

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**

**UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE**

**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-*Candida albicans* DA ASSOCIAÇÃO DO CITRONELAL COM A  
ANFOTERICINA B OU COM O CETOCONAZOL**

**CUITÉ-PB**

**2014**

**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-*Candida albicans* DA ASSOCIAÇÃO DO CITRONELAL COM A  
ANFOTERICINA B OU COM O CETOCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - Campus Cuité, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

**CUITÉ-PB**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586a Silva, Patrícia Duarte Costa.

Atividade anti-*Candida albicans* da associação do citronelal com a anfotericina B ou com o cetoconazol. / Patrícia Duarte Costa Silva. – Cuité: CES, 2014.

50 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientador: Wylly Araújo de Oliveira.

1. *Candida albicans*. 2. Antifúngicos. 3. Citronelal. I. Título.

CDU 616-083

**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-*Candida albicans* DA ASSOCIAÇÃO DO CITRONELAL COM A  
ANFOTERICINA B OU COM O CETOCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - Campus Cuité, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira**  
**Orientador – UFCG**

---

**Prof. Dr. Fillipe Oliveira Pereira**  
**Membro – UFCG**

---

**Profa. Dra. Maria Emília da Silva Menezes**  
**Membro – UFCG**

Dedico este trabalho inicialmente a Deus, o grande criador do universo, fonte de luz  
inspiradora da inteligência dos homens.  
Aos meus pais e irmãos que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu  
chegasse até esta etapa da minha vida.  
Aos meus avós pelo carinho, preocupação e incentivo.  
Minha homenagem in memoriam a meu avô Miguel Alexandre, que sempre me incentivou a  
continuar os estudos. Gostaria muito que estivesse hoje presente entre nós para  
compartilharmos juntos essa vitória.  
Dedico também ao meu namorado por todo amor e compreensão demonstrada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus todo poderoso pelo dom da vida, pelo amor infinito, e por ter iluminado meus caminhos durante todos esses anos. Agradeço-te, santo pai, por ter me dado condições de lutar e alcançar meus objetivos. Obrigada pela família que tenho e por todos os amigos que encontrei até hoje.

Aos meus queridos pais, Raimundo Miguel e Maria Dilce, alicerces da minha vida. Muito obrigada pelo apoio incondicional e por tudo que sempre fizeram por mim, pela simplicidade, exemplo, e carinho, fundamentais na construção do meu caráter. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amados irmãos, Anna Caroline e Richi Duarte pela amizade, afeto e companheirismo constantes. Agradeço pela disposição de sempre querer ajudar.

Ao meu namorado, Clécio Alves, por ter acreditado em mim, por estar sempre ao meu lado me apoiando e ajudando nos momentos difíceis, pela paciência, pelos tantos conselhos, força, coragem e incentivo. Obrigada por tudo meu amor, você é demais!

Aos meus colegas de classe, em especial aos meus amigos Danilo Andrade, Laize Soares, Karla Sunally, Ana Paula e Anderson Angel que sempre fizeram as aulas parecerem menos cansativas e que de alguma forma me incentivaram, me ajudaram e tornaram os dias mais alegres nesses cinco anos do curso.

Também aos meus amigos Edva Monalisa, Débora Dalila, Geyza, Crislaine, Fátima e família, Leonardo e Ana Gilza pelo abraço, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Obrigada pela mão que sempre me estenderam quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Ao meu professor orientador, Dr. Wylly Araújo de Oliveira, pela oportunidade, pelos ensinamentos e paciência. Muito obrigada pela confiança, amizade e dedicação ao longo deste período. Tenho em você um exemplo a seguir de honestidade e humildade.

A minha amiga e companheira de laboratório, Ana Gilza, por ter me ajudado na execução dos experimentos. Obrigada por tudo!

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica. Assim como os técnicos e aos funcionários do CES pela grande ajuda, esforço e desenvolvimento profissional para com os alunos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Se eu pudesse deixar algum presente a vocês, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho, além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

Infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* são responsáveis por altos índices de morbimortalidade em hospitais em todo mundo, afetando principalmente a população de imunocomprometidos. Dentre os fungos, *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas de lesões superficiais e sistêmicas. Este problema está associado ao aumento de resistência dos fungos patogênicos aos agentes utilizados no esquema terapêutico e ao número limitado de drogas para a cura dessas infecções. Dadas essas dificuldades, a busca por novos fármacos com atividade antifúngica tornou-se cada vez mais importante. Nesse sentido, os produtos naturais são conhecidos por serem fontes potenciais de fármacos antimicrobianos sendo ainda poucos explorados. A associação entre fármacos usualmente utilizados na prática clínica com outras substâncias pode ter entre outras vantagens a redução de efeitos adversos de medicamentos considerados tóxicos. Por esta razão, este projeto teve como objetivos estudar a atividade antifúngica do citronelal isoladamente e em associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do citronelal, anfotericina B e cetoconazol frente a cepas de *Candida albicans* foram avaliadas pela técnica da microdiluição, sendo ainda realizada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do citronelal contra as mesmas cepas. As CIMs variaram entre 250 e 500 µg/mL, enquanto as CFMs foram entre 250 e 2000 µg/mL. Através da metodologia *checkerboard* foi determinado o efeito da combinação do citronelal com a anfotericina B ou com o cetoconazol. Este estudo demonstrou que a associação do citronelal com o cetoconazol mostrou-se aditivo contra uma cepa de *C. albicans* e indiferente para outra cepa. Enquanto que a atividade combinada do citronelal com a anfotericina B demonstrou efeito indiferente para todas as cepas ensaiadas. Em nenhuma das associações foi encontrada efeito antagônico. De acordo com os dados obtidos neste trabalho, pode-se observar que o citronelal apresentou boa atividade anti-*Candida albicans* e que foi capaz de reduzir as CIMs dos antifúngicos em combinação. Essas informações servem de apoio para novas investigações de combinações com outros antifúngicos a fim de encontrar interações sinérgicas.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, antifúngicos, citronelal, *checkerboard*.

## ABSTRACT

Fungal infections caused by species of the genus *Candida* are responsible for high rates of morbidity and mortality in hospitals around the world, affecting mainly the population of immunocompromised. *Candida albicans* is the most frequently isolated species of superficial and systemic injuries. This problem is associated with increased resistance of pathogenic fungi to agents used in the treatment regimen and the limited number of drugs for curing such infections. Given these difficulties, the search for new drugs with activity antifungal has become increasingly important. In this sense, natural products are known to be potential sources of antimicrobial drugs are still few explored. The association of drugs commonly used in clinical practice with other substances may have other advantages from reduction of the adverse effects of toxic drugs considered. For this reason, the present work aimed to study the antimicrobial activity of citronellal alone and in combination with amphotericin B or ketoconazole. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of citronellal, amphotericin B and ketoconazole against strains of *Candida albicans* was evaluated by microdilution method, and even made the minimal fungicidal concentration (MFC) of citronellal against these strains. The MIC ranged between 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ , while the MFCs were between 250 and 2000  $\mu\text{g/mL}$ . The effect of citronellal combination with amphotericin B and ketoconazole were evaluated by the checkerboard method. The results showed that the combination of ketoconazole with citronellal showed additive effects against a strain of *C. albicans* and indifferent to another strain. While the combined activity of citronellal with amphotericin B showed indifferent effect for all the strains tested. In none of the associations was found antagonistic effect. According to the data obtained in this work can be seen that the citronellal showed good activity against *C. albicans* and has been able to reduce the MICs of antifungal agents in combination. These results provide support for further investigation of combinations with other antifungals in order to find synergistic interactions.

**Keywords:** *Candida albicans*, antifungal, citronellal, checkerboard.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do fluconazol (1), cetoconazol (2), itraconazol (3), anfotericina B (4) e nistatina (5).....	16
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do colesterol e do ergosterol.....	17
<b>Figura 3</b> - <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	19
<b>Figura 4</b> - Estrutura química do citronelal.....	20
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo de como foi preparado o inóculo.....	25
<b>Figura 6</b> - Esquema ilustrativo de como foi realizada a CIM.....	26
<b>Figura 7</b> - Esquema ilustrativo de como foi realizado a CFM.....	27
<b>Figura 8</b> - Esquema ilustrativo de como foram preparadas as diluições dos antifúngicos e do citronelal.....	28
<b>Figura 9</b> - Esquema ilustrativo de como foi realizado o <i>checkerboard</i> .....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados das CIMs do cetoconazol e anfotericina B e as CIMs e CFMs do citronelal frente às cepas estudadas.....	29
<b>Tabela 2</b> - Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com a Anfotericina B sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12 e ATCC 76615.....	33
<b>Tabela 3</b> - Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com o cetoconazol sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12 e ATCC 76615.....	34
<b>Tabela 4</b> - Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e tipos de interações....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ASD</b>	Agar Sabouraud Dextrose
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIF</b>	Concentração Inibitória Fracionada
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CSD</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ICIF</b>	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
<b>LM</b>	Laboratório de Micologia
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µg/mL</b>	Micrograma por Mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>%</b>	Percentual
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1. INTODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
4.1 LOCAL.....	24
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	24
4.3 MICRORGANISMOS.....	24
4.4 ANTIFÚNGICOS.....	24
4.5 PREPARAÇÃO DA EMULSÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	24
4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	24
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INOBITÓRIA MÍNIMA-CIM.....	25
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA-CFM.....	26
4.9 MÉTODO CHECKERBOARD.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DO CITRONELAL.....	29
5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ANTIFÚNGICOS PADRÃO.....	32
5.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (ICIF) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ANTIFÚNGICOS PADRÃO E CITRONELAL PELO MÉTODO DE <i>CHECKERBOARD</i> .....	33
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções invasivas causadas por fungos têm aumentado nas últimas décadas, especialmente nas grandes populações de doentes imunocomprometidos. As espécies do gênero *Candida* são as causas mais comuns desse tipo de infecção. Estas leveduras são comensais em humanos saudáveis, mais podem tornar-se patogênicas quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ACHKAR; FRIES, 2010; SARDI *et al.*, 2013).

O número de drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos ainda é bastante limitado, principalmente em comparação com o número de drogas antibacterianas. Os principais grupos de agentes antifúngicos com ação sobre espécies de *Candida* são representados pelos derivados azólicos e os antibióticos poliênicos, sendo a anfotericina B recomendada para as formas mais graves de infecções, no entanto, seu uso está bastante relacionado a problemas de nefrotoxicidade. Além do mais, a extensa exposição dos microrganismos às drogas tem aumentado o processo de resistência, constituindo um sério problema na terapêutica das infecções fúngicas (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; JOHNSON; PERFECT, 2010).

