



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
SINTÉTICOS E BIOATIVOS

HERMES DINIZ NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL
SOBRE *Candida albicans* E *Candida tropicalis* ISOLADAS DE
CONTEÚDO PULMONAR.

João Pessoa
2018

HERMES DINIZ NETO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL
SOBRE *Candida albicans* E *Candida tropicalis* ISOLADAS DE
CONTEÚDO PULMONAR.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde e Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de Concentração: Farmacologia

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D585a Diniz Neto, Hermes.

Avaliação da atividade antifúngica de geraniol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de conteúdo pulmonar / Hermes Diniz Neto. - João Pessoa, 2018.

52 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

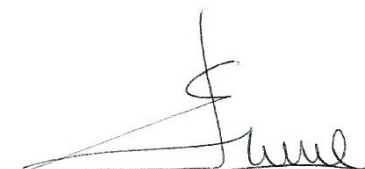
1. Farmacologia. 2. *Candida albicans*. 3. *Candida tropicalis*. 4. Candidíase pulmonar. 5. Candidemia. 6. Geraniol. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

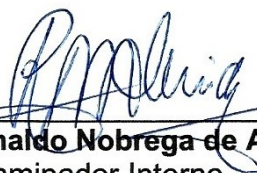
Hermes Diniz Neto

Avaliação da atividade antifúngica do geraniol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de conteúdo pulmonar.

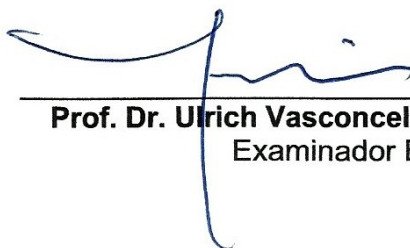
Aprovado. João Pessoa-PB. Data da Aprovação: 08 / 02 / 18



Prof.ª Dr.ª Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
Examinador Interno



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Examinador Externo

João Pessoa - PB
2018

Dedico este trabalho aos pilares de minha existência:

À minha **mãe**, que sempre me ofereceu luz, apoio e força onde quer que a escuridão, dúvida ou fraqueza pudessem surgir.

E à memória do meu **pai**, que deixou em mim seu exemplo de perseverança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profª Drª Edeltrudes de Oliveira Lima**, não só por ter me aceitado nesta caminhada que decidi tomar, oferecendo apoio e confiança, mas por também ser um modelo de profissional e pessoa a qual anseio me espelhar e com que possa continuar aprendendo.

Aos colegas de laboratório, **Ana Carolina, André Parente, Daniele de Figueredo, Janiere Sousa, Jefferson Rodrigues e Juliana Moura**. Por auxílio na execução e construção desta pesquisa e pela contínua troca de informação e conhecimentos que levarei adiante.

Aos meus inestimáveis amigos, **Adolfo Athayde, Amara Alcântara, Ana Raissa Nascimento, Aymê Serrano, Bruno Lubambo, Daniel Arola, Gislaine Schaeffer, Icaro Cipriano, Ive Fróes, Jéssica Mouzinho, Joana Kästle, Maria Alice Venâncio, Mariana Aguiar, Michele Holanda, Pablo Gomes, Paula Andrade, Pollyanni Dallara, Rayssa Nóbrega, Victor Batista, Victor Holanda, Waldir Cavalcanti e Wolfram Filho**, pessoas maravilhosas as quais tive o prazer e honra de ter ao meu lado durante essa caminhada nas situações mais difíceis e nos momentos mais alegres.

Aos **professores da minha graduação**, por terem me incentivado e apoiado continuamente, acreditando no meu potencial, atuando como profissionais extraordinários e sendo pessoas exemplares com as quais sempre pude e poderei contar.

Aos **professores da pós-graduação**, pelos valiosos ensinamentos passados e por terem apresentado a imensidão e grandeza do ambiente acadêmico e científico.

A minha **turma do mestrado**, com quem pude desenvolver fortes laços de amizade e dividir momentos ímpares de aprendizado e crescimento acadêmico ao longo das diversas disciplinas vividas.

À **secretaria e coordenação** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo alto nível de compromisso para com as necessidades dos discentes e incansáveis esforços para garantir um programa de alto nível.

À **UFPB**, por fornecer os recursos necessários para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

Resumo

DINIZ NETO, H. **Avaliação da atividade antifúngica do geraniol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de conteúdo pulmonar.** 2018. 52p. Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. 2018.

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento nos casos de infecções hospitalares provocadas por leveduras do gênero *Candida*, com notável crescimento da ocorrência de espécies não-*albicans*, além dos casos já frequentes provocados pela espécie *albicans*. As formas superficiais de candidíase são capazes de evoluir para a forma sistêmica afetando diferentes órgãos, podendo atingir as vias aéreas inferiores, compondo um quadro de candidíase disseminada pulmonar de diagnóstico complexo, difícil tratamento e alta mortalidade. Como meio de se obter novas opções terapêuticas no combate a estas infecções, os produtos naturais de origem vegetal possuem alto valor científico por oferecem uma vasta quantidade de diferentes substâncias de variadas classes fitoquímicas. Uma destas classes, os monoterpenos, se destacam por apresentar múltiplas atividades biológicas de interesse médico. Diante destas premissas, foi avaliada a atividade antifúngica do geraniol, um monoterpeno, contra cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* por meio de ensaios realizados in vitro: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), estudo do efeito do fitoconstituente sobre a micromorfologia fúngica, avaliação do efeito da substância sobre a cinética de crescimento microbiano (time-kill) e ensaio de associação entre o geraniol e antifúngico-padrão (anfotericina B). Nos ensaios de atividade antifúngica, o geraniol apresentou CIM de até 64 µg/mL e CFM de até 256 µg/mL. O monoterpeno também demonstrou eficácia em inibir o aparecimento de estruturas de virulência como pseudo-hifas e causar acentuada diminuição de blastoconídios no ensaio de efeito sobre micromorfologia fúngica. No ensaio de cinética de morte microbiana (time-kill), o monoterpeno demonstrou atividade fungicida concentração-dependente ao inibir o crescimento de aproximadamente 99% das leveduras testadas ao final do período de 24 h, com eficácia de inibição de crescimento diretamente proporcional a concentração utilizada. A associação entre o geraniol e a anfotericina B não apresentou sinergismo ou antagonismo, sendo caracterizada como indiferente por não serem observadas divergências entre a CIM da associação e a CIM de cada substância isolada. Em conclusão, o geraniol apresentou importante atividade fungicida, inibindo surgimento de estruturas de resistência e virulência fúngicas com eficácia dependendo diretamente da concentração utilizada, porém, sem atuar em sinergismo com antifúngico-padrão.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Candidíase pulmonar. Candidemia. Geraniol.

Abstract

DINIZ NETO, H. ***Evaluation of antifungal activity of geraniol against Candida albicans and Candida tropicalis isolated from pulmonary content.*** 2018. 52p. Master's Degree - Program of Post-Graduation in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba. 2018.

Recently, an increase in the number of hospital infections caused by *Candida* yeasts have been occurring, with a notable growing number of infections caused by non-albicans species, in addition to the already frequent cases caused by albicans species. The forms of superficial candidiasis may evolve to its systemic form, affecting different organs and being able to reach the lower airways, composing a condition of disseminated pulmonary candidiasis of complex diagnostic, difficult treatment and high mortality. As a way to obtain new therapeutic options in the combat against these infections, natural products of vegetal origin holds high scientific value due to their wide quantity of different substances of varied phytochemical classes. One of these classes, the monoterpenes, stands out for showing multiple biological activities of medical interest. Up to these premises, the antifungal activity of geraniol, a monoterpene, against strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* was evaluated through in vitro assays: Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC), study of the substance effect on the fungal micromorphology, evaluation of the substance effect on the kinetics of microbial growth (time-kill) and association assay between geraniol and standard antifungal agent (amphotericin B). On the antifungal activity assays, the geraniol displayed MIC of 64 µg/mL and MFC of 256 µg/mL. The monoterpene also exhibited efficacy in inhibiting the appearance of virulence structures such as pseudohyphae and promote intense decrease of blastoconids in the micromorphology assay. On the time-kill assay, the monoterpene showed dose-dependent fungicide activity by inhibiting the growth of nearly 99% of the yeasts tested by the end of the 24 h period, with growth inhibition efficiency proportional to the concentration used. The association between geraniol and amphotericin B did not displayed synergism nor antagonism, being characterized as indifferent for not showing disparity between the association MIC and the substance's isolated MIC. In conclusion, the monoterpene geraniol displayed important activity of fungicide character inhibiting the appearance of fungal virulence and resistance structures with efficacy depending directly on the concentration used, but without acting in synergism alongside the standard antifungal agent.

