



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DÉBORA LOPES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE HÍBRIDOS MOLECULARES
DE 2-ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA FRENTE ISOLADOS FENOTIPICAMENTE
RESISTENTES DE *Aspergillus fumigatus***

Recife
2023

DÉBORA LOPES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE HÍBRIDOS MOLECULARES
DE 2-ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA FRENTE ISOLADOS FENOTIPICAMENTE
RESISTENTES DE *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Prof^a Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Recife
2023

DÉBORA LOPES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE HÍBRIDOS MOLECULARES
DE 2-ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA FRENTE ISOLADOS FENOTIPICAMENTE
RESISTENTES DE *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovada em: 24/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Presidente da Banca/Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Bruna Rodrigues de Sousa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o Dr. Felipe Neves Coutinho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

S232a Santana, Débora Lopes de.
Avaliação da atividade antimicrobiana de híbridos moleculares de 2-isoxazolina
aza-bicíclica frente isolados fenotipicamente resistentes de *Aspergillus fumigatus* /
Débora Lopes de Santana – 2023.
102 p.

Orientadora: Rejane Pereira Neves
Coorientadora: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023.
Inclui referências.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Farmacorresistência Micótica . 3. Biofilmes. Neves,
Rejane Pereira (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 192)

Dedico este trabalho ao meu doce e bom Pai, e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu melhor amigo, por iluminar meus passos e me cercar de bondade e misericórdia.

À Prof^a Dr^a. Rejane Pereira Neves pela orientação, oportunidade, apoio e confiança em mim depositada.

À minha querida coorientadora, Prof^a Dra^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, por me ensinar, acreditar, aconselhar, e principalmente por me inspirar através do exemplo o tipo de pessoa e profissional que eu quero me tornar. Muito obrigada pelas valiosas trocas!

Aos meus pais, Madalena e Lindoval, por me apoiarem na decisão de seguir meus sonhos, por me ensinarem O caminho, e pelas orações depositadas tantas vezes em taças de ouro nos Céus.

À Marcos Lacerda, meu companheiro de vida e alma, por ser meu suporte e base, incentivando sempre meu crescimento, me nutrindo de amor e compreensão, e boas risadas.

À Mayara Bárbara e lanca Albuquerque, pela parceria na jornada acadêmica, nos surtos, nas alegrias, no apoio moral e físico durante os experimentos e na vida.

À Marques Leonel, por ser um grande amigo e verdadeiro contribuidor nas minhas pesquisas, e a Anne Luise, pelo afinho e dedicação na colaboração da pesquisa.

Aos demais integrantes do LAM, Gabriel Nascimento, Gabriel Torres, Maryanne, Fenícia e Felipe, por serem os pés e mãos de Jesus na minha vida durante os experimentos.

Às minhas melhores amigas Carol e Mabilly, por fazerem parte da minha história desde a graduação e permanecerem sendo tão especiais em cada jornada.

À Franz de Assis e Daniela Buonafina, e demais integrantes do Laboratório de Micologia Médica, por contribuírem ativamente para que meu conhecimento.

Aos meus professores da Pós-graduação de Medicina Tropical pelo conhecimento compartilhado que impactou minha formação acadêmica.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e por se mostrarem dispostos a contribuir para a melhoria da escrita e da pesquisa.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente a esse trabalho. Todos que passaram pela minha vida, principalmente nesse período, foram primordiais para o desenvolvimento e realização dessa pesquisa.

“Viajar pela rede micelial é como se misturar com os pontos mais obscuros e interessantes de nossa existência celestial”
(Paul Staments - Star Trek Discovery)

RESUMO

Aspergillus fumigatus é o principal agente etiológico da aspergilose pulmonar, cuja forma invasiva apresenta altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Um dos pré-requisitos para invasão tecidual e importante fator de virulência para a espécie é a produção de biofilmes. O tratamento nestas condições é complexo, e consiste tanto na remoção cirúrgica da massa fúngica, dos dispositivos associados, quanto no uso de antifúngicos azóis ou polienos. No entanto, a eficácia do tratamento farmacológico nos últimos anos tem sido ameaçada pelo surgimento de isolados resistentes. Desta forma, faz-se necessário a descoberta e desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas, onde, do ponto de vista químico-medicinal, os híbridos moleculares com 2-isoxazolina aza-bicíclica constituem-se boas opções. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos híbridos moleculares frente a células planctônicas e biofilmes proveniente de isolados resistentes de *A. fumigatus*. Foram utilizados isolados de *A. fumigatus*, originados de amostras ambientais e de espécimes clínicos, mantidos na Micoteca URM da UFPE. Ao todo, foram testados 10 híbridos moleculares frente às células planctônicas e sésseis de *A. fumigatus* pela técnica de microdiluição em caldo. Todos os híbridos inibiram o crescimento das células planctônicas com concentrações inibitórias variando de 32-1024 µg/mL. Os híbridos R-122 e R-147 também demonstraram atividade na inibição da formação de biofilme e na erradicação dos mesmos na concentração de 2048 µg/mL. A descoberta do mecanismo de ação e a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para revelar mais do potencial antifúngico.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; farmacorresistência micótica; biofilmes.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is the main etiologic agent of pulmonary aspergillosis, whose invasive form has high mortality rates in immunocompromised patients. One of the prerequisites for tissue invasion and an important virulence factor for the species is the production of biofilms. Treatment in these conditions is complex, and consists of both surgical removal of the fungal mass and associated devices, and the use of azole or polyene antifungals. However, the effectiveness of pharmacological treatment in recent years has been threatened by the environment of resistant isolates. Thus, it is necessary to discover and develop new pharmacotherapeutic alternatives, where, from a chemical-medicinal point of view, molecular hybrids with aza-bicyclic 2-isoxazoline are good options. Thus, the objective of this work was to evaluate the activity of molecular hybrids against planktonic cells and biofilms from resistant isolates of *A. fumigatus*. Isolates of *A. fumigatus* were used, originating from environmental samples and clinical specimens, admitted to the Micoteca URM of UFPE. Altogether, 10 molecular hybrids were tested against planktonic and sessile cells of *A. fumigatus* by the broth microdilution technique. All hybrids inhibited planktonic cell growth with inhibitory concentrations ranging from 32-1024 µg/mL. Hybrids R-122 and R-147 also generated activity in the trajectory of biofilm formation and in their eradication at a concentration of 2048 µg/mL. Discovery of the mechanism of action and further in vitro and in vivo tests are needed to reveal more of the antifungal potential.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; drug resistance; biofilms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Germinação de conídios de <i>A. fumigatus</i> através da análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	23
Figura 2 –	Imagens de microscopia confocal de fluorescência representativas de biofilmes de <i>A. fumigatus</i> durante os principais estágios de desenvolvimento.....	28
Figura 3 –	Visão geral esquemática das doenças pulmonares causadas por <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
Quadro 1 –	Critérios diagnósticos de ABPA.....	31
Figura 4 –	Estrutura química da isoxazolina.....	37
Figura 5 –	Estrutura química da hidrazona.....	37
Quadro 2 –	Origem e identificação dos isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> utilizados.....	40
Quadro 3 –	Substituintes da porção isoxazolina e hidrazona dos híbridos moleculares de 2-isoxazolina aza-bicíclica.....	51
Figura 6 –	Padrão de precipitação dos híbridos moleculares R-122, R-128, R-148 em meio RPMI 1640.....	52
Quadro 4 –	Média da produção de biofilme por isolado de <i>Aspergillus fumigatus</i> em função do tempo de desenvolvimento utilizando o ensaio de redução do (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) (MTT).....	57

Quadro 5 – Média da produção de biofilme por isolado de <i>Aspergillus fumigatus</i> após tratamento com R-122, R-147, voriconazol e anfotericina B, em diferentes concentrações, para inibir seu crescimento.....	59
Quadro 6 – Média da produção de biofilme por isolado de <i>Aspergillus fumigatus</i> após tratamento com os híbridos R-122 e R-147, em diferentes concentrações, nos tempos de 24 horas e 48 horas.....	64
Quadro 7 – Média da produção de biofilme por isolado de <i>Aspergillus fumigatus</i> após tratamento com voriconazol e anfotericina B, em diferentes concentrações, nos tempos de 24 horas e 48 horas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de itraconazol voriconazol e anfotericina B em 48h.....	45
Tabela 2 –	Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos híbridos moleculares híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica associada a hidrazonas frente isolados não-selvagens de <i>A. fumigatus</i>	50
Tabela 3 –	Concentração fungicida mínima ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos híbridos moleculares híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica associada a hidrazonas frente isolados não-selvagens de <i>A. fumigatus</i>	50
Tabela 4 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 7306.....	53
Tabela 5 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 7315.....	54
Tabela 6 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 6576.....	54

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
AI	Aspergilose invasiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima de biofilme
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMEB	Concentração mínima de erradicação de biofilme
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
GAG	Galactosaminogalactonano
HBD	Híbridos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HM	Hibridização molecular
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
LAM	Laboratório de Análises Clínicas
LASOF	Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
MetAP	Enzima metionina aminopeptidase
MEP	Matriz extracelular polimérica
MTT	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Solução salina estéril
NADPH - Oxidase	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Oxidase
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermóide de pulmão
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NS	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Solução Fosfato Salina
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i>
ROS	<i>Oxygen-reactive species</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	<i>University Recife Mycology</i> (Micoteca URM)
VRC	Voriconazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.2	INFECÇÕES ASSOCIADAS A <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	21
2.2.1	Conídios	22
2.2.2	Germinação dos conídios	23
2.2.3	Metabólitos secundários	24
2.2.4	Aquisição de ferro	25
2.2.5	Biofilmes	26
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO	28
2.3.1	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)	30
2.3.2	Aspergiloma	32
2.3.3	Aspergilose Invasiva (AI).....	32
2.4	TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA ASPERGILOSE E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	33
2.4.1	Azóis	33
2.4.2	Polienos.....	34
2.5	NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	HÍBRIDOS MOLECULARES	39
4.2	ANTIFÚNGICOS PADRÕES	39
4.3	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	39
4.4	SUSCEPTIBILIDADE in vitro DOS HÍBRIDOS MOLECULARES.....	40
4.4.1	Preparação do Inóculo	40
4.4.2	Determinação Da Concentração Inibitória Mínima e Concentração	

Fungicida Mínima	40
4.4.3 Ação do Produto na Parede Celular Fúngica.....	41
4.5 ENSAIOS EM BIOFILME.....	42
4.5.1 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes	42
4.5.2 Prospecção do Potencial Antibiofilme dos Híbridos Moleculares	43
4.5.3 Prospecção do Potencial Antimicrobiano no Tratamento de Biofilmes Maduros dos Híbridos Moleculares.....	44
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS.....	44
5.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS AOS HÍBRIDOS MOLECULARES	47
5.3 ENSAIOS EM BIOFILMES.....	56
5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILMES.....	57
5.5 POTENCIAL ANTIBIOFILME.....	59
5.6 TRATAMENTO EM BIOFILMES MADUROS	63
5.7 MECANISMO DE AÇÃO	70
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Apesar da grande diversidade do Reino Fungi, que inclui cerca de 120 mil espécies descritas e mais de 3,8 espécies estimadas, a maioria das infecções causadas por fungos em pacientes imunocompetentes são limitadas (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017; KÖHLER *et al.*, 2017). Por isso, os efeitos nocivos destes patógenos à saúde humana eram negligenciados em detrimento de outros microrganismos, como bactérias, vírus e parasitas (BROWN *et al.*, 2012). No entanto, o aumento da população imunocomprometida, decorrente das últimas décadas de infecções imunossupressoras, causada por HIV (PANDEY; GALVANI, 2019), da realização de mais transplantes de órgãos (OLIVEIRA *et al.*, 2016), quimioterapias (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014), e recentemente a pandemia da Sars-Cov-2 geraram um expressivo acréscimo nos casos de infecções fúngicas oportunistas, crônicas e/ou disseminadas, dentre os quais, *Aspergillus fumigatus* é um dos principais agentes etiológicos (SALEHI *et al.*, 2020).

A. fumigatus é um fungo filamentoso e sapróbio, comumente encontrado em solos, águas, detritos organicamente enriquecidos, vegetação em decomposição, superfícies internas de edifícios, gesso e alvenaria. Embora seja uma espécie essencialmente ambiental, *A. fumigatus* possui alta taxa de adaptabilidade, sendo capaz de se beneficiar das deficiências imunológicas, adquiridas ou hereditárias, de um hospedeiro, para diminuir suas chances de eliminação quando os esporos são inalados, desencadeando uma série de manifestações clínicas, que vão de um quadro alérgico a infecções invasivas e/ou disseminadas com altas taxas de mortalidade (KÖHLER *et al.*, 2017; JANBON *et al.*, 2019).

Um dos fatores agravantes para a patogênese de *A. fumigatus* é a formação de biofilmes, isto é, comunidades microbianas constituídas de hifas entrelaçadas, tridimensionalmente, envolvidas por uma Matriz Extracelular Polimérica (MEP). Os biofilmes de *A. fumigatus* tornam o manejo terapêutico da aspergilose extremamente difícil, uma vez que, nesta configuração, geralmente a patogenicidade e o perfil de resistência dos isolados aumentam, em relação às células planctônicas (KEOWN *et al.*, 2020). Somado a isto, o surgimento e disseminação de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* resistentes à azóis e outras classes de medicamentos torna o tratamento da aspergilose ainda mais complexo, impactando diretamente nas taxas de sobrevida dos pacientes, bem como no tempo de internação.

Logo, em decorrência do crescente número de isolados resistentes a medicamentos, dos impactos clínico-hospitalares reais, dos fatores de virulência associados a espécie *Aspergillus fumigatus* e do limitado arsenal terapêutico disponível nestas condições, faz-se necessário a descoberta e desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas (VIEIRA E SANTOS, 2017). Estas alternativas, do ponto de vista químico-medicinal, podem surgir a partir de testes com compostos híbridos contendo o núcleo de 2-isoxazolina aza-bicíclica, uma vez que estes já demonstraram atividade biológica para outros microrganismos, e mais recentemente, apresentaram atividade antifúngica, *in vitro*, quando associados ao fluconazol em cepa fúngica resistente a azóis do gênero *Candida* (ALBUQUERQUE, 2019).

Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica frente células planctônicas e biofilmes de isolados fenotipicamente resistentes de *A. fumigatus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES ASSOCIADAS A *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus é um fungo filamentoso, sapróbio de crescimento rápido, comumente encontrado no solo sobre a matéria orgânica em decomposição, bem como, na água e ar (LATGÉ, 2001; ABAD *et al.*, 2010; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013). Tem distribuição cosmopolita e se estabelece em diversos outros ambientes, com maior prevalência do que as outras espécies do gênero, devido suas características ecofisiológicas e morfológicas (PAULUSSEN *et al.*, 2017; DALOH *et al.*, 2022). Os isolados de *Aspergillus fumigatus* normalmente são termotolerantes, xerofílicos, capazes de resistir a contínuos ciclos de dessecação-reidratação e ainda esporular (CANNON *et al.*, 2009; KRIJGSHELD *et al.*, 2012; WYATT *et al.*, 2015). Também são capazes de crescer em amplas faixas de pH, suportar altas pressões e degradar polissacarídeos de células vegetais para adquirir nitrogênio (THOM; CHURCH, 1918; ABAD *et al.*, 2010). Além disso, essa espécie possui estruturas de reprodução de pequeno tamanho (conídios) e grande hidrofobicidade que contribuem para a flutuabilidade e disseminação em ambientes internos (superfícies de edifícios, ar-condicionado, eletrodomésticos) e externos (solo, ar/aerossóis, lagos e rios) (PARIS *et al.*, 2003; PAULUSSEN *et al.*, 2017; VALSECCHI *et al.*, 2017).

De forma semelhante à sua habilidade fisiológica de persistir em diferentes condições de estresse ambiental, *A. fumigatus* é capaz de adaptar sua maquinaria enzimática e desenvolver mecanismos que permitam sua sobrevivência em humanos, animais e vegetais, tornando-se assim, um patógeno fúngico facultativo e oportunista (VALSECCHI *et al.*, 2017; BALLARD *et al.*, 2018; GONZALEZ-JIMENEZ *et al.*, 2021). Quando infectam um hospedeiro humano, as manifestações clínicas decorrentes dependem do estado imunológico do hospedeiro, bem como, da patogenicidade e virulência do fungo, sendo a porta de entrada mais comum para esta espécie a via respiratória (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013; ROSOWSKI *et al.*, 2020).

Diariamente os seres humanos inalam em média 100 a 1.000 conídios de *A. fumigatus* por dia (LATGÉ, 1999; VALSECCHI *et al.*, 2017). Devido seu pequeno tamanho, uma fração dos conídios inalados pode escapar das barreiras físicas e mecânicas das vias aéreas superiores e penetrar no trato respiratório inferior, se ligando às proteínas da lâmina basal dentro do pulmão do hospedeiro, conseguindo

suprimir a acidificação dos macrófagos por causa da camada externa de melanina que possuem (CROFT *et al.*, 2016; PEREZ-CUESTA *et al.*, 2020; STEWART *et al.*, 2020). Apesar disso, a maioria dos indivíduos saudáveis conseguem neutralizar e eliminar estas estruturas através da depuração mucociliar, atuação de macrófagos e neutrófilos e outros mecanismos de defesa (MARGALIT; KAVANAGH, 2015). Entretanto, indivíduos imunocomprometidos são incapazes de eliminar esses conídios, levando a colonização do pulmão por *A.fumigatus* (GAZENDAM *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2022).

Após a colonização, a germinação dos esporos acontece através do aumento da pressão osmótica intracelular, seguido de absorção de água, crescimento isodiamétrico, e ruptura da camada de melanina. Isto resulta na perda da camada de “rodlet” e na hidrofobicidade do propágulo (OSHEROV, 2008; BALTUSSEN *et al.*, 2020). Em seguida, os conídios, com a parede interna inalterada, crescem e formam o tubo germinativo, de onde se originam as hifas. Constituídas essencialmente de galactosaminogalactonano (GAG), fator de virulência que desempenha papel adesivo, as hifas têm a capacidade de atravessar a barreira capilar alveolar, penetrar nas células endoteliais, e chegar ao lúmen das arteríolas pulmonares (RENSHAW *et al.*, 2016). Quando tais eventos ocorrem, às hifas induzem sua própria internalização, desencadeando injúria endotelial, liberação de citocinas pró inflamatórias, expressão de fator endotelial na superfície das células, ativação da cascata de coagulação e trombose intravascular, que resulta em significativos danos teciduais (KAMAI *et al.*, 2006). Ainda, fragmentos de hifas podem se disseminar por via hematogênica, levando à invasão de órgãos profundos e necrose tecidual nos focos de infecção (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

Em decorrência do mecanismo patogênico de *A.fumigatus* e de outras espécies do gênero *Aspergillus*, os casos de aspergilose têm sido cada vez mais reportados nos últimos anos (RUDRAMURTHY *et al.*, 2019). Atualmente, estima-se que existam 3 milhões de casos de aspergilose pulmonar crônica no mundo, e 300.000 casos de aspergilose invasiva (AI) a cada ano, dentre os quais, *A. fumigatus* é o principal agente etiológico responsável (BONGOMIN *et al.*, 2017). Além disso, estudo aponta que 30 milhões de pacientes estão susceptíveis imunologicamente ao desenvolvimento da aspergilose (BONGOMIN *et al.*, 2017; FIRACATIVE, 2020; SABINO *et al.*, 2021). Isto provavelmente é reflexo do aumento mundial da população imunocomprometida, decorrente das últimas décadas de

infecções imunossupressoras, como HIV e COVID-19, e aumento na realização de transplantes, quimioterapias e corticoterapias (OLIVER, 2021; HERNÁNDEZ-SOLÍS *et al.*, 2022). No entanto, acredita-se que os números reais de pacientes predispostos e casos confirmados sejam ainda maiores do que as estimativas, visto que, os relatórios sobre a situação epidemiológica de aspergilose são escassos em muitos países (REECE *et al.*, 2019).

No Brasil, as doenças causadas por *A. fumigatus* não fazem parte da lista nacional de notificação compulsória, sendo assim dados oficiais sobre a incidência, prevalência e mortalidade destas doenças ao nível nacional não existem (COSTA *et al.*, 2019). No entanto, alguns estudos conduzidos em instituições e hospitais terceirizados fornecem um vislumbre do panorama epidemiológico do país. Um estudo retrospectivo que analisou laudos de autópsia entre 1930 e 2015 de um centro de serviço de autópsia em São Paulo, relatou a incidência de 11,2% para aspergilose, sendo o primeiro diagnóstico realizado da doença apenas em 1996, pelas dificuldades metodológicas para identificar o patógeno até aquela década (DANTAS *et al.*, 2021). Este estudo também afirmou que a condição de base associada a estas infecções era o câncer. A pesquisa de Zicker e colaboradores (2011) que observaram a epidemiologia de infecções fúngicas em pacientes transplantados, relataram a incidência de 9% de aspergilose. E ainda, mais recentemente, foram descritos casos de aspergilose associada a COVID-19 em um centro de referência brasileiro, com taxa de mortalidade de 71,4% (DE ALMEIDA, 2022).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A espécie *Aspergillus fumigatus* exibe muitos fatores de virulência que determinam seu caráter infeccioso e oportunista. Estudos supõem que a espécie adquiriu muitos destes fatores, ao longo dos anos, para poder sobreviver em nichos ecológicos competitivos, como solo e água (TEKAIA; LATGÉ, 2005; FULLER *et al.*, 2011; CASADEVALL, 2012; BRIARD *et al.*, 2015; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2017). Outros modelos experimentais sugerem que a transição de fungo ambiental para fungo infeccioso ocorreu devido a “virulência de uso duplo”, uma vez que os mecanismos para evitar a predação ambiental são semelhantes aos mecanismos utilizados pelo fungo para escapar do sistema imune inato do hospedeiro (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; VAN WAEYENBERGHE *et*

al., 2013; HILLMANN *et al.*, 2015). No entanto, ainda há muito para ser definido sobre a origem evolutiva dos mecanismos de virulência de *A. fumigatus* e o consenso estabelecido é a virulência ser multifatorial (VAN DE VEERDONK *et al.*, 2017).

Dos fatores de virulência conhecidos, os mais citados são geralmente os associados ao tamanho, adesão e resistência dos conídios; à taxa de germinação das hifas; à produção de metabólitos secundários; aquisição de ferro e formação de biofilme (CROFT *et al.*, 2016). Porém, acredita-se que tal espécie expresse muito mais fatores de virulência, os quais não foram elucidados (BORAL *et al.*, 2018).

2.2.1 Conídios

Os conídios são os propágulos infecciosos de *A. fumigatus*. Tem pequeno diâmetro (2,0-3,5 μm) e sua taxa de germinação acontece de 37 até 50 °C. Estruturalmente, estes são compostos por três camadas: a camada externa, a camada intermediária, e a camada interna (LATGÉ; BEAUVAIS; CHAMILOS, 2017).

A camada superficial, onde estão as proteínas hidrofóbicas ou “*rodlets*”, é responsável pela flutuabilidade dos conídios, contribuindo conseqüentemente para a dispersão desse fungo no ambiente. Ainda, junto com a melanina, as “*rodlets*” são capazes de mascarar os Padrões Moleculares Associados Patógenos (PAMPS) presentes na parede celular fúngica e impedir seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (AIMANIANDA *et al.*, 2009; AIMANIANDA; LATGÉ, 2010).

A camada intermediária, composta principalmente de melanina dihidroxinaftaleno, é importante para estruturação e rigidez da parede celular dos conídios, sendo considerada como uma barreira protetora para o estresse biótico e abiótico (LATGÉ; BEAUVAIS; CHAMILOS, 2017). Também é descrito que a melanina tem ação anti-fagocítica, dado que inibe o complexo NADPH oxidase (conferindo resistência ao ataque oxidativo do hospedeiro), neutralizando a fagocitose associada à LC3 (essencial para morte intracelular de conídios) e bloqueando a acidificação do fagossomo (JAHN *et al.*, 2002; CHAMILOS *et al.*, 2016). Por tais motivos, a ausência de melanização nos conídios tem sido associada com a atenuação da virulência (AKOUMIANAKI *et al.*, 2016).

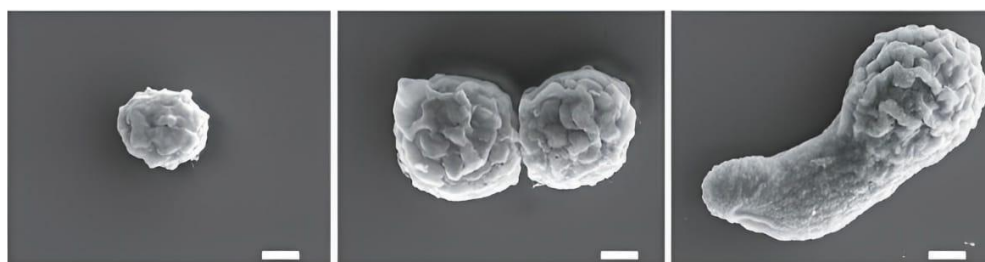
Por último, a camada de polissacarídeos atua como um escudo para os conídios devido às propriedades imunomoduladoras (BRIARD *et al.*, 2016). Um dos

principais polissacarídeos, a glucana, além de mascarar os PAPMs, têm papel adesivo entre conídios e hifas em germinação (CLAVAUD *et al.*, 2012). Já a galactomanana está associada ao perfil de resposta imune que favorece a infecção fúngica. Esta camada ainda possui muitas adesinas, importantes para germinação e interação com as células epiteliais do hospedeiro (ABAD *et al.*, 2010).