Com isso a busca por novas drogas e agentes mais eficazes para combater esse tipo de infecções vem se intensificando, e a associação entre agentes antimicrobianos é uma estratégia bastante estudada e tem como benefício a ampliação dos espectros de ação das drogas combinadas, a prevenção de resistência, a redução de dose e conseqüentemente a diminuição dos riscos de toxicidade das drogas utilizadas isoladamente, o que é essencialmente importante para medicamentos como a anfotericina B (VAZQUEZ, 2008; JOHNSON; PERFECT, 2010). Os produtos de origens naturais são modelos atraentes para esse fim, pois muitas plantas são geralmente usadas na medicina popular como agentes antimicrobianos, na forma de óleos essenciais e extratos (COWEN; ANDERSON; KOHN, 2002; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A partir disso, busca-se através desse trabalho estudar a atividade antifúngica do citronelal quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol. As atividades de cada droga foram determinadas através da técnica de microdiluição por *checkerboard*, um método de diluição em caldo que visa determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada composto em combinação um com o outro. Além disso, foram determinadas as CIMs do

citronelal, cetoconazol e anfotericina B contra as cepas de *Candida albicans* e avaliada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do citronelal frente ao mesmo fungo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos, unicelulares ou multicelulares que estão amplamente distribuídos na natureza, onde são encontrados em vários *habitats*. Estes microrganismos diferem de outros seres eucariotos por possuírem uma parede celular rígida constituída principalmente de glicano e quitina (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; PFALLER *et al.*, 2009). A membrana plasmática dos fungos também difere das membranas animais por apresentar o ergosterol, ao invés de colesterol, como principal esteroide. Este esteroide é responsável por inúmeras propriedades físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). De acordo com sua morfologia, os fungos podem ser classificados em filamentosos, leveduras e dimórficos. Os primeiros são formados por longos filamentos de células conectadas denominados de hifas. Enquanto que as leveduras são caracteristicamente esféricas ou ovais, reproduzem-se por brotamento e formam colônias pastosas ou cremosas. Deste grupo fazem parte os representantes do gênero *Candida* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Os fungos dimórficos são aqueles que se apresentam sob ambas as formas, ou seja, exibem forma de crescimento uni e multicelular segundo as condições ambientais. Quando incubadas a uma temperatura de 25 a 30°C, os fungos apresentam a forma filamentosa e quando cultivados de 35 a 37°C, apresentam a forma de levedura. (ANVISA, 2004; WINN *et al.*, 2008).

Segundo a classificação taxonômica, o gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, divisão Eumycota, classe Blastomycetes e família Cryptococcacea (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Este gênero engloba mais de 150 espécies, dentre estas, a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são os principais representantes de interesse clínico por serem importantes agentes etiológicos de infecção humana. Mais de 90% das infecções invasivas por fungos são causadas por essas espécies (SARDI *et al.*, 2013).

As espécies do gênero *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal da cavidade oral, do trato gastrointestinal, da vagina, da uretra e dos pulmões de indivíduos sadios (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Entretanto, quando ocorre ruptura desse equilíbrio com o hospedeiro ou o sistema imune deste encontra-se comprometido, essas leveduras podem tornar-se patogênicas (MIOTTO *et al.*, 2004; MONGE *et al.*, 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Dentre as espécies de *Candida spp*, a *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos. (ACHKAR; FRIES, 2010). Este fungo apresenta-se sob várias formas, que são chamadas de variações adaptativas, sendo as formas de leveduras associada à colonização assintomática, enquanto que as formas filamentosas são observadas em processos patogênicos (MONGE *et al.*, 2006). A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH. A capacidade de formar tubos germinativos por essa espécie contribui para sua virulência (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010). Além disso, sob condições impróprias de crescimento, esse fungo pode desenvolver clamidoconídios, estruturas de resistência, constituídos de reservas nutritivas e membrana espessa que permitem resistir aos fatores externos, ou seja, o fungo tem a capacidade de adaptar-se a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, um organismo “pleomórfico” (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010).

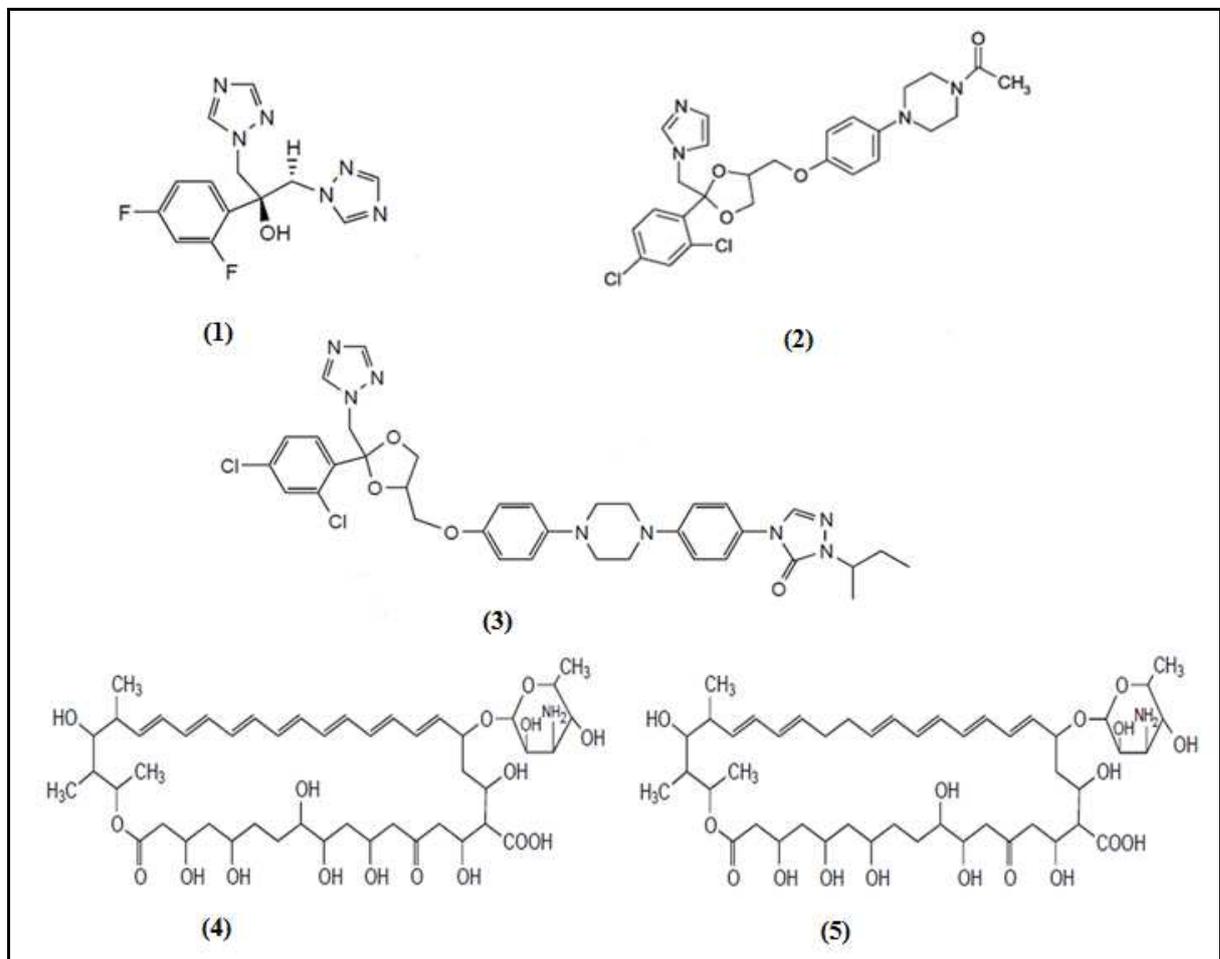
A patogenicidade da *C. albicans* é atribuída aos diversos fatores de virulência que lhes permitem disseminar-se e colonizar uma variedade de tecidos (SARDI *et al.*, 2013). Entre os fatores encontram-se os mecanismos específicos e inespecíficos de adesão a substratos inertes e biológicos, pleomorfismo, mudança fenotípica, formação de biofilme, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, tais como proteases, fosfolipases e hemolisina e evasão da resposta imune do hospedeiro (SAMARANAYAKE *et al.*, 2005; FISHER, 2011).

As infecções nosocomiais também chamadas de infecções hospitalares constituem um problema crescente de saúde pública em muitos países, elevando o tempo de internação e conseqüentemente o aumento dos custos de hospitalização, além de contribuir para altas taxas de morbimortalidade em hospitais de todo o mundo (MALUCHE; SANTOS, 2008). Segundo Demitto *et al.*, (2012) e Kaur *et al.*, (2014), as leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 80% das infecções hospitalares por fungo e a *C. albicans* encontra-se como o principal patógeno responsável por esse tipo de infecção.

Tais infecções envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas que acometem pacientes expostos aos vários fatores de risco, como a imunossupressão por várias causas, uso de antibióticos de largo espectro, queimaduras, cirurgias extensas e corticoterapia (RICHARDSON, 2005). A utilização prolongada de cateteres juntamente com a antibioticoterapia, também pode facilitar a multiplicação de leveduras no trato gastrointestinal

ou na pele, facilitando a disseminação do fungo para a corrente sanguínea, provocando um processo grave denominado de candidemia (FENNER *et al.*, 2006; MALUCHE; SANTOS, 2008). De acordo com Giolo e Svidzinski (2010), a mortalidade atribuída direta ou indiretamente a candidemia é de 40% a 60%.

Os principais agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas são representados pelos antibióticos poliênicos, como a anfotericina B e a nistatina, e pelos derivados azólicos, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol (Figura 1) (RIBEIRO *et al.*, 2004). Dentre estes, a anfotericina B é considerada a mais efetiva contra as espécies de *Candida* principalmente nos casos de infecções invasivas, porém seu uso está associado a efeitos adversos significantes (ODDS, 2003; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004).