Keywords: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Pulmonary Candidiasis. Candidaemia. Geraniol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do geraniol e nerol.....	24
Figura 2 – Microscopia óptica do ensaio de micromorfologia.....	36
Figura 3 – Viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC-60193 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.....	38
Figura 4 – Viabilidade de <i>C. albicans</i> LM-206 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.....	38
Figura 5 – Viabilidade de <i>C. tropicalis</i> ATCC-13803 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.....	39
Figura 6 – Viabilidade de <i>C. tropicalis</i> LM-165 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) do geraniol e da anfotericina B sobre cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	33
Tabela 2 – Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre o geraniol e a anfotericina B sobre cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LM	Laboratório de Micologia
NF-kB	Fator Nuclear kappa B (Nuclear Factor kappa B)
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SAAS	Susceptibilidade Antifúngica em Ágar Semissólido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α (Tumor necrosis factor alpha)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USA	United States of America

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICA.....	16
2.1 Gênero <i>Candida</i> e candidíase.....	16
2.2 Terapia e resistência antifúngica.....	20
2.3 Terapia combinada.....	22
2.4 Produtos naturais	22
2.5 Geraniol.....	23
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.	26
3.2 Objetivos Específicos.	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Local do trabalho.....	27
4.2 Substância	27
4.3 Meios de cultura	27
4.4 Cepas fúngicas.....	27
4.5 Inóculo	28
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	28
4.7 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	29
4.8 Efeito do produto teste sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> ...29	
4.9 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das leveduras (<i>time-kill</i>)	30
4.10 Ensaio de associação pelo método <i>checkerboard</i>	31
4.11 Análise dos dados..	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	32
5.2 Efeitos do produto teste sobre a micromorfologia das leveduras	35
5.3 Efeitos do produto teste sobre a cinética do crescimento das leveduras	37

5.4 Ensaio de associação pelo método <i>checkerboard</i>	40
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas estão ocorrendo com maior frequência ao decorrer do tempo. Desse tipo de infecções, as provocadas por *Candida* são as de maior incidência, sendo responsáveis por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas (SOYER et al., 2017; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Neste contexto, a candidíase adquire relevância por ser uma infecção que pode variar desde manifestações frequentes, como contaminação na mucosa vaginal e oral, até o desenvolvimento da forma visceral por via hematogênica ou linfática (LAGUNES; RELLO, 2016).

Candidemia é a infecção de corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida* e atualmente é reconhecida como grave problema de saúde pública. A gravidade da doença, associada a condições debilitantes do paciente, leva a um aumento do tempo de permanência, acarretando elevação nos custos da internação hospitalar. Outro fator de grande relevância diz respeito às complicações clínicas decorrentes dessa doença, possuindo altas taxas de morbimortalidade, variando de 40% a 60% (KIM et al., 2013; COLOMBO et al., 2014).

No Brasil, a candidemia tem uma alta incidência de 2,49 casos por 1.000 internações que corresponde a uma taxa de 2 a 15 vezes maior do que vários países do Hemisfério Norte como França, Estados Unidos e Suíça. Neste cenário, *Candida albicans* é a espécie mais comum em infecções sanguíneas, representando aproximadamente metade dos casos, seguida de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* (NAKAMURA; CLADEIRA; AVILA, 2013; NUCCI et al., 2010).

Considerada uma forma rara de candidíase, o fungo *Candida* pode infectar o tecido respiratório inferior, provocando complicações de difícil diagnóstico e tratamento pela dificuldade de se estabelecer a diferença entre colonização e infecção nestes pacientes, uma vez que esta levedura pode estar presente em amostras do trato respiratório superior em indivíduos saudáveis. Esta infecção pode ocorrer por origem sanguínea a partir de uma infecção sistêmica avançada ou proveniente de aparatos de respiração mecânica ou exposição prolongada de um indivíduo vulnerável. A candidíase pulmonar, também chamada de pneumonia provocada por *Candida* pode se manifestar de forma severa, causando disfunção do

órgão e comprometendo gravemente a saúde do paciente (TERRANEO et al., 2016; XU et al., 2015).

Os antifúngicos comumente utilizados para o tratamento das infecções causadas por estes micro-organismos são os derivados azólicos (fluconazol, intraconazol e voriconazol) e o poliênico anfotericina B. Os derivados azólicos são menos tóxicos e possuem uma boa biodisponibilidade oral, porém seu uso prolongado favorece o surgimento de resistência. Já a anfotericina B tem sido considerada o padrão “ouro” para o tratamento de infecções fúngicas, mas sua toxicidade limita seu uso (KATHIRAVAN et al., 2012).

O maior obstáculo para se alcançar um tratamento pleno destas doenças é o aparecimento de cepas multirresistentes aos antifúngicos empregados na terapia convencional. Cepas de isolados clínicos de *C. albicans* demonstram uma capacidade diversificada em desenvolver mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos (DOI et al., 2016).

O fluconazol é uma das alternativas clínicas mais utilizadas devido ao seu baixo custo e toxicidade assim como elevada susceptibilidade de fungos provenientes de hemocultura. Contudo, várias cepas já apresentam resistência a este antifúngico, impossibilitando seu uso e sendo necessária a intervenção com outras classes de antifúngicos como as equinocandinas, por exemplo: caspofungina e anidulafungina; sendo a escolha alternativa a anfotericina B para quadros de sepse grave e choque séptico. Porém, já foi documentada a existência de cepas resistentes também a fármacos desta classe de antifúngicos, diminuindo ainda mais o espectro de opções terapêuticas para tratamento desta infecção com elevado potencial letal (JENSEN et al., 2015; SALOMÃO et al., 2011).

Considerando as limitações dos antifúngicos existentes atualmente e a resistência apresentada pelos micro-organismos, a busca por novas fontes terapêuticas para o tratamento dessas infecções tem sido constante, buscando fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente. Nesse contexto, destaca-se a utilização dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente ativas (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 2014).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade para fins terapêuticos há vários séculos, sintetizando metabólitos secundários ativos que possuem diversas atividades farmacológicas, dentre elas a ação antifúngica. Além disso, pesquisas que envolvem plantas medicinais e seus fitoconstituintes podem levar à

descoberta de componentes que sirvam como fármacos ou como protótipos de fármacos (HADI; DURU; MARTIN-DIANA, 2013; XU et al., 2011).

Entre os produtos naturais de origem vegetal merecem destaque os óleos essenciais que são um grupo de misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixa massa molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes por moléculas de natureza terpênica. Frequentemente, apresentam odor agradável e marcante. Os monoterpenos, principais compostos dos óleos essenciais, estão presentes em 90% da composição dos óleos essenciais e possuem um enorme potencial biológico, incluindo atividade antimicrobiana (MARCHESE et al., 2016; LIMA et al., 2011).

Amplamente estudados devido a sua vasta gama de atividade farmacológica, os monoterpenos são um grupo de moléculas da família dos terpenóides, de grande interesse científico. Uma das moléculas deste grupo, o geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) é um componente majoritário de óleos essenciais de espécies como *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus* e *Rosa damascena*, entre outras (DEVAKI, 2015).

É uma matéria-prima vegetal de grande importância econômica para as indústrias de fragrâncias e cosméticos, estando presente na composição de aproximadamente 70% dos perfumes comercializados no mercado europeu. Além de possuir outras atividades farmacológicas, o geraniol já demonstrou excelente atividade antifúngica contra cepas padrão do gênero *Candida* (MARCOS-ARIAS et al., 2011).

Diante desta realidade, faz-se necessária a experimentação de substâncias com promissor potencial antifúngico contra cepas de *C. albicans* para que se possa determinar a escala de atividade destas substâncias e consequentemente estudar sua inserção como uma opção terapêutica de qualidade. Alternativas estas que estão sendo exploradas através de substâncias provenientes de matéria-prima vegetal, sejam elas estudadas isoladamente ou ainda em associação aos fármacos antifúngicos já utilizados, na tentativa de aumentar sua eficácia ou evitar sua inativação por mecanismos de resistência assim como também diminuir a dose do medicamento de forma a reduzir seus efeitos tóxicos e reações adversas.

