-848. 2010.

CAVALHEIRO, Mariana; FARIAS, Davi; FERNANDES, Geórgia Sampaio; NUNES, Edson; CAVALCANTI, Francisca; VASCONCELOS, Ilka; MELO, Vania; CARVALHO, Ana. Atividade biológica e enzimática do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 2B, p. 586-591. 2009.

CHABI, Marie Laurie; GORACCI, Ana; ROCHE, Nicholas; PAUGAM, André; LUPO, Antonie; REVEL, Marie-Pierre. Aspergilose pulmonary. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 96, n. 5, p. 435–442. 2015.

CHALLA, Sundaram. Pathogenesis and Pathology of Invasive Aspergillosis. **Current Fungal Infection Reports**. 12(1):23-32. 2018.

CHOWDHARY, Anuradha; SHARMA, Cheshta; MEIS, Jacques. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 216, n. 3, p. 436-444. 2017.

COSTA, Leydiana; GUILHON-SIMPLICIO, Fernanda; SOUZA, Tatiana. Libidibia ferrea (mart. Ex tul) l. P. Queiroz var. Ferrea: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 48-53. 2015.

COUTINHO, Diógenes. Lipídios de sementes: potencial econômico e quimiosistemático. *Universidade Federal de Pernambuco*, p. 1-73. 2013.

DENARDI, Laura Bedin; HOCH, Bianca Dalla-Lana; KUNZ, Francielle Pantella Jesus; BITTENCOURT, Cecília Severo; MORAIS, Janio; ZANETTE, Régis Adriel; HARTZ, Sydney Alves. In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 30-36. 2018.

DENNING, David; CADRANEL, Jacques; BEIGELMAN-AUBRY, Catherine; ADER, Florence; CHAKRABARTI, Arunaloke; BLOT, Stijn; ULMAN, André; DIMOPOULOS, George; LANGE, Christoph. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 1, p. 45–68. 2015.

DESAI, Jigar; MITCHELL, Aaron; ANDES, David. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1-18. 2014.

DESOUBEAUX, Guillaume; BAILLY, Éric; CHANDENIER, Jacques. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 3, p. 89-101. 2014.

DICHTL, Karl; SAMANTARAY, Sweta; AIMANIANDA, Vishukumar; ZHU, Zhaojun; PRÉVOST, Marie-Christine; LATGÉ, Jean-Paul; EBEL, Frank; WAGENER, Johannes. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β -1,3-glucan is viable, massively sheds

galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 458-471. 2014.

FERREIRA, Magda; SOARES, Luiz Alberto. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal Of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140-150. 2015.

FIORI, Barbara; POSTERARO, Brunella; TORELLI, Riccardo; TUMBARELLO, Mario; PERLIN, David, FADDA, Giovanni; SANGUINETTI, Maurizio. In Vitro Activities of Anidulafungin and Other Antifungal Agents against Biofilms Formed by Clinical Isolates of Different *Candida* and *Aspergillus* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3031-3035. 2011.

FISHER, Matthew; HAWKINS, Nichola; SANGLARD, Dominique; GURR, Sarah. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360 n. 6390, p. 739-742. 2018.

FORTÚN, Jesus; MELJE, Yolanda; FRESCO, Gema; MORENO, Santiago. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Clínica**, v. 30, n. 4, p. 201-208. 2012.

FRESENIUS, George; MYKOLOGIE, Beitrage Zur. **Siebenhundert Jahre Heilkunde in Frankfurt am Bronner**, p. 81-82. (1863)

GHAZAEI, Ciamark. Molecular Insights into Pathogenesis and Infection with *Aspergillus Fumigatus*. **The Malaysian Journal Of Medical Sciences : MJM**, p. 10-20. 2017.

GONÇALVES, Sarah Santos; SOUZA Aana Caroline Remondi; CHOWDHARY, Anuradha; MEIS, Jacques; COLOMBO, Arnaldo Lopes. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198-219. 2016.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, Alejandra Itzel; RAMÍREZ-GRANILLO, Ádrian; MEDINA-CANALES, Maria Gabriela; RODRÍGUEZ-TOVAR, Aída Verónica; MARTÍNEZ-RIVERA,

Maria Angelis. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. **Bmc Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-13. 2016.