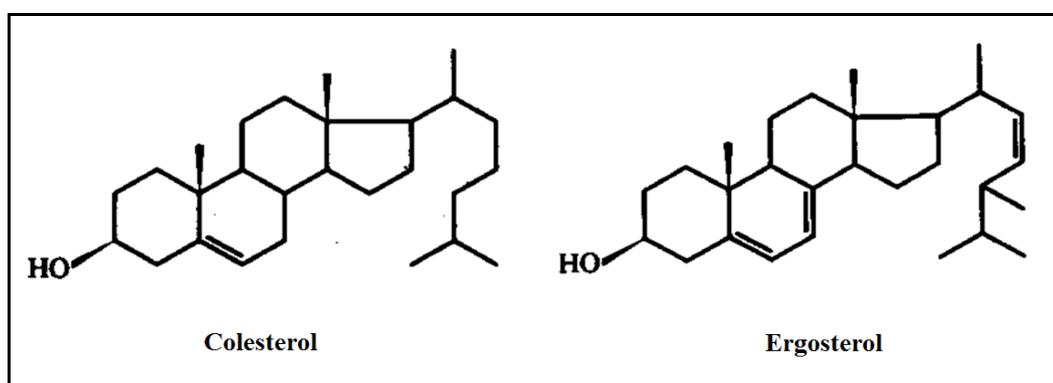


**Figura 1.** Estrutura química do fluconazol (1), cetoconazol (2), itraconazol (3), anfotericina B (4) e nistatina (5)

**Fonte:** ODDS; BROWN; GOW (2003)

A Anfotericina B é um antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo *Streptomyces nodosus*, bactéria que habita os solos (FILIPPIN; SOUZA, 2006). O espectro de ação da Anfotericina B é bastante amplo, incluindo quase todas as espécies de *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus* spp, *Cryptococcus neoformans* entre outros fungos (MELO, DUARTE, SOARES, 2012). Pode assumir ação fungicida ou fungistática, dependendo da sua concentração e da sensibilidade ou resistência do microrganismo. Seu mecanismo de ação ocorre pela ligação ao ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica. Essa interação com a membrana promove a formação de poros que permitem o extravasamento de substâncias intracelulares como íons e metabólitos, levando à morte celular. Além disso, a morte celular da *C. albicans* é também atribuída ao dano oxidativo provocado por esse poliênico (GHANNOUM, RICE, 1999; ODDS, BROWN, GOW, 2003; ODDS, 2003; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004).

A semelhança estrutural do colesterol ao ergosterol (Figura 2) explica em, grande parte, os muitos efeitos colaterais agudos e crônicos da anfotericina B descritos após a administração em pacientes (COWEN; ANDERSON; KOHN 2002; CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). Entre os efeitos decorrentes da toxicidade da droga encontram-se anemia, leucopenia, trombocitopenia e nefrotoxicidade (FILIPPIN; SOUZA, 2006; JOHNSON; PERFECT, 2010; BANERJEE; BURKARD; PANEPINTO, 2014). Este último representa um grande problema na utilização do fármaco, devido sua alta incidência e morbidade (LANIARDO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009). Estes danos são justificados pelo mecanismo de ação da molécula que apresenta certa afinidade com o colesterol, um constituinte da membrana celular dos mamíferos (ODDS; BROWN; GOW, 2003).



**Figura 2.** Estrutura química do colesterol e do ergosterol

**Fonte:** SAMPAIO-SANTOS; KAPLAN (1997)

Enquanto isso, os antifúngicos azólicos causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que a mesma. Além do mais, o uso excessivo desses medicamentos levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis, apresentando ainda a desvantagem da resistência cruzada (NOBRE *et al.*, 2002; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; SUN *et al.*, 2009).

O tratamento das infecções fúngicas tem-se tornado cada vez mais difícil, devido ao aumento crescente da resistência dos microrganismos às drogas antifúngicas (FENNER *et al.*, 2006). Alguns compostos azólicos como fluconazol e itraconazol tem tido sua eficácia clínica diminuída em decorrência do desenvolvimento de resistência secundária por espécies do gênero *Candida*. A resistência a estas drogas está relacionada a mecanismos moleculares que incluem bombas de efluxo, mutação da enzima-alvo do medicamento e alteração de outras enzimas na mesma via biossintética. Além de outros fatores como o uso amplo e prolongado desses medicamentos na prática médica hospitalar e na comunidade (COWEN; ANDERSON; KHON, 2002; SARDI *et al.*, 2013).

Diante das limitações para o uso dos fármacos comerciais, como a evidência de resistência microbiana, alto custo e ocorrências de efeitos indesejáveis, algumas substâncias de origem natural têm sido apontadas como possibilidades de tratamento.

Ao longo dos anos, os produtos de origem vegetal tornaram-se as bases para o tratamento de diferentes doenças. De acordo com Araújo (2009), o uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em vários países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições. Entre as principais estratégias utilizadas na busca de novos fármacos está a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos (RATES, 2001).

Na pesquisa de produtos naturais, os óleos essenciais assumem uma posição de destaque entre os compostos mais estudados dadas suas propriedades singulares. Diversos estudos têm comprovado o efeito de compostos extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais e um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (SEIXAS, 2011). Os óleos essenciais são considerados um dos grupos mais promissores de compostos naturais para o desenvolvimento de agentes antifúngicos mais seguros (SHIN; LIM, 2004; OLIVEIRA, M., 2011).

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas, nas quais são produzidos como consequência do metabolismo secundário. Na natureza, esses compostos desempenham um importante papel na proteção dos

vegetais, atuando como agentes antibacterianos, antifúngicos, favorecendo a dispersão do pólen e sementes e repelindo insetos indesejáveis. Devido a essas propriedades, os óleos essenciais são largamente empregados pela indústria farmacêutica (BAKKALI *et al.*, 2008; HONG-WEI *et al.*, 2014).

Dada a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Entre os vários componentes químicos presentes nesses óleos destacam-se os terpenos e fenilpropanóides (BAKKALI *et al.*, 2008). Os terpenos são representados principalmente pelos sesquiterpenos e monoterpênicos. Estes últimos compõem cerca de 90% dos óleos essenciais, são altamente hidrofóbicos e tem sua atividade biológica relacionada a interações com a membrana dos microrganismos (BAKKALI *et al.*, 2008).

O *Cymbopogon winterianus*, mais conhecido como citronela de Java é largamente cultivada nas regiões tropicais do planeta por suas propriedades aromáticas (Figura 3). Esta planta possui o citronelal, geraniol e o citronelol como principais constituintes do seu óleo essencial com 34,0 a 58,7 %, 14,6 a 29, 0% e 10,0 a 18,8% respectivamente (ROCHA; MING; MARQUES, 2000; GANJEWALA, 2009). Estes, por sua vez, já têm reconhecida sua capacidade de inibir o crescimento fúngico, o que os tornam interessantes alvos de pesquisa, vista a incidência de patógenos cada vez mais resistentes às drogas sintéticas disponíveis (BARBOSA, 2011).

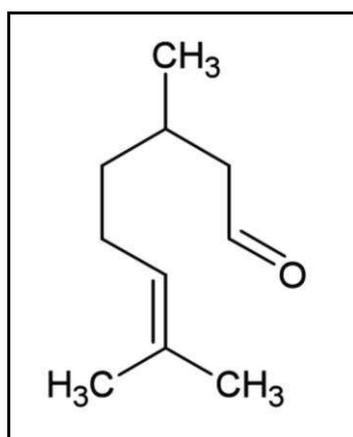


**Figura 3.** *Cymbopogon winterianus* Jowitt

**Fonte:** <http://www.jeyexports.com/herbal.html>

Na literatura encontram-se vários estudos sobre a atividade antifúngica de extratos de plantas, óleos essenciais e seus componentes químicos contra cepas de fungos de vários gêneros. O citronelal, por exemplo, já foi testado em *M. gypseum*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus Níger* (FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009). Neste trabalho, o citronelal teve sua atividade antifúngica avaliada sobre cepas de *C. albicans*.

O citronelal é um monoterpreno de função aldeídica (Figura 4) com elevada atividade antimicrobiana, principalmente contra espécies de fungos como as leveduras (SEIXAS, 2011). De acordo com Garcia *et al.* (2008) a atividade do citronelal está relacionada com a granulação do citoplasma, ruptura da membrana citoplasmática e inativação ou inibição da síntese de enzimas intracelulares e extracelulares. É um composto amplamente utilizado pela indústria para diversos fins e como material básico para a síntese de importantes compostos químicos denominados iononas e para a síntese de vitamina A (CASTRO *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Estrutura química do citronelal

**Fonte:** GANJEWALA (2009)

Devido ao aparecimento de microrganismos patógenos menos sensíveis aos medicamentos atualmente disponíveis, a busca por novos agentes antimicrobianos tornou-se cada vez mais necessária. Entre as alternativas de tratamento de agentes refratários encontra-se a combinação de compostos atuais com novos compostos de atividade antifúngica. Esta estratégia busca promover uma maior eficácia no tratamento, permitindo a utilização de doses menores de cada droga (DRAGO *et al.*, 2007; CUENCA-ESTRELLA, 2004).

A Sociedade Brasileira de Infectologia define combinação terapêutica como aquela em que dois antimicrobianos são utilizados para a cobertura do mesmo patógeno, no intuito de se melhorar a eficácia clínica, seja ela através da potencialização do efeito antimicrobiano (sinergismo) seja pela prevenção de surgimento de resistência durante o tratamento.

Geralmente, a atividade antifúngica dos óleos essenciais e de seus componentes é considerada leve em comparação com as substâncias sintéticas comumente utilizadas na terapia antifúngica. Este fator justifica a combinação desses produtos naturais com antifúngicos usados na prática clínica para observar possíveis efeitos sinérgicos (SHIN; LIM, 2004).

Estudos apontam experiência clínica com terapia combinada bem sucedida de antifúngicos para o tratamento de *Cryptococcus*, na qual foi usado a anfotericina B acrescida de flucitosina, demonstrando ainda que uso da flucitosina sozinha resultou no rápido aumento de resistência durante a terapia contra infecção por *Candida* e *Cryptococcus* (OSTROSKY-ZEICHNER, 2008; KIBBLER, 2012).

A combinação de dois agentes diferentes amplia o espectro de atividade por meio dos diferentes mecanismos de ação que cada droga exerce o que é interessante, especialmente, no início da terapia uma vez que o número elevado de microrganismo dificulta a taxa de mutação que possa levar à seleção de organismos resistentes. A anfotericina B, por exemplo, aumenta a permeabilidade da membrana celular fúngica, facilitando a penetração da flucitosina e permitindo níveis intracelulares mais elevados deste fármaco. Isso proporcionará um efeito terapêutico positivo nos casos de infecção causada por espécie considerada menos susceptível a esse composto (KIBBLER, 2012).

Dentre outras combinações já documentadas, estão os derivados azólicos com poliênicos ou com a flucitosina, bem como equinocandinas com azólicos ou poliênicos. Muitos desses estudos têm apresentado interação *in vitro* frente às diversas espécies de fungos como *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* (OSTROSKY-ZEICHNER, 2008; VAZQUEZ, 2008).