Baseado no potencial biológico contido nos monoterpenos, esta pesquisa propõe avaliar a atividade antifúngica do geraniol contra cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, avaliando sua associação aos antifúngicos a fim de que seja descoberta

uma possível alternativa terapêutica no combate às infecções humanas causadas pelos fungos do gênero *Candida*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Candida* e candidíase

Presente em vários ecossistemas, *Candida* spp. classificam-se taxonomicamente no reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcaeae (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). O gênero *Candida* compreende espécies leveduriformes, ou seja, apresentam estrutura celular oval ou arredondada (blastoconídios), medindo aproximadamente de 2 a 6 μ m e que se reproduzem por brotamento; em determinados ambientes, normalmente em temperatura superior a 36°C, estas leveduras podem se desenvolver em pseudohifas, atribuindo a característica de fungo dimórfico. As colônias têm coloração branca a creme e possuem superfície lisa ou rugosa (KASHEM et al., 2015).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis adotando a relação de comensalismo, podendo colonizar desde a cavidade bucal até o trato gastrointestinal e sistema geniturinário. Neste contexto, este fungo adquire relevância devido a possibilidade tanto de manifestações superficiais quanto o desenvolvimento de maneira sistêmica por via hematogênica ou linfática, representando grave ameaça a saúde do paciente, especialmente em casos mais delicados como indivíduos imunologicamente vulneráveis (MESINI et al., 2017).

Apesar de sua natureza comensal, as leveduras do gênero *Candida* podem facilmente infectar um paciente com fatores de risco favoráveis ao desenvolvimento desta patologia se tornando uma das infecções fúngicas mais recorrentes em ambiente hospitalar. Além de sua ubiquidade, as condições de debilidade do hospedeiro internado, exposição prolongada a procedimentos invasivos e perturbação no equilíbrio da microbiota humana favorecem o comportamento destes micro-organismos como patógenos oportunistas (BRANDT; LOCKHART, 2012).

A candidíase é o processo patológico caracterizado pela infecção micótica provocada pelo fungo do gênero *Candida*. Este tipo de infecção pode se manifestar de duas maneiras: a forma superficial, acometendo a pele, unhas e mucosas orofaríngeas e genitais, e a forma sistêmica, também chamada de candidíase

disseminada, invasiva ou profunda que é representada pela candidemia; ocorrendo estas manifestações de maneira isolada ou em conjunto de acordo com o grau e distribuição das leveduras (PEIXOTO et al., 2014).

A candidíase oral e a vulvovaginal são as manifestações superficiais mais comuns, onde apesar de normalmente não serem infecções graves, prejudicam a qualidade de vida. No entanto, em pacientes vulneráveis estes tipos de candidíase superficial podem se tornar a porta de entrada para a disseminação sistêmica da infecção, evoluindo para um quadro de difícil controle e alta mortalidade (RUIZ; RICHINI, 2016).

Dentre as cerca de 200 espécies pertencentes ao gênero *Candida*, *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista, por ser a mais frequentemente isolada em humanos (TARAFDER et al., 2016). Entretanto, nas últimas décadas tem sido observado significativo aumento do número de espécies não-*albicans* presentes em processos infecciosos humanos, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Deste grupo, espécies como *C. tropicalis* e *C. glabrata* ultimamente tem demonstrando resistência a antifúngicos como fluconazol e susceptibilidade a adquirir resistência a outros azólicos, sendo estas espécies não-*albicans* as que ocorrem com maior frequência em pacientes que receberam profilaxia com antifúngicos azólicos e/ou possuíam neutropenia como fator de risco (KAUR et al., 2016; YANG et al., 2012).

A candidemia recebe destaque como manifestação de difícil diagnóstico, elevada mortalidade e prolongamento do tempo de internação com consequente aumento de gastos. É um quadro caracterizado pela disseminação sistêmica das leveduras, cuja sintomatologia pode variar de acordo com a carga fúngica e local de maior contaminação e inserção tecidual profunda. Esta manifestação normalmente é de origem endógena, onde se origina a partir da microflora do próprio paciente; porém também pode ser de origem externa através do contato com materiais médico-hospitalares contaminados ou apenas o tempo de contato com materiais invasivos que favorecem o acesso do fungo às porções mais profundas do organismo (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

A candidemia também prolonga a permanência de pacientes em unidades de terapia intensiva, podendo acrescentar 8 a 30 dias a estadia em ambiente hospitalar, assim como aumenta os custos relacionados ao cuidado médico, estimando-se que cada episódio de candidíase invasiva possa custar aproximadamente U\$40.000 na

Austrália e até €16.000 em hospitais espanhóis (SLAVIN et al., 2004; OLAECHEA et al., 2004). Outros facilitadores para o surgimento desta manifestação são o sistema imunológico comprometido e deterioração das barreiras físicas como pele e mucosas (HA et al., 2011).

No Brasil, um estudo epidemiológico de 388 casos de candidemia conduzido por Wille et al. (2013) demonstrou que *C. tropicalis* foi a espécie não-*albicans* de maior prevalência (27,3% dos casos), perfil este que se repetiu em estudo recentemente conduzido por Xisto et al. (2017), com ocorrência de *C. tropicalis* em 30,6% dos casos de candidemia, inferior apenas aos casos provocados por *C. albicans* (38,6%). Ainda foram relatados casos de cepas de *C. tropicalis* formadoras de biofilme resistentes a anfotericina B (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015).

Apesar de serem considerados casos mais raros, cepas do gênero *Candida* podem infectar o sistema respiratório provocando enfermidades secundárias graves como pneumonite hipersensitiva e lesões superficiais que podem comprometer a função respiratória ao mesmo tempo em que contribui para a disseminação das leveduras por via hemática ou linfática para outros órgãos e o aparecimento de infecções provocadas por outros micro-organismos (SERRANO et al., 2010). Este tipo de infecção pode surgir por duas maneiras: por meio de leveduras migratórias da corrente sanguínea resultantes de um quadro de candidemia previamente instalada, podendo resultar em êmbolos fúngicos no pulmão além de outras afecções; ou mais raramente, através da aspiração de conteúdo fúngico elevado, causando pneumonia primária (TAMAI et al., 2012; HAMET et al., 2012).

Este caráter esporádico atribuído às infecções pulmonares provocadas por *Candida* estão diretamente relacionados a dificuldade de diagnóstico preciso e conclusivo, sendo a presença desta levedura no trato respiratório habitualmente considerada colonização em vez de infecção. O diagnóstico de pneumonia provocada por *Candida* normalmente requer as manifestações clínicas apropriadas (febre, tosse seca, dispnéia progressiva) assim como evidências histopatológicas da invasão da levedura no tecido pulmonar (exsudato, lesões e nódulos cavitários pulmonares) e culturas de sangue e escarro positivas (ARSHAD; GARCIA; KHAJA, 2017).

Clinicamente, devido às condições instáveis dos pacientes e outros fatores de risco, métodos diagnósticos invasivos são cada vez menos utilizados, dificultando o diagnóstico exato. Apenas recentemente têm sido estudado a investigação dos níveis séricos e de amostras respiratórias (fluido broncoalveolar e aspirado traqueal) de $\beta(1-3)$ D-glucanos como ferramenta de apreciada utilidade para diagnóstico e acompanhamento terapêutico (SU et al., 2017; XU et al., 2015).

O gênero *Candida* possui uma parede celular rica em $\beta(1-3)$ D-glucanos, polissacarídeo responsável por deflagrar respostas inflamatórias mediadas por marcadores como IL-1 e TNF- α através da ativação de NF- κ B assim como a produção de espécies reativas de oxigênio, além de aumentar também os níveis de IL-8 e IL-6. Mecanismos estes que podem potencializar resultados de piora clínica, sugerindo que espécies de *Candida* presentes no trato respiratório possuem um papel fisiopatológico significativo, inclusive favorecendo a instalação de pneumonias bacterianas (TAN et al., 2016; DENG et al., 2015b; WILLIAMSON et al., 2011).

Recentemente, têm ocorrido um aumento dos casos de infecção hospitalar provocados por *Candida* spp. de forma geral, notadamente o aumento do número de infecções por espécies não-*albicans* (CHAKRABARTI et al., 2015). Vale enfatizar como um dos determinadores para este aumento no número de infecções a negligência da possibilidade de infecção fúngica ao considerar os diagnósticos de infecção exclusivamente bacterianos, podendo promover o atraso ao combate eficiente contra o real agente etiológico e permitindo um desenvolvimento deste micro-organismo que conseqüentemente induzirá a complicações no quadro de saúde do paciente. Soma-se ainda a este efeito o desequilíbrio da microbiota natural humana promovido pela administração equivocada de antibacterianos, favorecendo ainda mais a disseminação da infecção fúngica (RUIZ; RICHINI, 2016).