2.2.2 Germinação dos conídios

Em condições favoráveis, na natureza e no hospedeiro, os conídios podem germinar de 1 a 18 horas (DANION *et al.*, 2021). Durante a germinação dos conídios (**Figura 1**), a superfície celular fúngica passa por diversas modificações que levam a perda das estruturas das camadas externas (melanina e proteínas “rodlets”) e a expressão de Galactosaminogalactano (GAG) na parede celular (LATGÉ; BEAUVAIS; CHAMILOS, 2017). Este último composto, é um dos principais fatores de virulência expressos durante a transição de conídios a hifas, e estão envolvidos em várias interações com o hospedeiro, incluindo a adesão às células hospedeiras, evasão e modulação da resposta imune e ativação plaquetária (SPETH *et al.*, 2019).

Figura 1 - Germinação de conídios de *A. fumigatus* através da análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).



Fonte: Adaptado de Lamon *et al.*, (2023).

Estudos revelam que a deficiência na expressão do GAG por cepas de *Aspergillus fumigatus* reflete em baixa aderência, e consequente baixa colonização e disseminação do fungo (FULLER *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, o GAG também prejudica o reconhecimento das hifas pelas lectinas 1 do tipo C, o que implica na supressão de algumas respostas inflamatórias do hospedeiro (GRAVELAT *et al.*, 2013).

Quanto à atuação em neutrófilos, autores sugerem que o GAG age por dois mecanismos para impedi-los: induzindo a apoptose e conferindo resistência à morte

por armadilhas extracelulares de neutrófilos (ROBINET *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015). Ele também possui efeitos imunomoduladores, promovendo um padrão de citocinas que regula negativamente a resposta TH1 e favorece a resposta TH2. Resposta esta que não é eficiente ou protetora e contribui para o crescimento fúngico (GRESNIGT *et al.*, 2014).

Em contraste com as interações citadas acima, constatou-se que o GAG também pode acionar a resposta antimicrobiana através da ativação plaquetária (RAMBACH *et al.*, 2015). Contudo, a ativação e degranulação das plaquetas pode contribuir também para patogênese do fungo, uma vez que causam agregação plaquetária e trombose, particularidades de uma infecção fúngica pulmonar (STANZANI *et al.*, 2015; SPETH *et al.*, 2019).

2.2.3 Metabólitos secundários

O gênero *Aspergillus* produz uma notável variedade de metabólitos secundários, isto é, moléculas bioativas não envolvidas no crescimento fúngico, mas que desempenham papel fundamental na adaptação e virulência do microorganismo (VADLAPUDI *et al.*, 2017). Entre os 226 compostos produzidos pela espécie *A. fumigatus* a gliotoxina e fumagilina, sobressai-se a nível de compreensão biológica e genética, sendo os metabólitos mais investigados nas últimas décadas (FRISVAD *et al.*, 2009).

A gliotoxina, um tipo de epipolítiodioxopiperazina, atua através de diversos mecanismos para mediar a citotoxicidade celular, como: 1) antiangiogênese; 2) indução de apoptose; 3) Imunossupressão e 4) genotoxicidade. A ação antiangiogênica ocorre por meio da redução da produção de ROS e a supressão de NF- κ B (fator nuclear kappa B), um regulador transcricional de resposta pró-inflamatória do hospedeiro (KNOWLES *et al.*, 2020). A imunossupressão ocorre principalmente pela capacidade da gliotoxina de facilitar a evasão do fungo do sistema fagocitário, e reprimir a proliferação de células gigantes e células T (ZHANG *et al.*, 2019; GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2022). Já a indução da apoptose pode acontecer em decorrência de distintos mecanismos de sinalização via fosforilação e estresse oxidativo. Além disso, estudos revelam que a gliotoxina pode induzir danos ao DNA e mitocôndrias de células epiteliais pulmonares (JIA *et al.*, 2014).

A fumagilina, micotoxina isolada primeiramente em 1949, também tem grande papel na virulência, e tem como alvo a MetAP (enzima metionina aminopeptidase)

do tipo 2 (FALLON; REEVES; KAVANAGH, 2011). A atividade desta MetAP é essencial para a viabilidade celular por estar relacionada à síntese de novas proteínas (ESA *et al.*, 2022). Logo a ligação irreversível e a inativação da mesma realizada pela fumagilina implica diretamente na integridade celular do hospedeiro (GURUCEAGA *et al.*, 2018). Além disso, a fumagilina também está associada com a promoção de eritrocitose e de efeitos citotóxicos e citostáticos em linhagens celulares susceptíveis (GURUCEAGA *et al.*, 2019).

Cabe ressaltar que outros metabólitos secundários biossintetizados por *Aspergillus fumigatus* como fumitoxinas, fumigaclavinas A e C, fumitremorginas, tripacidina, pseurotinas, ácido helvólico, piripiropenos, metil-sulocrina, verruculogênio, fumiquinazolininas também estão envolvidos com o comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, e alguns deles não sejam considerados micotoxinas reguladas (ARASTEHFAR *et al.*, 2021). Há também uma grande variedade de enzimas que como metaloproteases, proteases alcalinas, aspartil protease, serina protease e elastases, que tem impacto direto na patogenia no hospedeiro (RODRIGUES, 2016).

2.2.4 Aquisição de ferro

Sabe-se que a absorção de macro e micronutrientes é fundamental para o crescimento e a patobiologia de fungos. Por isso, *A. fumigatus*, como um grande competidor de nicho, desenvolveu diversos mecanismos para adquirir nutrientes eficientemente, entre os quais está o ferro (VAN DE VEERDONK *et al.*, 2017).

O ferro é um cofator indispensável para diversos processos metabólicos, e seu papel na virulência está relacionado com o crescimento intracelular dos conídios e a sobrevivência dos mesmos durante a fagocitose (HAAS, 2012; GERWIEN *et al.*, 2018). A aquisição deste metal durante a infecção representa um desafio, uma vez que sua disponibilidade é baixa e depende também da imunidade nutricional do paciente (VAN DE VEERDONK *et al.*, 2017).

As formas conhecidas de captação de ferro por *A. fumigatus* são por sistema de assimilação redutora de ferro, permeases metálicas gerais, e sideróforos (PEREZ-CUESTA *et al.*, 2021). Estes últimos destacam-se por ter papel altamente especializado em *A. fumigatus* e serem capazes de se ligar ao ferro extracelular com muita afinidade, sendo a falta ou defeito desse sistema associada à virulência

atenuada (EISENDLE *et al.*, 2006; SCHRETTL *et al.*, 2007; GSALLER *et al.*, 2012; GERWIEN *et al.*, 2018).

2.2.5 Biofilmes

Biofilmes são definidos como comunidades estruturadas e complexas (**Figura 2**), compostas de células firmemente aderidas entre si e a uma superfície biótica ou abiótica, envoltas por uma matriz extracelular polimérica (MELLO *et al.*, 2016). Embora seja um modo de crescimento microbiano comum na natureza, evidências claras comprovam que a capacidade e intensidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência para muitos microrganismos, incluindo, *A. fumigatus* (IKEDA.; SUGIMOTO; KUME, 2018).

A produção de biofilmes acentua a virulência dos isolados, uma vez que, neste modo, os fungos podem estabelecer-se como comunidades em superfícies, biomateriais, e em dispositivos médicos implantados (cateteres, marcapassos cardíacos, válvulas cardíacas, próteses articulares, etc.) promovendo rotas alternativas de infecção, além da via respiratória (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2011). Além disso, no hospedeiro, a transição morfológica para uma forma mais complexa estruturalmente favorece a invasão, colonização e multiplicação de *A. fumigatus* em outros tecidos e órgãos (RAMMAERT, 2018).

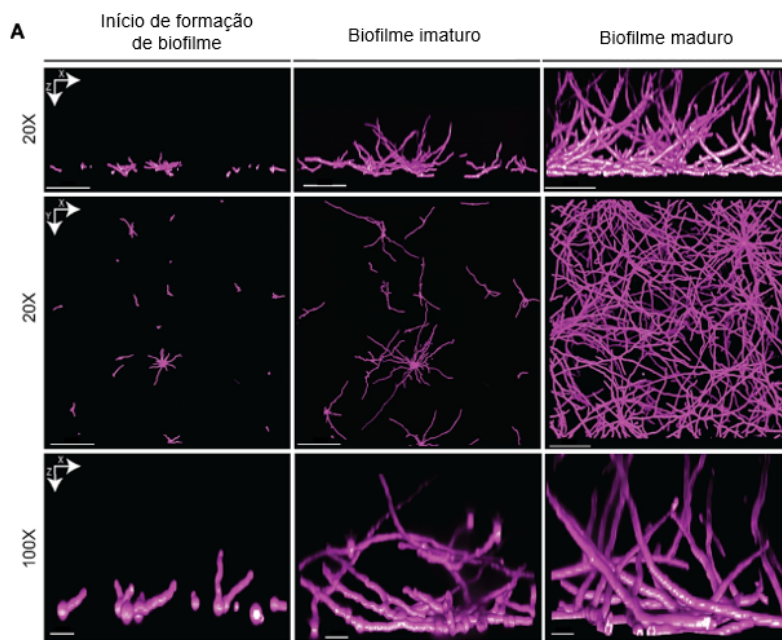
Quando comparadas às células planctônicas, as células incorporadas no biofilme são rigorosamente mais resistentes aos antimicrobianos convencionalmente utilizados, e possuem diversos e distintos mecanismos para evadir-se eficientemente as células efetoras do hospedeiro (SWAPNAJA *et al.*, 2016). Por isto, a presença de biofilmes na aspergilose se correlaciona com a diminuição da susceptibilidade antifúngica e falhas do tratamento terapêutico (PERDONI, 2015).

Entre os mecanismos de resistência exibido pelos biofilmes de *A. fumigatus*, acredita-se que a MEP, formada de polissacarídeos, galactosaminogalactana, proteínas e lipídios, desempenhe um papel fundamental na resistência, dado que, ela une de forma coesa as hifas e promove um ambiente de comunicação entre as células e transferência horizontal de genes de resistência (ARBARI; KJELLERUP, 2015; RIARD *et al.*, 2016). Além disso, ela serve como uma barreira física, impedindo a penetração e difusão dos antifúngicos, e semelhantemente, impedindo a ação dos leucócitos. Outro fator que contribui para a resistência é a presença de bombas de efluxo de resistência a múltiplos medicamentos, que estão envolvidas na

extrusão ativa de moléculas antimicrobianas, incluindo azóis, polienos e equinocandinas. Há também alterações e/ou superexpressão de moléculas alvo, tolerância e densidade celular limitadas, entre outros mecanismos (VAN DE SANDE *et al.*, 2010; FRANCISCO; BRAGA, 2022).

O processo de formação de biofilmes de *A. fumigatus* é cíclico, sequencial, e resumidamente inclui quatro estágios: adesão e germinação de conídios (10 horas); entrelaçamento das hifas e formação de monocamadas (10-16 horas); aumento de complexibilidade e maturidade estrutural (18-24 horas); dispersão do biofilme (48-72 horas) (SAUER *et al.*, 2022). O primeiro estágio consiste na adesão e germinação de conídios das células planctônicas ao substrato. Esta operação é realizada por processos físicos e biológicos que dependem de interações eletrostáticas, hidrofobicidade dos conídios, e da rugosidade das superfícies que pode ser biótica e abiótica, por isso, a ligação é considerada instável e reversível (CRAMER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2022). O segundo estágio inicia-se quando a força de repulsão eletrostática entre célula e substrato é superada, tornando a adesão sólida e irreversível. Ainda, nesta fase ocorre a produção da MEP, composta por melanina, proteínas, monossacarídeos, 1,3 glucano e DNA extracelular, que une as hifas de forma coesa e fornece complexibilidade estrutural e profundidade dos biofilmes. Além disso, a MEP garante a captação de nutrientes e de mais células planctônicas para constituir o biofilme e impede a penetração de antifúngicos (KAUR; SINGH, 2014). Em seguida, as células adsorvidas se multiplicam formando microcolônias, e amadurecem dentro da estrutura tridimensional da matriz, sendo agora chamado de biofilme maduro. Por fim, quando o biofilme atinge a espessura máxima e os nutrientes não são capazes de suprir a necessidade de toda comunidade, ocorre o fenômeno de dispersão, em que algumas células do biofilme se desprendem e dispersam formando novos biofilmes (RAJENDRAN *et al.*, 2013; MORELLI; KERKAERT; CRAMER, 2021).

Figura 2 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência representativas de biofilmes de *A. fumigatus* durante os principais estágios de desenvolvimento.



Fonte: Adaptado de Morelli, Kerkaert e Cramer (2021).

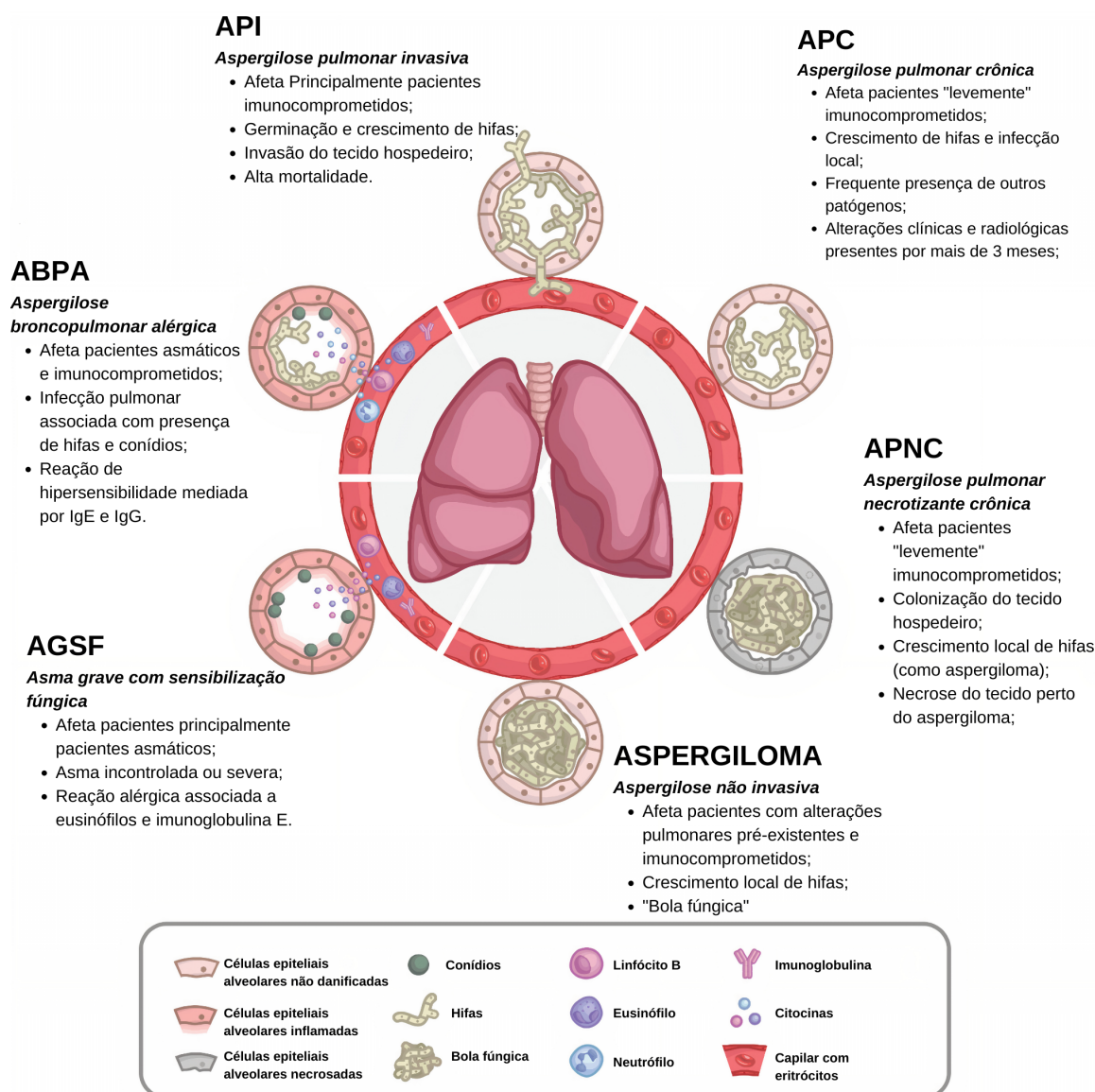
Cabe ressaltar que os biofilmes de *Aspergillus fumigatus* podem apresentar diferentes configurações tridimensionais. No aspergiloma, estudos descrevem que as hifas dos biofilmes são numerosas e estão intimamente entrelaçadas e compactadas, formando uma massa esférica de hifas chamada de “bola fúngica”. Em contraste, na Aspergilose Invasiva (AI) as hifas dos biofilmes estão entrelaçadas de forma difusa (RAMAGE *et al.*, 2011). Estas diferenças podem ser parcialmente explicadas pela localização diferencial do α 1,3-glucano, um componente da MEP, nos biofilmes. No aspergiloma, α 1,3-glucano na MEP medeia a aglutinação de hifas, enquanto em AI, α 1,3-glucano está presente na camada interna da parede celular, o que leva a separação e difusão das hifas (BEAUVAIS; LATGÉ, 2015).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

Como citado anteriormente, a manifestação clínica das infecções causadas por *A. fumigatus* depende tanto da imunidade do hospedeiro quanto da patogenicidade do isolado de *A. fumigatus* (**Figura 3**). No entanto, o órgão comumente afetado é o pulmão, devido à inalação contínua de conídios de *Aspergillus* sp. e a colonização no trato respiratório. De forma geral, aspergilose

inclui três principais formas clínicas: alérgica (aspergilose broncopulmonar alérgica, sinusite alérgica), crônica e saprofítica (aspergilose pulmonar crônica, otomicoses, aspergiloma), invasiva (aspergilose pulmonar invasiva, endocardite, traqueobronquite, formas disseminadas) (HARMOUCHI *et al.*, 2020). Manifestações clínicas superficiais também podem ocorrer, como ceratite e onicomicoses. Ademais, com menor frequência, pacientes podem ter fungemia secundária ao foco pulmonar e apresentar invasão do sistema nervoso central por contiguidade da sinusite (CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2021).

Figura 3. Visão geral esquemática das doenças pulmonares causadas por *Aspergillus fumigatus*.



Fonte: Adaptado de Verburg *et al.*, (2022).

2.3.1 Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)

Descrita pela primeira vez em 1952, a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) é uma condição pulmonar alérgica causada por uma reação de hipersensibilidade mediada por imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG) aos antígenos de *Aspergillus fumigatus*, e outras espécies do mesmo gênero (HINSON *et al.*, 1952; GAGO; SHAH; PANJABI, 2016; DENNING; BOWYER, 2019). Ela afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos ou aqueles com doença pulmonar subjacente, como asma e fibrose cística, e se apresentam comumente na terceira à quinta década de vida (VITTE *et al.*, 2017).

Devido à falta de dados robustos sobre a prevalência de ABPA no mundo, estimava-se que o total era de 4 milhões de pessoas afetadas. No entanto, atualmente, acredita-se que o número real de pacientes com ABPA exceda 4,8 milhões de pessoas, com tendência de aumento, dado a fragilidade pulmonar da população causada pela pandemia de COVID-19 (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013; CAGGIANO *et al.*, 2022). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), sugerem que na África a incidência estimada de ABPA variem de 117.000 a 587.000, no Sudeste Asiático de 202.000 a 1.009.000, na Europa de 297.000 a 1.487.000 e nas Américas de 409.000 a 2.045.000. Os dados ainda estimam que 4.837.000 dos 193 milhões de pacientes com asma ativa desenvolverão ABPA (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013). No Brasil, não é possível estabelecer uma prevalência precisa de ABPA, tendo em vista que mesmo após 30 anos do primeiro caso diagnosticado no Brasil, menos de 15 artigos abordam a temática (SANTOS; DA FONSECA; BARROS, 2021). No entanto, estima-se que esse número pode chegar a mais de 480 mil pacientes (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013).

Os sintomas da ABPA são semelhantes ao da exacerbação da asma e fibrose cística pulmonar e podem incluir sibilância, hiperreatividade brônquica, bronquiectasias centrais associadas a broncorreia crônica, e tosse produtiva com expectoração acastanhada contendo hifas. Pode ainda surgir outros sintomas inespecíficos como astenia, anorexia, mialgia, febre baixa e hemoptises (SHAH; PANJABI, 2016; PATEL *et al.*, 2019).

O diagnóstico de ABPA é baseado em uma combinação de características clínicas, sorológicas e radiológicas, e inclui a: verificação da hiperreatividade cutânea imediata ao antígeno de *A. fumigatus*; análise e quantificação dos níveis

séricos totais de IgE e IgG específica para *A. fumigatus*; radiografias e tomografia computadorizada de tórax que podem evidenciar consolidações, nódulos centrolobulares, opacidades parenquimatosas pulmonares fugazes, bronquiectasias centrais, muco com elevada atenuação e aprisionamento de ar; e testes para verificar a obstrução ao fluxo aéreo (ROSENBERG *et al.*, 1977; WANG *et al.*, 1978; GREENBERGER, 2013; AGARWAL *et al.*, 2013). No entanto, não há um protocolo único preconizado para o diagnóstico, sendo os critérios de diagnóstico propostos por vários autores sumarizados no **quadro 1**.

Quadro 1 – Critérios diagnósticos de ABPA.

CRITÉRIOS DE ROSENBERG-PATTERSON	CRITÉRIOS DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE MICOLOGIA HUMANA E ANIMAL	NOVOS CRITÉRIOS PARA DOENTES SEM FIBROSE CÍSTICA	CRITÉRIOS UTILIZADOS NA FIBROSE CÍSTICA
Critérios maior: • Asma; • Presença de infiltrados pulmonares transitórios (<i>fleeting shadows</i>); • Reatividade cutânea imediata para <i>Aspergillus</i> sp.; • Elevação da IgE total; • Precipitinas positivas para <i>Aspergillus</i> sp.; • Eosinofilia periférica; • Elevação da IgE e IgG específicas para antígenos de <i>Aspergillus</i> sp.; Critérios menores: • Expectoração com “rolhões” de muco acastanhado; • Cultura de expectoração positiva para <i>Aspergillus</i> sp.; • Reatividade cutânea tardia para <i>Aspergillus</i> sp. . Observação: Para o diagnóstico é necessário cumprir 5 critérios maiores e 3 critérios menores	Critérios essenciais (um tem de estar presente): • Asma; • Fibrose cística. Critérios obrigatórios (ambos têm de estar presentes): • Níveis detectáveis de IgE específica para <i>Aspergillus</i> sp. (> 0,35 kU/L) ou testes cutâneos de picada positivos para o fungo; • Elevação da IgE total (tipicamente > 1000 IU/ mL, mas se o paciente cumprir todos os outros critérios, um valor < 1000 IU/mL pode ser aceitável, especialmente se os níveis de IgG específica forem > 27 mg/L). Outros critérios (pelo menos dois têm de estar presentes): • Precipitinas de <i>Aspergillus</i> sp. ou elevação da IgG específica por imunoensaio (> 27 mg/L); • Opacidades pulmonares radiológicas consistentes com ABPA; • Eosinofilia > 500 células/μL em doentes glucocorticoides-naïve.	• História atual ou prévia de asma ou sintomas asmáticos; • Eosinofilia periférica $\geq$ 500 células/mm^3; • IgE total sérica $\geq$ 417 IU/mL; • Reatividade cutânea imediata ou IgE específica positiva para fungos filamentosos; • Precipitinas positivas ou IgG positiva para fungos filamentosos; • Crescimento de fungos filamentosos em cultura de expectoração ou lavado broncoalveolar; • Presença de hifas fúngicas no muco brônquico; • Bronquiectasias centrais na tomografia torácica; • Impactação mucóide nos brônquios centrais observável na tomografia torácica/broncoscopia, ou história de expectoração com “rolhões” de muco;; Observação: Os pacientes que cumpram pelo menos 6 critérios são diagnosticados com ABPA ou micose fúngica; Os fungos filamentosos nos critérios devem ser idênticos.	Presentes dois dos seguintes três: • Testes cutâneos positivos para <i>Aspergillus</i> sp.; • Precipitinas para <i>Aspergillus</i> sp.; • IgE total sérica > 1000 IU/mL. E pelo menos dois dos seguintes seis: • Broncoconstrição • Eosinofilia periférica > 1000/μL; • História de infiltrados pulmonares; • Elevação de IgE/IgG específica <i>Aspergillus</i> sp.; • Crescimento de <i>Aspergillus</i> sp. em cultura ou esfregaço de expectoração; • Resposta a corticoterapia.

Fonte: Adaptado de Abreu, Silva e Plácido (2022).

2.3.2 Aspergiloma

O aspergiloma (bola fúngica), é um tipo não invasivo de aspergilose pulmonar crônica caracterizado por um aglomerado de material fúngico viável e morto, células inflamatórias, fibrina, muco, sangue e detritos do parênquima pulmonar, presente em uma cavidade pré-existente, normalmente lobo superior ou brônquio dilatado (RUSSO et al., 2020). Devido à necessidade de estabelecer-se em uma cavidade pré-existente, pacientes com câncer de pulmão, fibrose cística, tuberculose, pneumoconiose, abscessos pulmonares, entre outros são susceptíveis ao desenvolvimento do aspergiloma (HERNÁNDEZ-SOLÍS et al., 2022). Além disso, estima-se que a incidência de aspergiloma em pacientes com aspergilose pulmonar crônica seja de 25% (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013).