Entre os benefícios potenciais oferecidos pela combinação de antimicrobianos estão a redução de doses dos medicamentos individuais o que pode minimizar a toxicidade, o aumento da potência e do espectro de atividade, a prevenção do surgimento de resistência fúngica e redução da duração da terapia (CHATURVEDI *et al.*, 2011; KIBBLER, 2012). De modo geral, seu principal objetivo é melhorar as respostas das substâncias envolvidas na associação e reduzir a mortalidade de pessoas por infecções fúngicas (KIBBLER, 2012).

Existem vários modelos experimentais que mensuram os efeitos de combinação entre drogas. Uma das formas mais conhecidas é o teste de *checkerboard*, que utiliza tubos ou placas de microdiluição para testar dois agentes antifúngicos em concentrações diferentes, as diluições variam acima e abaixo da CIM para o fungo a ser testado. Os dados obtidos são

interpretados através da determinação do índice de Concentração Inibitória Fracionada- ICIF, que consiste na concentração mais baixa de cada droga capaz de inibir o crescimento microbiano (ODDS, 2003; YAN *et al.*, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar a atividade antifúngica do citronelal quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do citronelal frente a cepas de *Candida albicans*.
- b) Avaliar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do citronelal contra estas cepas.
- c) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B e do cetoconazol contra cepas de *Candida albicans*.
- d) Verificar o efeito da associação do citronelal quando combinado com a anfotericina B ou com o cetoconazol.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL

Os estudos de investigação da atividade antifúngica foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bioquímica e Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Cuité-PB.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ASD (Agar Sabouraud Dextrose) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD), adquiridos da Difco<sup>®</sup> preparados de acordo com as instruções do fabricante.

### 4.3 MICRORGANISMOS

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 05 cepas de *Candida albicans*: ATCC 40042, ICB-12, LM-410, LM-393 e LM-178 cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba. Todas elas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ASD inclinado sob refrigeração (4°C).

### 4.4 ANTIFÚNGICOS

Foram utilizados a anfotericina B e o cetoconazol. As soluções dos antifúngicos foram preparadas somente no momento da execução dos testes, dissolvendo-os em água destilada estéril na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) e solubilizando-os com o auxílio do vórtex.

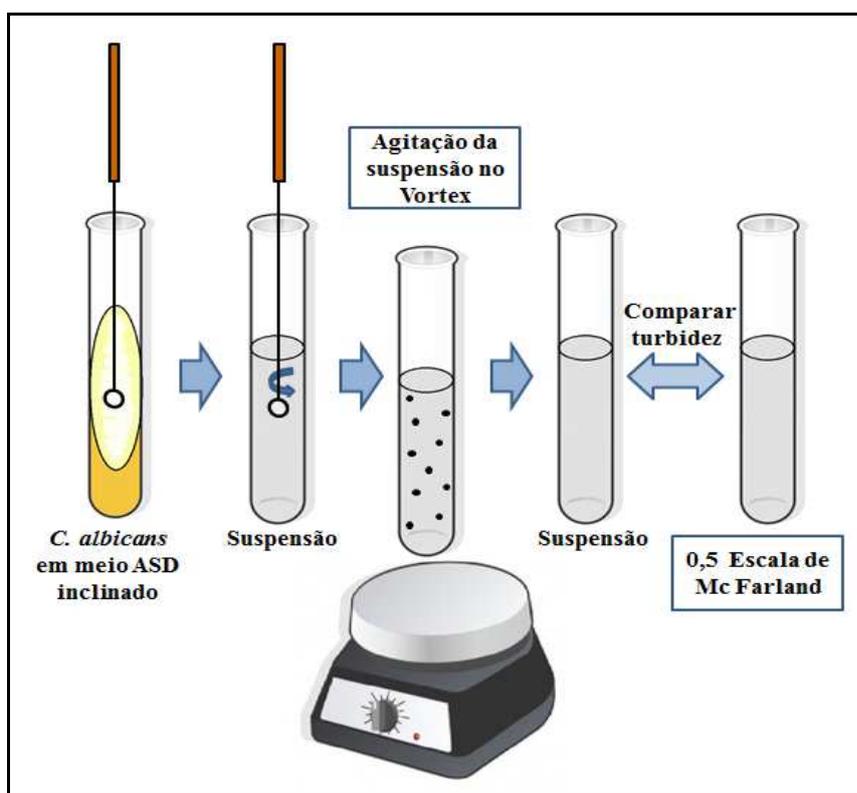
### 4.5 PREPARAÇÃO DA EMULSÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A emulsão com o citronelal foi preparada no momento da execução dos testes, dissolvendo em água destilada estéril na presença de Tween<sup>®</sup> 80 (polissorbato) e solubilizando com o auxílio do vórtex. O citronelal foi testado em concentrações entre 2000 µg/mL e 1,95 µg/mL.

### 4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As cepas de *C. albicans* foram cultivadas em meio ASD inclinado a 37°C por 24-48 horas. As suspensões dos microrganismos foram preparadas em tubos contendo salina estéril

(NaCl a 0,9%). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho vórtex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela escala 0,5 de McFarland que corresponde a um inóculo de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias/mL - UFC/mL (Figura 5) (CLEELAND; SQUIRES, 1991).



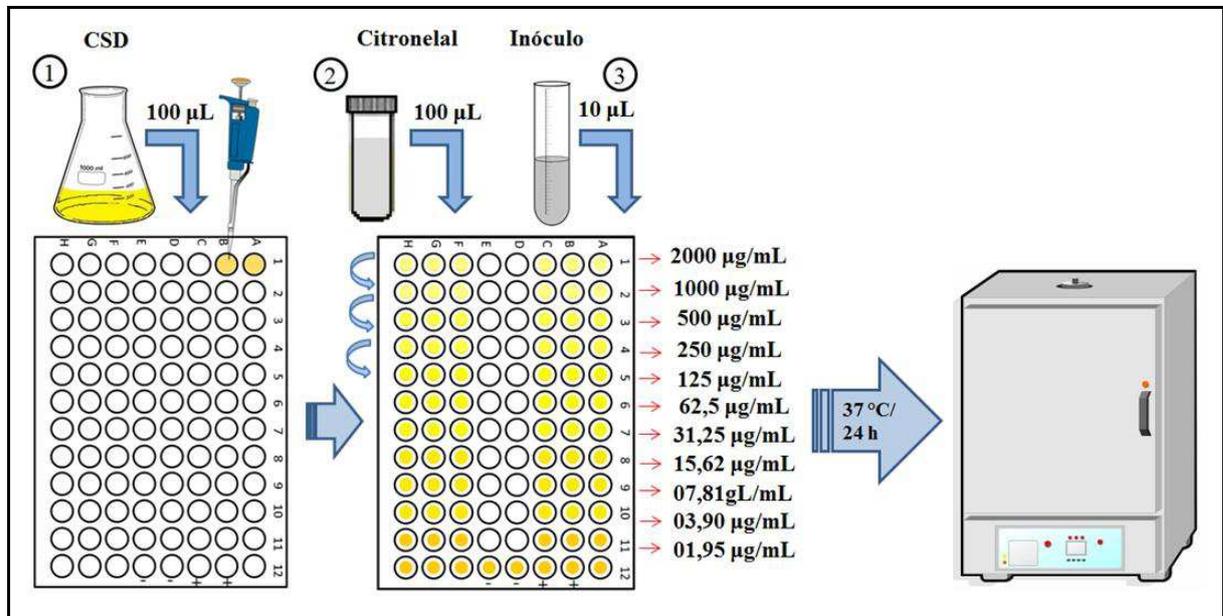
**Figura 5.** Esquema ilustrativo de como foi preparado o inóculo

**Fonte:** Elaborada pela autora

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA-CIM

As CIMs do cetoconazol, anfotericina B e citronelal foram determinadas através da técnica de microdiluição e conduzidas de acordo com as normas propostas pelo CLSI (2008) (Clinical and Laboratory Standards Institute), documento M27-A3, com algumas modificações. A determinação da CIM de cada composto foi determinada em microplacas de 96 cavidades e CSD como meio de cultura, as substâncias foram diluídas seriadamente 1:2 para obtenção de concentrações entre 2.000 a 1,95  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram conduzidos com aproximadamente  $1-5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias/mL. A última coluna da placa foi utilizada para o controle negativo (apenas CSD) e controle positivo do experimento (CSD e o microrganismo) (Figura 6). Todos os testes foram realizados em triplicata.

As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C e a leitura foi feita após 24 horas, observando presença ou ausência de crescimento visível. A CIM foi considerada a menor concentração da substância testada que inibiu o crescimento do microrganismo.

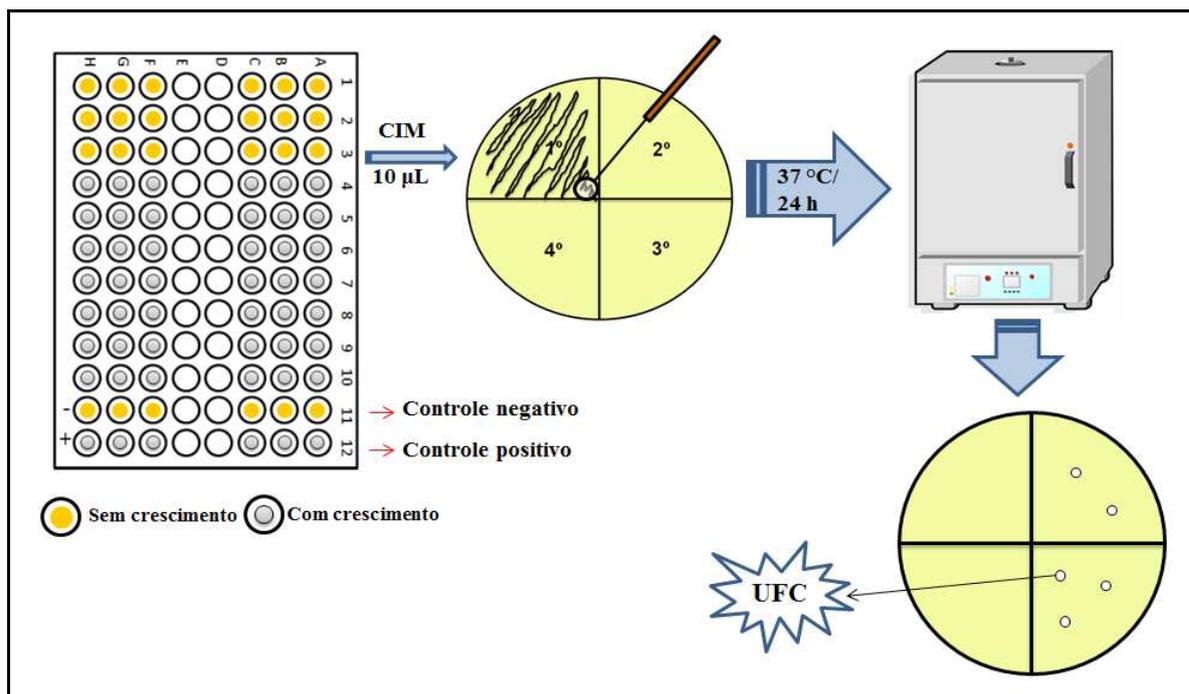


**Figura 6.** Esquema ilustrativo de como foi realizado a CIM

Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA-CFM

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada em placa de Petri contendo ASD. Uma alíquota de 10 µL do conteúdo de cada uma das cavidades da placa de microdiluição que representam as 4 menores concentrações onde não houve crescimento do microrganismo foi semeada em uma placa de Petri (Figura 7). Após 24-48 horas de incubação a 37°C, foi verificado o crescimento de colônias nas respectivas concentrações. A CFM correspondeu a menor concentração da droga que reduziu  $\geq 99,9\%$  de células (KLEPSEK *et al.*, 1998; ERNST *et al.*, 1999).