GRAVELAT, Fabrice; EJZYKOWICZ, Danielle; CHIANG, Lisa; CHABOT, José; URB, Mirijam; MACDONALD, Denyese, AL-BADER, Nadia, FILLER, Scott; SHEPPARD, Donald. *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 473–488. 2010.

GUERRA, Andreza Conceição Vêras de Aguiar. Avaliação das atividades antitumoral e antioxidante in vitro e extratos de *Libidibia ferrea* em células de câncer colorretal. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

HILLMANN, Falk; NOVOHRADSKÁ, Silvia; MATTERN, Derek; FORBERGER, Tilman; HEINEKAMP, Thorsten; WESTERMANN, Martin; WINCKLER, Thomas; BRAKHAGE, Axel. Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. **Microbiol**, v. 17, p. 2858–2869. 2015.

HOKKEN, Margriet; ZOLL, Jan; COOLEN, Jordy; ZWAAN, Bas; VERWEIJ, Paul; MELCHERS, Willem. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1. 2019.

KABARA, Jon; SWIECZKOWSKI, Dennis; CONLEY, Anthony; TRUANT, Josephy. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23-28. 1972.

KALE, Shashank Sharad; DARADE, Vijaya; THAKUR, Hemantkumar. Analysis of fixed oil from *sterculia foetida* linn. **International Journal Pharmaceutical and Research**, v. 2, n. 11, p. 2908-2914. 2010.

KAUFFMAN, Carol; GREGG, Kevin. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Clinical Aspects, and Treatment. **Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 662-672. 2015.

KAUR, Savneet; SINGH, Shweta. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, p. 1-8. 2013.

KAYA, Selçuk; GENÇALIOĞLU, Eda; SÖNMEZ, Mehmet; KÖKSAL, İftihar. The importance of risk factors for the prediction of patients with invasive pulmonary aspergillosis. **Revista Da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 9, p. 764–770. 2017.

KOBAYASHI, Yuri Teiichi; ALMEIDA, Vívian Tavares; BANDEIRA, Talita; ALCÂNTARA, Bianca Nascimento; SILVA, Andressa Santa Brígida; BARBOSA, Wagner Luiz Ramos; SILVA, Paula Barbosa; MONTEIRO, Maria Vivina Barros; ALMEIDA, Milton Begeres. Phytochemical evaluation and wound healing potential of the fruit extract ethanolic of Jucá (*Libidibia ferrea*) in Wistar rats. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 34. 2015.

KOEHLER, Phillip; HAMPRECHT, Axel; BADER, Oliver; BEKEREDJIAN-DING, Isabelle; BUCHHEIDT, Dieter; DOELKEN, Gottfried; ELIAS, Johannes; HAASE, Gerhard; HAHN-AST, Corinna; KARTHAUS, Meinolf; KEKULÉ, Alexander; KELLER, Peter; KIEHL, Michael; KRAUSE, Stefan; KRÄMER, Carolin; NEUMANN, Silke; ROHDE, Holger; ROSÉE, Paul La; RUHNKE, Markus; SCHAFHAUSEN, Philippe; SCHALK, Enrico; SCHULZ, Katrin; SCHWARTZ, Stefan; SILLING, Gerda; STAIB, Peter; ULLMANN, Andrew; VERGOULIDOU, Maria; WEBER, Thomas; CORNELLY, Oliver; VEHRESCHILD, Maria. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: the SEPIA Study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 49(2), 218–223. 2017.