A depender da resposta imune do hospedeiro, a constituição, propensão à invasão fúngica do parênquima, e sintomatologia podem variar. Normalmente, os pacientes são assintomáticos, dificultando o diagnóstico. No entanto, quando apresentam sintomas o principal é a hemoptise, que pode transformar-se em uma hemorragia maciça e fatal em alguns casos. Outros sintomas também são relatados como: tosse crônica, fibrose pulmonar, anorexia e febre (CHAKRABORTY, 2022; KESKIN; DIROL; BOZKURT, 2022).

De acordo com a suspeita clínica, o diagnóstico de aspergiloma é realizado através da combinação de evidência radiológica e sorológica ou microbiológica direta das espécies de *Aspergillus* sp. Os resultados de exames de imagens normalmente mostram uma massa sólida arredondada, por vezes móvel, dentro de uma cavidade esférica ou oval, e separada da parede da cavidade por um espaço aéreo de tamanho e forma variáveis. A fibrobroncoscopia pode auxiliar no diagnóstico do aspergiloma (SEHGAL et al., 2019; HARMOUCHI et al., 2020).

Ademais, cabe ressaltar que a presença de aspergiloma pulmonar está relacionada com a resistência antifúngica e falhas no tratamento da aspergilose crônica pulmonar uma vez que a penetração de medicamentos antifúngicos na bola fúngica é reduzida (LACHANAS et al., 2005; LANG et al., 2020).

2.3.3 Aspergilose Invasiva (AI)

A aspergilose invasiva é a manifestação mais grave da aspergilose e apresenta altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos, principalmente neutropênicos (GREGG; KAUFFMAN, 2015). É uma doença

agressiva que consiste na intrusão de hifas de *Aspergillus* sp. na parede brônquica e arteríolas pulmonares, que resulta em hemorragias, trombose e necrose (BARNES; MARR, 2006; BINDER; LASS-FLÖRL, 2013). Além disso, a aspergilose pode difundir-se por via hematogênica, e atingir outros órgãos como cérebro (levando a convulsões, infartos cerebrais, hemorragia intracraniana, meningite e abscesso epidural), pele (aspergilose cutânea), rins, pleura, coração (endocardite), olhos (endoftalmite) esôfago e fígado (DAGENAIS; KELLER, 2009; CHALLA, 2018).

A sintomatologia da aspergilose invasiva é variável, inespecífica e depende dos locais afetados. Geralmente os pacientes apresentam dor pleurítica, tosse produtiva, dispneia, e febre não responsiva a antibióticos. Hemoptise leve também é relatada em pacientes com aspergilose invasiva. No entanto, a hemoptise grave é mais comum em pacientes neutropênicos (PAULUSSEN *et al.*, 2016).

Em virtude dos sintomas clínicos inespecíficos, o diagnóstico da aspergilose invasiva constitui-se um desafio na prática clínica. Embora os métodos de diagnósticos convencionais baseados em cultura e histologia de amostras clínicas continuem sendo essenciais para o diagnóstico (SCHAUWVLIEGHE, 2018); Outros critérios importantes devem ser considerados, como: evidências radiológicas de infecção do trato respiratório inferior (normalmente com a presença de múltiplos infiltrados, nódulos com uma zona opaca ao redor, chamado sinal de halo); testes imunológicos, sorológicos e moleculares para detecção de antígenos de *Aspergillus* sp., características relacionadas ao paciente, como neutropenia ou febre (LASS-FLÖRL, 2019).

2.4 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA ASPERGILOSE E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

A eficácia da terapia antifúngica depende do perfil de sensibilidade dos isolados, do estado imunológico do hospedeiro e do diagnóstico precoce. As principais classes de antifúngicos utilizados para o tratamento da aspergilose são os azóis, polienos e equinocandinas (PAULUSSEN *et al.*, 2016; VAN DE VEERDOONK *et al.*, 2017).

2.4.1 Azóis

Os antifúngicos azólicos compreendem anéis heterocíclicos de cinco membros com dois (imidazóis) ou três (triazóis) átomos de nitrogênio. Atualmente,

constitui-se como a classe de medicamentos mais empregada em tratamentos e prevenção de infecções fúngicas, incluindo as invasivas, por possuir um amplo espectro de ação. Além disso, a classe conta com mais de 40 medicamentos, dentre os quais destacam-se: voriconazol, itraconazol, clotrimazol, cetoconazol, fluconazol, posaconazol e isavuconazol (SHAFIEI *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação compartilhado por todos os medicamentos azólicos consiste na inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51), afetando na biossíntese do ergosterol fúngico. Este, é o principal e fundamental componente da membrana celular fúngica, e atua como um biorregulador de integridade, fluidez e assimetria da mesma. Além disso, o ergosterol é um importante fator de proliferação das células fúngicas (CHANDRIKA; SHARMA, 2020). Desta forma, o bloqueio na biossíntese do ergosterol resulta na alteração da permeabilidade e fluidez normais da membrana da célula fúngica, o que impacta na atividade de enzimas ligadas à membrana e acarreta na inibição de crescimento e replicação de células fúngicas (ZAVREL; WHITE, 2015; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016).

Embora os azóis, principalmente o voriconazol, aumente a taxa de sobrevivência de pacientes com aspergilose invasiva e constitua-se como primeira linha de tratamento da aspergilose, o surgimento de isolados de *Aspergillus sp.* resistentes a azóis tem ameaçado a eficácia esta classe (LESTRADE *et al.*, 2019). Em um estudo, Fuhren *et al.*, (2015) revelam altas incidências de resistência ao voriconazol (16,2%) para isolados de *A. fumigatus* em pacientes de alto risco. Já Resendiz-Sharpe *et al.*, (2019) reportaram uma taxa de resistência ao voriconazol de 19% em pacientes com aspergilose invasiva e doenças hematológicas subjacentes, e associaram esta resistência ao aumento de 21% na taxa de mortalidade desses pacientes. Os mecanismos de resistência adquirida de *A. fumigatus* a azóis estão comumente relacionados a mutações da CYP51A. No entanto, outros mecanismos mediados por bombas de efluxo multirresistentes também são citados (SHARMA *et al.*, 2015; NABILI *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2021; RHODES *et al.*, 2022).

2.4.2 Polienos

Os polienos são uma classe de medicamentos anfifílicos, caracterizados quimicamente pela existência de átomos de carbono ligados por numerosas ligações duplas, sendo muitos delas conjugadas e alternadas. O principal representante dos

polienos é a anfotericina B, porém existem outros medicamentos como nistatina, natamicina, filipina, partricina (AGUIRRE; HAMID, 2015; STONE *et al.*, 2016).

A anfotericina B (AmB) é um medicamento de amplo espectro, utilizado em ambiente hospitalar, para o tratamento de uma gama de infecções fúngicas invasivas. Para o tratamento da aspergilose, a ANF é administrada nos casos de infecções resistentes aos medicamentos azóis. Sua ação ocorre através de sua ligação com o ergosterol da célula fúngica, formando um complexo. Isto resulta no aumento da permeabilidade da membrana, vazamento do conteúdo citoplasmático e, finalmente, na morte da célula fúngica. Sendo assim, os polienos são fungicidas (BRÜGGEMANN; JENSEN; LASS-FLÖRL, 2022).

Vale mencionar que embora tenha um bom efeito terapêutico para o tratamento da AI e outras manifestações da aspergilose, as altas taxas de toxicidade e efeitos colaterais como nefrotoxicidade, flebite, colaterais gastrointestinais, como diarreia, náuseas e vômitos, distúrbios eletrolíticos, restringem seu uso (CAROLUS *et al.*, 2020).

Embora a resistência a anfotericina B ocorra em menor frequência quando comparada à resistência aos azóis, muitos relatos descrevem o progressivo aumento deste tipo de resistência em isolados de *Aspergillus* sp. (AZZOLA *et al.*, 2004; STEINBACH *et al.*, 2004; HADRICHS *et al.*, 2012; BARCHIESI *et al.*, 2013). A maior taxa de resistência foi registrada em um estudo conduzido na Índia (92%) (KATHURIA *et al.*, 2015), seguido por um estudo na França (84%) (HADRICHS *et al.*, 2012). No entanto, a prevalência exata de espécies de *Aspergillus* sp. resistentes a AmB não foi determinada até o momento.

Os mecanismos pelos quais os isolados de *Aspergillus* sp. adquirem resistência a anfotericina B ainda não estão elucidados, porém, suspeita-se que envolva a diminuição da concentração de ergosterol na membrana celular e o aumento de produção de catalases que promove a proteção da célula fúngica do estresse oxidativo (GONÇALVES *et al.*, 2016).

2.5 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

A urgência de ampliar o arsenal terapêutico antifúngico, devido ao aumento de isolados multirresistentes de *A. fumigatus*, leva a comunidade científica a buscar novas estratégias e/ou compostos para o manejo mais efetivo das infecções fúngicas (LI; ELA; CALDERONE, 2020). Neste contexto, a hibridização molecular

constitui-se como uma importante estratégia, dentro da química medicinal, para obter compostos bioativos com um bom perfil de estabilidade química e atividade biológica (IVASIV *et al.*, 2019).

A hibridização molecular é um método de criação de novos protótipos, isto é, substâncias com relação estrutura-atividade confirmadas, baseado na combinação de duas subunidades bioativas. Esta combinação gera *scaffolds*, os quais são estruturas híbridas que devem manter as características pré-selecionadas dos modelos originais (ARAÚJO *et al.*, 2015; IVASIV *et al.*, 2019). Entre os benefícios e objetivos do planejamento e síntese de compostos a partir da hibridização estão: a minimização de reações adversas ou efeitos secundários indesejáveis; sinergismo farmacológico; e a interação de uma única molécula com vários alvos farmacológicos, o que pode diminuir a indução de mecanismos de resistência por microrganismos (SANTOS, 2020).

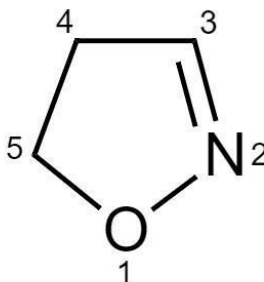
Em razão da grande versatilidade proporcionada pelo método de hibridização molecular, e ampla diversidade de grupos farmacofóricos, há várias possibilidades para síntese de híbridos moleculares ativos contra fungos (NERY *et al.*, 2020). Neste contexto, compostos heterocíclicos, como as isoxazolininas (**Figura 4**) desperta o interesse de muitos pesquisadores para hibridização, uma vez que quimicamente são fáceis de obter e possuem versatilidade quanto às substituições em sua estrutura (REIS *et al.*, 2011). Além disto, estas moléculas já apresentaram diversas atividades biológicas anteriormente na literatura, como antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antinociceptiva, anticoagulante e antitumoral (SARKER; NAHAR, 2011; STEFANI, 2009; TAVARES, 2010; PATEL; MEHTA, 2017; BASAPPA, 2003; KALIRAJAN *et al.*, 2012; SADASHIVA *et al.*, 2003; GHIDINI *et al.*, 2015).

Semelhantemente, as hidrazonas (**Figura 5**), compostos orgânicos relacionados com cetonas e aldeídos, são considerados importantes para a síntese de compostos heterocíclicos e subunidades de interesse para hibridização (APRAHAMIAN, 2017). Isto ocorre porque estes compostos possuem diversas propriedades biológicas e farmacológicas descritas na literatura como antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, anti-tubercular, antiviral, anticancerígeno (LIU *et al.*, 2009; KAREEM *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2020; KHODJA *et al.*, 2020). Além disso, outros estudos revelam exploram atividade antiplaquetária, antimalárica, anticonvulsivante, cardioprotetora, anti-helmíntica, anti-protozoária, anti-tripanosossoma, anti-esquistossomose e etc (ROLLAS, 2007;

NARASIMHAN; KUMAR; SHARMA, 2010; NARANG; NARASIMHAN; SHARMA, 2012; KAJAL *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA, 2020).

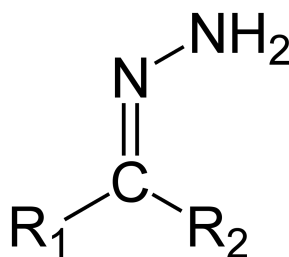
Assim, estes dois compostos são particularmente valiosos em vários métodos sintéticos para a obtenção de produtos químicos bioativos, uma vez que suas estruturas facilitam a modificação dos substituintes (WANG *et al.*, 2023;). Ademais, suas arquiteturas permitem uma possível ligação de alta afinidade a muitos alvos ou múltiplos receptores distintos, auxiliando no desenvolvimento de medicamentos inovadores com aplicações terapêuticas originais (MISHRA; PATEL; HALPANI, 2019). Portanto, os químicos medicinais têm se interessado em desenvolver e testar compostos contendo hidrazonas e isoxazolina (SHAO; APRAHAMIAN, 2020).

Figura 4 – Estrutura química da isoxazolina



Fonte: Sarker, Nahar (2011).

Figura 5 – Estrutura química da hidrazona



Fonte: VERMA *et al.*, (2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial antifúngico de híbridos moleculares de 2-isoxazolina aza-bicíclica frente células planctônicas e biofilmes de isolados fenotipicamente resistentes à azóis e polienos de *Aspergillus fumigatus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos híbridos moleculares frente aos isolados resistentes de *Aspergillus fumigatus*;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação dos híbridos moleculares;
- Avaliar a ação dos compostos híbridos selecionados sobre os biofilmes de *Aspergillus fumigatus* em diferentes fases de formação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa do tipo experimental, *in vitro*, de abordagem quantitativa e qualitativa, na qual derivados de 2-isoxazolina aza-bicíclica associado a hidrazonas para foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a células planctônicas e sésseis. A pesquisa de bioprospecção, *in vitro*, foi realizada através do método de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), e os ensaios em biofilmes formados e em formação para determinar a concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) e concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) (CLSI, 2018; PIERCE *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que os testes foram realizados com 4 repetições independentes.

4.1 HÍBRIDOS MOLECULARES

Neste estudo, 10 (dez) compostos derivados da hibridização do núcleo 2-isoxazolina aza-bicíclica com hidrazonas, sendo os códigos dos compostos: R-122, R-127, R-128, R-142, R-143, R-147, R-148, R-154, R-155 e R-158. Estes foram sintetizados cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos (LASOF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, e solubilizados em DMSO a 1% e tween 20, na proporção 1:5, para facilitar a homogeneização. As concentrações utilizadas foram definidas a partir de um ensaio piloto: 2 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ensaios em células planctônicas, 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para testes em biofilmes.

4.2 ANTIFÚNGICOS PADRÕES

Os medicamentos de escolha foram anfotericina B (SigmaAldrich®), itraconazol (Brainfarma®) e o voriconazol (SigmaAldrich®), comumente utilizados para o tratamento de infecções por *Aspergillus* sp. Os fármacos foram diluídos em DMSO, e as concentrações utilizadas no ensaio de células planctônicas foram de 0,03 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para biofilmes de 16 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Para os ensaios de atividade antifúngica, 03 (três) isolados de *Aspergillus fumigatus*. Para o controle de qualidade da produção de biofilme, foi utilizada a cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) 203405®, ambos cedidos na Coleção de

Cultura da Universidade Federal de Pernambuco (**Quadro 2**). As culturas foram mantidas em meio ágar batata dextrose à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Quadro 2 – Origem e identificação dos isolados de *Aspergillus fumigatus* utilizados.

Registro URM	Substrato	Local	Depósito
7306	Solo de bosque	São Paulo	2015
7315	Solo de mata atlântica	Paraná	2015
6576	Espito humano	Pernambuco	2012

Legenda: URM: University Recife Mycology (Micoteca URM).

4.4 SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DOS HÍBRIDOS MOLECULARES

4.4.1 Preparação do Inóculo

A preparação do inóculo foi realizada segundo as recomendações do documento M59 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020), com algumas modificações. As cepas foram previamente cultivadas em tubos contendo meio Ágar Batata Dextrose, por 48 horas, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguidamente, foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) contendo 0,01 mL de Tween 20, na concentração de 0,025% (v/v). As suspensões resultantes foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio esterilizados e agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho vortex. Em seguida, a densidade óptica das suspensões foi ajustada para absorbância de 0,09 a 0,13, por espectrofotometria, a 530 nm. Tal procedimento promoveu suspensões com concentração de 1×10^6 a 5×10^6 de células por mL, que foram confirmadas através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em câmara de Neubauer.

4.4.2 Determinação Da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima

A determinação da CIMs e CFMs dos compostos foram realizadas pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de fundo chato e em triplicata, segundo o documento M38 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 μL do meio líquido RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de $0,22\mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem

bicarbonato de sódio e pH $7,0 \pm 0,1$ tamponado com Ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS), $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich), duplamente concentrado. Posteriormente, $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução dos compostos, também duplamente concentrado, foram adicionados nas cavidades da primeira coluna da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois da coluna 1 a coluna 10, foram obtidas concentrações de $1024 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ até $2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os híbridos moleculares, e de $16 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ até $0,03 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os fármacos, de modo que na primeira coluna da placa se encontrará a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ do inóculo das cepas em todos os poços da coluna de 1 a 11.

Um controle de microorganismo foi realizado na coluna 11, com $100 \text{ }\mu\text{L}$ de RPMI 1640 duplamente concentrado e $100 \text{ }\mu\text{L}$ do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados, foram feitos também controles com o solvente (DMSO), surfactante (Tween 20), e os compostos (fármacos comerciais e híbridos) utilizados na preparação das soluções. Além disso, um controle de esterilidade do meio RPMI também foi realizado. Em seguida, as microplacas foram seladas e incubadas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e lidas em 24 e 48 horas.

A leitura visual foi executada considerando como Concentração Inibitória Mínima a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 80% do crescimento fúngico, e como Concentração Fungicida Mínima, a menor concentração de antifúngico capaz de eliminar 100% do crescimento fúngico. As CIM e CFM foram confirmadas pelo retrocultivo de todos os poços, em placas de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose, as quais foram incubadas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas.

4.4.3 Ação do Produto na Parede Celular Fúngica

Para investigar a ação dos híbridos na parede celular fúngica foi realizado ensaio com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. A determinação da CFM dos híbridos, na presença do sorbitol ($0,8\text{M}$), foram realizadas pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades. O isolado utilizado foi a ATCC 203405®. Nos poços da microplaca foram adicionados meio $100 \text{ }\mu\text{L}$ RPMI 1640, previamente adicionado de sorbitol $0,8 \text{ M}$. Posteriormente, $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução dos compostos, também duplamente concentrado, foram adicionados nas cavidades da primeira coluna da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois da coluna 1 à coluna 10, foram

obtidas concentrações de 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os híbridos moleculares. Por fim, foram adicionados 100 μL do inóculo nas cavidades (FROST *et al.*, 1995). Foi estabelecido controles positivos e de esterilidade. As placas serão assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C por 48 horas. A leitura foi realizada de forma semelhante ao descrito no tópico anterior, e os resultados foram comparados com o mesmo ensaio na ausência do sorbitol (FROST *et al.*, 1995).

4.5 ENSAIOS EM BIOFILME

4.5.1 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes

Os isolados de *A. fumigatus* foram cultivados em Ágar Batata Dextrose a 35 °C $\pm$ 2 °C por cinco dias. Os conídios foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5ml de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2 contendo Tween 20 na concentração de 0,025% (v/v), e ajustados para 1×10^5 células em meio RPMI 1640 (Sigma) tamponado com HEPES (Gibco®) em espectrofotômetro a 570 nm (MOWAT *et al.*, 2007). Em seguida, 180 μL da suspensão celular padronizada foi inserida nos poços das placas de microtitulação de fundo chato (96 poços) e mantida por 12, 24, 48, 72, 96 horas para avaliação do crescimento. Vale ressaltar que os experimentos foram realizados em triplicata, e em quatro ensaios independentes. Também foram feitos controles de esterilidade para o meio RPMI 1640 (Sigma) tamponado com HEPES, Tween 20, e PBS.

O biofilme produzido foi quantificado usando o ensaio de redução de sal de 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical, St. Louis, MO), em que 20 μL , na proporção de 5 μL para 1 mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22 μm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação. As microplacas foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de 35 °C, por 18 horas. Seguidamente, o corante foi aspirado, e os biofilmes foram descorados com a inserção de 200 μL de isopropanol nos poços (FREMOSIER *et al.*, 1999; BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM *et al.*, 2006). As microplacas foram mantidas em repouso por 15 min e em seguida foram transferidos 100 μL do conteúdo de cada poço para uma nova placa de microtitulação, a fim de realizar a leitura em leitor de microplacas com 570 nm de comprimento de onda (RAMAGE *et al.*, 2002; KROM *et al.*, 2006; PIERCE *et al.*, 2008).

Os valores de absorvância obtidos foram proporcionais à atividade metabólica do biofilme fúngico (quanto maior a quantidade de material biológico, maior o nível de coloração e absorvância). O ponto de corte correspondeu ao valor médio das absorvâncias do controle negativo somado a três desvios padrão. Para a interpretação dos dados foram considerados os valores médios da leitura de absorvância de acordo com a equação de Stepanovic *et al.* (2007). As amostras assim foram classificadas como fortemente (absorvância média superior a quatro vezes o ponto de corte), moderadamente (absorvância média entre duas e quatro vezes o ponto de corte) ou fracamente (absorvância média superior a duas vezes o ponto de corte) ou não produtoras de biofilme (absorvância média igual ou inferior o ponto de corte).

4.5.2 Prospecção do Potencial Antibiofilme dos Híbridos Moleculares

Baseado nos testes de determinação de CIM e CFM, foram selecionados 2 (dois) híbridos moleculares, considerando as melhores atividades antimicrobianas em relação aos demais e o padrão de precipitação. Ademais, foram utilizados 2 (dois) fármacos comerciais: anfotericina B (AmB) e voriconazol (VRC). A avaliação do potencial antibiofilme foi realizada de acordo com Pierce *et al.* (2008), com modificações. De forma semelhante ao descrito no tópico anterior, os isolados de *Aspergillus fumigatus* foram cultivados e as suspensões celulares foram produzidas. Cerca de 120 µL do inóculo foram inseridos nos poços nas microplacas juntamente com 60 µL da solução do híbrido (1024 µg.mL⁻¹ e 2048 µg.mL⁻¹) ou fármaco a ser testado (16 µg.mL⁻¹ e 32 µg.mL⁻¹). Em seguida, as microplacas foram incubadas incubada a 37 °C por 48 horas. Cabe ressaltar que o experimento foi realizado em triplicata, com controles negativos (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI), controles de crescimento (com suspensão de células em RPMI, sem nenhum composto), e controle de esterilidade (PBS, RPMI 1640, Tween).

Decorrido o tempo de incubação, os sobrenadantes foram aspirados e os poços lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderentes. A quantificação foi realizada de acordo com o ensaio de redução de sal de 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5- diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical, St. Louis, MO). As CIMBs foram determinadas como 100% de redução do metabolismo comparado com o controle não tratado.

4.5.3 Prospecção do Potencial Antimicrobiano no Tratamento de Biofilmes Maduros dos Híbridos Moleculares

Os biofilmes foram produzidos conforme o descrito anteriormente. Após o sobrenadante ser retirado, os poços foram lavados três vezes com PBS, e em seguida, 180 microlitros μL das soluções dos híbridos ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou fármacos a serem testados ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram adicionadas as cavidades com biofilmes. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas. Cabe ressaltar que o experimento foi realizado em triplicata, com controles negativos (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI), controles de crescimento (com suspensão de células em RPMI, sem nenhum composto), e controle de esterilidade (PBS, RPMI1640, Tween 20).

Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e os poços lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderentes. A quantificação foi realizada de acordo com o ensaio de redução de sal de MTT (Sigma Chemical, St. Louis, MO). As CMEBs foram determinadas como 100% de redução do metabolismo comparado com o controle não tratado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados separadamente, consoante a metodologia e literatura proposta. Após a tabulação dos dados, a significância estatística entre os grupos analisados foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA), ou duas vias, dependendo do modelo, seguida do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ou 99%, utilizando o software *Graph Pad prism* 8.0. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Além disso, foram consideradas medidas descritivas como média, mediana, coeficiente de variação, e desvio padrão da média, e foi assumido 5% de erro tipo 1 para que o intervalo de confiança fosse de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS

Conforme os resultados descritos na **tabela 1**, observa-se que as três cepas são consideradas selvagens frente ao itraconazol, bem como, não-selvagens frente

ao voriconazol e anfotericina B, não havendo diferenças estatísticas significativas entre os isolados ambientais e clínico ($p < 0,001$).

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de itraconazol, voriconazol e anfotericina B em 48h.

Isolados	Fármacos testados		
	Itraconazol (0,03 – 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Voriconazol (0,03 – 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Anfotericina B (0,03 – 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
URM 7306	0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (WT)	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)
URM 7315	0,250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (WT)	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)
URM 6576	0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (WT)	4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NWT)

Legenda: URM - University Recife Mycology (Micoteca URM); CIM: Concentração inibitória mínima; WT: Wild-type (selvagem); NWT: Non-wild-type (não-selvagem).