**Figura 7.** Esquema ilustrativo de como foi realizado a CFM

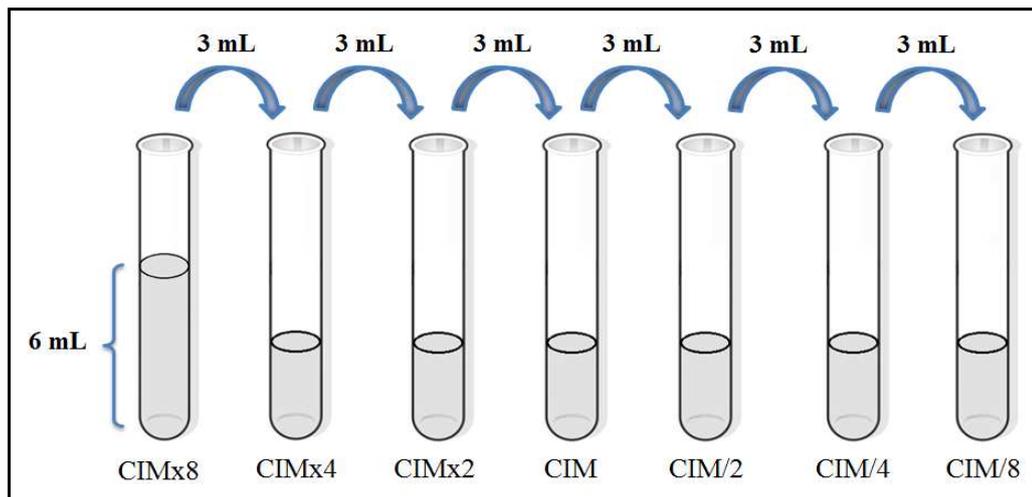
**Fonte:** Elaborada pela autora

#### 4.9 MÉTODO *CHECKERBOARD*

Após a definição da CIM de cada droga antifúngica e do citronelal foram realizadas as combinações. O estudo de associação entre o cetoconazol e citronelal foi conduzido utilizando-se a técnica de microdiluição por *checkerboard*. Inicialmente, foram preparadas diluições do cetoconazol e do citronelal em sete concentrações diferentes CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8 (Figura 8). Em seguida, 100 µL do CSD foram distribuídos nos poços da placa de microdiluição de 96 cavidades. Depois 50 µL do antifúngico em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) foram adicionados no sentido vertical (ex.: cetoconazol) e 50 µL do citronelal também em diferentes concentrações foram adicionados no sentido horizontal da microplaca. Desta maneira, as diversas concentrações do citronelal foram testadas na presença de várias concentrações do cetoconazol. Por último, foram acrescentados 20 µL do inóculo das cepas ICB-12 e ATCC 76615, previamente ajustadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland. O mesmo procedimento foi realizado para associação da anfotericina B e citronelal. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura foi feita após 24 - 48 horas para observar a presença ou ausência do crescimento fúngico (Figura 9).

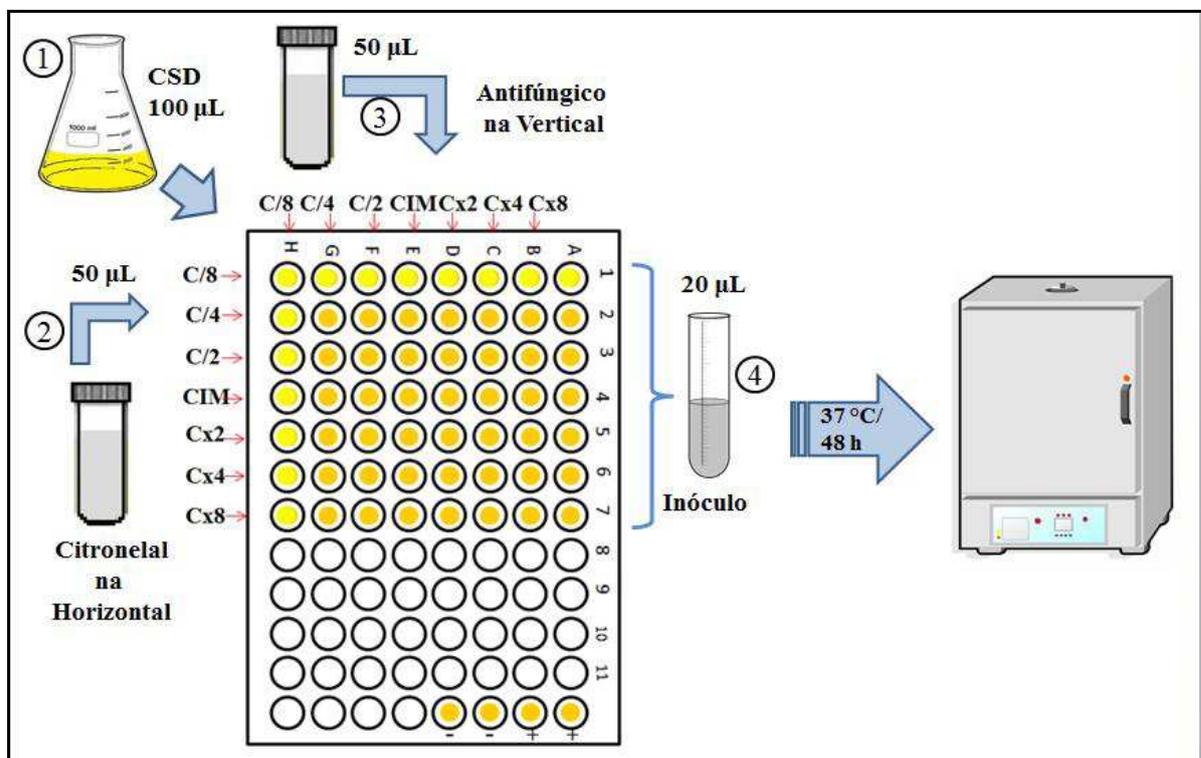
O Índice da Concentração Inibitória Fracional (ICIF) foi calculada de acordo com a equação  $A/CIMA + B/CIMB = CIFA + CIFB = ICIF$ , onde A e B são as CIMs da droga A e

B em combinação respectivamente; CIMA e CIMB representam as CIMs das drogas A e B sozinhas; CIFA e CIFB são as Concentrações Inibitórias Fracionais das drogas A e B, respectivamente. O ICIF foi interpretado da seguinte forma:  $\leq 0.5$  sinergismo,  $> 0.5$  e  $\leq 1.0$  aditismo,  $> 1.0$  e  $< 4.0$  representa indiferença e  $\geq 4.0$  ocorre antagonismo (CHIN; WEITZMAN; DELLA-LATTA, 1997).



**Figura 8.** Esquema ilustrativo de como foram preparadas as diluições dos antifúngicos e do citronelal

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 9.** Esquema ilustrativo de como foi realizado o checkerboard.

Fonte: Elaborada pela autora

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DO CITRONELAL

Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas do citronelal frente a quatro cepas de isolados clínicos ICB-12, LM-393, LM-410, LM-178 e frente a uma cepa padrão ATCC-76615. Conforme mostram os resultados da Tabela 1, nota-se que o citronelal apresentou inibição a todos os microrganismos ensaiados, sendo a maioria deles sensível à concentração de 250 µg/mL, ao passo que a ICB-12 e ATCC-76615 demonstraram uma maior resistência com inibição do crescimento à concentração de 500 µg/mL.

Quanto aos valores das CFMs, observou-se que o citronelal apresentou atividade fungicida para as cepas LM-393, LM-410 e LM-178 na concentração 250 µg/mL, ou seja, esse valor coincidiu com aqueles encontrados para as CIMs com as mesmas estirpes. No entanto, os resultados obtidos para a ICB-12 e ATCC-76615 indicaram que a concentração capaz de matar 99,9% das células fúngicas (CFM) é quatro vezes maior do que as CIMs encontradas para essas cepas, como ilustrado na Tabela 1.

É importante enfatizar que nos controles positivos, apenas com o CSD e o microrganismo, houve crescimento das cepas estudadas, mostrando a viabilidade do experimento.

**Tabela 1** - Resultados das CIMs do cetoconazol e anfotericina B e as CIMs e CFMs do citronelal frente às cepas estudadas

Cepas	Cetoconazol	Anfotericina B	Citronelal	
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	
	CIM	CIM	CIM	CFM
ICB-12	64	0,03125	500	2000
ATCC 76615	8	0,125	500	2000
LM-393	250	0,25	250	250
LM-410	31,25	0,25	250	250
LM-178	250	0,5	250	250

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2014

De acordo com Sartoratto *et al.*, (2004) as CIMs com 50 e 500 µg/mL são consideradas uma forte atividade antimicrobiana, com CIMs entre 600 e 1500 µg/mL atividade moderada e CIMs acima de 1500 µg/mL são considerada atividade fraca. Portanto,

pode-se considerar que o citronelal possui forte atividade anti-*Candida albicans*, visto que a CIM variou de 250 a 500 µg/mL

Resultados apresentados por Toscan (2010), demonstraram CIM mais baixa do citronelal contra cepa de *C. albicans* com média de 4,78 a 0,23 µg/mL. Do mesmo modo Zore *et al.*, (2011) estudaram a atividade anti-*Candida albicans* do citronelal e tiveram bons resultados de CIM.