Além da persistente negligência no tocante a infecções fúngicas e uso irracional de antibióticos, outra razão para esta progressão de ocorrências se deve ao aumento da sobrevivência dos pacientes, mais especificamente ao aumento do número de casos de indivíduos imunocomprometidos detectados, sejam pacientes que se submeteram a procedimentos cirúrgicos, tratamentos quimioterápicos, que estão em unidade de cuidado intensivo por longos períodos de tempo ou em pacientes HIV positivos, grupos estes que tradicionalmente apresentam acentuada vulnerabilidade para a ocorrência de doenças infecciosas (ENOCH et al., 2017).

2.2 Terapia e resistência antifúngica

O tratamento de infecções superficiais e sistêmicas provocadas por *Candida* normalmente emprega fármacos de três grupos terapêuticos predominantes: fármacos azólicos, poliênicos e equinocandinas. Vale salientar que uma etapa de suma importância que precede o início da farmacoterapia é o correto diagnóstico e identificação do agente infectante para que se possa escolher a estratégia farmacológica mais adequada ao tratamento de forma que se possa controlar e extinguir a infecção com o mínimo de danos ao paciente, buscando também minimizar os custos e evitar o aparecimento de cepas resistentes (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015; RANG, 2012).

Frequentemente utilizados em infecções fúngicas desde o seu surgimento na década de 1950 até os dias de hoje, com novas moléculas no mercado, os antifúngicos azólicos compõem um grupo de moléculas sintéticas diferenciadas de acordo com seu núcleo que pode ser imidazólico (ex. cetoconazol e miconazol) ou triazólico (ex. fluconazol, voriconazol e itraconazol). Esta classe de fármacos atua inibindo a via metabólica da biosíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14a-demetilase, responsável pela conversão de lanosterol a ergosterol, um esterol fundamental na estrutura da membrana celular fúngica. Este mecanismo resulta na alteração da fluidez da membrana e comprometimento do crescimento fúngico (MUSIOL; KOWALCZYK, 2012).

A classe dos derivados poliênicos é representada pela anfotericina B e nistatina. Enquanto a nistatina é utilizada para o tratamento de infecções superficiais da pele e lúmen intestinal, a anfotericina B é considerada o “padrão-ouro” para o tratamento de candidíase disseminada. Estas moléculas se ligam diretamente ao ergosterol presente na membrana celular formando poros, levando ao extravasamento do conteúdo interno como água e íons ocasionando a morte celular. Apesar de sua eficácia no tratamento de infecção sistêmica, a anfotericina B possui alto grau de toxicidade, sobretudo a renal, ocorrendo em 80% dos pacientes que iniciam a farmacoterapia com este fármaco, além de efeitos adversos provenientes da infusão (calafrios, febre, cefaléia e tremores) que podem ser contornados com formulações especiais como a anfotericina B-lipossomal (JANOUT et al., 2015; RANG, 2012).

Desde o seu surgimento na década de 1970, as equinocandinas demonstraram ser uma importante alternativa na farmacoterapia antifúngica. Estas moléculas são lipopeptídeos sinteticamente modificados provenientes de alguns fungos (Anidulafungina, derivada de *Aspergillus nidulans*) e atuam em nível de parede celular fúngica inibindo a síntese de 1,3-b-D-glucana, polímero de função estrutural fundamental. A ausência deste polímero acarreta em ruptura da parede celular resultando em atividade fungicida especialmente em cepas de *Candida*, incluindo aquelas resistentes a antifúngicos azólicos e poliênicos. Além de sua notável atividade fungicida, esta classe é bem tolerada na terapêutica, produzindo menos efeitos adversos que outros fármacos utilizados contra candidíase sistêmica como a anfotericina B (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015).

O desenvolvimento de resistência antifúngica constitui um grave problema de saúde. Ultimamente tem surgido vários relatos de identificação de cepas fúngicas resistentes a vários fármacos tradicionalmente empregados na terapêutica, em especial as espécies não-*albicans* cujo número de casos de resistência ao fluconazol, antifúngico azólico amplamente utilizado em nível hospitalar com finalidade profilática ou de manutenção, vem aumentando significativamente; e de caráter mais grave, o surgimento de cepas resistentes a equinocandinas, que até o momento, representavam uma valiosa alternativa eficaz e segura para o tratamento de quadros graves de infecção fúngica (LOCKHART et al., 2017; PERLIN, 2015).

Devido a plasticidade genética da espécie, as espécies do gênero *Candida* podem facilmente adquirir resistência a um antifúngico quando o tratamento não estiver sendo administrado da maneira correta, seja por subdose, interrupções na frequência de administração ou antifúngico inadequado. O fenômeno da resistência pode ocorrer de forma inerente ao fungo, sem necessidade de exposição ao antifúngico, ou quando uma espécie previamente susceptível se torna resistente após o contato e adaptação ao fármaco. Alguns mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de resistência são de caráter genético e adaptativo, aos quais cepas que são expostas e sobrevivem a um tratamento ineficaz, desenvolvendo ferramentas específicas de defesa contra a ação dos antifúngicos, tais como: modificações na membrana plasmática reduzindo a permeabilidade ou captação do fármaco, aumento da expressão de bombas de efluxo que retiram a molécula do meio intracelular e alterações estruturais no sítio alvo como a substituição do ergosterol por outros tipos de esteróis que não sofrem a ação de determinadas

moléculas (KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016; JENSEN et al., 2015; FEKKAR et al., 2013).

2.3 Terapia combinada

Na prática médica já se utilizam antifúngicos de diferentes classes, cuja combinação de mecanismos de ação atuantes em diferentes alvos celulares buscam alcançar um efeito sinérgico que proporciona uma terapia mais eficaz diminuindo doses de fármacos conhecidamente tóxicos, como é o caso da associação de anfotericina B a outros antifúngicos como equinocandinas e flucitosina, fármaco inibidor da síntese de DNA nas células fúngicas (THOMSON et al., 2017; BENNETT, 2007; MARINÉ et al., 2006).

Estudos de associação entre antifúngicos diferentes permitem viabilizar uma terapia de êxito onde as monoterapias não conseguiriam resultados satisfatórios. Diante do aumento do número de infecções fúngicas caracterizadas pelo difícil tratamento e pelo surgimento de novas cepas multi-resistentes surge a necessidade de se desenvolver tratamentos alternativos e/ou adjuvantes para as infecções sistêmicas. Apesar de escassos, alguns trabalhos de pesquisa já direcionam seu foco para a avaliação da atividade antifúngica de produtos de origem natural utilizados isoladamente e em associação a fármacos já utilizados contra cepas resistentes de *Candida*, demonstrando um horizonte de novos estudos e possibilidades promissoras na descoberta de novos tratamentos (HAN et al., 2016).

2.4 Produtos naturais

Atualmente, há aumento do interesse por terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente por derivados de plantas. Acompanhando a história humana desde civilizações antigas, o uso terapêutico de plantas sempre foi profundamente estudado no âmbito científico e têm adquirido cada vez mais espaço na medicina moderna, se renovando enquanto progride como área de estudo devido ao aparecimento dos mais variados adventos tecnológicos, permitindo investigações mais exatas e precisas sobre a composição química de plantas utilizadas, assim como analisar, qualificar e quantificar suas atividades biológicas pressupostas sempre com o objetivo de oferecer novas alternativas

terapêuticas cada vez mais seguras e eficientes para diversas doenças humanas existentes (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Grande parte desta valorização crescente do estudo de produtos naturais ocorre devido a procura da população por medicamentos e terapias que apresentem menores efeitos colaterais com o máximo de eficácia possível, escapando dos padrões atuais de medicamentos disponíveis no mercado com relação risco-benefício pouco proveitosa, submetendo o paciente a alguns desconfortos que podem prejudicar a adesão ao tratamento impossibilitando a terapêutica adequada (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

Outro fato de grande relevância está no uso tradicional pela população, gerando a preocupação por parte de organizações, tais como a Organização Mundial da Saúde (OMS), que buscam valorizar este contexto cultural trazendo o conhecimento científico para permear o conhecimento popular através da implantação de programas de fitoterapia em atenção básica e disseminação do conhecimento para a sociedade, prezando pela segurança da população (GONÇALVES et al., 2013).