A suscetibilidade de isolados de *A. fumigatus* a antifúngicos azólicos é bem documentada na literatura (LATGÉ; BEAUVAIS; CHAMILOS, 2017; REVIE *et al.*, 2018; SHAFIEI *et al.*, 2020). Os fármacos triazólicos, como itraconazol e voriconazol, são frequentemente utilizados no tratamento de muitas infecções causadas por *A. fumigatus*, e de maneira geral, são eficazes na inibição do crescimento microbiano, uma vez que interferem na biossíntese do ergosterol (BELLMANN; SMUSZKIEWICZ, 2017; CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2021). No entanto, a eficácia desta classe de medicamentos tem sido ameaçada, nos últimos anos, pelo surgimento e disseminação de cepas com sensibilidade reduzida e/ou resistentes (HENDRICKSON *et al.*, 2019). Esta resistência, segundo estudos, decorre principalmente de mutações no gene *CYP51*, responsável por codificar a proteína 14- α -desmetilase, alvo dos azóis (MOROGOVSKY *et al.*, 2022), e desafiam as estratégias atuais de tratamento em pacientes com doenças causadas por *A. fumigatus*, visto que mutações deste gene têm sido associadas a falhas terapêuticas e aumento da mortalidade desses pacientes (TAKEDA *et al.*, 2021).

No presente estudo, embora todos isolados apresentem sensibilidade ao itraconazol, resistência ao voriconazol foi registrada. Tais resultados corroboram com os estudos de Resendiz-Sharpe *et al.* (2019) e Lestrade *et al.* (2019) que descrevem significativa prevalência de resistência ao voriconazol por isolados de *A. fumigatus*.

(DENNING; BOWYER, 2013; ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2022). Além disso, o padrão de sensibilidade exibido pelas amostras, com resistência a apenas um triazólico, é concordante com a pesquisa de Lescar *et al.* (2014). Esta descreve uma amostra pulmonar de *A. fumigatus*, suscetível ao itraconazol e posaconazol, mas não ao voriconazol. Segundo os referidos autores, padrão de susceptibilidade como este decorre da substituição isolada do aminoácido Y121F da CYP51A, que está envolvido no acoplamento do anel pirimidina do voriconazol, comprometendo assim a distribuição e ação deste medicamento (ZHUANG *et al.*, 2019). Em contraste, os autores também destacaram que a substituição do aminoácido Y121F não parece interferir no desempenho antifúngico do itraconazol ou posaconazol, uma vez que estes medicamentos não possuem anel pirimidina equivalentes, e podem acoplar-se a CYP51A de formas complementares (SHRIVASTAVA; SHARMA; SINGH, 2021).

O perfil de sensibilidade apresentado pelos isolados URM 7306 e URM 7315, com CIM de 4-8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o voriconazol, evidencia a importância da rota ambiental na resistência a triazóis adquirida por *A. fumigatus*. De acordo com Lescar *et al.* (2014), a seleção de cepas resistentes deste fungo pode ocorrer tanto em pacientes tratados com triazóis, quanto em ambientes que contêm resíduos de pesticidas agrícolas triazólicos, uma vez que estes últimos podem exercer pressão seletiva sobre os isolados por atuarem no mesmo sítio de ação dos triazóis. Tal teoria é apoiada pelos números crescentes de casos de aspergilose resistente à azóis em pacientes virgens de terapia azólicas na França (DAUCHY *et al.*, 2018), Espanha (PELAEZ *et al.*, 2015), Dinamarca (ASTVAD *et al.*, 2014), México (GONZALEZ-LARA *et al.*, 2019) e Holanda (SNELDERS *et al.*, 2008), e sustentada pelos achados genéticos de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* que compartilham as mesmas mutações no agrupamento de genes *cyp51A* (SHARMA *et al.*, 2015; NABILI *et al.*, 2016; RHODES *et al.*, 2022). No entanto, como o perfil genético de resistência dos isolados não fazia parte do objetivo desta pesquisa, mais estudos são necessários para esclarecer a correlação à resistência das amostras ambientais e clínicas.

Em relação a anfotericina B, polieno de amplo espectro que causa a despolarização da membrana celular fúngica por interagir com o ergosterol, todas as amostras foram não-selvagens a este fármaco, com CIM de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Segundo Fakhim *et al.* (2022), isolados ambientais ou clínicos de *A. fumigatus* resistentes à anfotericina B são pouco relatados e ocorrem com menor frequência quando

comparados a isolados resistentes à azóis. Contudo, trabalhos realizados na Espanha (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2013), Canadá (ASHU *et al.*, 2018) e Coreia do Sul (HEO *et al.*, 2015) confirmam o aumento deste tipo de resistência no gênero *Aspergillus* nos últimos anos. Alastruey-Izquierdo *et al.* (2013) ao analisar a distribuição de espécies e resistência a medicamentos antifúngicos na Espanha envolvendo 29 hospitais em diferentes regiões da Espanha, percebeu que dentre os 325 isolados, 278 isolados eram do gênero de *Aspergillus*, e destes 35 foram resistentes a anfotericina B (10,8%). Já Heo *et al.* (2015) relataram uma taxa de 26,5% de resistência num estudo conduzido com 136 isolados clínicos *Aspergillus sp.*. Ashu *et al.* (2018) ao investigarem o perfil de susceptibilidade antifúngica de 195 isolados de *A. fumigatus*, sendo 124 amostras ambientais e 71 amostras clínicas, verificaram resistência a anfotericina B em 92% e 100% dos isolados respectivamente. E Reichert-Lima *et al.* (2018), em estudo realizado no Brasil, identificaram uma frequência de resistência de 27,4% ao citado polieno em 168 amostras provindas de pacientes atendidos pelo Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, São Paulo.

Sendo assim, os achados de resistência à anfotericina B da atual pesquisa são respaldados pela literatura. Cabe ressaltar que a resistência à anfotericina B constitui-se um grave e emergente problema de saúde pública, visto que, este medicamento é o padrão ouro no tratamento de infecções fúngicas invasivas e não responsivas a azóis. Porém, ainda há poucas informações disponíveis sobre os mecanismos de resistência à AMB em *A. fumigatus* e as mutações que conferem resistência permanecem largamente inexploradas (FAN; KORFANTY; XU, 2021)

5.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS AOS HÍBRIDOS MOLECULARES

De acordo com os dados da **tabela 2 e 3**, em 24 horas todos os compostos híbridos testados conseguiram inibir o crescimento *in vitro* de *A. fumigatus*, com CFM variando de 32 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (70,79 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 2.767,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Em 48 horas, no entanto, os valores da CFM aumentaram uma ou duas diluições, tendo todos mantido atividade antifúngica. Dentre estes, os compostos R-122, R-147, R-154, R-155 destacaram-se por apresentarem atividade antifúngica com menores CFM nos três isolados ($p < 0,001$).

Compostos híbridos derivados do núcleo 2-isoxazolina aza-bicíclica, sintetizados pelo LASOF, já haviam demonstrado atividade biológica anteriormente. Mota (2018) ao avaliar o desempenho de dois derivados de isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclica relatou significativo efeito anti-inflamatório, mucolítico, antiasmático e analgésico, sugerindo que estes candidatos a fármacos poderiam tornar-se eficazes no tratamento da asma brônquica e analgesia. Coutinho (2022), em seu trabalho, descreveu atividade antitumoral de híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica/tiazóis frente a células cancerígenas das linhagens NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e Jukart (leucemia aguda de células T), bem como, potente atividade antichagásica. Ainda, recentes experimentos revelaram a atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. infatum* superior a miltefosina de uma série híbrida com tiazolidina-2,4-diona (dados não publicados). No entanto, este é o primeiro estudo que relata a atividade antifúngica de compostos híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica em fungos filamentosos, em especial, *Aspergillus fumigatus*.

Diferentemente dos resultados de Albuquerque (2019), que avaliou três híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica com tiazolidina-2,4-diona e com tiossemicarbazona frente a *Candida* sp. e não verificou nenhuma atividade antifúngica por parte dos mesmos. O presente trabalho destaca o potencial antimicrobiano do núcleo de 2-isoxazolina aza-bicíclica associado a hidrazonas como um importante composto contra fungos, em especial *A. fumigatus*, tendo em vista que todas as moléculas obtiveram atividade antifúngica. Ademais, salientam a importância da hibridização molecular, para a química medicinal, na obtenção de novas moléculas bioativas de alta estabilidade química e com um bom perfil biológico (IVASIV *et al.*, 2019; AUTI; GEORGE; PAUL, 2020)

A atividade antimicrobiana dos compostos híbridos deste trabalho converge com a ação biológica de seus grupos farmacofóricos, isto é, hidrazonas e 2-isoxazolina, registradas amplamente na literatura (ROCHA *et al.*, 2019; SANKAR, *et al.*, 2019; DASCALU *et al.*, 2020; KHODJA *et al.*, 2020; TREFZGER *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Thamba-chandrika *et al.* (2020) descreveram uma série de monohidrazonas ativas contra cepas do gênero *Candida*, incluindo amostras resistentes ao fluconazol, com CIM entre 0,06 - 31,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. BANO *et al.* (2015), demonstraram a equipotente atuação antifúngica, em relação ao fluconazol, de alguns derivados de isoxazolininas frente a cepas de *Aspergillus fumigatus*,

Aspergillus versicolor e *Aspergillus flavus*, com CIM entre 3,125 - 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E ainda, Kauthale *et al.* (2017) verificaram a expressiva atividade de tiazolil hidrazonas contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, com CIM entre 3,125 - 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 2 – Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos híbridos moleculares híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica associada a hidrazonas frente isolados não-selvagens de *A. fumigatus*.

Híbrido	URM 7306		URM 7315		URM 6576	
	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}
R-122	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-127	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-128	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-142	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-143	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-147	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-148	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-154	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-155	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
R-1586	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Legenda: URM - University Recife Mycology (Micoteca URM); CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 3 – Concentração fungicida mínima ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos híbridos moleculares híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica associada a hidrazonas frente isolados não-selvagens de *A. fumigatus*.

Híbrido	URM7306		URM7315		URM6576	
	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}	CFM _{24horas}	CFM _{48horas}
R-122	289,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.158,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	289,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	579,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	72,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	144,85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-127	70,79 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	566,37 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.132,74 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.132,74 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.132,74 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.265,48 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-128	1.143,84 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.285,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	571,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	571,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.142,84 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.285,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-142	1.201,87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.201,87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.201,87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.403,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	300,46 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.201,87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-143	1.213,27 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.213,27 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.213,27 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.426,54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.213,27 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.426,54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

R-147	320,80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	641,60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	160,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	320,80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	320,80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	641,60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-148	2.767,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.767,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	691,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.383,78 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.383,78 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.383,78 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-154	1.171,62 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.343,24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	146,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	585,81 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	292,90 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.171,62 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-155	627,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.254,90 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	313,72 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	627,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	627,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	627,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
R-158	335,07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.340,31 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	670,15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.340,31 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.680,62 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2.680,62 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Legenda: URM - University Recife Mycology (Micoteca URM); CFM: Concentração fungicida mínima.

Apesar de compartilharem semelhanças entre a arquitetura híbrida e exibirem efeito antifúngico perante os isolados testados, os novos compostos exibiram concentrações fungicidas elevadas e variáveis entre si, e entre os microrganismos testados, tanto em 24 horas como em 48 horas ($70,79 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $2.767,56 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Além disso, nenhum dos híbridos apresentaram atividade antifúngica superior ou equipotente aos fármacos de escolhas (voriconazol e anfotericina B).

A disparidade constatada na atividade fungicida dos híbridos pode estar relacionada com a estrutura e configuração molecular da arquitetura híbrida, com as propriedades físico-químicas dos mesmos, e com os mecanismos de resistência dos isolados (LIU *et al.*, 2016). No que concerne aos isolados, sabe-se que os isolados utilizados para os ensaios são não-selvagem para anfotericina B e voriconazol, fármacos convencionalmente utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas (PERFECT; GHANNOUM, 2020). De acordo com a literatura, o tipo de mecanismo de resistência que um isolado exibe se correlaciona com os resultados *in vitro* dos testes de microdiluição (CHAABANE, Farid *et al.*, 2019; ROGERS *et al.*, 2022). Portanto, não é infundado conjecturar que os mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos por cada isolado utilizado nesta pesquisa podem diferir um dos outros e consequentemente impactar na variabilidade de CFM (LOGAN; WOLFE; WILLIAMSON, 2022).

Quadro 3 – Substituintes da porção isoxazolina e hidrazona dos híbridos moleculares de 2-isoxazolina aza-bicíclica.

Híbridos	Porção isoxazolina	Porção hidrazona
R-122	Nitro	Cloro
R-127	Terc-butila	Cloro
R-128	Terc-butila	Metoxila
R-142	Metoxila	Cloro
R-143	Metoxila	Metoxila
R-147	Flúor	Flúor
R-148	Flúor	Furfurila
R-154	Terc-butila	Flúor
R-155	Terc-butila	Furfurila
R-158	Metoxila	Furfurila

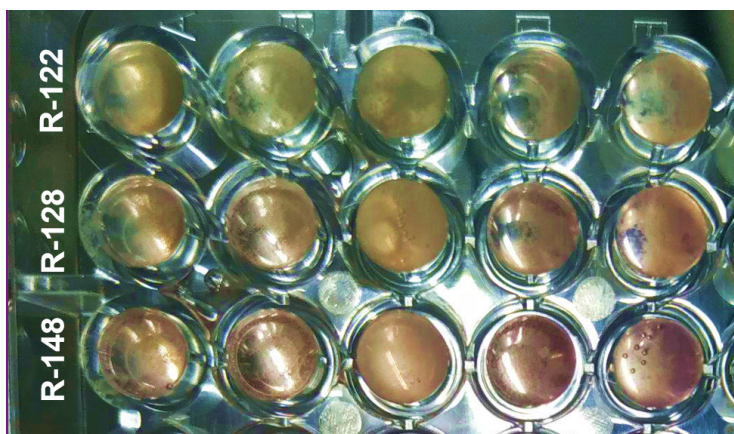
Acerca da configuração e estrutura molecular dos compostos bioativos, Yang *et al.* (2022) e Teixeira *et al.* (2022) afirmam que substituintes doadores ou retiradores de elétrons, como os grupos nitro, bromo, metila e metoxi são essenciais para potencializar a atividade antifúngica. Já MEI *et al.* (2020), descreve que a presença de halogênios, como cloro e flúor, aumenta a lipofilicidade de compostos, facilitando sua permeabilidade na membranas, e consequentemente intensificando as interações com os receptores alvo (MULLER; FAEH; DIEDERICH, 2007; GILLIS *et al.*, 2015). Ainda, ZHANG *et al.* (2019) reporta que a posição da substituição no núcleo pode influenciar a ação biológica, sendo a posição orto é mais benéfica para isoxazolininas do que as para e meta, enquanto as hidrazonas substituídas na posição meta, tem efeito antifúngico (THAMBA-CHANDRIKA *et al.*, 2020). Dessa forma, a multivalência de substituições incorporada aos híbridos deste trabalho (**quadro 3**) parece repercutir na atividade antifúngica e variabilidade biológica da ação, sendo as substituições cloro-nitro realizadas no híbrido R-122 e flúor-flúor no híbrido R-147, consideradas as melhores entre os híbridos, com base nas CFM resultantes (MURAFUJI *et al.*, 2011).

Com relação às propriedades físico-químicas, o inadequado perfil de solubilidade manifestado pelos híbridos pode ter limitado a atuação dos mesmos e

contribuindo para variabilidade de CFM encontrada na tabela 2. De acordo com Das, Mehta e Nayak (2020) a solubilidade é um dos parâmetros importantes para um fármaco alcançar uma resposta farmacológica consistente e linear. No entanto, os híbridos deste trabalho, apresentaram baixa solubilidade no meio utilizado nos ensaios de microdiluição (RPMI1640), sendo realizados vários ajustes metodológicos para a boa execução dos testes.

Apesar dos esforços realizados para solucionar a questão da solubilidade, todos os híbridos precipitaram parcialmente em meio RPMI 1640. Conforme a visualização das microplacas na **figura 6**, observa-se que o desequilíbrio dinâmico entre os processos simultâneos e opostos de dissolução e união de fases ocorreu principalmente nos poços em que a quantidade de soluto era maior que o solvente, isto é, nos 5 primeiros poços da diluição (DESHMUKH; TIWARI; MAHAJAN, 2017; AINUROFIQ *et al.*, 2021). Os híbridos com maiores deposições no fundo dos poços foram: R-122, R-128, R-147, R-148. Logo, com base no exposto, supõe-se, que o padrão de precipitação apresentado pelos híbridos se relacione diretamente com a variabilidade das respostas antifúngicas exibidas pelos mesmos (KAWABATA, *et al.*, 2011; ABDELLATIF *et al.*, 2019).

Figura 6 – Padrão de precipitação dos híbridos moleculares R-122, R-128, R-148 em meio RPMI1640.



Ainda sobre a solubilidade, acredita-se que esta tenha contribuído significativamente para a elevação da CFM dos híbridos. Esta conjectura é justificada pela literatura que afirma que fármacos poucos solúveis requerem altas concentrações para obterem suas ações farmacológicas (KHADKA *et al.*, 2014; KALE; KAKADE; BHOSALE, 2020), e respaldada pelos resultados de inibição

microbiana dos poços seguintes a CFM resumidos nas **tabelas 4, 5 e 6**, que mostram a notável atuação inibitória dos híbridos em concentrações menores que as demonstradas na tabela 2. De fato, os híbridos R-122 e R-147 se destacaram por exibir percentuais de inibição acima de 90% nos três isolados com CIM variando de 8-64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (20,05 - 160,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), as demais moléculas híbridas apresentaram CIM acima de 80%. Os referidos dados além de apoiarem a hipótese de elevação de CIM devido a inadequada solubilidade, expõem um novo aspecto do potencial antifúngico dos híbridos moleculares: o comportamento fungistático. Logo, supõe-se que os híbridos moleculares sejam tanto fungicidas quanto fungistáticos, a depender da concentração (BIANCALANA *et al.*, 2011).

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 7306.

Híbridos	URM 7306					
	CFM _{24horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{24horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 24 horas	CFM _{48horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{48horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 48 horas
R-122	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32,21 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,78% $\pm$ 0,39	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	72,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	90,40% $\pm$ 1,23
R-127	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	17,69 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	89,57% $\pm$ 0,71	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	141,59 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,72% $\pm$ 2,98
R-128	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	71,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	97,52% $\pm$ 0,65	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	285,71 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,90% $\pm$ 4,98
R-142	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	150,23 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,36% $\pm$ 0,52	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	300,46 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	81,65% $\pm$ 3,90
R-143	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	303,31 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	91,27% $\pm$ 0,23	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	303,31 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,65% $\pm$ 2,70
R-147	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	80,20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,72% $\pm$ 0,65	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	160,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	90,26% $\pm$ 1,16
R-148	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	345,94 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,78% $\pm$ 0,78	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	691,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,49% $\pm$ 3,50
R-154	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	73,22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,51% $\pm$ 0,74	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	585,81 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	82,40% $\pm$ 4,89
R-155	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	156,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	96,17% $\pm$ 0,89	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	156,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	84,51% $\pm$ 1,62
R-158	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	83,76 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,78% $\pm$ 0,39	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	335,07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	88,40% $\pm$ 1,23

URM: University Recife Mycology (Micoteca URM).

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 7315.

	URM 7315					
Híbridos	CFM _{24horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{24horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 24 horas	CFM _{48horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{48horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 48 horas
R-122	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	72,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	97,16% $\pm$ 0,87	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	144,85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	90,12% $\pm$ 1,12
R-127	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	141,59 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	93,81% $\pm$ 0,21	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	283,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	83,45% $\pm$ 2,34
R-128	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	71,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	90,16% $\pm$ 0,87	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	142,85 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	88,16% $\pm$ 1,87
R-142	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	150,23 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	91,88% $\pm$ 0,53	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	300,46 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,17% $\pm$ 1,58
R-143	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	151,65 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	92,40% $\pm$ 0,65	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	606,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	82,93% $\pm$ 1,25
R-147	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,30% $\pm$ 0,34	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	160,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	89,99% $\pm$ 0,98
R-148	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	86,48 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,76% $\pm$ 0,45	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	345,94 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	81,46% $\pm$ 1,32
R-154	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	36,61 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,57% $\pm$ 0,13	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	146,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	88,74% $\pm$ 1,76
R-155	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	39,21 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	94,53% $\pm$ 0,14	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	156,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	87,98% $\pm$ 3,45
R-158	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	167,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	92,98% $\pm$ 0,65	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	335,07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	86,43% $\pm$ 1,67

URM: University Recife Mycology (Micoteca URM);

Tabela 6 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos híbridos moleculares frente URM 6576

	URM 6576					
Híbridos	CFM _{24horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{24horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 24 horas	CFM _{48horas} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM _{48horas} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% de inibição fúngica em 48 horas
R-122	8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	18,10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,23% $\pm$ 0,27	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32,21 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	91,23% $\pm$ 0,78
R-127	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	283,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,46% $\pm$ 0,64	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	566,37 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	86,23% $\pm$ 4,58
R-128	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	285,71 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,84% $\pm$ 1,89	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	571,42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	89,45% $\pm$ 1,90
R-142	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	150,23 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,84% $\pm$ 0,89	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	150,23 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	84,02% $\pm$ 5,02
R-143	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	151,65 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,46% $\pm$ 1,49	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	303,31 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	80,09% $\pm$ 1,66
R-147	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40,10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	97,30% $\pm$ 0,78	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	160,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	90,61% $\pm$ 1,19
R-148	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	43,24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	95,38% $\pm$ 0,61	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	86,48 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	89,93% $\pm$ 3,92
R-154	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	73,22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	99,23% $\pm$ 0,34	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	146,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	83,51% $\pm$ 4,80
R-155	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	156,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	98,46% $\pm$ 0,82	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	313,72 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	87,41% $\pm$ 4,53

R-158	32 µg.mL ⁻¹	83,76 µmol.L ⁻¹	95,76% ± 0,54	128 µg.mL ⁻¹	335,07 µmol.L ⁻¹	89,34% ± 3,76
--------------	------------------------	----------------------------	---------------	-------------------------	-----------------------------	---------------

URM: University Recife Mycology (Micoteca URM).

Os dados aqui analisados indicam que, apesar das limitações, os novos compostos heterocíclicos têm significativa atividade *in vitro* contra cepas não-selvagem frente azóis e polienos de *Aspergillus* sp., e constituem-se como arquiteturas antifúngicas (LIU *et al.*, 2016). Por conseguinte, sua complexibilidade estrutural e estereoquímica devem ser analisadas mais profundamente para a otimização da estrutura quanto às substituições e posições mais promissoras para a atividade antifúngica e solubilidade (PATEL *et al.*, 2014).

Cabe ressaltar também, que a solubilidade limitada de moléculas que apresentem boa atividade intrínseca a um alvo farmacológico não é impeditiva para produção e desenvolvimento de novos medicamentos (TAKAGI *et al.*, 2006; LIPINSKI, 2000; VOLKOVA; SIMONOVA; PERLOVICH, 2021). Antifúngicos como anfotericina B (WASAN *et al.*, 2009; EHRENFREUND-KLEINMAN *et al.*, 2002; SOTO *et al.*, 2022.), itraconazol (CEVHER, *et al.*, 2014; ALSARRA *et al.*, 2010; EL-BARGHOUTH *et al.*, 2006), voriconazol (SIAFAKA *et al.*, 2016; FÜREDI *et al.*, 2016; MILETIC *et al.*, 2013), propiconazol (FIFERE, *et al.*, 2012; MARANGOCI *et al.*, 2011; GABITOV, *et al.*, 2017), posaconazol (TANG *et al.*, 2017; KUMINEK *et al.*, 2019; DE ALENCAR DANDA *et al.*, 2019; VEMURI; LANKALAPALLI; GUNTAKA, 2022) e isavuconazol (LI; NGUYEN; GARCIA-DIAZ, 2015; SOYSAL, 2015), classicamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas, passaram por otimização de solubilidade e biodisponibilidade durante sua concepção ou após sua aplicação clínica (REGINATTO *et al.*, 2020). Novas classes de antifúngicos que estão em estado avançado de desenvolvimento clínico também estão sofrendo ajustes para o aperfeiçoamento de suas propriedades físico-químicas que irão interferir em propriedades farmacocinéticas (GINTJEE; DONNELLEY; THOMPSON III, 2020; HOENIGL *et al.*, 2021).

Ademais, atualmente a Indústria Farmacêutica dispõe de amplo repertório de métodos físicos e químicos, e sistemas modernos para mitigar a questão da solubilidade, como formação de nanopartículas (GAO *et al.*, 2012; ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016.), formulações à base de lipídeos (SEMALTY, 2014; MA *et al.*, 2014), micronização (RASENACK; MÜLLER, 2004; BASAVARAJ; BETAGERI, 2014), formação de complexos com ciclodextrinas (SZEJTLI, 2013), e associação com

biopolímeros (SARFRAZ *et al.*, 2017) entre outros, e viabilizam o desenvolvimento de medicamentos com excelente atividade biológica e fórmulas farmacêuticas com propriedades físico-químicas favoráveis ao aumento da biodisponibilidade (SZEJTLI, 2013).

5.3 ENSAIOS EM BIOFILMES

Evidências claras comprovam que a capacidade e intensidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência para muitos microrganismos, incluindo, *A. fumigatus* (IKEDA.; SUGIMOTO; KUME, 2018). Isto ocorre porque no modo biofilme, os patógenos conseguem colonizar, aderir, e, subsequentemente, invadir tecidos de hospedeiros com maior facilidade, acarretando sua multiplicação e disseminação dentro das células (RAMMAERT, 2018). Além disso, comparada às células planctônicas, as células incorporadas do biofilme são rigorosamente mais resistentes aos antimicrobianos convencionalmente utilizados, e possuem diversos e distintos mecanismos para evadir-se eficientemente as células efetoras do hospedeiro e/ou dos estresses ambientais, permitindo a persistência de patógenos por longos anos dentro destes nichos (SWAPNAJA *et al.*, 2016).