Diversos estudos apontam atividade antimicrobiana do citronelal contra várias espécies de fungos, incluindo fungos filamentosos. A literatura relata, por exemplo, inibição marcada de proliferação de micélio causada por citronelal em trabalho realizado por Garcia *et al.*, (2008) que encontraram atividade para os fungos *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Também Seixas (2011) obteve ótimos resultados em ensaios realizados com esse composto, no qual foi observado 100% de inibição do crescimento micelial do fungo *Fusarium subglutinans*.

Além disso, diferentes óleos essenciais demonstram significativas atividades antifúngicas como é o caso do óleo essencial do *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon nardus* que possui o citronelal como constituinte majoritário (CASTRO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, W. *et al.*, 2011). Como demonstrado por Cavalcante, Almeida e Padilha (2011) o óleo essencial do *Cymbopogon winterianus* (citronela) foi efetivo contra espécies de gênero *Candida*.

Devkatte, Zore, e Karuppayil (2005) determinaram a CIM e CFM de diferentes óleos essenciais contra *C. albicans*, inclusive do óleo da citronela e encontraram valores de CFM superiores ou iguais a CIM, assim como o presente estudo. Shin e Lim (2004) também avaliaram a CIM e CFM de diferentes óleos e dos componentes citronelol e geraniol sobre 6 cepas de *Trichophyton* spp e acharam CFMs mais elevadas do que as CIMs. Ainda de acordo com os mesmos autores muitas substâncias de origem natural apresentam apenas atividade fungistática, necessitando de concentrações mais elevadas para atingir sua atividade fungicida.

O citronelal também é ativo contra algumas espécies de bactérias como é o caso da *Propionibacterium acnes* que teve seu crescimento inibido em estudo feito por Khunkitti *et al.*, (2010), os quais determinaram a CIM e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da substância, obtendo CIMs entre 3,12 a 6,25 µg/ml, além de efeito bactericida.

Os resultados deste trabalho corroboram com de outros autores, no que diz respeito à eficácia do composto em inibir o crescimento fúngico. Há muito tempo os produtos naturais

vem sendo utilizados para o tratamento de enfermidades. A história de utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto à história da humanidade (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013). O interesse por esses produtos vem aumentando nos últimos anos (RATES, 2001). Pesquisadores do mundo todo baseados no uso etnofarmacológico das plantas tem buscado novos compostos com propriedades antifúngicas, tendo em vista o aumento da resistência fúngica às drogas antimicrobianas convencionais (ZAGO *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2012; LOBO *et al.*, 2013).

Muito se tem estudado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas com o objetivo de identificar substâncias que tenham melhor desempenho sobre tais microrganismos (CAVALCANTE; ALMEIDA; PADILHA, 2011).

Os óleos essenciais são os mais investigados em consequência do seu menor custo e menor resistência microbiana (SEIXAS *et al.*, 2011). É possível que os óleos essenciais atuem na parede celular fúngica, causando extravasamento do conteúdo celular. A característica lipossolúvel dos óleos e de seus constituintes permite a interação com estruturas celulares que também tem uma constituição lipídica levando ao aumento da permeabilidade da membrana e consequente morte celular (CASTRO; LIMA, 2010). Muitos estudos são necessários para elucidar com clareza o mecanismo de ação desses produtos.

Uma grande dificuldade enfrentada em investigar a atividade *in vitro* de produtos naturais está na falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, o que torna difícil a comparação dos resultados obtidos (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

Diferentes metodologias têm sido empregadas para verificar a atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus componentes como a difusão em disco, diluição em ágar e microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Este último foi o método escolhido para realizar os ensaios com o citronelal. Os testes realizados foram baseados no protocolo M27-A3 do CLSI (2008), porém com algumas modificações, pois as metodologias propostas pelo CLSI não atendem as especificações da substância teste (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Sendo o citronelal uma substância de natureza lipofílica, adaptações foram necessárias para garantir qualidade do experimento. A volatilidade e a insolubilidade são desafios enfrentados durante os experimentos com esse tipo de substância, visando contornar essas dificuldades e alcançar resultados mais seguros foi utilizado Tween® 80 (polissorbato) para permitir a solubilidade do citronelal ao meio de cultura.

A microdiluição é o método mais eficiente para atestar a atividade antimicrobiana de substâncias naturais. Além de ser de fácil execução é também o que melhor oferece dados quantitativos e permite uma fácil interpretação, por isso é ótima escolha para pesquisa de novos produtos com potencial atividade antifúngica.

As determinações das CIMs no primeiro passo deste trabalho forneceram dados indispensáveis para as etapas seguintes.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ANTIFÚNGICOS PADRÃO

Os resultados de susceptibilidade das cepas estudadas frente à Anfotericina B e ao Cetoconazol encontram-se descritos na Tabela 1. Contatou-se que todas as cepas tratadas com anfotericina B apresentaram sensibilidade à droga após 24 horas de incubação, sendo a ICB-12 a levedura mais sensível com CIM igual a 0,03125  $\mu\text{g/mL}$  seguida pela ATCC 76615 com CIM 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . São considerados resistentes os microrganismos cuja CIM seja  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  o que não ocorreu neste experimento, visto que todas as CIMs foram  $<1 \mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2008). Em concordância com estes resultados Lemos (2009) obteve CIMs semelhantes em seus ensaios com CIMs de 0,125 e 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , assim como Nunes (2011) que encontrou CIM  $< 0,5 \mu\text{g/ml}$ .

Já está bem fundamentada na literatura a ação fungicida da anfotericina B em baixas concentrações. Batista, Birman e Cury (1999) mostraram em seus estudos que a anfotericina B apresentou boa atividade fungistática com CIM igual a 0,03  $\text{mg/ml}$  para a maioria das leveduras estudadas. Observou, também, excelentes resultados para ação fungicida com CFMs variando de 0,03 a 0,15  $\mu\text{g/ml}$  para 15 das 19 cepas de *C. albicans*.

Em relação ao cetoconazol observou-se resultados bastante variáveis. A cepa ATCC 76615 mostrou-se mais sensível com CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$ , seguida da LM-410 com CIM 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto as cepas clínicas LM-393 e LM-178 indicaram maior resistência com CIMs de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Batista, Birman e Cury (1999) apresentaram CIMs do cetoconazol equivalentes a 4  $\mu\text{g/mL}$  para a maioria das cepas ensaiadas. Assim como Beneditti, Fornari e Schervinski (2011) que mostraram que a *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade ao cetoconazol com concentrações consideravelmente mais baixas. Os valores das CIMs apresentados por este trabalho para o cetoconazol foram mais elevados do que os relatados por outros autores, no entanto, é importante lembrar que vários fatores podem

influenciar na divergência desses resultados como a cepa do microrganismo sob investigação e as condições de pesquisa (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (ICIF) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ANTIFÚNGICOS PADRÃO E CITRONELAL PELO MÉTODO DE *CHECKERBOARD*.

Os resultados da combinação entre citronelal e anfotericina B, e citronelal com cetoconazol pelo método de *Checkerboard* contra as cepas ICB-12 e ATCC 76615 estão ilustrados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Neste estudo foi possível observar que o citronelal apresentou efeito inibitório *in vitro* no crescimento de cepas de *C. albicans* tanto testado isoladamente como em combinação. Como ilustrado na Tabela 2, o citronelal foi capaz de reduzir a CIM da anfotericina B para a cepa ICB-12 em cerca de 8 vezes o valor da CIM da anfotericina B testada sozinha. Após a combinação com o citronelal, a CIM da droga padrão passou de 0,03125 para 0,004 µg/mL. No entanto, houve valor crescente da CIM combinada para o citronelal quando ensaiada com ATCC 76615. Valores constantes de CIMs foram avaliados para anfotericina B com ATCC 76615 e citronelal com a ICB-12. De acordo com a interpretação do ICIF, a interação entre as drogas foi indiferente para as duas cepas.

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com a Anfotericina B sobre cepa de *C. albicans* ICB-12 e ATCC 76615

Cepa	CIM das drogas associadas (µg/mL)		CIF <sup>a</sup>		ICIF <sup>b</sup>	
	Citronelal	Anfotericina B	Citronelal	Anfotericina B	Interação	
ICB-12	500	0,004	1	0,125	1,125	Indiferente
ATCC 76615	1000	0,125	2	1	3	Indiferente

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2014

<sup>a</sup>Concentração Inibitória Fracional; <sup>b</sup>Índice CIF

Com relação aos efeitos combinados do citronelal com cetoconazol, observou-se redução das CIMs do cetoconazol para ambas as cepas estudadas com expressão maior para a cepa ICB-12 que teve seu crescimento inibido com CIM 8 vezes menor. O mesmo ocorreu para CIM combinada do citronelal para a cepa ATCC 76615 para qual também verificou-se uma diminuição de 8 vezes. No entanto, nenhuma alteração foi observada para CIM do

citronelal em combinação para ICB-12. Conforme a Tabela 3, os valores obtidos para o ICIF indicaram interação do tipo indiferente para ICB-12 e aditivo para ATCC 76615.

**Tabela 3** - Concentração Inibitória Mínima (CIM -  $\mu\text{g/mL}$ ) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com o cetoconazol sobre cepa de *C. albicans* ICB-12 e ATCC 76615

Cepa	CIM das drogas associadas ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIF <sup>a</sup>		ICIF <sup>b</sup>	Interação
	Citronelal	Cetoconazol	Citronelal	Cetoconazol		
ICB-12	500	8	1	0,125	1,125	Indiferente
ATCC 76615	62,5	4	0,125	0,5	0,625	Aditivo

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2014

<sup>a</sup>Concentração Inibitória Fracional; <sup>b</sup>Índice CIF

Vários estudos realizados *in vitro*, utilizando a combinação de óleos essenciais e seus constituintes alcançaram resultados promissores, demonstrando que esta é uma alternativa viável a ser utilizada no controle de infecções fúngicas. A maioria dos casos mostraram efeitos sinérgicos e aditivos e só alguns indiferentes e antagônicos. Assim como foi feito por Shin e Lim (2004) que investigaram a ação combinada do cetoconazol com citronelol e cetoconazol com geraniol contra cepas de *Trichophyton* spp. e observaram fortes atividades sinérgicas contra duas espécies de *Trichophyton* e aditividade para uma dada espécie.

Shin e Pyun (2004) também relataram aditividade em associação feita entre cetoconazol com componentes majoritários de óleos essenciais contra *C. tropicalis*.

Da mesma forma, Mulyaporningsih *et al.*, (2010) encontraram efeito aditivo na maioria dos ensaios de combinações entre terpenóides realizados contra cepas de bactérias multirresistentes.