2.5 Geraniol

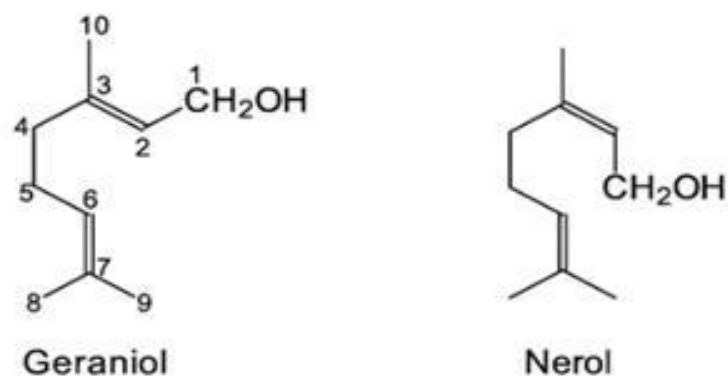
Da vasta gama de metabólitos secundários de organismos vegetais que possuem atividade biológica e possível uso terapêutico, vale salientar a presença dos óleos essenciais, misturas líquidas voláteis bastante estimadas por suas fragrâncias normalmente agradáveis e popular uso medicinal devido a suas atividades anti-inflamatória, antiséptica e anti-oxidante. Estas misturas são compostas predominantemente por substâncias da classe dos terpenoides, formados pela combinação de duas, três, quatro ou até mais do que oito unidades de isopreno (C_5H_8), sendo classificados de acordo com o número destas unidades monoméricas, a saber: monoterpenos (duas unidades de isopreno), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades) e tetraterpenos (oito unidades). Estruturas com número de unidades monoméricas superior a oito são chamadas de polisoprenóides ou politerpenos (DEBENEDETTI; WILSON, 2014; AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; HERAS et al., 2003).

Da família dos terpenoides, os monoterpenos representam uma classe de substâncias químicas de grande importância científica, sendo estudados há décadas devido a diversas atividades tais como antitumoral e analgésica. Nos últimos anos, com o aumento de infecções por cepas de micro-organismos resistentes, em especial a ocorrência de infecções fúngicas, os monoterpenos também vêm sendo estudados com a finalidade de obtenção de novos fármacos antifúngicos contra espécies resistentes à farmacoterapia convencional (SOBRAL et al., 2014; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

O geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol), tradicionalmente referenciando seus dois isômeros cis-trans, porém, apropriadamente nomeado como geraniol o seu isômero trans e nerol seu isômero cis, é um monoterpeno de aspecto oleoso e translúcido podendo apresentar coloração pálida amarelada, possui aroma semelhante ao de rosas e é um grande componente de óleos vegetais, sendo encontrado em espécies como *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus* e *Rosa damascena*, entre outras (DEVAKI, 2015; CHEN; VILJOEN, 2010).

Também apreciado no mercado de fragrâncias, o geraniol está presente em 76% dos desodorantes e perfumes no mercado europeu e em 33% de formulações cosméticas (LAPCZYNSKI et al., 2008). Além de possuir importantes propriedades farmacológicas e bioquímicas como ação anti-inflamatória, antidepressiva e até mesmo antitumoral através da supressão de angiogênese, já foi demonstrado no geraniol a eficácia como repelente de insetos e sua atividade antimicrobiana tem sido destacada em diversos estudos (WITTIG et al., 2015; DENG et al., 2015a; JAYACHANDRAN; CHANDRASEKARAN; NAMASIVAYAM, 2015).

Figura 1 – Estrutura química do geraniol e nerol.



O geraniol e o citronelol já demonstraram atividade antifúngica contra espécies dermatófitas, especialmente contra cepas de *Trichophyton*, cuja investigação do mecanismo de ação propunha ligação ao ergosterol e subsequente desestabilização da membrana celular provocando a morte do micro-organismo (PEREIRA et al., 2015). Tais dados corroboraram com resultados de pesquisas anteriores, quando foram observadas menor espessura da membrana celular, descontinuidades em sua superfície, assim como sua destruição em maiores concentrações, além da ocorrência de anormalidades na estrutura mitocondrial fúngica (MIRON et al., 2014).

Desta forma, devido à gama de atividades biológicas apresentada pelo fitoconstituente, permite-se estudar o geraniol como um potencial fármaco que possa ser utilizado com segurança e eficácia contra infecções de alta mortalidade provocadas por micro-organismos do gênero *Candida*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica do geraniol contra cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas de conteúdo pulmonar.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do geraniol;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) através do método de associação (checkerboard) do fitoconstituente com antifúngico padrão;
- Avaliar a interferência do produto sobre a micromorfologia das leveduras;

4 METODOLOGIA

4.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Substâncias

O geraniol foi a substância utilizada como o objeto de estudo desta pesquisa. E a anfotericina B como antifúngico padrão. As referidas substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Filial: São Paulo-SP). As mesmas foram solubilizadas em tween 80 a 2% e dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de até 10% e preparadas nas concentrações de 1024 até 0,5 µg/mL (PEREIRA et al., 2015; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.3 Meios de cultura

Para a manutenção das cepas e ensaios da atividade antifúngica, foram utilizados o Agar Sabouraud Dextrose – ASD, Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO LABORATORIES/USA/FRANCE), Agar Fubá (HIMEDIA LABORATORIES/INDIA) e Roswell Park Memorial institute - RPMI 1640-L-glutamina (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), preparados segundo as descrições dos fabricantes.

4.4 Cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas padrão (ATCC) e de origem clínica isoladas de amostra pulmonar (LM), sendo estas de *C. albicans*: ATCC-60193, LM-20, LM-23, LM-32, LM-76, LM-136, LM-206, LM-296 e LM-925; e *C. tropicalis*: ATCC-13803, LM-07, LM-26, LM-56, LM-165, LM-268 e LM-

271. Todas as linhagens fúngicas pertencem à coleção da MICOTECA do Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Dentre as linhagens que apresentaram CIM e CFM condizente com a maioria, foram escolhidas aleatoriamente duas cepas para os ensaios seguintes de micromorfologia, associação e cinética de morte microbiana, sendo uma cepa clínica de cada espécie (LM-206 e LM-165 para *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente). Todas as cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios repiques de 24-48 h em ASD, incubados a 35±2°C.

4.5 Inóculo

Para preparação do inóculo, culturas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, foram semeadas em meio nutriente e incubadas a 35±2°C durante 24-48 h. Colônias dessas culturas, foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, para obter um inóculo de 10⁶ UFC/mL e em seguida diluída em solução salina numa proporção de 1:10 a fim de obter uma suspensão fúngica contendo 10⁵UFC/mL que foi utilizada nos ensaios (OSTROSKY et al., 2008; HADACEK; GREGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Hadacek e Greger (2000), Eloff (1998) e NCCLS (2002). A determinação da CIM do geraniol sobre cepas de *Candida* foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de Caldo RPMI nos poços das placas. Em seguida, 100 µL da emulsão do geraniol foram dispensados nas cavidades da primeira coluna da placa. Logo depois, foi feita uma diluição seriada a uma razão de dois, de forma que as concentrações finais do monoterpeno nos poços após a adição do inóculo fossem de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada linha da placa refere-se a uma cepa fúngica específica. Paralelamente, foram realizados controle

com anfotericina B (1024 µg/mL até 0,5 µg/mL), caldo RPMI como controle de esterilidade e caldo RPMI com inóculo fúngico como controle de viabilidade das leveduras. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e as placas assepticamente fechadas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h para ser realizada a leitura posteriormente.

A CIM foi definida como a menor concentração dos produtos capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico da maior porcentagem de cepas verificado nos poços, quando em comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios. A atividade antifúngica dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: < abaixo de 500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; SARTORATTO et al., 2004).

4.7 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x4) nas placas de microdiluição foram adicionadas em 100 µL de caldo RPMI contidos em novas placas de cultura de células, que foram incubadas por 24-48 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A CFM foi considerada como a menor concentração da emulsão em que não houve crescimento de leveduras no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; SALIE; EAGLES; LENG, 1996).

4.8 Efeito do produto teste sobre a micromorfologia de *C. albicans* e *C. tropicalis*

Para o estudo de possíveis alterações na micromorfologia de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi empregada a técnica de microcultivo em lâmina em placa de Petri (câmara úmida). O meio de cultura agar-fubá-Tween 80 fundido foi fracionado em tubos estéreis contendo o monoterpene em concentração correspondente a CIM. Também foi utilizado um tubo apenas com o meio de cultura para controle de esterilidade. Após homogeneização, cada meio de cultura foi espalhado sobre uma

lâmina de vidro. Repiques de 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ASD de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram semeados e as placas incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica utilizando microscópio biológico (2000I-BINO-CE Bioval), em um aumento de 400x, para observação da presença ou não de estruturas características como blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios (ALVES et al., 2013).