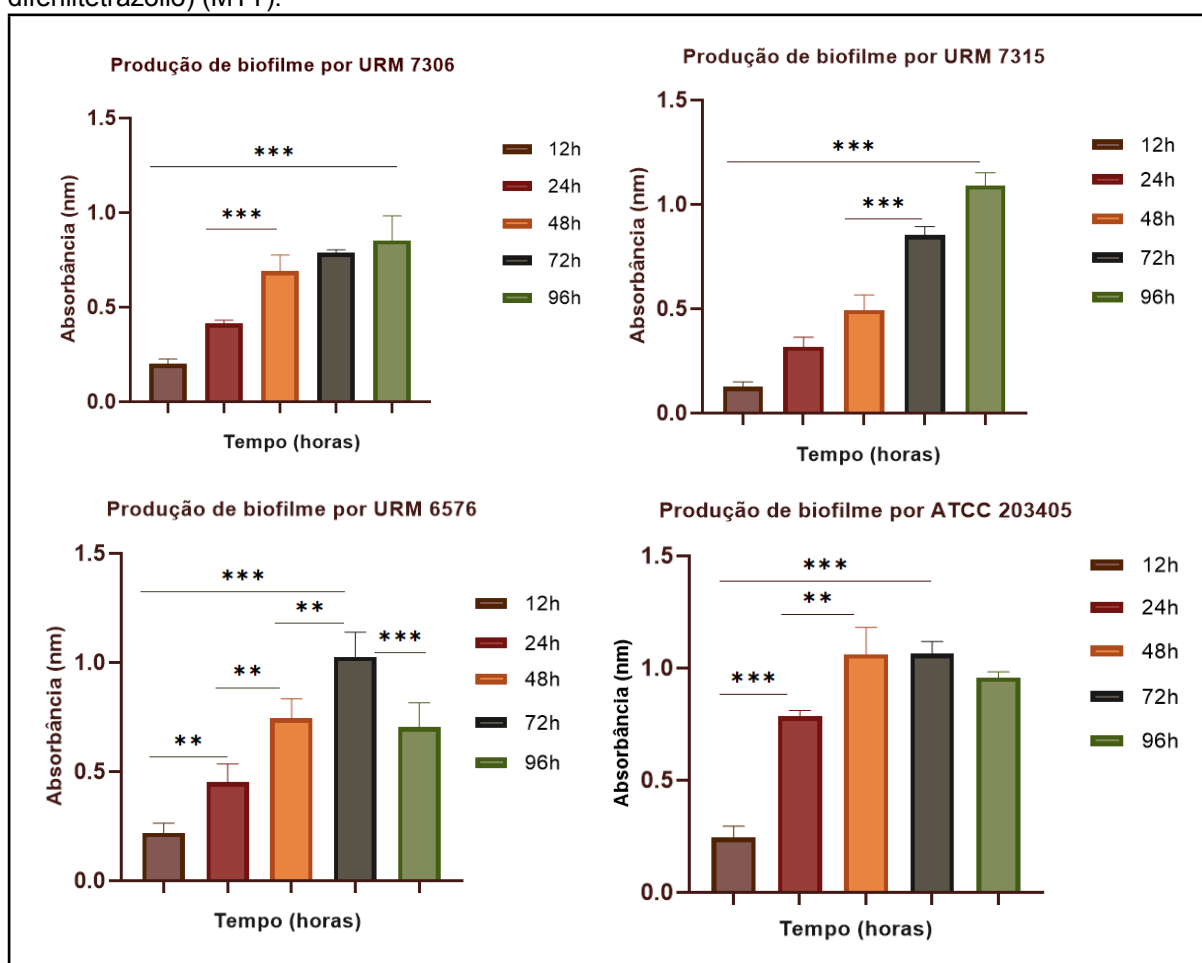
Devido ao significado clínico da presença do biofilme em infecções, e ao arsenal antifúngico limitado, urge-se a necessidade da criação de novos antifúngicos (BALTUSSEN *et al.*, 2020). Da perspectiva da Indústria Farmacêutica, o desenvolvimento de novas alternativas deve ser baseado nas etapas que regem a formação de biofilme. Portanto, o alvo de novas moléculas com finalidade para tratar biofilmes de *Aspergillus fumigatus* são: 1) prevenir a aderência inicial dos conídios; 2) Suprimir a maturação do biofilme; 3) erradicar biofilmes pré-formados; 4) dispersar as células dentro do biofilme (VAN DE SANDE *et al.*, 2010; MORELLI; KERKAERT; CRAMER, 2021).

Neste trabalho, analisou-se a capacidade e intensidade de produção de biofilmes dos isolados URM 7306, URM 7315, URM 6576 e ATCC203405 em diferentes tempos, bem como o potencial antibiofilme e de tratamento dos híbridos moleculares de isoxazolina aza-bicíclica R-122 e R-147.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILMES

Os isolados de *A. fumigatus*, ambos resistentes, foram avaliados quanto sua capacidade de produção de biofilmes nos tempos 12, 24, 48, 73 e 96 horas, estando os resultados sumarizados no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Média da produção de biofilme por isolado de *Aspergillus fumigatus* em função do tempo de desenvolvimento utilizando o ensaio de redução do (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) (MTT).



****p<0,0001; ***p=0,0002; **p=0,0021; h-horas; URM: University Recife Mycology (Micoteca URM).

Em conformidade com os dados do Quadro 4, observa-se que todos os isolados estudados foram capazes de formar biofilmes, *in vitro*. A cepa ATCC 20345 apresentou maior capacidade de formação de biofilme ($p<0,0001$), enquanto o isolado URM 7306 apresentou menor capacidade ($p=0,0021$). No entanto, todas as amostras classificam-se como fortes produtoras de biofilmes, segundo a classificação proposta por Christensen *et al.* (1985).

Em relação ao crescimento de biofilmes aos isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* (URM 7306 e URM 7315), não houve diferenças estatísticas significativas entre estes e o isolado clínico (URM 6576) ($p=0,005$). O presente estudo diverge dos resultados de Singh *et al.* (2017) em que amostras clínicas e ambientais foram avaliadas quanto à produção de biofilmes, e os isolados clínicos demonstraram maior capacidade de produção de biofilmes (82,5%) do que os amostras ambientais (38,46%). No entanto, os dados são semelhantes aos trabalhos de Ildnay (2016) e González-Ramírez *et al.* (2016) em que os isolados ambientais e clínicos não apresentaram distinção quanto à produção de biofilmes. De acordo com Rhodes *et al.* (2022) a produção de biofilmes por isolados ambientais favorecem a sobrevivência dos mesmos em ambientes hostis, e podem corroborar para a infecção nos hospedeiros, principalmente imunocomprometidos. Portanto, os resultados do presente trabalho corroboram com a literatura, ainda que não possam ser inteiramente considerados pela pequena quantidade de isolados. Ademais, supõe-se que divergências aqui constatadas podem ser decorrentes da variabilidade genética intraespecífica dos isolados (DEBEAUPUIS *et al.*, 1997; PUÉRTOLAS-BALINT *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2022).

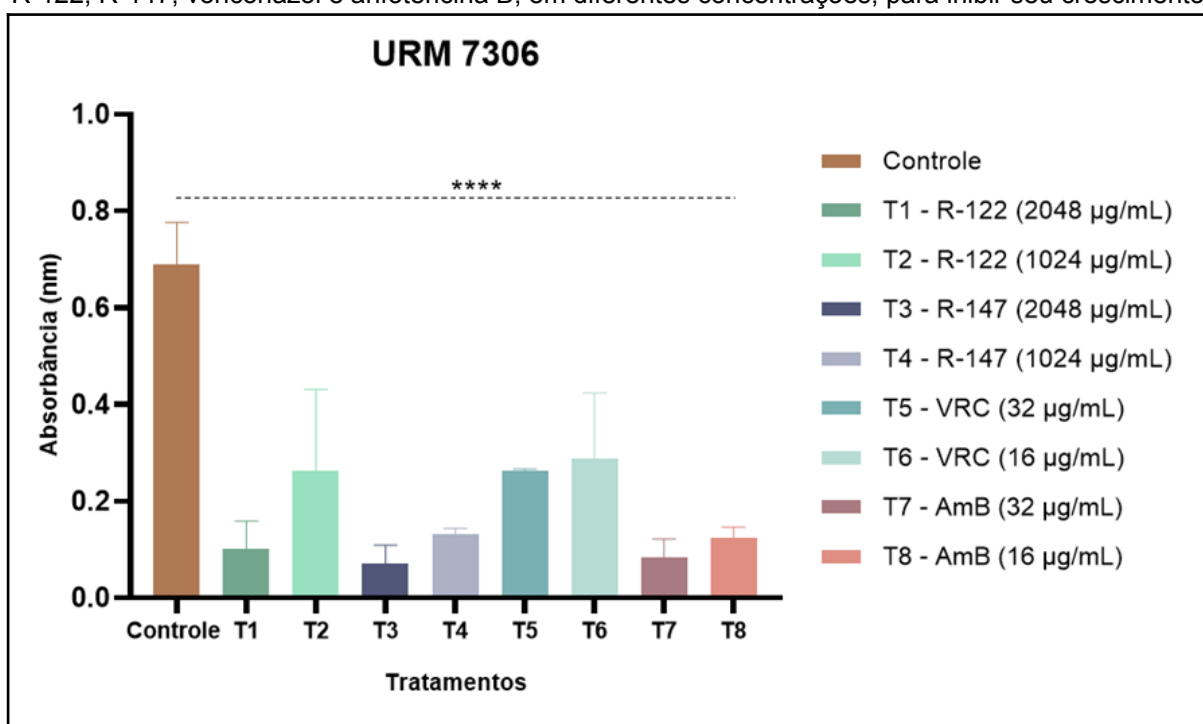
Com relação à evolução de formação e a produção de biofilme ao longo do tempo, todos os isolados exibiram semelhantes absorbâncias para 12h e 24h ($p<0,001$), com exceção da ATCC 203405, que em 24h diferiu significativamente em relação às demais amostras no mesmo tempo. Os tempos de 48-72 horas foram os melhores na maior produção de biofilme por todos os isolados ($p<0,001$), com exceção do isolado URM 7315 ($p<0,001$). Esses resultados confluem com os estudos realizados por Morelli, Kerkaert, Cramer (2021), que ao avaliar o crescimento dos biofilmes de *Aspergillus fumigatus* observaram que a espessura e atividade metabólica dos biofilmes deste fungo aumentam de acordo com o período de crescimento, e com os estudos de Rajendran *et al.* (2013) que relataram que após 24 horas a atividade metabólica aumenta.

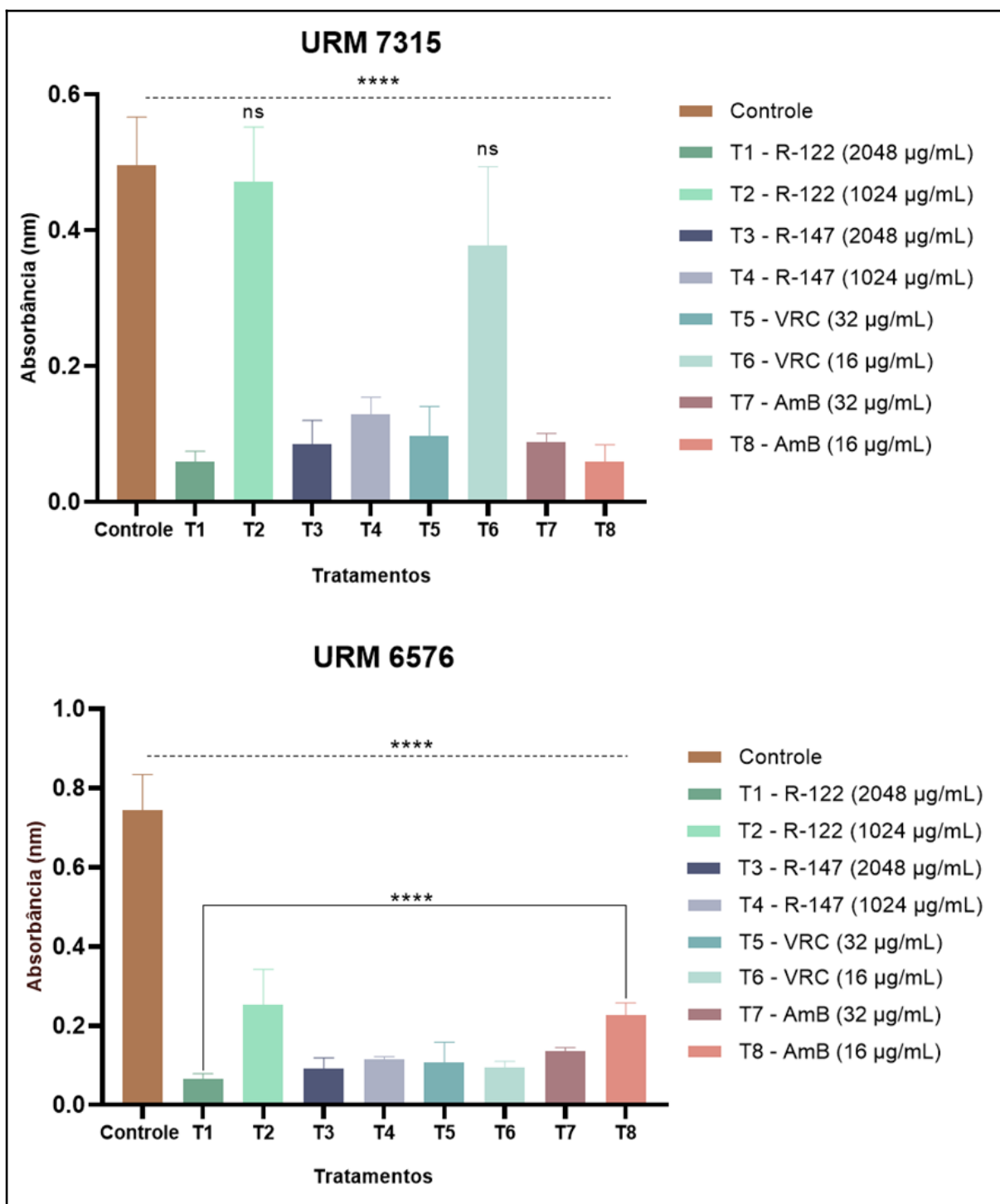
Quanto ao tempo de dispersão, isto é, o momento em que as células do biofilme começam a se desprender da comunidade para encontrar outras fontes de nutrientes (RUMBAUGH; SAUER, 2020) o presente estudo não conseguiu determinar nas amostras URM 7306, URM 7315, ATCC 203405, apenas na URM 6576, visto que a absorbância de atividade metabólica diferiu significativamente entre os tempos 72 e 96 horas ($p<0,0001$).

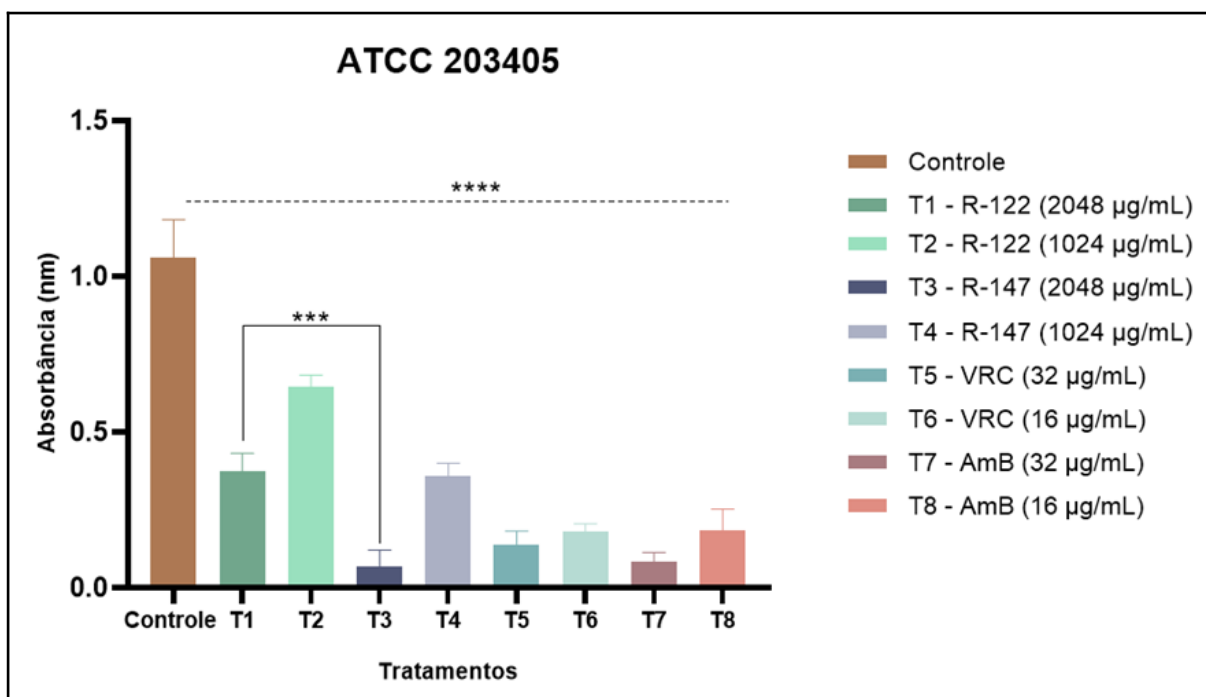
5.5 POTENCIAL ANTIBIOFILME

De acordo com os resultados no **Quadro 5**, observa-se que os compostos híbridos apresentam considerável ação contra a formação de biofilmes, diminuindo a viabilidade metabólica dos mesmos nas concentrações de $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção do híbrido R-122 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o isolado URM 7315. Observa-se também que o efeito ocorreu de forma dose-dependente a concentração, sendo a melhor concentração a de $2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do que $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$). Quanto aos isolados, percebe-se que houve variação significativa no nível de atuação dos híbridos ($p = 0,0025$).

Quadro 5 – Média da produção de biofilme por isolado de *Aspergillus fumigatus* após tratamento com R-122, R-147, voriconazol e anfotericina B, em diferentes concentrações, para inibir seu crescimento.







****p<0,0001; ***p=0,0002; **p=0,0021; ns: não significativo; T: Tratamento; h-horas; URM: University Recife Mycology (Micoteca URM); VRC: voriconazol; AmB: Anfotericina B

Os resultados aqui apresentado corroboram com o estudo recente de Aydin *et al.* (2022), que ao investigarem a atividade biológica de derivados de sulfonil hidrazona frente isolados resistentes e sensíveis de *Candida* sp., reportaram que estes compostos foram capazes de suprimir a adesão e aderência das células deste fungo e impedir a formação de biofilme. Os dados também concordam com os estudos de Thamban-Chandrika *et al.* (2021) que reportaram atividade antibiofilme de monohidrazonas com concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB₅₀) semelhante ao voriconazol para ATCC 10231 de *C. albicans*. Além disso, uma série de derivados de isoxazol, moléculas estruturalmente similares às isoxazolinias, anteriormente já haviam atividade antibiofilme pronunciada para isolados testados, que incluíam bactérias e leveduras (SWAPNAJA *et al.*, 2016). Todavia, existem poucos estudos que exploram a atividade de hidrazonas e/ou isoxazolinias frente aos biofilmes de *Aspergillus fumigatus*. Este fato pode ser parcialmente explicado pela propensão da maioria das pesquisas de triagem de fármacos, infelizmente, concentrar-se apenas na forma conidial do fungo (VAN DE SANDE *et al.*, 2010; MORELLI; KERKAERT; CRAMER, 2021), que é imprescindível para o início da infecção no hospedeiro, e desconsiderar o modo de vida sésil que tem sido relacionado a sucessivas falhas terapêuticas e resistência antifúngica (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; BALTUSSEN *et al.*, 2020).

Segundo Subroto *et al.* (2022), intervir sob o “estágio iniciação do biofilme” de *Aspergillus fumigatus* representa atualmente a melhor estratégia para prevenir o desenvolvimento de infecções disseminadas ou invasivas associadas a esta espécie. Isto ocorre porque neste estágio as células de *A. fumigatus* ainda estão em processo de adesão e agregação para subsequente formação do biofilme, e não exibem estruturas de alta complexibilidade como a matriz extracelular (HAGIWARA *et al.*, 2016; MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; LIU *et al.*, 2022), sendo susceptíveis à antimicrobianos, como voriconazol e itraconazol, em doses elevadas (RAMAGE *et al.*, 2011; GRAVELAT *et al.*, 2013; SPETH *et al.*, 2019).

As abordagens utilizadas no contexto clínico para impedir a formação de biofilmes incluem o revestimento de dispositivos médicos com soluções antimicrobianas e a utilização de terapia antifúngica sistêmica combinada a "terapia de bloqueio" (WALRAVEN; LEE, 2013; KOPARKAR *et al.*, 2022). Esta última consiste na utilização de agentes antifúngicos, como o azóis e polienos, em altas concentrações, se difundindo lentamente no lúmen de um catéter por algumas horas antes da inserção no pacientes (ÖNCÜ, 2011; FERNÁNDEZ-HIDALGO; ALMIRANTE, 2014; IMBERT; RAMMAERT, 2018). Entretanto, devido o avanço de isolados resistentes, muitos antifúngicos têm sido incapazes de inibir eficientemente a formação biofilme, sendo a descoberta e desenvolvimento de medicamentos antibiofilme necessários para aumentar o arsenal terapêutico e contribuir para o tratamento de doenças associadas a biofilmes de *A. fumigatus* (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

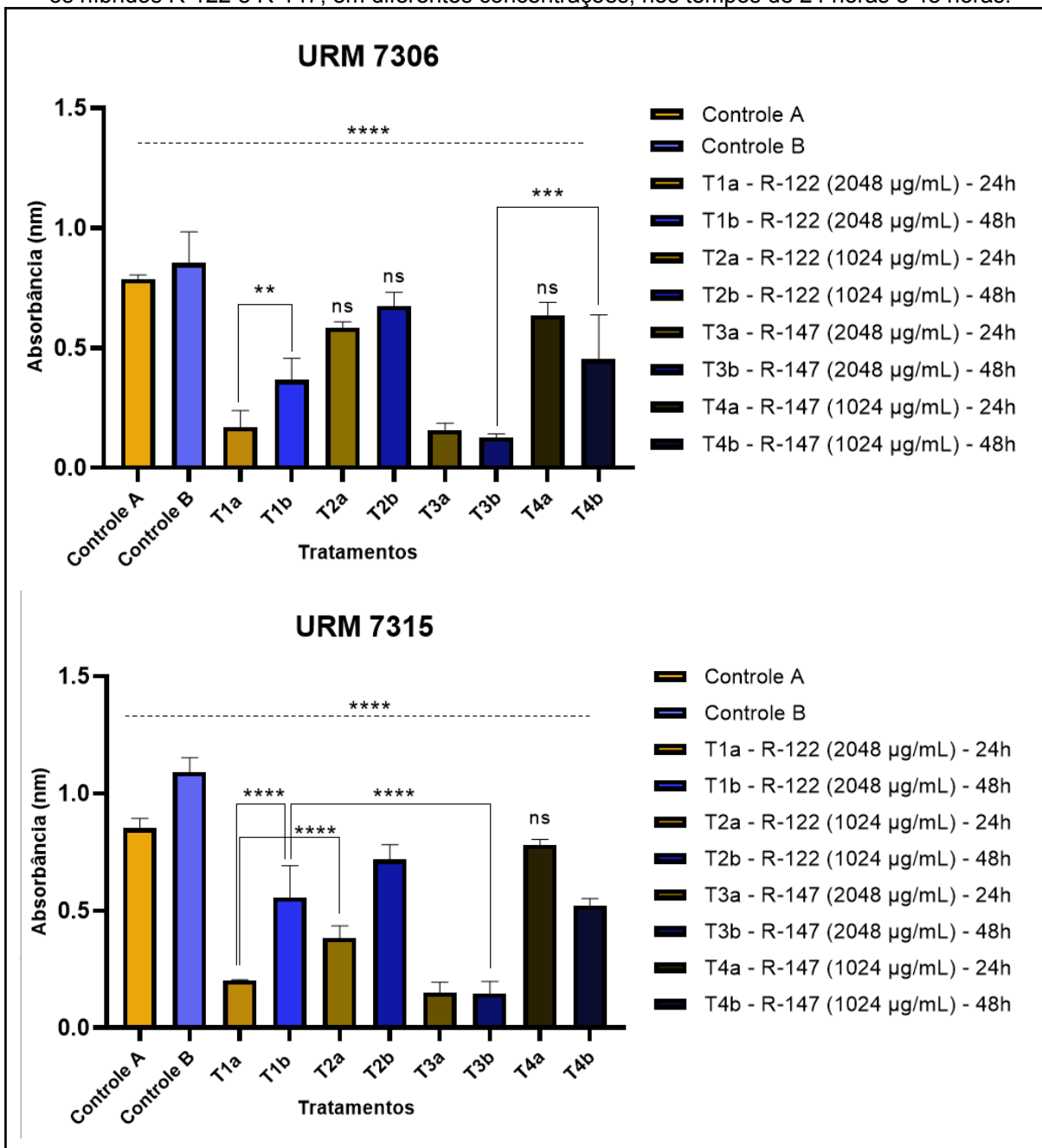
Em relação ao potencial antibiofilme dos medicamentos, os resultados são concordantes com a literatura que descrevem que tanto os polienos quanto os azóis são capazes de atuar na inibição da formação de biofilmes (MOWAT *et al.*, 2007; VAN DE SANDE *et al.*, 2010). No que tange as concentrações, 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi superior, em potencial de inibição ($p=0,0037$). Ademais, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas entre o potencial antibiofilme da anfotericina B e voriconazol para as URM7306, URM6576 e ATCC 203405. Porém, para o isolado URM7315, o desempenho da anfotericina B (16-32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi superior que o voriconazol (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p<0,0001$). Esta diferença é respaldada pelos estudos de Bugli *et al.* (2013), Francisco, Braga e Guimarães (2022), Krishnan, Manavuthu, Chandrasekar (2005) que reportaram que os dois medicamentos se diferenciam em termos de eficácia e início da ação. Segundo o estudo de Talas *et al.*

(2019), através de microscopia de lapso de tempo, o tratamento com voriconazol, dentro da janela crítica de formação de biofilmes (12h), não bloqueia a germinação dos conídios, porém retarda em 3 horas e 21 minutos o crescimento das hifas e inibe a ramificação das mesmas. Já o tratamento com AmB inibe tanto a germinação dos conídios quanto os estágios posteriores de desenvolvimento do biofilme como crescimento de hifas e ramificação. No entanto, vale ressaltar que a anfotericina B não é primeira linha de tratamento de infecções causadas por *A. fumigatus* por apresentar importantes reações adversas como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade cardiopulmonar, entre outros (CAVASSIN *et al.*, 2021; COINTAULT *et al.*, 2021). Sendo assim, sua administração é preferível em hospedeiros gravemente comprometidos (HAMILL, 2013; KLEPSEK, 2011).