Zore *et al.*, (2011) avaliaram a atividade de seis terpenóides em combinação com o fluconazol sobre *C. albicans* e exibiram excelentes atividades sinérgicas em todos os ensaios, inclusive, para a combinação entre citronelal e fluconazol na qual observaram redução de CIM do fluconazol de 64  $\mu\text{g/mL}$  para 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Amber *et al.*, (2010) demonstraram atividades sinérgicas entre o óleo essencial de *Ocimum sanctum* com o fluconazol ou o cetoconazol contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Neste estudo foi verificado que cepas diferentes da mesma espécie tiveram respostas diferentes à combinação do óleo essencial com cada antifúngico, sendo que na maioria das combinações o efeito foi sinérgico, mas em algumas o

efeito foi indiferente. A associação dos óleos essenciais de *Thymus broussonetti* ou *Thymus maroccanus* com anfotericina B ou fluconazol contra *C. albicans* tiveram efeito sinérgico (SAAD *et al.*, 2010). Assim como os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, *Origanum vulgare* e *Melaleuca alternifolia* que também apresentaram sinergismo com anfotericina B contra *C. albicans* (ROSATO *et al.*, 2008).

Atividade de combinações contendo citronelal contra *C. albicans* tem sido menos investigada. Ressaltando a importância de se explorar cada vez mais a ação antimicrobiana dessa substância, uma vez reconhecida sua atividade antifúngica.

O pequeno arsenal de drogas antifúngicas e a emergência de resistência por espécies patogênicas, sobretudo por *C. albicans*, tem acarretado em dificuldades para tratamento dessas micoses, o que tem levado a necessidade urgente de medicamentos mais eficientes e mais seguros (SOARES, 2011). Daí a importância da combinação de drogas antifúngicas como terapia alternativa, principalmente, nos casos de pacientes com infecções fúngicas invasivas graves não responsivos à monoterapia antifúngica habitual (ODDS, 2003).

A avaliação da combinação sinérgica de substâncias de origem vegetal com medicamentos antifúngicos tornou-se uma importante área de interesse. Muitos estudos nesse sentido têm sido realizados para melhorar o desempenho biológico das drogas convencionais e permitir o uso de fármacos que apresentam considerável toxicidade (OLAJUYIGBE; AFOLAYAN, 2013).

Diversas substâncias extraídas de plantas já foram documentadas como potenciadores sinérgicos atuando simultaneamente com drogas padrão para aumentar o efeito dessas drogas. Como ilustrado por Oliveira, S. *et al.* (2011) que demonstrou que o extrato etanólico da casca da *Mangifera indica* L. em combinação com antibióticos contra as estirpes de *S. aureus* reduziu quatro vezes os valores da CIM para a tetraciclina e a eritromicina ( de CIM  $\geq$  2048  $\mu\text{g/ml}$  para MIC = 512  $\mu\text{g/ml}$  ). O estudo indicou ainda que mesmo o extrato individual não tendo apresentado significativa atividade antibacteriana, o produto vegetal poderia servir como uma fonte de potencial adjuvante de antibióticos.

A explicação para a ação da terapia combinada é baseada essencialmente nos mecanismos de ação e respectivos alvos terapêuticos dos fármacos em estudo. Desta forma, as combinações mais lógicas seriam aquelas que envolvem fármacos com diferentes mecanismos de ação (ZHU *et al.*, 2004).

O citronelal atua sobre a membrana celular fúngica (GARCIA *et al.*, 2008). Este mecanismo difere do mecanismo de ação do cetoconazol, o qual atua na biossíntese do

ergosterol através da inibição seletiva da esterol-14-alfa-desmetilase, uma enzima do citocromo P450 microsomal que converte o lanosterol em ergosterol. Esse processo provoca anomalias na permeabilidade da membrana, levando à morte celular (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). Assim, é possível que o citronelal potencialize o acesso do cetoconazol ao citoplasma das células fúngicas agilizando o processo de morte do microrganismo.

Assim como o cetoconazol, a anfotericina B também atua por meio de mecanismo diferente do citronelal. Ela causa alteração na permeabilidade da membrana celular do fungo, através da sua ligação direta ao ergosterol, como já esclarecido anteriormente (WINGARD; LEATHER, 2004; JOHNSON; PERFECT, 2010). É provável que a ligação dessas duas drogas em diferentes alvos cause a morte do microrganismo em menores concentrações já que cada uma contribui de alguma forma para fragilizar a membrana celular, componente importante para a sobrevivência do microrganismo (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

Para o estudo da atividade *in vitro* da combinação de antifúngicos foram desenvolvidas várias metodologias, contudo, o *checkerboard* e o método da cinética de morte (*time-kill*) são as técnicas mais frequentemente utilizadas (LEWIS *et al.*, 2002). O *checkerboard* é um método de fácil execução e interpretação, mas tem a limitação de fornecer apenas uma medida relativa da potência para a combinação e oferece poucos dados sobre a dinâmica da interação antifúngica. Diferentemente do *time-kill*, que avalia a atividade fungicida medindo o efeito da interação antifúngica sobre a taxa e extensão da morte fúngica ao longo do tempo, mas possui algumas desvantagens como o tamanho do inóculo e as dificuldades de interpretação dos resultados, além de ser muito demorado e dispendioso (WHITE *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2005; TEIXEIRA-SANTOS *et al.*, 2012).

Ainda não existe um método de referência padronizado para avaliar *in vitro* o efeito da interação de antifúngicos. Dessa forma, o método de *checkerboard* é baseado no protocolo de microdiluição desenvolvido pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A maioria das pesquisas envolvendo combinações entre antimicrobianos é realizada por essa metodologia devido as vantagens oferecidas por ela. Logo, o presente estudo também optou por essa técnica para realizar os ensaios de associação.

As CIMs obtidas pelo método de *checkerboard* são usadas para calcular a concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). Estes índices têm sido a forma mais comumente utilizada para caracterizar a atividade de combinações entre antimicrobianos em laboratório. O ICIF representa a soma das CIFs de

todos os fármacos testados, sendo que a CIF é determinada para cada uma das drogas através da divisão da CIM de cada medicamento em combinação pela CIM de cada droga utilizada sozinha, conforme as equações 1 e 2 (JOHNSON, *et al.*, 2004; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

*Eq 1.*

$$ICIF = CIF(\text{citronelal}) + CIF(\text{anfotericina B})$$

*Eq 2*

$$ICIF = \frac{CIM(\text{citronelal em combinação})}{CIM(\text{citronelal})} + \frac{CIM(\text{anfotericina B em combinação})}{CIM(\text{anfotericina B})}$$

Os valores dos ICIFs utilizados para definir a natureza da interação entre as drogas diferem entre as publicações, tornando complicada a comparação entre os estudos. A maioria dos trabalhos publicados utilizam a definição de sinergia quando o  $ICIF \leq 0.5$ , aditismo com  $ICIF > 0,5$  e  $\leq 1$ , indiferença com  $ICIF > 1$  e  $< 4$  e antagonismo com  $ICIF \geq 4$  (KILIC *et al.*, 2008). Outros estudos apresentam outras interpretações como, por exemplo, Pei *et al.* (2009) definiram  $ICIF < 1$  como sinérgico,  $ICIF = 1$  como aditismo,  $ICIF > 1$  e  $\leq 2$  indiferente e  $ICIF > 2$  como antagonismo. Galluci *et al.* (2009) consideraram efeito sinérgico o  $ICIF \leq 0,75$  como aditismo o  $ICIF > 0,75$  e  $\leq 2$  e como efeito antagônico o  $ICIF > 2$ . Devido as divergências entre as pesquisas para classificar os tipos de interações pelo método de *checkboard*, o presente trabalho assumiu as definições mais adotadas pela literatura. A Tabela 4 ilustra simplificada as interpretações utilizadas por este estudo segundo a classificação descrita por LEWIS *et al.*, (2002), SHALIT *et al.*, (2003), KILIC *et al.*, (2008), MULYANINGSIH *et al.*, (2010) e CORREA-ROYERO *et al.*, (2010).

**Tabela 4-** Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e tipos de interações

<b>Tipos de iterações</b>	<b>ICIF</b>
Sinérgica	$\leq 0.5$
Aditismo	$> 0,5$ e $\leq 1$
Indiferente	$> 1$ e $< 4$
Antogonismo	$\geq 4$

**Fonte:** MULYANINGSIH *et al.*, (2010)

De acordo com Johnson *et al.*, (2004) as terminologias empregadas para atribuir aos resultados uma interpretação adequada também é um assunto de debate. No caso das definições para sinergismo e antagonismo ainda existe uma concordância geral entre os autores. No entanto, há muitas discussões acerca dos termos aditismo e indiferente, pois muitos os consideram como ausência de interação entre os agentes combinados (CUENCA-ESTELLA, 2004; TEIXEIRA-SANTOS *et al.*, 2012).

O sinergismo é uma interação positiva que ocorre quando dois agentes combinados exercem um efeito inibitório maior do que a soma dos seus efeitos individuais e antagonismo é uma interação negativa observada quando o efeito das drogas combinadas é significativamente inferior do que a resposta de cada uma delas utilizada separadamente. Por outro lado, a aditividade é observada quando o resultado de uma combinação é igual a soma dos efeitos de cada droga testada isoladamente, enquanto a indiferença sugere que o efeito combinado é igual ao obtido apenas com a droga que é mais eficaz (CUENCA-ESTELLA, 2004; ODDS, 2003).

Os resultados da combinação do citronelal com a anfotericina B e do citronelal com o cetoconazol não atingiram os critérios estabelecidos para que a combinação entre as duas substâncias fosse considerada sinérgica, mas isso não implica dizer que não houve nenhum benefício em associá-los, visto que a inibição do crescimento fúngico foi possível em concentrações inferiores tanto da anfotericina B quanto do cetoconazol quando eles foram associados ao citronelal.

Para Argenta (2008) e Zhu *et al.*, (2004) uma combinação é considerada ideal quando é sinérgica, porém a ausência de sinergismo nem sempre significa que não há nenhum benefício entre as combinações terapêuticas. Pois a associação entre duas drogas pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento, além de permitir o uso de doses mais baixas de cada composto e conseqüentemente reduzir os efeitos tóxicos das drogas utilizadas individualmente. Ao mesmo tempo, a combinação entre medicamentos que atuam por meio de mecanismo de ação diferentes pode evitar o aparecimento de resistência.