4.9 Efeito do produto teste sobre a cinética do crescimento das leveduras (*time-kill*)

O estudo da interferência do produto teste sobre curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia proposta por Klepser et al. (1998). Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas dos produtos, foi observado o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24 h.

Inicialmente, 1 mL da suspensão de leveduras foi inoculado em 9 mL de CSD contendo o monoterpene em concentrações crescentes de acordo com a sua CIM, a saber: CIM, CIMx2 e CIMx4, que correspondem a 64 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também foram realizados o controle com anfotericina B em concentrações semelhantes às utilizadas para o monoterpene (CIM, CIMx2 e CIMx4, correspondendo a 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), controle de esterilidade do meio e controle de viabilidade fúngica.

Nos intervalos 0 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h após a incubação, uma alíquota de 10 μL desse inóculo foi uniformemente semeada em placa de ASD. As placas inoculadas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h. Após período de incubação foi realizada a contagem de UFC presentes nas placas de Petri e determinada a quantidade por mL de solução em cada período para cada substância em suas concentrações. O experimento foi realizado em duplicata.

As curvas de crescimento foram construídas plotando a contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas) com o software estatístico GraphPadPrism. Foi considerada atividade fungicida da droga quando houver redução no crescimento maior ou igual a 3 \log_{10} (99,9%) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houver redução no crescimento menor que 3 \log_{10} (< 99,9%) UFC/mL (KLEPSEK et al., 2000).

4.10 Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

O efeito de associação do geraniol com antifúngico padrão foi determinado a partir do método checkerboard para derivação do Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). Foram utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM's.

Inicialmente, 100 μ L de caldo RPMI foram adicionados nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U" (ALAMAR®). Em seguida, 50 μ L de cada produto testado, em diversas concentrações (CIM \div 8, CIM \div 4, CIM \div 2, CIM, CIM \times 2, CIM \times 4 e CIM \times 8) foram adicionados no sentido vertical (anfotericina B) e horizontal (geraniol) da microplaca. Por fim, foi adicionado 20 μ L da suspensão fúngica. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo as microplacas incubadas a 35 \pm 2°C por 24-48 h.

O ICIF foi calculado através da soma do CIFA + CIFB (CIFA= Concentração Inibitória Fracionada do produto teste; CIFB= Concentração Inibitória Fracionada do antifúngico padrão). O CIFA, por sua vez, é calculado através da relação CIMA combinado/CIMA isolado, enquanto que o CIFB = CIMB combinado/CIMB isolado. Este índice é interpretado da seguinte forma: sinergismo (ICIF 0,5), antagonismo (ICIF > 4,0) e indiferença (0,5 < ICIF 4) (ODDS, 2003; SHIN, 2003).

4.11 Análise dos dados

Os dados dos ensaios de CIM, CFM e estudo de associação foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. A curva de cinética de crescimento microbiana foi plotada pelo log₁₀ UFC/mL em função dos intervalos de tempo e das concentrações estudadas das substâncias utilizadas. Para organização e análise dos dados referentes aos resultados da presente pesquisa foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 7.0 para Windows, San Diego, CA - USA). Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os resultados do ensaio de avaliação de atividade antifúngica do fitoconstituente geraniol contra cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* estão expressos na tabela 1.

O geraniol foi capaz de inibir o crescimento de 8 (89%) das 9 cepas de *C. albicans* até a concentração de 64 µg/mL, com uma destas cepas (LM-925) sendo inibida na concentração de 32 µg/mL. Apenas uma cepa (LM-32) foi inibida na concentração de 128 µg/mL. Nesta mesma concentração, o geraniol inibiu o crescimento de todas as 7 cepas de *C. tropicalis*, sendo 2 destas cepas (LM-26 e LM-56) inibidas em concentração de 32 µg/mL.

Tabela 1 – Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) do geraniol e da anfotericina B sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*

Leveduras	Cepas	Geraniol		Anfotericina B	
		CIM µg/mL	CFM µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL
<i>C. albicans</i>	ATCC-60193	64	256	1	2
	LM-20	64	256	1	2
	LM-23	64	256	1	2
	LM-32	128	256	1	2
	LM-76	64	256	1	2
	LM-136	64	128	1	2
	LM-206	64	256	1	2
	LM-296	64	64	1	1
	LM-925	32	64	1	2
	ATCC-13803	64	128	1	2
<i>C. tropicalis</i>	LM-07	64	256	1	1
	LM-26	32	256	1	1
	LM-56	32	256	1	1
	LM-165	64	256	1	1
	LM-268	64	64	1	1
	LM-271	64	256	1	1

Fonte: Do autor

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) da substância-teste contra *C. albicans* não foi superior a 256 µg/mL para as 10 cepas, com 2 cepas (LM-296 e LM-925) já demonstrando ausência de crescimento em concentração de 64 µg/mL e 1 cepa (LM-136) se comportando de maneira semelhante a 128 µg/mL. O monoterpeno se comportou de maneira semelhante contra as cepas de *C. tropicalis*, apresentando CFM de no máximo 256 µg/mL para as cepas estudadas, valendo notar que 2 cepas (LM-26 e LM-56) já demonstraram ausência de crescimento em concentrações inferiores (64 e 128 µg/mL).

O controle realizado com antifúngico padrão, anfotericina B, apresentou resultados satisfatórios com CIM de 1 µg/mL para todas as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A CFM não foi superior a 2 µg/mL. O controle de viabilidade das leveduras foi satisfatório, assegurando o crescimento durante a realização dos ensaios fúngicos. Não houve crescimento de micro-organismos no controle de esterilidade.

As micoses humanas, especialmente as de caráter sistêmico, são infecções com alto grau de dificuldade de tratamento. As alternativas terapêuticas são escassas e alguns dos antifúngicos disponíveis que obtêm algum sucesso também possuem acentuada toxicidade, o que transforma o tratamento do paciente com poucos efeitos colaterais em um fenômeno delicado (NEGRI et al., 2014).

O uso de produtos naturais com finalidade terapêutica já era explorado pela humanidade desde a antiguidade. Porém, apenas recentemente com os avanços tecnológicos e a crescente necessidade de se encontrar novas moléculas seguras e eficazes no tratamento destas infecções, os produtos naturais foram obtendo uma maior atenção científica onde seus fitoconstituintes passaram a ser investigados quanto a suas possíveis atividades biológicas, destacando em particular, seu potencial antifúngico (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2016; FERREIRA et al., 2015; FENNER et al., 2006).

Tampieri et al. (2005) já haviam estudado o potencial antifúngico do geraniol contra cepas de *C. albicans* através de ensaio de Susceptibilidade Antifúngica em Ágar Semissólido (SAAS) e verificou que o geraniol apresentou CIM de 100 µg/mL para as leituras realizadas após 48h. Neste contexto, os resultados encontrados neste trabalho sobre o potencial antifúngico do geraniol sobre espécies de *Candida* estão compatíveis com aqueles registrados anteriormente.

Os resultados obtidos no presente estudo condizem com os de estudos prévios realizados. Leite et al. (2015) constataram que o geraniol apresentou intensa atividade frente *C. albicans* com CIM de 16 µg/mL contra 90% das cepas estudadas. O geraniol demonstrou ser mais eficaz contra as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* do que descrito por Miron et al. (2014) ao avaliar o monoterpeneo contra dermatófitos e leveduras, incluindo *C. albicans* e *C. tropicalis*, obtendo uma CIM com variação entre 32 e 128 µg/mL contra dermatófitos e 72 e 128 µg/mL contra as leveduras.

Em recente estudo, conduzido por Sharma, Khan e Manzoor (2016), também foi constatada atividade antifúngica por parte do geraniol, que por sua vez

apresentou CIM de 130 µg/mL para *C. albicans* e *C. glabrata* e de 80 µg/mL para *C. tropicalis*. O efeito fungicida foi observado com CFM de 160 µg/mL para *C. albicans* e *C. glabrata* e 140 µg/mL para *C. tropicalis*. Já Pereira et al. (2015) demonstrou que o geraniol possui atividade contra cepas de *Trichophyton rubrum* com CIM variando entre 16 e 256 µg/mL. (KIM; PARK, 2012) também observaram atividade antifúngica do geraniol contra *Aspergillus niger* demonstrando CIM de 56 µg/mL para 77% das cepas estudadas. Desta forma, o geraniol com CIM de 64 µg/mL foi classificado como tendo forte atividade.