5.6 TRATAMENTO EM BIOFILMES MADUROS

De acordo com a **Quadro 6**, nota-se que os híbridos reduziram moderadamente a atividade metabólica dos biofilmes dependendo da concentração utilizada e do tempo de tratamento para a maioria dos isolados ($p > 0,001$), com exceção do híbrido R-147 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o isolado URM 7306 e URM 7315 em 24h; R-122 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para os isolados URM 7306 em 24h; e R-122 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para as URM 7306 e URM 6576 em 48 horas.

Quadro 6 – Média da produção de biofilme por isolado de *Aspergillus fumigatus* após tratamento com os híbridos R-122 e R-147, em diferentes concentrações, nos tempos de 24 horas e 48 horas.



A erradicação de biofilmes de *A. fumigatus* é uma tarefa difícil e desafiadora (WOLFMEIER *et al.*, 2018). Isto ocorre porque as progressivas alterações morfológicas, transcrpcionais e metabólicas que transformam as células planctônicas em células sésseis promovem alta complexibilidade estrutural e altos níveis de resistência antifúngica, que consequentemente dificultam a eliminação dos mesmos, tanto pelo sistema imune do hospedeiro quanto pelo tratamento medicamentoso (MOWAT *et al*, 2008; MORELLI; KERKAERT; CRAMER, 2021). Logo, a presença de biofilmes traduz-se em aumento da mortalidade/morbidade para pacientes com

infecções invasivas/disseminadas por *Aspergillus fumigatus* (KOWALSKI *et al.*, 2021).

O tratamento quando os biofilmes já estão estabelecidos é complexo e requer a administração de altas concentrações de antifúngicos (LÓPEZ-MEDRANO *et al.*, 2016), remoção cirúrgica do biofilme (no caso de aspergiloma) (MOODLEY; PILLAY; DHEDA, 2014; SAMEER *et al.*, 2021), ou remoção/substituição do dispositivo médico implantado contaminado (AGARWAL *et al.*, 2020). Entretanto, este último é na maioria das vezes evitado por aumentar o ônus econômico dos hospitais e sistemas de saúde e estar relacionado com traumas físicos e mentais aos pacientes (BAI *et al.*, 2019).

Em razão dos motivos citados acima, há uma improrrogável necessidade de novas alternativas e estratégias farmacêuticas capazes de erradicar o biofilme maduro de *A. fumigatus* (IVANOV; ĆIRIĆ; STOJKOVIĆ, 2022). No entanto, poucos estudos descrevem a atividade de moléculas nesta fase de crescimento do biofilme. Gupat e colaboradores (2022) reportaram a redução da hidrofobicidade dos conídios, inibição de formação e erradicação do biofilmes de *A. fumigatus* após o tratamento com o isoeugenol, com concentração mínima para erradicação do biofilme (CMEB) de $312 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($1.900,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Semelhantemente, Hona *et al.* (2019) relataram a erradicação de 80% do biofilme amadurecido da mesma espécie pela ação do composto cis-9-hexadecenal na CMEB de $156 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste cenário escasso, os resultados do presente estudo, representam um avanço na exploração de novas possíveis opções terapêuticas ativas frente a biofilmes, dado que os híbridos R-122 e R-147 também contribuíram na redução de biofilmes maduros, provindo de espécies fenotipicamente resistentes.

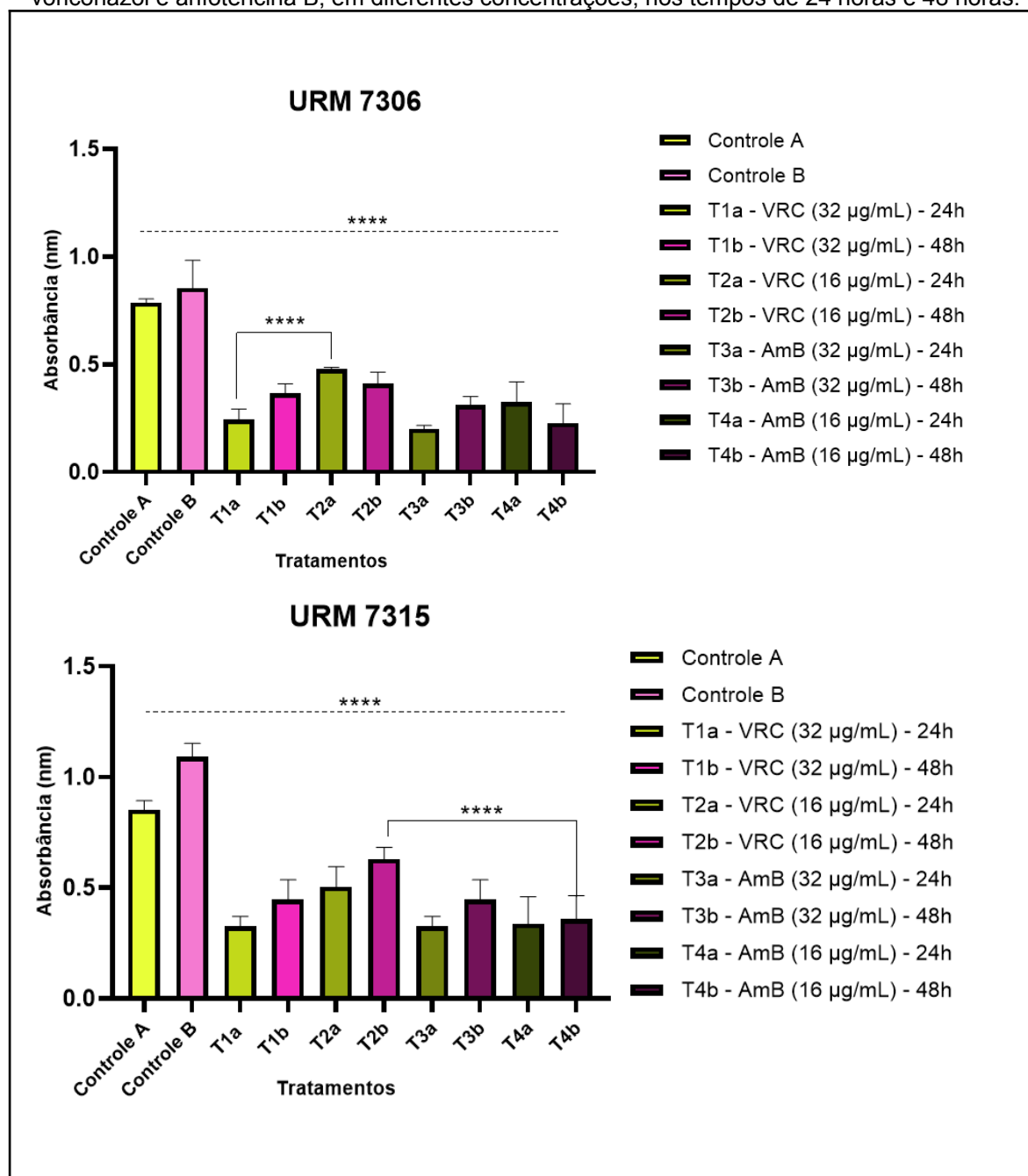
No que concerne ao tempo de tratamento, é possível perceber que houve diferença quanto ao tempo de exposição dos mesmos, tendo a maior redução do metabolismo celular ocorrido em 24 horas de exposição do que 48 horas tanto para híbridos quanto medicamentos (Quadro 6). O híbrido R-122 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou melhor atividade na erradicação dos biofilmes nas primeiras 24 horas em relação ao híbrido R-147 ($1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com $p=0,0029$. E em 48 horas, o inverso foi verdadeiro para as amostras URM 7315 e ATCC 203405 ($p=0,0002$).

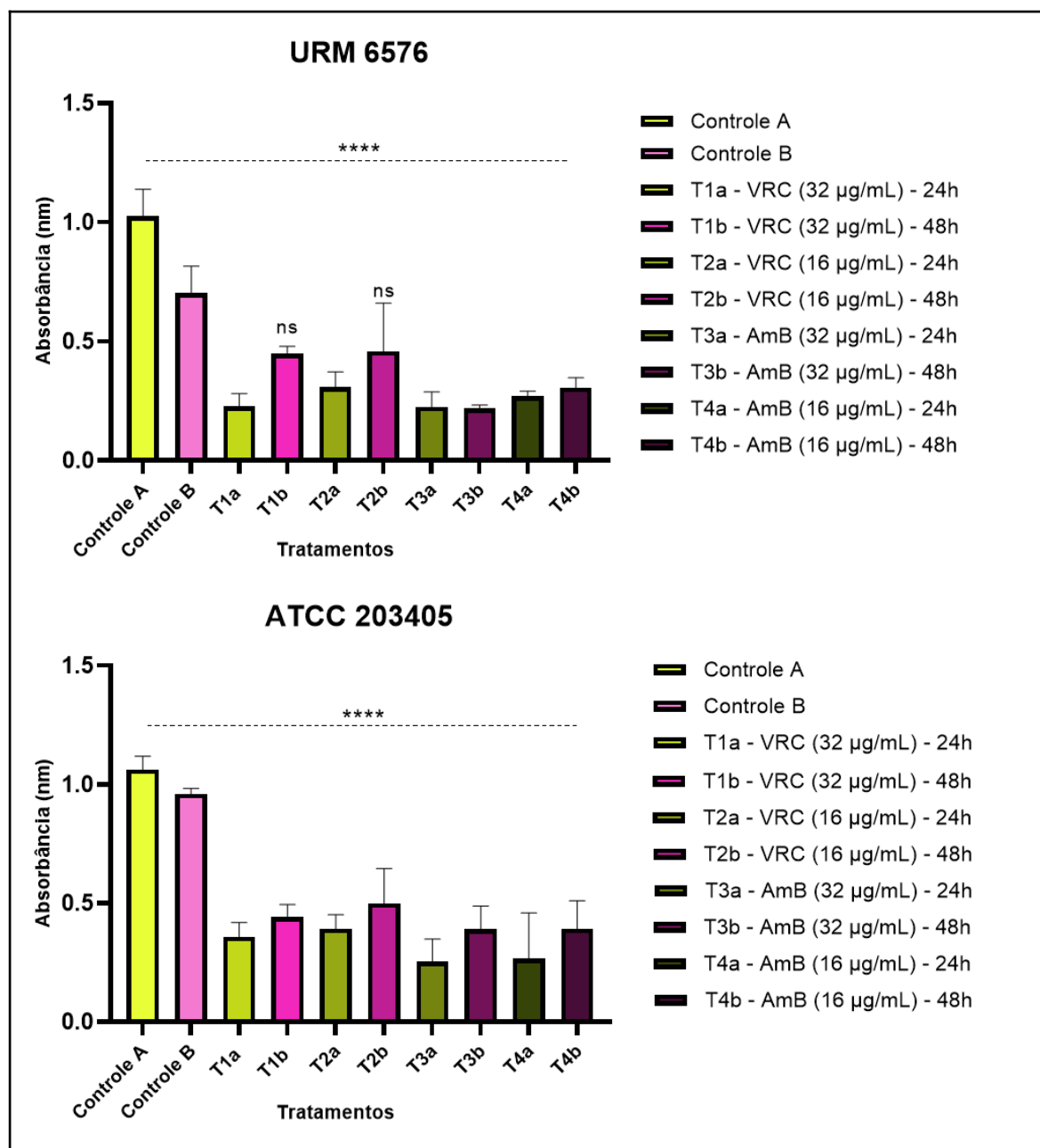
A respeito da concentração, $2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi estatisticamente melhor do que $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os isolados independente do tempo ($p<0,001$), com exceção do isolado URM 7315 para 48 horas ($p=0,0043$). Além disso, de modo

geral, o híbrido R-147 ($2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$) teve atividade superior na erradicação do biofilme para todos os isolados, independente do tempo em concentração, quando comparados com a atuação do híbrido R-122 ($p < 0,0001$).

Ainda sobre a concentração, estudos posteriores para avaliar os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, como a dose limiar, dose que produz o efeito máximo, proporcionalidade da resposta em razão da dose, tempo e duração do efeito, índice terapêutico, biodisponibilidade, entre outros, poderão esclarecer se há uma relação quantitativa entre as concentrações e o efeito *in vivo*, bem como, se doses sucessivas com menores concentrações seria mais apropriado que uma única dose, com a finalidade de evitar possível toxicidade (LEWIS *et al.*, 2011; AUTMIZGUINE *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2017; LUCAS *et al.*, 2019). No entanto, cabe ressaltar, que estudos anteriores de toxicidade aguda, *in vivo*, revelaram que compostos híbridos da mesma série testada neste trabalho apresentaram baixa toxicidade com concentrações acima de 1500 mg/Kg (REIS, 2008; DE MORAES, 2008). Portanto, especula-se que a concentração de $2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto R-147 possa ter perfil de toxicidade semelhante.

Quadro 7 – Média da produção de biofilme por isolado de *Aspergillus fumigatus* após tratamento com voriconazol e anfotericina B, em diferentes concentrações, nos tempos de 24 horas e 48 horas.





****p<0,0001; ***p=0,0002; **p=0,0021; ns: não significativo; T: Tratamento; h-horas; URM: University Recife Mycology (Micoteca URM); VRC: voriconazol; AmB: Anfotericina B.

Acerca da atividade da anfotericina B e voriconazol no tratamento de biofilmes (**Quadro 7**), ambos foram capazes de reduzir parcialmente a atividade metabólica dos mesmos (com exceção do voriconazol 16-32 µg.mL⁻¹ para URM 6576), porém não houve total erradicação dos biofilmes. Estes resultados são condizentes com os estudos de Kaur e Singh (2014), Fernandes *et al.* (2018) e Manavathu, Vager e Vazquez (2014) que correlacionam a redução da susceptibilidade antifúngica com o entrelaçamento das hifas em uma conformação

tridimensional e consequente maturação. Além disso, corrobora com as pesquisas de Morelli, Kerkaert e Cramer (2021) que reportaram que em relação às células planctônicas, a concentração inibitória mínima para erradicar 90% dos biofilmes de *A. fumigatus* (CMEB₉₀) do voriconazol aumenta de 0,5 µg.mL⁻¹ para >256 µg.mL⁻¹. Este padrão de susceptibilidade pode decorrer de diversos mecanismos de resistência que os biofilmes possuem, como: a falta de ergosterol na membrana celular; aumento da atividade antioxidante; presença e aumento da matrix extracelular que diminui a penetração de medicamentos; expressão de bombas de efluxo para múltiplas drogas (AfMDR), entre outros (MARTEL *et al.*, 2010; WEI; ZHANG; LU, 2015; PAUL *et al.*, 2018; PEREZ-CANTERO *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar, que não foram observadas distinções estatisticamente relevantes entre os dois medicamentos nos isolados e tempos testados.

5.7 MECANISMO DE AÇÃO

Embora o mecanismo antifúngico pelo qual os novos híbridos atuem não esteja elucidado, experimentos realizados com hidrazonas e isoxazolinias permitem pressupor que as moléculas híbridas ajam na biossíntese do ergosterol (CHOI; PODUST; ROUSH, 2014; BANO *et al.*, 2015; NASSAR *et al.*, 2020; ALTINTOP *et al.*, 2020.). Segundo estudos de modelagem molecular realizados por Appna *et al.* (2019), algumas hidrazonas bioativas conseguem interagir com os mesmos resíduos aminoácidos (Gly308, Gly472, Cys470, Ser312) da CYP51 que o miconazol, e possuem boa afinidade no encaixe com este sítio ativo. Semelhantemente, as isoxazolinias têm demonstrado poder de interação com os resíduos aminoácidos Gly312, Cys449 e Gly451 do mesmo sítio ativo (CYP51) (SADEGHIAN *et al.*, 2023). Dessa forma, acredita-se que os novos híbridos tenham mecanismo de ação semelhante aos azóis em células planctônicas, e possam interagir e inibir a enzima esterol 14α-desmetilase, essencial para biossíntese do ergosterol, e consequentemente, para fluidez, permeabilidade e integridade das membranas celulares fúngicas (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2013; KELLER *et al.*, 2015; MONK; KENIYA, 2021).

Para corroborar com esta hipótese, o ensaio de proteção de sorbitol foi realizado para determinar se a parede celular fúngica era alvo farmacológico das moléculas híbridas. A parede celular é essencial para o crescimento e viabilidade do fungo, uma vez que age como barreira protetora evitando a ruptura osmótica das

células (DE ARAÚJO NETO *et al.*, 2017; BIERNASIUUK *et al.*, 2021). Na presença de um suporte osmótico, como o sorbitol, mesmo que as paredes celulares sejam danificadas por moléculas que inibem sua síntese, espera-se que a CIM ou CFM aumente, dado que o sorbitol funciona como estabilizador dos protoplastos fúngicos (FROST *et al.*, 1995; CASANOVA *et al.*, 2015). No entanto, na presença do sorbitol, as CFMs dos híbridos deste trabalho não aumentaram, corroborando com a teoria que o mecanismo de ação dos referidos seja primariamente na biossíntese do ergosterol (MIRON *et al.*, 2014).

Em relação ao potencial antibiofilme dos híbridos R-122 e R147 supõe-se, com base na literatura e na forma como os híbridos se comportaram na forma planctônica, que estes atuem semelhantemente a azóis interferindo na biossíntese do ergosterol, promovendo o colapso de conídios e hifas degeneradas (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2013; KELLER *et al.*, 2015; FATTAHI *et al.*, 2021; MONK; KENIYA, 2021; FRANCISCO; BRAGA; GUIMARÃES, 2022). Ademais, outros mecanismos já postulados na literatura que poderiam explicar a atividade antibiofilme dos referidos híbridos, como: a diminuição na hidrofobicidade dos conídios acarretando na supressão da aderência dos mesmos em superfícies (GUPTA *et al.*, 2022); interferência no *quorum sensing* (MUNIR *et al.*, 2020); alteração nos genes que regulam a transição morfológica necessária para formação do biofilme (SERAFINI *et al.*, 2021); despolarização mitocondrial (QU *et al.*, 2019); aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio acarretando na ampliação da peroxidação lipídica e ativação da defesa antioxidante (SHEKHOVA; KNIEMEYER; BRAKHAGE, 2017); promoção de alterações na fluidez da membrana celular com formação de poros, entre outros (BUGLI *et al.*, 2013).

Semelhantemente, a atividade dos híbridos nos biofilmes maduros indica que outras vias antifúngicas além da biossíntese do ergosterol possam existir, e que estas possivelmente consigam contornar o “sequestro” de medicamentos promovido pela matriz extracelular (NETT; ANDES, 2020) e as bombas de efluxo que conferem resistência dos biofilmes de *A. fumigatus* à múltiplas drogas, permitindo a penetração do composto e sua atividade (Du *et al.*, 2021). Por conseguinte, estudos aprofundados a respeito dos mecanismos devem ser realizados para elucidar tais questões.

6 CONCLUSÃO

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

- Todos os isolados de *A. fumigatus* testados são resistentes ao voriconazol e a anfotericina B;
- Todos híbridos de 2-isoxazolina/hidrazonas apresentaram atividade fungicida, *in vitro*, contra os isolados fenotipicamente resistentes ao voriconazol e anfotericina B de *Aspergillus fumigatus*, com CFM variando de 32-1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas e 64-1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas;
- Todos híbridos de 2-isoxazolina/hidrazonas apresentaram atividade fungistática, *in vitro*, contra os isolados fenotipicamente resistentes de *Aspergillus fumigatus*, com CIM80% variando de 8-128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas e 32-256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas;
- Os híbridos moleculares R-122 e R-147 destacaram-se por apresentarem atividade antifúngica superior quando comparada aos outros híbridos;
- Todos os isolados de *A. fumigatus* ensaiados foram fortes produtores de biofilmes, *in vitro*;
- Os híbridos R-122 e R-147 foram capazes de inibir consideravelmente, *in vitro*, a formação de biofilmes de *A. fumigatus*;
- Os híbridos R-122 e R-147 exibiram atividade, *in vitro*, no tratamento de biofilmes maduros de *A. fumigatus*, no entanto, não conseguiram erradicá-los, assim como o voriconazol e anfotericina B;
- Os tempos dos tratamentos impactaram na capacidade de erradicação de biofilmes de *A. fumigatus*;
- As concentrações de 2048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos híbridos R-122 e R-147 foram mais eficientes na atividade antifúngica contra biofilmes de *A. fumigatus* do que 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- O desempenho antifúngico do híbrido R-147 foi consideravelmente superior ao híbrido R-122 e voriconazol para alguns isolados;
- A inadequada solubilidade em RPMI1640 impactou a atividade biológica, *in vitro*, dos híbridos;

- Os híbridos moleculares presumivelmente não tem como alvo farmacológico a parede celular fúngica, uma vez que as CFMs não alteraram com a adição de um protetor osmótico;
- Outros ensaios *in vitro* e *in vivo* são necessários para determinar os alvos e mecanismos de ação antifúngica, antibiofilme e no tratamento de biofilmes por parte dos híbridos moleculares.

REFERÊNCIAS

- ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J.V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO, F.L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista iberoamericana de micología**, v. 27, n. 4, p. 155-182, 2010.
- ABDELLATIF, A. A. H.; EL-TELBANY, D.F.A.; ZAYED, G.; AL-SAWAHLI, M. M. Hydrogel containing PEG-Coated Fluconazole Nanoparticles with Enhanced Solubility and Antifungal Activity. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 14, n. 2, p. 112-122, 2019.
- ABREU, Daniela Brandão; SILVA, Diana; PLÁCIDO, José. Aspergilose broncopulmonar alérgica. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 30, n. 2, p. 85-100, 2022.
- AGARWAL, Aakash *et al.*, Implant retention or removal for management of surgical site infection after spinal surgery. **Global Spine Journal**, v. 10, n. 5, p. 640-646, 2020.
- AGARWAL, Ritesh. *et al.*, Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 8, p. 850-873, 2013.
- AGREGG, Kevin S.; KAUFFMAN, Carol A. Invasive aspergillosis: epidemiology, clinical aspects, and treatment. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2015. p. 662-672.
- AGUIRRE, Juan Pablo Botero; HAMID, Alejandra Maria Restrepo. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 11, 2015.
- AIMANIANDA, Vishukumar *et al.*, Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1117-1121, 2009.
- AIMANIANDA, Vishukumar; LATGÉ, Jean-Paul. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 185-187, 2010.
- AINUROFIQ, Ahmad *et al.*, A review on solubility enhancement methods for poorly water-soluble drugs. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 137, 2021.
- AKOUMIANAKI, Tonia *et al.*, *Aspergillus* cell wall melanin blocks LC3-associated phagocytosis to promote pathogenicity. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 1, p. 79-90, 2016.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *et al.*, Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3380-3387, 2013.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana *et al.*, WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022.

ALBUQUERQUE, Ianca Karine Prudencio de. **Avaliação da atividade anti-Candida de híbridos de 2-isoxazolina aza-bicíclica e sua interação com fluconazol**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ALCAZAR-FUOLI, Laura; MELLADO, Emilia. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 439, 2013.

ALSARRA, Ibrahim A. *et al.*, Comparative study of itraconazole-cyclodextrin inclusion complex and its commercial product. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 7, p. 1009-1017, 2010.

ALTINTOP, Mehlika D. *et al.*, A series of furan-based hydrazones: design, synthesis, and evaluation of antimicrobial activity, cytotoxicity and genotoxicity. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 17, n. 3, p. 312-322, 2020.

ANSELMO, Aaron C.; MITRAGOTRI, Samir. Nanopartículas na clínica. **Bioengenharia e medicina translacional**, v. 1, n. 1, pág. 10-29, 2016.