KONTOYIANNIS, Dimitrios; MARR, Kieren; PARK, Benjamin; ALEXANDER, Barbara; ANAISSIE, Elias; WALSH, Thomas; ITO, James; ANDES, David; BADDLEY, Jhon; BROWN, Janice; BRUMBLE, Lisa; FREIFELD, Alison; HADLEY, Susan; HERWALDT, Loreen; KAUFFMAN, Carol; KNAPP, Katherine; LYON, Marshall; MORRISON, Vicki; PAPANICOLAOU, Genovefa; PATTERSON, Thomas; PERL, Trish; SCHUSTER, Mindy; WALKER, Randal; WANNEMUEHLER, Katheleen; WINGARD, John; CHILLER, Tom; PAPPAS, Peter. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection

Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 8, p. 1091–1100. 2010.

KOSMIDIS, Chris; DENNING, David. The aspergillosis clinical spectrum of pulmonary. **BMJ Journal**, v. 70, n. 3, p.270-277. 2014.

KOUSHA, Mohammad; TADI, Reddy; SOUBANI, Ayman. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, p. 156-174. 2011.

KWON-CHUNG, Kyung; SUGUI, Janyce. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **Frontiers In Microbiology**, p. 1-8. 2016.

LAMOTH, Federic. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-8. 2016.

LATGÉ, Jean-Paul; BEAUVAIS, Anne; CHAMILOS, Gerogios. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. **Rev. Microbioly**, n. 71, p. 99-115. 2017.

LIMA, Sandrine Maria; ARAÚJO, Larissa Cardoso; SITÔNIO, Marília Maria; FREITAS, Ana Carina; MOURA, Sirlene; CORREIA, Maria Tereza; MALTA, Diana Jussara; GONÇALVES-SILVA, Teresinha. Potencial anti-inflamatório e analgésico da *Caesalpinia ferrea*. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 22, v. 1, p. 169-175. 2012.

LOUSSERT, Céline; SCHMITT, Christine; PREVOST, Marie-Christine; BALLOY, Viviane; FADEL, Elie; PHILIPPE, Bruno; KAUFFMANN-LACROIX, Catherine; LATGÉ, Jen-Paul; BEAUVAIS, Anne. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 405-410. 2010.

MACIEL, Maria Aparecida; PINTO, Angelo; VEIGA JR, Valdir. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 29-438. 2002.

MANFIOLLI, Adriana Oliveira; REIS, Thaila Fernanda; ASSIS, Leandro José; CASTRO, Patrícia Alves; SILVA, Lilian Pereira; HORI, Juliana; WALKER, Louise; MUNRO, Carol;

RAJENDRAN, Ranjith; RAMAGE, Gordon; GOLDMAN, Gustavo. Mitogen activated kinases (MAPK) and protein phosphatases are involved in *Aspergillus fumigatus* adhesion and biofilm formation. **The Cell Surface**, n. 1, p. 43–56. 2018.

MARTINS, Maristela; KLUCZKOVSKI, Ariane; SOUZA, Tatiane; PACHECO, Caroline; SAVI, Dagostim; SCUSSEL, Vildes Maria. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 131-137. 2014.

MATOS, Antônio César Batista; ATAIDE, Glauciana da Mata; BORGES, Eduardo Euclides. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. **J. Seed Sci**, v. 37, n. 1, p. 26-32. 2015.

MAVRIDOU, Eleftheria; MELETIADIS, Joseph; RIJS, Antony; MOUTON, Johan; VERWEIJA, Paul. The Strength of Synergistic Interaction between Posaconazole and Caspofungin Depends on the Underlying Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1738- 1744. 2015.

MEIS, Jacques; CHOWDHARY, Anuradha; RHODES, Johanna; FISHER, Matthew; VERWEIJ, Paul. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371 n. 1709, p. 1-10. 2016.

MICHALET, Serge; PAYEN-FATTACCIOLI, Laetitia; BENEYA, Chantal; CEGIÉLAA, Pascale; BAYET, Chrsitine; CARTIERA, Gilbert; NOUNGOUÉ-TCHAMO, Diderot; TSAMO, Etienne; MARIOTTE, Anne-Marie; VE DIJOUX-FRANCA, Marie-Genevieve. New Components Including Cyclopeptides from Barks of *Christiana africana* DC. (Tiliaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p.1106-1117. 2008.