Ficou evidente neste trabalho que o efeito inibitório das drogas foi mais evidente quando foram utilizadas em combinação com o citronelal, as quais foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* das cepas de *C. albicans* em concentrações menores do que quando utilizadas sozinhas.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados por este estudo demonstraram que o citronelal foi efetivo contra os fungos testados e sua associação com o cetoconazol mostrou aditividade para a cepa ATCC 76615, pois as CIMs de ambas as substâncias foram reduzidas. No entanto, a associação com a anfotericina B mostrou-se indiferente em todos os ensaios e não houve interação antagônica em nenhum dos casos. Ponto importante a ser considerado, já que é interessante que os estudos de associação entre antifúngicos não apresente antagonismo, pois neste conceito a interação do efeito das drogas ensaiadas não diminui a sensibilidade do microrganismo.

O reconhecimento da atividade do citronelal sobre as cepas de *C. albicans* evidenciada por este trabalho representa uma importante informação para avaliar a viabilidade da utilização de tal substância para obtenção de medicamentos para uso na prática clínica. Mas vale salientar a necessidade de mais estudos que avaliem a eficácia e a segurança para assegurar seu uso *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 253–273, 2010.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALMEIDA, L. F. D. *et al.* Atividade Antifúngica e Alterações Morfológicas Induzidas pelo Óleo Essencial de *Cinnamomum cassia* frente Cepas de *Candida albicans* Isoladas de Pacientes HIV Positivos. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 12, n. 3, p. 393-98, jul./set. 2012.

ARGENTA, J. S. **Atividade in vitro, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e terbinafina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum***. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

AMBER, K. *et al.* Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, Oxford, v. 17, p. 91-925, 2010.

ARAUJO, M. M. **Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais no assentamento Santo Antonio, Cajazeiras, PB, Brasil**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2009.

BANERJEE, D.; BURKARD, L.; PANEPINTO, J. C. Inhibition of nucleotide biosynthesis potentiates the antifungal activity of amphotericin B. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 1, Jan. 2014.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Cambridge, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. DST - **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Niterói, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, D. B. M. **Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de**

*Arpergillus*. 2011. 93f. Tese (Doutorado em odontologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2011.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 343-348, out/dez. 1999.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em Fármacos Antifúngicos: Uma Revisão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BENEDETTI, V. P.; FORNARI, G.; SCHERVINSKI, N. R. Avaliação da Susceptibilidade a Antifúngicos de Diferentes Espécies de Leveduras *Candida* Isoladas de Mucosa Bucal e Pele. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 093-095, 2011.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Módulo VII: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, Brasília, 2004. 27p.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista española de quimioterapia**, Madrid, v. 19, n. 2, p. 130-139, Jun. 2006.

CASTRO, H.G. de *et al.* Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 308-314, abr/jun. 2010.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 3, p. 179-184. maio/jun. 2010.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Anti-*Candida* Activity and Chemical Composition of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 56 n. 5, p. 749-755, Sept/Oct. 2013.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 20, n. 52, p. 68-73, 2011.

CHATURVEDI, V. *et al.* Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1543-1548, Abr. 2011.

CHIN, N. X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. *In vitro* activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 41, n. 4, p. 850-852, 1997.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, [S. l.], p. 739-788. 1991.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, v. 28, n. 14, 2008.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CORREA-ROYERO, J. T. V. *et al.* *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida Albicans*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 139-165, Jan. 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of fungal agents in therapy-what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

DEMITTO, F. O. *et al.* Suscetibilidade a antifungos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 5, p. 315-321, out. 2012.

DEVKATTE, A. N.; ZORE, G. B.; KARUPPAYIL, S. M. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. **FEMS yeast research**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 867-873, Jun. 2005.

DRAGO, L. *et al.* *In vitro* evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infections Diseases**, London, v.7, p. 111, Set. 2007.

ERNST, E. J. *et al.* *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 75-80, 1999.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.3, p. 369-394, 2006.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 167-194, abr./jun. 2006.

FISHER, J. F. Candida Urinary Tract Infections—Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: **Executive Summary**. CID 2011.

FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v.11, n.2, p. 216-220, 2009.

GALLUCCI, M.N *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 348–354, Nov/Dez. 2009.

GANJEWALA, D. Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, [S. l.], v. 3, p. 56-65, 2009.

GARCIA, R. *et al.* Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 163-168, 2008.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, Out. 1999.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003.

HONG-WEI, A. *et al.* Antifungal Properties and Chemical Analysis of Essential Oil from *Vitex negundo* Seeds. **British Journal of Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 541-548, 2014.

JOHNSON; M. D.; PERFECT, J. R. Use of Antifungal Combination Therapy: Agents, Order, and Timing. **Current Fungal Infection Reports**, New York, v. 4, n. 2, p. 87–95, May. 2010.

JOHNSON, M. D. *et al.* Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48 n. 3, p. 693-715, Mar. 2004.

KAUR, R. *et al.* Epidemiology and Virulence Determinants including Biofilm Profile of *Candida* Infections in an ICU in a Tertiary Hospital in India. **Journal of Mycology**. New York, v. 2014, p. 1-9, 2014.

KHUNKITTI, W. *et al.* Effect of Citronella Oil on Time Kill Profile, Leakage and Morphological Changes of *Propionibacterium acnes*. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 270, May/June, 2010.

KIBBLER, C. C. The Pro-debate: How can we improve the outcome of invasive fungal infection? The case for combination therapy. **Infectio Revista de la asociación Colombiana de Infectología**, Bogotá, v. 16, n. 3, p. 3-10, 2012.

KILIC, S. *et al.* *In vitro* synergistic activity of antibiotic combinations against *Brucella melitensis* using e-test methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n. 2, p. 233–237, Apr/June, 2008.

KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 41, p. 397-401, 1998.

LANIARDO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: Side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 26, n. 4, p. 223-227, Dez. 2009.

LEMOS, J.A. *et al.* Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV<sup>+</sup> patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin: killing kinetics of

caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 163-169, 2009.

LEWIS, R. E. *et al.* Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida species*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LOBO, M. A. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis* pers (*Typhaceae*). **Unisanta BioScience**, [S. l.], v. 2 n. 1, p. 42 - 51, 2013.

LOGUERCIO-LEITE, C. *et al.* A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, jun. 2006.

MALUCHE, M. E.; SANTOS J. I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MELO, V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. **Guia Antimicrobianos**. 2012. 57f. Guia. 1.ed. (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MIOTTO, N. M. L. *et al.* Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida*. **Revista da Faculdade de Odontologia**. Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 27-33, 2004.

MONGE, R. A. *et al.* The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, London, v. 152, p. 905-912, 2006.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 12, n. 1, p. 38-43, jan. 2013.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 18 n. 1, p. 163-194, Jan. 2005.

MULYANINGSIH, S. *et al.* Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8 cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Oxford, v. 17, n. 13, p.1061- 1066, Nov. 2010.

NASCIMENTO, P.F.C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 17, n. 1, p.108-113, Jan./Mar. 2007.

NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1, p.175-184, 2002.

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

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 272-279. Jun. 2003.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, Oxford. v. 52, n. 1, p. 1, Jul. 2003.

OLAJUYIGBE, O. O.; AFOLAYAN, A. J. Evaluation of Combination Effects of Ethanolic Extract of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. and Antibiotics against Clinically Important Bacteria. **The ScientificWorld Journal**, New York, v. 2013. 2013.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, São Paulo, v.13, n.1, p. 08-16, 2011.

OLIVEIRA, S. M. S. de *et al.* Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) peel. **Revista Brasileira de farmacognosia**, Brasília, v. 21, n.1, p. 190-193, Feb. 2011.

OLIVEIRA, W. A. de *et al.* Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 433-441, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 65-70, Mai. 2008.

PEI, R. S. *et al.* Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 74, n. 7, p. 379–383, 2009.

PFALLER, M. A. *et al.* Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 10 p. 3185–3190, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 603–613, Mai. 2001.

RIBEIRO, E. L. R. *et al.* Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, São Paulo, ed. 64, 2004.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, 2005.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Influência de Cinco Temperaturas de secagem no Rendimento e Composição do óleo Essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 73-78, 2000.

ROSATO, A. *et al.* The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, Oxford, v. 15, p. 635-638, 2008.

SAAD, A. *et al.* Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetti* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, Oxford, v. 17, p. 1057-1060, 2010.

SAMARANAYAKE, Y. H. *et al.* Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 54, p. 583–593, 2005.

SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Superordem corniflorae: química, etnofarmacologia e farmacologia. **Química Nova**, São Paulo, v.20, n.6, p. 599-611, 1997.

SARDI, J. C. O. *et al.* Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. London, v. 62, p. 10–24, 2013.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 35, p. 275–280, 2004.

SEIXAS, P.T.L. *et al.* Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S. l.], v.13, p. 513-517, 2011.

SHALIT, I., *et al.* In Vitro Synergy of Caspofungin and Itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus Minimal Effective Concentration End Points. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 47, n. 4, p. 1416–1418, April. 2003.

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

SHIN, S.; PYUN, M. S. Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 18, p. 827-830, 2004.

SOARES, L. A. **Estudo da atividade antidermatofítica de Protocatecuatos contra *T. rubrum* e *T. interdigitale***. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. **Uso combinado de antimicrobianos**. São Paulo: [s.n., 20--]. Disponível <<http://www.infectologia.org.br/boletim-sbi-institucional>> Acesso em: 16 dez. 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, 2013.

SUN, L. *et al.* In Vitro Activities of Retigeric Acid B Alone and in Combination with Azole Antifungal Agents against *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 4 p. 1586-1591, Apr. 2009.

TEIXEIRA-SANTOS, R. *et al.* Novel Method for Evaluating *In Vitro* Activity of Anidulafungin in Combination with Amphotericin B or Azoles, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2748-2754, Ago. 2012.

TORTORA, G.R.; FUNK, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2010.

VAZQUEZ, J. A. Combination Antifungal Therapy for Mold Infections: Much Ado about Nothing? **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 46, n.12, 2008.

WHITE, R. L. *et al.* Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, Ago. 1996.

WINGARD, J.R.; LEATHER, H. A New Era of Antifungal Therapy. **Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, Arlington Heights, v. 10, n. 2, p. 73-90, Feb. 2004.

WINN, W. *et al.* **Koneman Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

YAN, Z. *et al.* Potent Antifungal Activity of Pure Compounds from Traditional Chinese Medicine Extracts against Six Oral Candida Species and the Synergy with Fluconazole against Azole-Resistant *Candida albicans*. **Hindawi Publishing Corporation**, Cairo, p. 6, 2012.

ZAGO, J. A. A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v.19, n.4, p. 828-833. 2009.

ZHU, L. L.; GIL- LAMAINERE, C.; MULLER, F. M. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 319-325, Aug. 2004.

ZORE, G. B. *et al.* Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, Oxford, v. 18, n. 13, Out. 2011.