Uma substância antifúngica pode exercer um efeito fungicida ou fungistático de acordo com a sua concentração e o tempo de exposição ao microrganismo. Tal informação é de fundamental importância para poder analisar a viabilidade terapêutica dessa substância, visto que indivíduos imunocompetentes podem se beneficiar de uma substância fungistática para conseguir tratar a infecção, porém, em indivíduos imunodebilitados, uma substância fungicida é a orientação terapêutica mais eficaz. Uma maneira de analisar se esta substância é fungicida ou fungistática se dá através do cálculo da razão entre a CFM e a CIM observadas como proposto por Siddiqui et al., (2013). Dessa forma, foi calculada a razão CFM/CIM para determinar se a substância possuía uma atividade fungistática ($CFM/CIM > 4$) ou fungicida ($CFM/CIM \leq 4$). Sabendo que a CIM determinada foi de 64 µg/mL e a CFM foi equivalente a 256 µg/mL, a razão 256/64 (CFM/CIM) foi igual a 4, sugerindo fortemente que o geraniol possua atividade antifúngica de caráter fungicida.

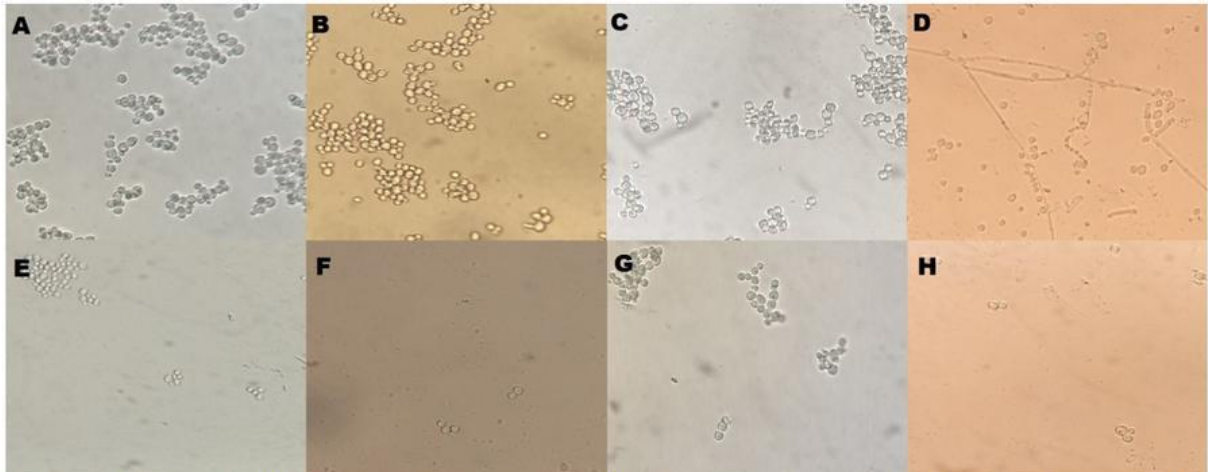
Apesar da constante comprovação da atividade antifúngica pelo geraniol em vários estudos, torna-se difícil uma avaliação comparativa entre os resultados obtidos nestes testes. Tal fenômeno se dá pela falta de padronização para os testes de avaliação de atividade antifúngica, visto que diversos fatores como tempo de leitura, meio nutriente utilizado e técnica utilizada influenciam intensamente os resultados obtidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA et al., 2014).

5.2 Efeitos do produto teste sobre a micromorfologia das leveduras

Foi realizada a observação das culturas de leveduras na presença e ausência do monoterpene. As leveduras testadas foram as cepas ATCC-60193 e LM-206 de *C. albicans* e ATCC-13803 e LM-165 de *C. tropicalis*. Na ausência do fitoconstituente, todas as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Figura 2-A, B e C) apresentaram

grande quantidade de blastoconídios com a ocorrência de algumas pseudohifas na lâmina de *C. tropicalis* LM-165 (Figura 2-D). Contudo, após exposição ao geraniol, todas as cepas de ambas as espécies apresentaram diminuta quantidade de blastoconídios com ausência de pseudo-hifas (Figura 2-E,F,G e H).

Figura 2 – Microscopia óptica do ensaio de micromorfologia.



C. albicans ATCC-60193 (A), *C. albicans* LM-206 (B), *C. tropicalis* ATCC-13803 (C), *C. tropicalis* LM-165 (D) antes da exposição ao geraniol. *C. albicans* ATCC-60193 (E), *C. albicans* LM-206 (F), *C. tropicalis* ATCC-13803 (G), *C. tropicalis* LM-165 (H) após exposição ao geraniol em concentração de 64 µg/mL.

Fonte: Do autor

O estudo sobre as alterações micromorfológicas provocadas pela substância contribui para a relevância do geraniol como potencial agente antifúngico, visto que a formação de pseudohifas em espécies do gênero *Candida* são importantes fatores de virulência, uma vez que estas estruturas conferem resistência ao fungo dificultando processos de defesa como fagocitose pelas células imunológicas. Tais alterações morfológicas estão relacionadas a patogenicidade do fungo em virtude de favorecerem a invasão tecidual devido a sua capacidade de adesão ao tecido epitelial e endotelial do hospedeiro, e são influenciadas por fatores ambientais como a temperatura, por exemplo (ALVES et al., 2013).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura (SHARMA; KHAN; MANZOOR, 2016). Os autores avaliaram por meio de microscopia eletrônica a influência do geraniol na concentração de 130 µg/mL sobre a micromorfologia de cepas de *C. albicans*. Como resultado, puderam observar que as leveduras expostas ao monoterpene apresentaram acentuada redução da quantidade de estruturas de virulência, as pseudohifas. Também foi observado que as leveduras tratadas com o

geraniol se apresentavam atrofiadas, desfiguradas ou como entidades destruídas, enquanto as leveduras não tratadas continham a superfície celular intacta.

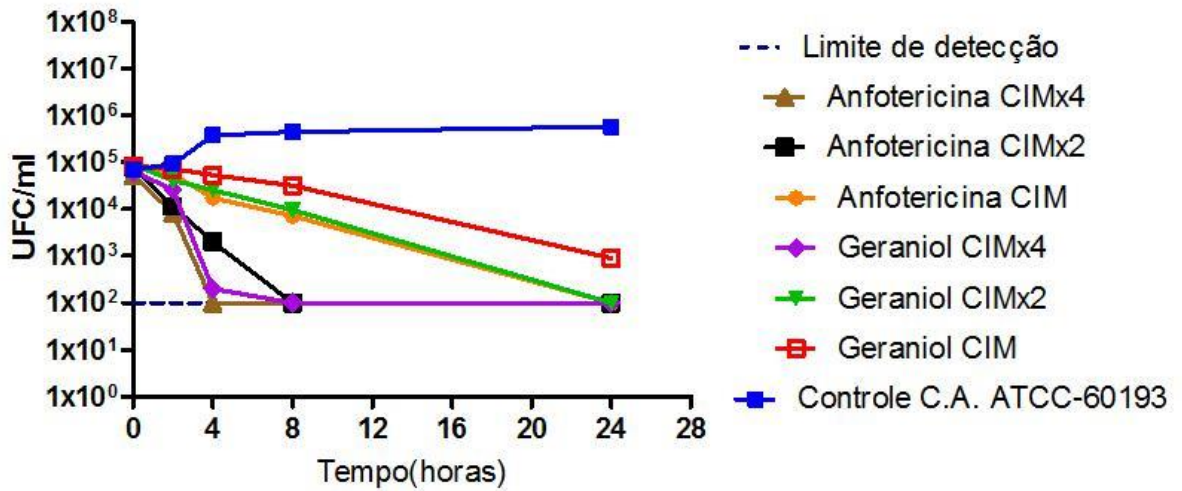
5.3 Efeitos do produto teste sobre a cinética do crescimento das leveduras

Após a avaliação da CIM e CFM, foi estudada a viabilidade das leveduras em diferentes intervalos de tempo expostas ao geraniol e anfotericina B com a finalidade de confirmar a atividade fungicida apresentada pelo monoterpene e ainda se esta atividade é concentração ou tempo-dependente. Nas figuras 3-6 estão expressas as relações entre o número de UFC/mL versus os intervalos de tempo para as diferentes concentrações utilizadas (CIM, CIMx2 e CIMx4) sobre as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

As figuras 3 e 4 mostram que o geraniol contribuiu para a redução das populações das cepas de *C. albicans* em aproximadamente 99% após o período de 24 h, demonstrando que este monoterpene possui atividade fungicida concentração-dependente contra esta espécie do gênero *Candida*, visto que concentrações progressivas (CIMx2 e CIMx4) do monoterpene alcançaram maior eficácia de inibição microbiana em menor período de tempo, com a CIMx4 sendo capaz de eliminar 99% das UFC de ambas as cepas de *C. albicans* até o intervalo de 8h após o início dos testes, semelhante a CIMx4 de Anfotericina B, enquanto a CIMx1 apresentou efeito fungistático no período de tempo avaliado.