MONTAGNA, Maria Teresa; CAGGIANO, Giuseppina; LOVERO, Grazia; DE GIGLIO, Osvalda; CORETTI, Caterina; IATTA, Roberta; GIGLIO, Maria Teresa; DALFINO, Lidia; BRUNO, Francesco; PUNTILLO, Filoneba. Epidemiology of invasive fungal infections in the

intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). **Infection**, v.41, n. 3, p. 645-653. 2013.

MOWAT, Eilidh; LANG, Sue; WILLIAMS, Craig; MCCULLOCH, Elaine; JONES, Brain; RAMAGE, Gordon. Phase dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 1281–1284. 2008.

MOYE-ROWLEY, Scott. Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n.70. 2015.

MULDOON, Eavan; STREK, Mary; PATTERSON, Karen. Allergic and Noninvasive Infectious Pulmonary Aspergillosis Syndromes. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 521-534. 2017.

MUSZKIETA, Laetitia; BEAUVAIS, Anne; PÄHTZ, Vera; GIBBONS, John; ANTON, Veronique; BEAU, Remi; SHIBUYA, Kazutoshi; ROKAS, Antonis; FRANCOIS, Jean; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Alex; LATGÉ, Jean-Paul. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Frontiers in Microbiology**, n. 12, p. 4-13. 2013.

NAYAK, Ajay; CROSTON, Tara; LEMONS, Angela; GOLDSMITH, William; MARSHALL, Nikki; KASHON, Michael; GERMOLEC, Dori; BEEZHOLD, Donald; GREEN, Brett. *Aspergillus fumigatus* viability drives allergic responses to inhaled conidia. **Annals Of Allergy, Asthma & Immunology**, p. 1-33. 2018.

NEGRI, Clara; GONÇALVES, Sarah Santos; SOUSA, Ana Cristina; BERGAMASCO, Maria Daniella; MARTINO, Marinês; QUEIROZ-TELLES, Flávio; AQUINO, Valerio; CASTRO, Paulo; HAGEN, Ferry; MEIS Jacques; COLOMBO, Arnaldo Luiz. Triazole Resistance Is Still Not Emerging in *Aspergillus fumigatus* Isolates Causing Invasive Aspergillosis in Brazilian Patients. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. 1-12. 2017.

ONG, Hwai Chyuan; SILITONGA, Arridina Susan ; MASJUKI, Bin Haji Hassan; MAHLIA, Indra; CHONG, Wen Tong; BOOSROH, Mohd Hariffin. Production and comparative fuel properties of biodiesel from non-edible oils: *Jatropha curcas*, *Sterculia foetida* and *Ceiba pentandra*. **Rev. Conversão e Gestão de Energia**, n. 73, p. 245-255. 2013.

PANA, Zoe Dorothea; ROILIDES, Emmanuel; WARRIS, Adilia; GROLL, Andreas. H; ZAOUTIS, Theoklis. Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Children. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, p. 3–11. 2017.

PATTERSON, Thomas; THOMPSON, George; DENNING, David; FISHMAN, Jaya; HADLEY, Susan; HERBRECHT, Raol; KONTOYIANNIS, Dimitrios; MARR, Kieren; MORRISON, Vicki; NGUYEN, Hong; SEGAL, Brahm; STEINBACH, William; STEVENS, David; WALSH, Thomas; WINGARD, John; YOUNG, Jo-Anne; BENNETT, John. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. 1-60. 2016.

PAULUSSEN, Caroline; HALLSWORTH, John; ÁLVAREZ-PÉREZ, Sérgio; NIERMAN, William; HAMILL, Phillip; BLAIN, David; REDIERS, Hans; LIEVENS, Bart. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p.296-322. 2016.

PEDROSA, Tatiana; BARROS, Aline Oliveira; NOGUEIRA, Jéssica Rodrigues; FRUET, Andréia Costa; RODRIGUES, Isis Costa; CALCAGNO, Danielle Queiroz; SMITH, Marília Arruda; DE SOUZA, Tatiana Pereira; BARROS, Silvia Berlanga; DE VASCONCELLOS, Marne Carvalho; SILVA, Felipe Moura; KOOLEN, Hector Herinque; MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi; LIMA, Emerson Silva. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of *Jucá* (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives Of Dermatological Research**, v.308, n. 9, p. 643-654. 2016.