APPNA, Nooka Ratnam *et al.*, Desenho e síntese de novos derivados de pirimidina 4-hidrazona funcionalizados/1, 2, 4-triazol fundidos [2, 3-d] pirimidina, sua avaliação para atividade antifúngica e estudos de ancoragem. **Pesquisa em Química Medicinal**, v. 28, n. 9, pág. 1509-1528, 2019.

APRAHAMIAN, Ivan. Hydrazone switches and things in between. **Chemical Communications**, v. 53, n. 50, p. 6674-6684, 2017.

ARASTEHFAR, Amir *et al.*, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. **Studies in mycology**, v. 100, n. 1, p. 100115-100115, 2021.

ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo *et al.* Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual Scifinder®. *Química Nova*, v. 38, p. 868-873, 2015.

ASHU, Eta E. *et al.*, Widespread amphotericin B-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* in Hamilton, Canada. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1549, 2018.

ASTVAD, K. M. T. *et al.*, First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naïve patients in Denmark despite negative findings in the environment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5096-5101, 2014.

AUTI, Prashant S.; GEORGE, Ginson; PAUL, Atish T. Recent advances in the pharmacological diversification of quinazoline/quinazolinone hybrids. **RSC advances**, v. 10, n. 68, p. 41353-41392, 2020.

AUTMIZGUINE, Julie *et al.*, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children: clinical implications. **Drugs**, v. 74, n. 8, p. 891-909, 2014.

AYDIN, Merve *et al.*, In vitro antifungal and antibiofilm activities of novel sulfonyl hydrazone derivatives against *Candida* spp. **Journal of Medical Mycology**, v. 33, n. 1, p. 101327, 2023.

AZZOLA, A. *et al.* Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus* ustus infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4805-4808, 2004.

BAI, Yanbin *et al.*, Incidence of surgical-site infection following open reduction and internal fixation of a distal femur fracture: an observational case–control study. **Medicine**, v. 98, n. 7, 2019.

BALLARD, Eloise *et al.*, In-host microevolution of *Aspergillus fumigatus*: A phenotypic and genotypic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 113, p. 1-13, 2018.

BALTUSSEN, Tim JH *et al.*, Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 1, p. e00049-19, 2020.

BADIEE P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014 Feb;139(2):195-204. PMID: 24718393; PMCID: PMC4001330.

BANO, Sameena *et al.*, Synthesis, biological evaluation and molecular docking of some substituted pyrazolines and isoxazolines as potential antimicrobial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 95, p. 96-103, 2015.

BARCHIESI, Francesco *et al.* Effects of amphotericin B on *Aspergillus flavus* clinical isolates with variable susceptibilities to the polyene in an experimental model of systemic aspergillosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2587-2591, 2013.

BARNES, Penelope D.; MARR, Kieren A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics**, v. 20, n. 3, p. 545-561, 2006.

BASAVARAJ, S.; BETAGERI, Guru V. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 3-17, 2014.

BEAUVAIS, Anne; LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus* biofilm in vitro and in vivo. **Microbial Biofilms**, p. 149-161, 2015.

BELLMANN, Romuald; SMUSZKIEWICZ, Piotr. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737-779, 2017.

BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, v. 11, p. 127-152, 2005.

BIANCALANA, Fernanda Simas Corrêa *et al.*, Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 71, n. 4, p. 378-385, 2011.

BIERNASIUK, Anna *et al.*, The newly synthesized thiazole derivatives as potential antifungal compounds against *Candida albicans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 16, p. 6355-6367, 2021.

BINDER, Ulrike; LASS-FLORL, Cornelia. New insights into invasive aspergillosis-from the pathogen to the disease. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 20, p. 3679-3688, 2013.

BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. *Candida albicans* adds more weight to iron regulation. *Cell host & microbe*, v. 10, n. 2, p. 93-94, 2011.

BONGOMIN, Felix *et al.*, Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BORAL, Hazal *et al.*, Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 111, p. 92-107, 2018.

BRIARD, Benoit *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.

BRÜGGEMANN, R. J.; JENSEN, G. M.; LASS-FLÖRL, C. Liposomal amphotericin B—the past. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. Supplement_2, p. ii3-ii10, 2022.

BROWN, Gordon D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BUGLI, Francesca *et al.*, 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, 2013.

CADENA, Jose; THOMPSON, George R.; PATTERSON, Thomas F. Aspergillosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 415-434, 2021.

CAGGIANO, Giuseppina *et al.*, Tendency in Pulmonary Aspergillosis Investigation during the COVID-19 Era: What Is Changing?. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 12, p. 7079, 2022.

CANNON, Richard D. *et al.*, Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CAROLUS, Hans *et al.* Amphotericin B and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CASADEVALL, Arturo. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Recent advances on model hosts**, p. 1-10, 2012.

CASADEVALL, Arturo; STEENBERGEN, Judith N.; NOSANCHUK, Joshua D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 332-337, 2003.

CASANOVA, Bruna B. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9229-9241, 2015.

CAVASSIN, Francelise B. *et al.*, Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, p. 115-147, 2021.

CEVHER, Erdal *et al.*, Bioadhesive tablets containing cyclodextrin complex of itraconazole for the treatment of vaginal candidiasis. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 124-136, 2014.

CHAABANE, Farid *et al.*, Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2788, 2019.

CHAKRABORTY, Rebanta K.; BARADHI, Krishna M. Aspergilloma. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

CHALLA, Sundaram. Pathogenesis and pathology of invasive aspergillosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 12, p. 23-32, 2018.

CHAMILOS, Georgios *et al.*, Melanin targets LC3-associated phagocytosis (LAP): a novel pathogenetic mechanism in fungal disease. **Autophagy**, v. 12, n. 5, p. 888-889, 2016.

CHANDRIKA, KVS Mani; SHARMA, Sahida. Promising antifungal agents: A minireview. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 7, p. 115398, 2020.

CHANG, Ya-Lin *et al.*, New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.

CHOI, Jun Yong; PODUST, Larissa M.; ROUSH, William R. Drug strategies targeting CYP51 in neglected tropical diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11242-11271, 2014

CHRISTENSEN, Gordon D. *et al.*, Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CLAVAUD, Cécile *et al.*, The composition of the culture medium influences the β -1, 3-glucan metabolism of *Aspergillus fumigatus* and the antifungal activity of inhibitors of β -1, 3-glucan synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3428-3431, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**, 3rd Edition 3rd Edition. Approved standard. CLSI M38. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008

COINTAULT, Olivier *et al.*, Weekly high-dose liposomal amphotericin B prevents invasive aspergillosis after heart transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v. 23, n. 6, p. e13745, 2021.

COSTA, M. C. *et al.*, Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 29, p. 100496, 2019.

COUTINHO, Felipe Neves. **Synthèse et évaluation des activités anticancéreuses et antiparasitaires de nouveaux dérivés hybrides isoxazoles azabicycliques/thiazoles et dérivés diaryl-isoxazoles**. 2022. Tese de Doutorado. Nantes Université; Universidade federal rural de Pernambuco (Recife, Brésil).

CRAMER JR, Robert A. *et al.*, Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 2008.

CRAMER, Robert A.; RIVERA, Amariliz; HOHL, Tobias M. Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned?. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 315, 2011.

CROFT, Carys A. *et al.*, Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: a critical review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 472, 2016.

CULIBRK, Luka *et al.*, Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* by human bronchial epithelial cells is mediated by the Arp2/3 complex and WIPF2. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 16, 2019.

DAGENAIS, Taylor RT; KELLER, Nancy P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DALOH, Monlaya *et al.*, High prevalence and genetic diversity of a single ancestral origin azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in indoor environments at Walailak University, Southern Thailand. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 10, p. 4641-4651, 2022.

DANION, François *et al.*, *Aspergillus fumigatus*, one uninucleate species with disparate offspring. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 30, 2021.

DANTAS, Kátia Cristina *et al.*, A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 3943, 2021.

DAS, Torsa; MEHTA, Chetan H.; NAYAK, Usha Y. Multiple approaches for achieving drug solubility: an in silico perspective. **Drug discovery today**, v. 25, n. 7, p. 1206-1212, 2020.

DASCALU, Anca-Elena *et al.*, Design, synthesis and evaluation of hydrazine and acyl hydrazone derivatives of 5-pyrrolidin-2-one as antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 13, p. 127220, 2020.

DAUCHY, Camille *et al.*, Emergence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in azole-naïve patients with chronic obstructive pulmonary disease and their homes. *Indoor Air*, v. 28, n. 2, p. 298-306, 2018.

DE AGUIAR CORDEIRO, Rossana *et al.*, Synthesis and in vitro antifungal activity of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 1-5, 2016.

DE ALENCAR DANDA, Lucas José *et al.*, Combining amorphous solid dispersions for improved kinetic solubility of posaconazole simultaneously released from soluble PVP/VA64 and an insoluble ammonio methacrylate copolymer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 133, p. 79-85, 2019.

DE ALMEIDA, João N. *et al.*, COVID-19-associated aspergillosis in a Brazilian referral centre: Diagnosis, risk factors and outcomes. **Mycoses**, v. 65, n. 4, p. 449-457, 2022.

DE ALMEIDA, Valderes Moraes. Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e arilhidrazonas, derivadas do novo heterociclo 7-(benzoil)-2-isoxazolina [5, 4-b] pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas. 2008.

DE ARAÚJO NETO, Luiz Nascimento *et al.*, Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological interactions**, v. 272, p. 172-181, 2017.

DE OLIVEIRA CARNEIRO BRUM, Juliana *et al.* Synthesis and biological activity of hydrazones and derivatives: A review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 20, n. 5, p. 342-368, 2020.

DEBEAUPUIS, Jean-Paul *et al.*, Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and immunity**, v. 65, n. 8, p. 3080-3085, 1997.

DENNING, David W.; BOWYER, Paul. Editorial commentary: voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: should we be concerned?. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. 521-523, 2013.

DENNING, David W.; PLEUVRY, Alex; COLE, Donald C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Medical mycology**, v. 51, n. 4, p. 361-370, 2013.

DESAI, Jigar V.; MITCHELL, Aaron P.; ANDES, David R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 10, p. a019729, 2014.

DESHMUKH, Amol S.; TIWARI, Kundan J.; MAHAJAN, Vijay R. Solubility enhancement techniques for poorly water-soluble drugs. **Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol**, v. 10, n. 8, 2017.

DU, Wenlong *et al.*, The C2H2 transcription factor SltA contributes to azole resistance by coregulating the expression of the drug target Erg11A and the drug efflux pump Mdr1 in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. e01839-20, 2021.

EHRENFREUND-KLEINMAN, T. *et al.*, Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B–arabinogalactan conjugates. **Biomaterials**, v. 23, n. 5, p. 1327-1335, 2002.

EISENDLE, Martin *et al.*, The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1596-1603, 2006.

EL-BARGHOUTH, M. I. *et al.*, Inclusion complexation of Itraconazole with β - and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrins in aqueous solutions. **Russian journal of physical chemistry**, v. 80, n. 7, p. 1050-1055, 2006.

ESA, Rawnaq *et al.*, Newly synthesized methionine aminopeptidase 2 inhibitor hinders tumor growth. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 1-13, 2022.

ESPINEL-INGROFF, Ana; TURNIDGE, John. O papel dos valores de corte epidemiológicos (ECVs/ECOFFs) no teste de suscetibilidade antifúngica e

interpretação para leveduras e bolores incomuns. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 33, n. 2, pág. 63-75, 2016.

FAKHIM, Hamed *et al.*, Trends in the Prevalence of Amphotericin B-Resistance (AmBR) among Clinical Isolates of *Aspergillus* Species. **Journal of Medical Mycology**, p. 101310, 2022.

FALLON, John P.; REEVES, Emer P.; KAVANAGH, Kevin. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1481-1488, 2011.

FAN, Yuying; KORFANTY, Gregory A.; XU, Jianping. Genetic analyses of amphotericin B susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 860, 2021.

FAN, Yuying; WANG, Yue; XU, Jianping. Comparative genome sequence analyses of geographic samples of *Aspergillus fumigatus*—relevance for Amphotericin B resistance. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1673, 2020.

FATTAHI, Mahsa *et al.*, Effect of Voriconazole on Biofilm of Filamentous Species Isolated from Keratitis. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, 2021.

FERNANDES, Julien *et al.*, Penetration of the human pulmonary epithelium by *Aspergillus fumigatus* hyphae. **The Journal of infectious diseases**, v. 218, n. 8, p. 1306-1313, 2018.

FERNÁNDEZ-HIDALGO, Nuria; ALMIRANTE, Benito. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 1, p. 117-129, 2014.

FIFERE, Adrian *et al.*, Theoretical study on β -cyclodextrin inclusion complexes with propiconazole and protonated propiconazole. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 8, n. 1, p. 2191-2201, 2012.

FIRACATIVE, Carolina. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

FRANCISCO, Camila Guedes; BRAGA, Gilberto Bida Leite; GUIMARÃES, Luis Henrique Souza. Use of the amphotericin B, miconazole, and sodium hypochlorite to control the growth of the robust *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* biofilms on polyethylene support. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 27-34, 2022.

FRISVAD, Jens C. *et al.*, Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 47, n. sup1, p. S53-S71, 2009.

FROST, DAVID J. *et al.*, A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

FUHREN, J. et al. High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2894-2898, 2015.

FULLER, Kevin K. *et al.*, *Aspergillus fumigatus* photobiology illuminates the marked heterogeneity between isolates. **MBio**, v. 7, n. 5, p. e01517-16, 2016.

FULLER, Kevin K. *et al.*, Divergent Protein Kinase A isoforms co-ordinately regulate conidial germination, carbohydrate metabolism and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1045-1062, 2011.

FÜREDI, Petra *et al.*, Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 159-163, 2016.

GABITOV, R. F. *et al.*, Drying and impregnation of wood with propiconazole using supercritical carbon dioxide. **Russian Journal of Physical Chemistry B**, v. 11, n. 8, p. 1223-1230, 2017.

GAGO, Sara; DENNING, David W.; BOWYER, Paul. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. **Medical mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S219-S227, 2019.

GAO, Lei *et al.*, Nanocristais de fármacos: performances in vivo. **Jornal de liberação controlada**, v. 160, n. 3, pág. 418-430, 2012.

GAZENDAM, Roel P. *et al.*, Human neutrophils use different mechanisms to kill *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae: evidence from phagocyte defects. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1272-1283, 2016.

GERWIEN, Franziska *et al.*, Metals in fungal virulence. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 1, p. fux050, 2018.

GHASEMI, Mahshid *et al.*, The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

GHIDINI, E. *et al.*, Discovery of a novel isoxazoline derivative of prednisolone endowed with a robust anti-inflammatory profile and suitable for topical pulmonary administration. **Steroids**, v. 95, p. 88-95, 2015.

GILLIS, Eric P. *et al.*, Applications of fluorine in medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 21, p. 8315-8359, 2015.

GINTJEE, Thomas J.; DONNELLEY, Monica A.; THOMPSON III, George R. Aspiring antifungals: review of current antifungal pipeline developments. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 28, 2020.

GOMEZ-LOPEZ, Alicia *et al.*, Dynamics of gliotoxin and bis (methylthio) gliotoxin production during the course of *Aspergillus fumigatus* infection. **Medical Mycology**, v. 60, n. 4, p. myac025, 2022.

GONCALVES, Sarah Santos *et al.* Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198-219, 2016.

GONZALEZ-JIMENEZ, Irene *et al.*, Hospital environment as a source of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains with tR34/L98H and g448s cyp51a mutations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 22, 2021.

GONZALEZ-LARA, Maria F. *et al.*, Azole resistance and cyp51A mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 7, p. 2047-2050, 2019.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, Alejandra Itzel *et al.*, 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 N. *et al.*, *Aspergillus galactosaminogalactan* mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β -glucan from the immune system. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003575, 2013.

GREENBERGER, Paul A. When to suspect and work up allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 111, n. 1, p. 1-4, 2013.

GRESNIGT, Mark S. *et al.*, A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003936, 2014.

GSALLER, Fabio *et al.*, The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in *Aspergillus fumigatus*. **Metallomics**, v. 4, n. 12, p. 1262-1270, 2012.

GUPTA, Lovely *et al.*, Isoeugenol affects expression pattern of conidial hydrophobin gene RodA and transcriptional regulators MedA and SomA responsible for adherence and biofilm formation in *Aspergillus fumigatus*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 4, p. 214, 2022.

GURUCEAGA, Xabier *et al.*, Fumagillin, a mycotoxin of *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, biological activities, detection, and applications. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 7, 2019.

HAAS, Hubertus. Iron—a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 28, 2012.

HADRICH, Inès *et al.* Amphotericin B in vitro resistance is associated with fatal *Aspergillus flavus* infection. **Medical mycology**, v. 50, n. 8, p. 829-834, 2012.

HAGIWARA, Daisuke *et al.*, Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2016.

HAMILL, Richard J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, p. 919-934, 2013.

HARMOUCHI, Hicham *et al.*, Pulmonary aspergilloma: from classification to management. **Asian Cardiovascular and Thoracic Annals**, v. 28, n. 1, p. 33-38, 2020.

HAWKSWORTH, David L. *et al.*, The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA fungus**, v. 2, n. 1, p. 105-111, 2011.

HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4. 10, 2017.

HENDRICKSON, Joshua A. *et al.*, Antifungal resistance: a concerning trend for the present and future. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 12, p. 1-8, 2019.

HEO, Min Seok *et al.*, Molecular identification and amphotericin B susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* from 11 hospitals in Korea. **Annals of laboratory medicine**, v. 35, n. 6, p. 602, 2015.

HERNÁNDEZ-SOLÍS, Alejandro *et al.*, Pulmonary aspergilloma in immunocompromised patients in a Respiratory Care Unit. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n. 03, p. 564-569, 2022.

HILLMANN, Falk *et al.*, Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2858-2869, 2015.

HINSON, K. F. W.; MOON, A. J.; PLUMMER, N. S. Broncho-pulmonary aspergillosis: a review and a report of eight new cases. **Thorax**, v. 7, n. 4, p. 317, 1952.

HOENIGL, Martin *et al.*, The antifungal pipeline: fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazole, and rezafungin. **Drugs**, v. 81, n. 15, p. 1703-1729, 2021.

HOHL, Tobias M.; FELDMESSER, Marta. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 11, p. 1953-1963, 2007.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri *et al.*, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOUBRAKEN, J. *et al.*, Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 96, n. 1, p. 141-153, 2020.

IASHIN, Vladimir; WIRTANEN, Tom; PEREA-BUCETA, Jesus E. Tetramethylammonium Fluoride: Fundamental Properties and Applications in CF Bond-Forming Reactions and as a Base. **Catalysts**, v. 12, n. 2, p. 233, 2022.

IKEDA, S.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. A mistura de vitaminas RPMI-1640 promove o desenvolvimento de blastocisto bovino in vitro e diminui a expressão gênica de TXNIP com modificação epigenética de histonas associadas. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 1, pág. 87-94, 2018.

IMBERT, Christine; RAMMAERT, Blandine. What could be the role of antifungal lock-solutions? From bench to bedside. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 6, 2018.

IVANOV, Marija; ĆIRIĆ, Ana; STOJKOVIĆ, Dejan. Emerging antifungal targets and strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2756, 2022.

IVASIV, Viktoriya *et al.*, Molecular hybridization as a tool for designing multitarget drug candidates for complex diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 1694-1711, 2019.

JAHN, Bernhard *et al.*, PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 12, p. 793-803, 2002.

JIA, Xiaodong *et al.*, Gliotoxin promotes *Aspergillus fumigatus* internalization into type II human pneumocyte A549 cells by inducing host phospholipase D activation. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 6, p. 491-501, 2014.

KAJAL, Anu *et al.* Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agents. **International journal of medicinal chemistry**, v. 2014, 2014.

KALE, Anjali R.; KAKADE, Sujit; BHOSALE, Ashok. A Review on: Solubility Enhancement Techniques. **Journal of Current Pharma Research**, v. 10, n. 2, p. 3630-3647, 2020.

KALIRAJAN, R. *et al.*, Research Article Docking Studies, Synthesis, Characterization and Evaluation of Their Antioxidant and Cytotoxic Activities of Some Novel Isoxazole-Substituted 9-Anilinoacridine Derivatives. 2012.

KAREEM, Huda S. *et al.* Correlação das atividades antioxidantes com estudos teóricos para novos compostos de hidrazona contendo uma porção 3, 4, 5-trimetoxi benzil. **Jornal europeu de química medicinal**, v. 103, p. 497-505, 2015.

KATHURIA, Shallu *et al.* Molecular epidemiology and in-vitro antifungal susceptibility of *Aspergillus terreus* species complex isolates in Delhi, India: evidence of genetic diversity by amplified fragment length polymorphism and microsatellite typing. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118997, 2015.

KAUTHALE, Sushama *et al.*, Synthesis, antioxidant, antifungal, molecular docking and ADMET studies of some thiazolyl hydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 16, p. 3891-3896, 2017.

KAWABATA, Yohei *et al.*, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1-10, 2011.

KELLER, Petra *et al.*, An antifungal benzimidazole derivative inhibits ergosterol biosynthesis and reveals novel sterols. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6296-6307, 2015.

KESKIN, Hakan; DIROL, Hülya; BOZKURT, Nurgül. Pulmonary aspergilloma management: 5 years of experience from a tertiary hospital. **Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska/Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 19, n. 4, p. 194-198, 2022.

KEOWN, Karen *et al.* Coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *European Respiratory Review*, v. 29, n. 158, 2020.

KHADKA, Prakash *et al.*, Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 6, p. 304-316, 2014.

KHODJA, Imene Amine *et al.*, Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking, DFT calculations and in silico ADME analysis of (benz) imidazole-hydrazone derivatives as promising antioxidant, antifungal, and anti-acetylcholinesterase agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1218, p. 128527, 2020.

KLEPSE, Michael. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of critical care**, v. 26, n. 2, p. 225. e1-225. e10, 2011.

KNOWLES, Sonja L. *et al.*, Gliotoxin, a known virulence factor in the major human pathogen *Aspergillus fumigatus*, is also biosynthesized by its nonpathogenic relative *Aspergillus fischeri*. **MBio**, v. 11, n. 1, p. e03361-19, 2020.

KÖHLER, Julia R. *et al.*, Fungi that infect humans. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 5.3. 08, 2017.

KOPARKAR, Vidyullata *et al.*, P011 Antifungal lock therapy. **Medical Mycology**, v. 60, n. Supplement_1, p. myac072P011, 2022.

KOWALSKI, Caitlin H. *et al.* A heterogeneously expressed gene family modulates the biofilm architecture and hypoxic growth of *Aspergillus fumigatus*. *MBio*, v. 12, n. 1, p. e03579-20, 2021.

KRIJGSHELD, Pauline *et al.*, Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *Aspergillus niger*. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 5, p. 2807-2818, 2012.

KRISHNAN, Suganthini; MANAVATHU, Elias K.; CHANDRASEKAR, Pranatharthi H. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 914-920, 2005.

KUMINEK, Gislaine *et al.*, Posaconazole cocrystal with superior solubility and dissolution behavior. **Crystal Growth & Design**, v. 19, n. 11, p. 6592-6602, 2019.

KWON-CHUNG, Kyung J.; SUGUI, Janyce A. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013.

LACHANAS, E. *et al.*, An unusual pulmonary cavitating lesion. **Respiration**, v. 72, n. 6, p. 657, 2005.

LAMON, Gaëlle *et al.* Solid-state NMR molecular snapshots of *Aspergillus fumigatus* cell wall architecture during a conidial morphotype transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 6, p. e2212003120, 2023.

LANG, Min *et al.*, Non-surgical treatment options for pulmonary aspergilloma. **Respiratory Medicine**, v. 164, p. 105903, 2020.

LASS-FLÖRL, Cornelia. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis. **Medical mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S155-S160, 2019.

LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LATGÉ, Jean-Paul. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

LATGÉ, Jean-Paul; BEAUVAIS, Anne; CHAMILOS, Georgios. The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 99-116, 2017.

LATGÉ, Jean-Paul; CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. e00140-18, 2019.

LEE, Mark J. *et al.*, The fungal exopolysaccharide galactosaminogalactan mediates virulence by enhancing resistance to neutrophil extracellular traps. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005187, 2015.

LESCAR, J. *et al.*, *Aspergillus fumigatus* harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 12, p. 3244-3247, 2014.

LESTRADE, Pieter P. *et al.*, Voriconazole resistance and mortality in invasive aspergillosis: a

LEWIS, Russell E. Current concepts in antifungal pharmacology. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2011. p. 805-817.

LI, Dongmei; ELA, Xiaodong; CALDERONE, Ricardo. O pipeline antifúngico: a necessidade é estabelecida. Existem novos compostos?. **Pesquisa de fermento FEMS**, v. 20, n. 4, pág. foaa023, 2020. See More

LI, Julius; NGUYEN, Cynthia T.; GARCIA-DIAZ, Julia. Role of new antifungal agents in the treatment of invasive fungal infections in transplant recipients: isavuconazole and new posaconazole formulations. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 3, p. 345-366, 2015.

LIPINSKI, Christopher A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.

LIPINSKI, CHRISTOPHER A. **Solubility in water and DMSO: Issues and potential solutions**. AAPS Press, Arlington, VA, USA, 2004.

LIPINSKI, Christopher. Drug solubility in water and dimethylsulfoxide. **Molecular drug properties**, p. 255-282, 2008.

LIU, Ko-Wei *et al.*, Postinfluenza Environment Reduces *Aspergillus fumigatus* Conidium Clearance and Facilitates Invasive Aspergillosis In Vivo. **Mbio**, v. 13, n. 6, p. e02854-22, 2022a.