PERLIN, David; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 383-392. 2017.

POHL, Carolina. H; KOCK, Johan; THIBANE, Vuyisile Samuel. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, n. 3, p. 61-71. 2011.

PORT'S, Pollyane; CHISTÉ, Renan Campos; GODOY, Helena Texeira; PRADO, Marcelo Alexandre. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 28, p. 75-881. 2013.

RAJASEKHARREDDY, Pala; RANI, Pathipati Usha. Biofabrication of Ag nanoparticles using Sterculia foetida L. seed extract and their toxic potential against mosquito vectors and HeLa cancer cells. **Science and Materials of Engenary**, n. 39, p. 203–212. 2014.

RAJENDRAN, Ranjith; MOWAT, Elidh; MCCULLOCH, Elaine; LAPPIN, David; JONES, Brian; LANG, Sue; MAJITHIYA, Jayesh; AVISAR, Peter; WILLIAMS, Craig; RAMAGE, Gordon. Azole Resistance of Aspergillus fumigatus Biofilms Is Partly Associated with Efflux Pump Activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 2092–2097. 2011.

RAJENDRAN, Ranjith; MOWAT, Ranjith; WILLIAMS, Craig; RAMAGE, Gordon. Prior in vitro exposure to voriconazole confers resistance to amphotericin B in Aspergillus fumigatus biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2015.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; GUTIERREZ-CORREA, Marcel; JONES, Brian; WILLIAMS, Craig. Aspergillus biofilms: clinical and industrial significance. **Fems Microbiology Letters**, v. 324, n. 2, p. 89-97. 2011.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; SHERRY, Leighann; WILLIAMS Craig. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, p 1-15. 2012.

REICHERT-LIMA, Franqueline; LYRA, Luiza; PONTES, Laís; MORETTI, Maria Luiza; PHAM, Cau; LOCKHART, Shawan; SCHREIBER, Angélica Schreiber. Surveillance for azoles resistance in Aspergillus spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, v. 61, n.6, p. 360-365. 2018.

REICHHARDT, Courtney; FERREIRA, José; JOUBERT, Lydia-Marie; CLEMONS, Karl; STEVENS, David; CEGELSKI, Lynette. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* biofilm extracellular matrix by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Eukaryot Cel**, n. 14, p.1064–1072. 2015.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 4, n. 5, p.1-14. 2014.

ROZWALKA, Luciane Cristina; LIMA, Maria Lucia Rosa; MIO, Louise; NAKASHIMA, Tomoe. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p.301-307. 2008.

SALAÛN, Jacques. Cyclopropane Derivatives and their Diverse Biological Activities. **Topics in Current Chemistry**, p. 1–67. 1999.

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella; LASS-FLÖRL, Cornelia. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p.2-13.

SANTOS, Renato Lima; GUIMARAES, Geovani Pereira; PORTELA, Alyne da Silva Portela. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 4, p.486-491. 2011.

SATISH, B., MAHESH A. S. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. **World Journal Of Agricultural Sciences**, n. 4, p. 839-843. 2008.

SCHARF, Daniel; HEINEKAMP, Thorsten; REMME, Nicole; HORTSCHANSKY, Peter; BRAKHAGE, Axel; HERTWECK, Christian. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 467-472. 2011.

SCHWEER, Katherine; BANGARD, Christopher; HEKMAT, Khosro; CORNELLY, Oliver. Chronic pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, v. 57, n. 5, p. 257-270. 2013.

SEVILHA, Joyce Betta; RODRIGUES, Rosana Soza; BARRETO, Miriam Menna; ZANETTI, Gláucia; HOCHHEGGER, Bruno; MARCHIORI, Edson. Infectious and Non-Infectious Diseases Causing the Air Crescent Sign: A State-of-the-Art Review. **Lung**, v. 196, n. 1, p. 1-10. 2017.

SHAMSUNDAR, Shahabdkar; PARAMJYOTHI, Swamy. Preliminary pharmacognostical and phytochemical investigation on *Sterculia foetida* Linn. Seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 13, p. 1987-1989. 2010.

SHEPPARD, Donald. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 375–379. 2011.

SINGH, Gurjeet, URHEKAR, Anant. Virulence Factors Detection in *Aspergillus* Isolates from Clinical and Environmental Samples. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, p. 13-18. 2017.

SRINIVASAN, Anand; LOPEZ-RIBOT, José; RAMASUBRAMANIAN, Anand. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, n. 11, p. 65-71. 2014.

SUGUI, Janyce; KWON-CHUNG, Kyung; JUVVADI, Praveen; LATGÉ, Jean-Paul; STEINBACH, William. *Aspergillus fumigatus* and Related Species. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 5, n. 2, p. 1-17. 2014.

TACCONE, Fábio Silvio; VAN DEN ABEELE, Anne-Marie; BULPA, Pierre; MISSET, Benoit; MEERSSEMAN, Wouter; CARDOSO, Teresa; PAIVA, José-Arthur; BLASCONAVALPOTRO, Miguel; DE LAERE, Emmanuel; DIMOPOULOS, George; RELLO, Jordi; VOGELAERS, Dirk; BLOT, Stijn. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1-15. 2015.

UEDA, Hidenori; TACHIBANA, Kyoto; MORIYASU, Masataka; KAWANISHI, Kazuko Kawanishi; ALVES, Sérgio Mello. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381. 2002.

VAN DE VEERDONK, Frank; GRESNIGT, Mark; ROMANI, Luigina; NETEA, Mihai; LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661-674. 2017.

VEIGA JUNIOR, Valdir; PINTO Angelo. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p.19-528. 2005.

VENKATESWARA, Parimi Rao; KUMAR Anil. Study of C I Engine performance with Diesel - Biodiesel (*sterculia foetida*) Blend as fuel. **International Journal of Trend in Research and Development**, v. 2, n. 4, p. 1-4. 2015.

VERWEIJ, Paul; ZHANG, Jianhua; DEBETS, Alfons; MEIS, Jacques; VAN DE VEERDONK, Frank; SCHOUSTRA, Sijmen; ZWAAN, Bas; MELCHERS, Willem. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. **The Lancet Infectious Disease**, n. 16, p. 11251-260. 2016.

VIPUNNGEUN, Niran; PALANUVEJ, Chanida. Fatty Acids Of *Sterculia Foetida* Seed Oil. **J Health Res**, v. 23, n. 3, p. 157. 2009.

VITAL, Pianrangueli; VELASCO, Rogelio; DEMIGILLO, José-Maria; RIVERA, Windel. Antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of *Ficus septica* Burm and *Sterculia foetida* L. leaf extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 1, p. 58-63. 2010.

WIEDERHOLD, Nathan. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection And Drug Resistance**, n. 10, p. 249-259. 2017.

XU, Xiao-Yung; CHEN, Fei; SUN, He; CHEN, Chen; ZHAO, Bei-Lei. Important factors mediates the adhesion of *aspergillus fumigatus* to alveolar epithelial cells with E-cadherin. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 5, p. 2419-2425. 2016.

ZHANG, Ming; FENG, Chun-Lai; CHEN, Fei; HE, Qian; SU, Xin; SHI, Yi. Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Obtained in Nanjing, China. **Chinese Medical Journal**, v. 130, n. 6, p. 665–668. 2017.

ZHANG, Shizhu; CHEN, Yuan; MA, Zhihua; CHEN, Qiuyi; OSTAPSKA, Hanna; GRAVELAT, Fabrice; LU, Ling; SHEPPARD, Donald. PtaB, a lim- domain binding protein in *Aspergillus fumigatus* regulates biofilm formation and conidiation through distinct pathways. **Microbiol Celular**, v. 12799, n. 20, p. 1-10. 2017.