LIU, Na *et al.*, Strategies in the discovery of novel antifungal scaffolds. **Future medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1435-1454, 2016.

LIU, Shuai *et al.*, Filamentous fungal biofilms: Conserved and unique aspects of extracellular matrix composition, mechanisms of drug resistance and regulatory networks in *Aspergillus fumigatus*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2022b.

LIU, Wei-Yong *et al.* Synthesis of novel ribavirin hydrazone derivatives and anti-proliferative activity against A549 lung cancer cells. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 11, p. 1270-1275, 2009

LOGAN, Ashley; WOLFE, Amanda; WILLIAMSON, John C. Antifungal resistance and the role of new therapeutic agents. **Current Infectious Disease Reports**, p. 1-12, 2022.

LÓPEZ-MEDRANO, Francisco *et al.*, Clinical presentation and determinants of mortality of invasive pulmonary aspergillosis in kidney transplant recipients: a multinational cohort study. *American journal of transplantation*, v. 16, n. 11, p. 3220-3234, 2016.

LUCAS, Adam J. *et al.*, Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 12, p. 1313-1327, 2019.

MA, Hequn *et al.*, Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation. **Fitoterapia**, v. 93, p. 54-61, 2014.

MANAVATHU, Elias K.; VAGER, Dora L.; VAZQUEZ, Jose A. Development and antimicrobial susceptibility studies of in vitro monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC microbiology**, v. 14, p. 1-15.

MARTEL, Claire M. et al. Complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* ERG11/CYP51 (sterol 14 α -demethylase) doxycycline-regulated mutant and screening of the azole sensitivity of *Aspergillus fumigatus* isoenzymes CYP51A and CYP51B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 11, p. 4920-4923, 2010.

MARANGOCI, Narcisa *et al.*, Inclusion complex of a new propiconazole derivative with β -cyclodextrin: NMR, ESI-MS and preliminary pharmacological studies. **Results in pharma sciences**, v. 1, n. 1, p. 27-37, 2011.

MARGALIT, Anatte; KAVANAGH, Kevin. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 5, p. 670-687, 2015.

MASS, Eduardo Bustos. Hibridização molecular: reação de Huisgen aplicada na síntese de chalconas-dihidropirimidinonas. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 150, 2017.

MEI, Haibo *et al.*, Applications of fluorine-containing amino acids for drug design. **European journal of medicinal chemistry**, v. 186, p. 111826, 2020.

MELLO, Thaís P. et al. Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling*, v. 32, n. 7, p. 737-749, 2016.

MILETIC, Tijana *et al.*, Spray-dried voriconazole–cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 122-131, 2013.

MIRON, Diogo *et al.*, Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 24, p. 660-667, 2014.

MISHRA, Satyendra; PATEL, Sejal; HALPANI, Chandni G. Recent updates in curcumin pyrazole and isoxazole derivatives: synthesis and biological application. **Chemistry & biodiversity**, v. 16, n. 2, p. e1800366, 2019.

MITCHELL, Kaitlin F.; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Fungal Biofilms and related infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 3**, p. 21-35, 2016.

MONK, Brian C.; KENIYA, Mikhail V. Roles for structural biology in the discovery of drugs and agrochemicals targeting sterol 14 α -demethylases. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 02, p. 67, 2021.

MOODLEY, Loven; PILLAY, Jehron; DHEDA, Keertan. Aspergilloma and the surgeon. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6, n. 3, p. 202, 2014.

MORELLI, Kaesi A.; KERKAERT, Joshua D.; CRAMER, Robert A. Aspergillus fumigatus biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 8, p. e1009794, 2021.

MOROGOVSKEY, Alma *et al.*, Horizontal Gene Transfer of Triazole Resistance in Aspergillus fumigatus. **Microbiology Spectrum**, p. e01112-22, 2022.

MOTA, Fernanda Virginia Barreto. Avaliação das atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicas R-99 e R-123. 2018.

MOWAT, Eilidh *et al.*, Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of Aspergillus fumigatus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1205-1212, 2007.

MULLER, Klaus; FAEH, Christoph; DIEDERICH, François. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. **science**, v. 317, n. 5846, p. 1881-1886, 2007.

MOWAT, Eilidh *et al.* Phase-dependent antifungal activity against Aspergillus fumigatus developing multicellular filamentous biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 6, p. 1281-1284, 2008.

MUNIR, Samman *et al.*, Quorum sensing interfering strategies and their implications in the management of biofilm-associated bacterial infections. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

MURAFUJI, Toshihiro *et al.*, Bismuth heterocycles based on a diphenyl sulfone scaffold: Synthesis and substituent effect on the antifungal activity against Saccharomyces cerevisiae. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 2, p. 519-525, 2011.

NABILI, Mojtaba *et al.*, High prevalence of clinical and environmental triazole-resistant Aspergillus fumigatus in Iran: is it a challenging issue?. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 6, p. 468-475, 2016.

NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S. A review on biological activities and chemical synthesis of hydrazide derivatives. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 4, p. 569-612, 2012.

NARASIMHAN, Balasubramanian; KUMAR, Pradeep; SHARMA, Deepika. Biological activities of hydrazide derivatives in the new millennium. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 52, n. 2, 2010.

NASSAR, Ibrahim F. *et al.*, Synthesis of new uracil derivatives and their sugar hydrazones with potent antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 39, n. 7, p. 991-1010, 2020.

NERY, Ana Carlyne Sombra *et al.* Synthesis of benzylpiperazine derivatives containing the pyrazine moiety with potential activity against M. tuberculosis. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 15340-15354, 2020.

NETT, Jeniel E.; ANDES, David R. Contributions of the biofilm matrix to Candida pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, 2020.

NI, Tingjunhong *et al.*, Design, synthesis, and evaluation of novel tetrazoles featuring isoxazole moiety as highly selective antifungal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 115007, 2023.

NI, Tingjunhong *et al.*, Design, synthesis, and in vitro and in vivo antifungal activity of novel triazoles containing phenylethynyl pyrazole side chains. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3370, 2022.

OLIVER, Sara E. Data and clinical considerations for additional doses in immunocompromised people. 2021.

OLIVEIRA, Juliana Gomes Ramalho de *et al.* Aumento do número de mortes violentas e transplante de órgãos no Brasil: há um paralelo?. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 38, p. 383-384, 2016.

ÖNCÜ, Serkan. In vitro effectiveness of antifungal lock solutions on catheters infected with Candida species. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, n. 5, p. 634-639, 2011.

OSHEROV, Nir. Conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. **Aspergillus fumigatus and Aspergillosis**, p. 131-142, 2008.

PANDEY, Abhishek; GALVANI, Alison P. The global burden of HIV and prospects for control. **The Lancet HIV**, v. 6, n. 12, p. e809-e811, 2019.

PARIS, Sophie *et al.*, Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1581-1588, 2003.

PATEL, Avani R. *et al.*, Treating allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. **Cureus**, v. 11, n. 4, 2019.

PATEL, Harun M. *et al.*, Quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies as strategic approach in drug discovery. **Medicinal chemistry research**, v. 23, n. 12, p. 4991-5007, 2014.

PATEL, R. B.; PATEL, M. R.; MEHTA, J. B. Validation of stability indicating high performance liquid chromatographic method for estimation of Desloratadine in tablet formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S644-S650, 2017.

PAUL, Raees A. *et al.*, Magnitude of voriconazole resistance in clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus* and investigation into the role of multidrug efflux pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e01022-18, 2018.

PAULUSSEN, Caroline *et al.*, 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, 2017.

PELAEZ, T. *et al.*, First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naïve patient in Spain. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 33-34, 2015.

PERDONI, Federica *et al.*, Antifungal activity of Myriocin on clinically relevant *Aspergillus fumigatus* strains producing biofilm. **Bmc Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.

PEREZ-CANTERO, Alba *et al.*, Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 1, p. 105807, 2020.

PEREZ-CUESTA, U. *et al.*, Melanin and pyomelanin in *Aspergillus fumigatus*: from its genetics to host interaction. **International Microbiology**, v. 23, p. 55-63, 2020.

PEREZ-CUESTA, Uxue *et al.*, Nitrogen, Iron, and Zinc Acquisition: Key Nutrients to *Aspergillus fumigatus* Virulence. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 518, 2021.

PERFECT, John R.; GHANNOUM, Mahmoud. Emerging issues in antifungal resistance. **Infectious Disease Clinics**, v. 34, n. 4, p. 921-943, 2020.

PIERCE, Christopher G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PIERCE, Christopher G. *et al.* A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2015.

PUÉRTOLAS-BALINT, Fabiola *et al.*, Revealing the virulence potential of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates using whole-genome sequencing. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1970, 2019.

QU, Su *et al.*, Cinnamaldehyde, a promising natural preservative against *Aspergillus flavus*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2895, 2019.

RAJENDRAN, Ranjith *et al.*, Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2092-2097, 2011.

RAJENDRAN, Ranjith *et al.*, Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 3, p. 420-429, 2013.

RAMAGE G, *et al* 2002. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 46(11):3634-3636.

RAMAGE, Gordon *et al.*, *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS microbiology letters**, v. 324, n. 2, p. 89-97, 2011.

RAMBACH, Günter *et al.*, Identification of *Aspergillus fumigatus* surface components that mediate interaction of conidia and hyphae with human platelets. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 7, p. 1140-1149, 2015.

RASENACK, Norbert; MÜLLER, Bernd W. Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques. **Pharmaceutical development and technology**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2004.

REECE, Emma *et al.*, The prevalence of *Aspergillus fumigatus* in early cystic fibrosis disease is underestimated by culture-based diagnostic methods. **Journal of microbiological methods**, v. 164, p. 105683, 2019.

REGINATTO, Paula *et al.*, Rational selection of antifungal drugs to propose a new formulation strategy to control *Candida* biofilm formation on venous catheters. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1037-1049, 2020.

REICHERT-LIMA, Franqueline *et al.*, 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.

REIS, Silvio Leandro Gonçalves Bonfim. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antioceptiva e toxicidade de novas isoxazolil-aril-hidrazonas**. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

RENSHAW, Hilary *et al.*, Distinct roles of myosins in *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1556-1564, 2016.

RESENDIZ-SHARPE, Agustin *et al.* Prevalence of voriconazole-resistant invasive aspergillosis and its impact on mortality in haematology patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 9, p. 2759-2766, 2019.

REVIE, Nicole M. *et al.*, Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RHODES, Johanna *et al.*, Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. **Nature microbiology**, v. 7, n. 5, p. 663-674, 2022.

RIARD, Benoit *et al.*, Galactosaminogalactan of *Aspergillus fumigatus*, a bioactive fungal polymer. **Mycologia**, v. 108, n. 3, p. 572-580, 2016.

RIBEIRO, Ana I. *et al.*, Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 19, p. 4699-4702, 2014.

ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D.; COWEN, Leah E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 5, p. 4.5. 19, 2016.

ROBINET, Pauline *et al.*, A polysaccharide virulence factor of a human fungal pathogen induces neutrophil apoptosis via NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 5332-5342, 2014.

ROCHA, Cleidivania S. *et al.*, Structural studies and investigation on the antifungal activity of silver (I) complexes with 5-nitrofuranyl-derived hydrazones. **Polyhedron**, v. 170, p. 723-730, 2019.

RODRIGUES, A. G. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Aspergillus*. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2016. p. 81-93.

ROGERS, Thomas R. *et al.*, Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 8, p. 2053-2073, 2022.

ROLLAS, Sevim; GÜNİZ KÜÇÜKGÜZEL, Ş. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910-1939, 2007.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275-288, 2011.

ROSENBERG, Michael *et al.*, Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 4, p. 405-414, 1977.

ROSOWSKI, Emily E. *et al.*, Efficacy of voriconazole against *Aspergillus fumigatus* infection depends on host immune function. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. e00917-19, 2020.

RUDRAMURTHY, Shivaprakash M. *et al.*, Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

RUMBAUGH, Kendra P.; SAUER, Karin. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.

RUSSO, Alessandro *et al.*, Pulmonary aspergillosis: an evolving challenge for diagnosis and treatment. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, p. 511-524, 2020.

SABINO, Raquel *et al.*, Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various clinical and environmental sources. **Medical mycology**, v. 54, n. 7, p. 740-756, 2016.

SABINO, Raquel *et al.*, Trends on aspergillus epidemiology—perspectives from a national reference laboratory surveillance program. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 28, 2021.

SADASHIVA, M. P. *et al.*, Solution-phase synthesis of novel Δ^2 -isoxazoline libraries via 1, 3-dipolar cycloaddition and their antifungal properties. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 21, p. 4539-4544, 2003.

SADEGHIAN, Sara *et al.*, 1, 2, 4-Triazole derivatives as novel and potent antifungal agents: Design, synthesis and biological evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1271, p. 134039, 2023.

SALES-CAMPOS, Helioswilton *et al.*, The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SALEHI, Mohammadreza *et al.* Opportunistic fungal infections in the epidemic area of COVID-19: a clinical and diagnostic perspective from Iran. *Mycopathologia*, v. 185, n. 4, p. 607-611, 2020.

SAMEER, Mallampati *et al.*, Surgical management of pulmonary aspergilloma—12 years' experience from a tertiary care centre in India. **Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 37, n. 4, p. 402-410, 2021.

SAMSON, Robert A. *et al.*, Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. **Studies in Mycology**, v. 59, n. 1, p. 147-203, 2007.

SANKAR, Balakrishnan *et al.*, Design of a simple and efficient synthesis for bioactive novel pyrazolyl–isoxazoline hybrids. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 26, p. 10458-10467, 2019.

SANTOS, Roberta Kahwage; DA FONSECA LOUREIRO, Gabriel de Jesus; BARROS, Letícia Barbosa. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Brazil. **International Archives of Medicine**, v. 14, 2021.

SANTOS, Samuel José. Reações multicomponentes combinadas com a cicloadição de huisgen na síntese de híbridos moleculares. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 40, 2020.

SARFRAZ, Rai Muhammad *et al.*, Application of various polymers and polymers based techniques used to improve solubility of poorly water soluble drugs: A review. **Acta Pol. Pharm**, v. 74, p. 347-356, 2017.

SARKER, S. J.; NAHAR, L. Química para Estudantes de Farmácia. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SAUER, Karin *et al.*, The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608-620, 2022.

SCHAUWVLIEGHE, Alexander FAD *et al.* Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 6, n. 10, p. 782-792, 2018.

SCHRETTL, Markus *et al.*, Distinct roles for intra-and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 9, p. e128, 2007.

SEHGAL, Inderpaul Singh *et al.*, Efficiency of *A. fumigatus*-specific IgG and galactomannan testing in the diagnosis of simple aspergilloma. **Mycoses**, v. 62, n. 12, p. 1108-1115, 2019.

SEMALTY, Ajay. Cyclodextrin and phospholipid complexation in solubility and dissolution enhancement: a critical and meta-analysis. **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 8, p. 1255-1272, 2014.

SERAFINI, Mairim Russo *et al.*, A patent review of antibiofilm fungal drugs (2002-present). **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 229-248, 2021.

SHAFIEI, Mohammad *et al.*, History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104240, 2020.

SHAH, Ashok; PANJABI, Chandramani. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a perplexing clinical entity. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 8, n. 4, p. 282-297, 2016.

SHAIK, Afzal *et al.*, Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of some novel isoxazole ring containing chalcone and dihydropyrazole derivatives. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1047, 2020.

SHAO, Baihao; APRAHAMIAN, Ivan. Hydrazones as new molecular tools. **Chem**, v. 6, n. 9, p. 2162-2173, 2020.

SHARMA, Cheshta *et al.*, Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: is it de novo or environmentally acquired?. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 69-74, 2015.

SHARMA, P. C. *et al.* Hydrazone comprising compounds as promising anti-infective agents: Chemistry and structure-property relationship. **Materials Today Chemistry**, v. 18, p. 100349, 2020.

SHEIKHI-MOHAMMAREH, Seddigheh *et al.*, Synthesis of Various Derivatives of [1, 3] Selenazolo [4, 5-d] pyrimidine and Exploitation of These Heterocyclic Systems as Antibacterial, Antifungal, and Anticancer Agents. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 32, p. 10060-10066, 2020.

SHEKHOVA, Elena; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A. Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by itraconazole, terbinafine, and

amphotericin B as a mode of action against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e00978-17, 2017.

SHISHODIA, Sonia Kumari; TIWARI, Shraddha; SHANKAR, Jata. Mecanismo de resistência e proteínas em espécies de *Aspergillus* contra agentes antifúngicos. **Micologia**, v. 10, n. 3, pág. 151-165, 2019.

SHRIVASTAVA, Mansi; SHARMA, Poonam; SINGH, Rambir. Identification of potential CYP51 inhibiting anti-*Aspergillus* phytochemicals using molecular docking and ADME/T studies. **Chemical Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 18-21, 2021.

SIAFAKA, Panoraia I. *et al.*, Two different approaches for oral administration of voriconazole loaded formulations: Electrospun fibers versus β -cyclodextrin complexes. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 282, 2016.

SILVA, Iara R. *et al.*, Improving the solubility of an antifungal thiazolyl hydrazone derivative by cyclodextrin complexation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 156, p. 105575, 2021.

SINGH, Gurjeet *et al.*, Virulence factors detection in *Aspergillus* isolates from clinical and environmental samples. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 7, p. DC13, 2017.

SNELDERS, Eveline *et al.*, Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. e219, 2008.

SOTO, R. *et al.*, Solubility, aggregation and stability of Amphotericin B drug in pure organic solvents: Thermodynamic analysis and solid form characterization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 366, p. 120276, 2022.

SOYSAL, Ahmet. Prevention of invasive fungal infections in immunocompromised patients: the role of delayed-release posaconazole. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 321, 2015.

SPETH, Cornelia *et al.*, Galactosaminogalactan (GAG) and its multiple roles in *Aspergillus* pathogenesis. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 976-983, 2019.

STANZANI, Marta *et al.*, High resolution computed tomography angiography improves the radiographic diagnosis of invasive mold disease in patients with hematological malignancies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 11, p. 1603-1610, 2015.

STEELE, Chad *et al.*, The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 4, p. e42, 2005.

STEFANI, H. A. Introdução à Química de Compostos Heterocíclicos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STEINBACH, William J. et al. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 2, p. 192-198, 2004.

STEWART, James IP *et al.*, Reducing *Aspergillus fumigatus* virulence through targeted dysregulation of the conidiation pathway. **Mbio**, v. 11, n. 1, p. e03202-19, 2020.

STEWART, Philip S. Prospects for anti-biofilm pharmaceuticals. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 3, p. 504-511, 2015.

STONE, Neil RH et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, p. 485-500, 2016.

SUBROTO, Eefje *et al.*, Growth of *Aspergillus fumigatus* in Biofilms in Comparison to *Candida albicans*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 48, 2022.

SUGUI, Janyce A. *et al.*, *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2015.

SWAPNAJA, K. Jones M. *et al.*, Desenho, síntese e avaliação biológica de híbridos diaziridinil quinona isoxazol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 85-98, 2016.

SZEJTLI, József. **Cyclodextrin technology**. Springer Science & Business Media, 2013.

TAKAGI, Toshihide *et al.*, A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 631-643, 2006.

TAKEDA, Keita *et al.*, High detection rate of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* after treatment with azole antifungal drugs among patients with chronic pulmonary aspergillosis in a single hospital setting with low azole resistance. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 327-334, 2021.

TALAS, Laszlo *et al.*, Effect of amphotericin B and voriconazole on the outgrowth of conidia of *Aspergillus fumigatus* followed by time-lapse microscopy. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

TANG, Peixiao *et al.*, Characterization and In Vitro Evaluation of the Complexes of Posaconazole with β - and 2, 6-di-O-methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 104-114, 2017.

TAVARES, Aline. Isoxazolinás: uma classe de materiais avançados revisitada. 2010.

TEIXEIRA, Melissa Martins *et al.*, New Antifungal Agents with Azole Moieties. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 11, p. 1427, 2022.

TEKAIA, Fredj; LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 385-392, 2005.

THAMBAN CHANDRIKA, Nishad *et al.*, Broad-Spectrum Antifungal Agents: Fluorinated Aryl-and Heteroaryl-Substituted Hydrazones. **ChemMedChem**, v. 16, n. 1, p. 124-133, 2021.

THOM, Charles; CHURCH, Margaret B. *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* n. sp. and their allies. **American Journal of Botany**, v. 5, n. 2, p. 84-104, 1918.

TREFZGER, Ozildéia S. *et al.*, Design, synthesis, antileishmanial, and antifungal biological evaluation of novel 3, 5-disubstituted isoxazole compounds based on 5-nitrofuran scaffolds. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 2, p. 1900241, 2020.

VADLAPUDI, Varahalarao *et al.*, *Aspergillus* secondary metabolite database, a resource to understand the secondary metabolome of *Aspergillus* genus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7325, 2017.

VALSECCHI, Isabel *et al.*, Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of fungi**, v. 4, n. 1, p. 2, 2017.

VAN DE SANDE, Wendy WJ *et al.*, The effects of antifungal agents to conidial and hyphal forms of *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 48-55, 2010.

VAN DE VEERDONK, Frank L. *et al.*, *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661-674, 2017.

VAN DYCK, Katrien *et al.*, Microbial interkingdom biofilms and the quest for novel therapeutic strategies. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 412, 2021.

VAN WAEYENBERGHE, Lieven *et al.*, Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *A. canthamoeba castellanii* parallels macrophage–fungus interactions. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 819-824, 2013.

VERBURG, Kim *et al.* Novel treatment approach for Aspergilloses by targeting germination. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 758, 2022.

VEMURI, Venkata Deepthi; LANKALAPALLI, Srinivas; GUNTAKA, Purna Chandra Reddy. Posaconazole-amino acid cocrystals for improving solubility and oral bioavailability while maintaining antifungal activity and low *In vivo* toxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, p. 103491, 2022.

VIEGAS-JUNIOR, Claudio *et al.* Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current medicinal chemistry*, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *Rbac*, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

VITTE, Joana *et al.*, Multivariate analysis as a support for diagnostic flowcharts in allergic bronchopulmonary aspergillosis: a proof-of-concept study. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1019, 2017.

VOLKOVA, Tatyana V.; SIMONOVA, Olga R.; PERLOVICH, German L. New antifungal compound: Impact of cosolvency, micellization and complexation on solubility and permeability processes. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1865, 2021.

WALRAVEN, Carla J.; LEE, Samuel A. Antifungal lock therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2013.

WANG, Hsuan-Chen *et al.*, Prevalence, mechanisms and genetic relatedness of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* exhibiting resistance to medical azoles in the environment of Taiwan. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 1, p. 270-280, 2018.

WANG, Josephine LF *et al.*, Serum IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* as a diagnostic aid in allergic bronchopulmonary aspergillosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 117, n. 5, p. 917-927, 1978.

WANG, Xiyue *et al.* Isoxazole/Isoxazoline Skeleton in the Structural Modification of Natural Products: A Review. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 2, p. 228, 2023.

WASAN, Ellen K. *et al.*, Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 76-84, 2009.

WEI, Xiaolei; ZHANG, Yuanwei; LU, Ling. The molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: from bedside to bench and back. **Journal of Microbiology**, v. 53, p. 91-99, 2015.

WILLIAMS, Hywel D. *et al.*, Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 315-499, 2013.

WOLFMEIER, Heidi *et al.*, New perspectives in biofilm eradication. **ACS infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 93-106, 2018.

WYATT, Timon T. *et al.*, Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *N. eosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 395-411, 2015.

XIE, Fei *et al.*, Design, synthesis, and in vitro evaluation of novel triazole analogues featuring isoxazole moieties as antifungal agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 103982, 2020.

YANG, Liu *et al.*, SAR analysis of heterocyclic compounds with monocyclic and bicyclic structures as antifungal agents. **ChemMedChem**, v. 17, n. 12, p. e202200221, 2022.

ZAVREL, Martin; WHITE, Theodore C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355-1373, 2015.

ZHA, Gao-Feng *et al.*, Synthesis, SAR and molecular docking studies of benzo [d] thiazole-hydrazones as potential antibacterial and antifungal agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 14, p. 3148-3155, 2017.

ZHANG, Changjian *et al.*, Gliotoxin induces cofilin phosphorylation to promote actin cytoskeleton dynamics and internalization of *Aspergillus fumigatus* into type II human pneumocyte cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1345, 2019a.

ZHANG, Jianhua *et al.*, Asexual sporulation facilitates adaptation: The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Evolution**, v. 69, n. 10, p. 2573-2586, 2015.

ZHANG, Lulu *et al.*, Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110184, 2020.

ZHANG, Shizhu *et al.*, PtaB, a lim-domain binding protein in *Aspergillus fumigatus* regulates biofilm formation and conidiation through distinct pathways. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 1, p. e12799, 2018.

ZHANG, Tao *et al.*, Synthesis and antifungal activity of novel pyrazolines and isoxazolines derived from cuminaldehyde. **Journal of pesticide science**, v. 44, n. 3, p. 181-185, 2019b.

ZHOU, Duanyong *et al.*, Genetic diversity and azole resistance among natural *Aspergillus fumigatus* populations in Yunnan, China. **Microbial Ecology**, v. 83, n. 4, p. 869-885, 2022.

ZHUANG, Wan-Ru *et al.*, Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 294, p. 311-326, 2019.

ZICKER, Michelle *et al.*, Epidemiology of fungal infections in liver transplant recipients: a six-year study of a large Brazilian liver transplantation centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 339-345, 2011.