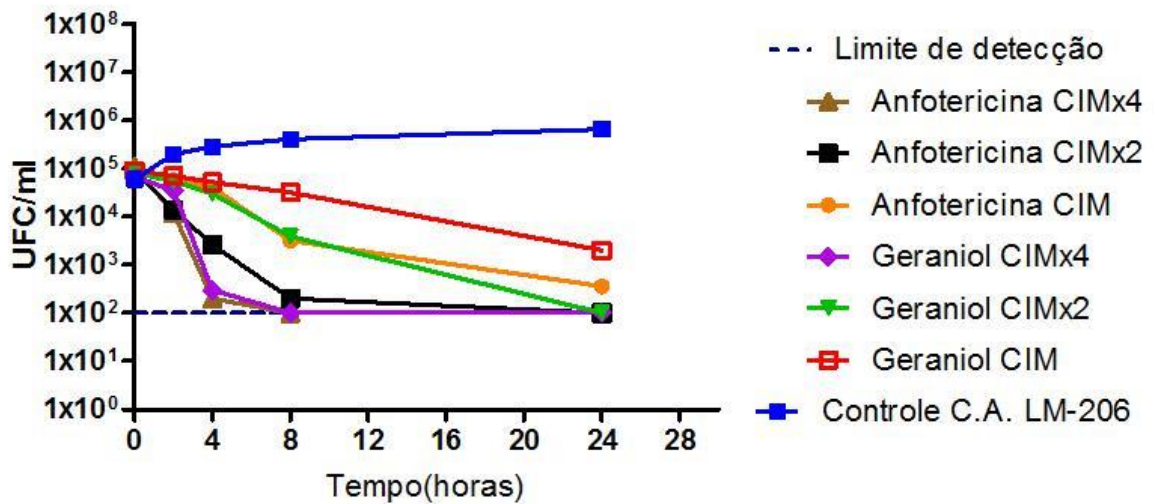
Nas figuras 5 e 6 o fitoconstituente se comporta de maneira semelhante, eliminando 99% das UFC até o intervalo final (24 h) nas concentrações menores (CIMx1 e CIMx2) e atingindo a mesma eficácia em período de tempo menor (8 h) na maior concentração (CIMx4). Porém, o monoterpene demonstrou menor inibição do crescimento microbiano, com crescimento de maior número de UFC das espécies de *C. tropicalis* nas mesmas concentrações e mesmos intervalos de tempo em comparação com a outra espécie estudada.

Figura 3 - Viabilidade de *C. albicans* ATCC-60193 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.



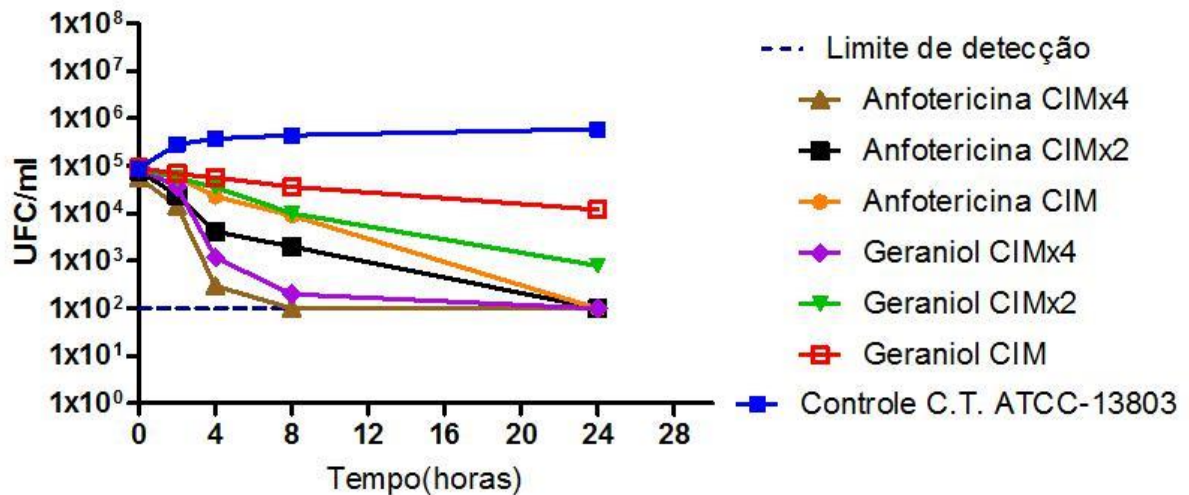
Fonte: Do autor

Figura 4 - Viabilidade de *C. albicans* LM-206 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.



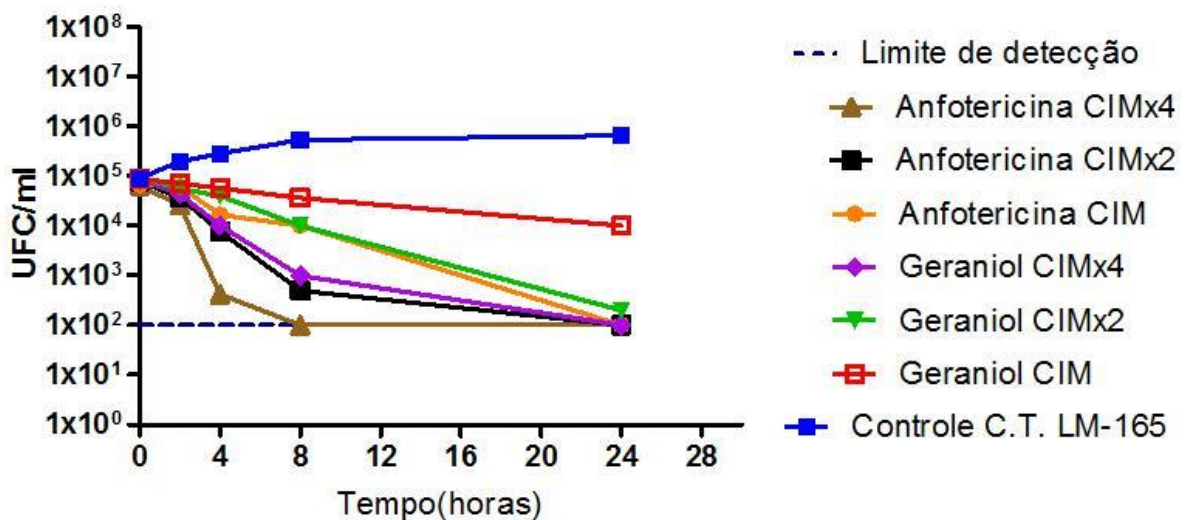
Fonte: Do autor

Figura 5 - Viabilidade de *C. tropicalis* ATCC-13803 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Do autor

Figura 6 - Viabilidade de *C. tropicalis* LM-165 em UFC/mL na presença de geraniol e anfotericina B em diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Do autor

Tais dados indicam que, apesar do monoterpene também apresentar atividade fungicida frente as cepas de *C. tropicalis*, as mesmas concentrações utilizadas inibiram em menor escala o crescimento destas leveduras nos mesmos intervalos de tempo, o que poderia sugerir que estas cepas de *C. tropicalis* possuam um caráter inato de resistência, sendo menos sensíveis às substâncias utilizadas.

Todas as cepas de ambas as espécies apresentaram crescimento satisfatório nas condições de controle positivo (Sem exposição ao monoterpene ou antifúngico), assegurando a viabilidade das leveduras em condições normais. Não houve crescimento microbiano nas placas do controle de esterilidade.

Os resultados obtidos condizem com os de Toledo et al. (2016), que avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, cuja composição química possuía 22,77% de geraniol. O óleo essencial testado conseguiu inibir o crescimento de diferentes espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans* e *C. tropicalis* durante 24 h de ensaio realizado na concentração de 1000 µg/mL.

Previamente, Leite et al. (2015) também havia estudado a influência do geraniol contra cepas de *C. albicans* em determinados intervalos de tempo ao longo do período de 24 h, obtendo resultados semelhantes em que o monoterpene inibiu o crescimento da levedura mantendo um plateau a partir do intervalo de 8 h em diante na concentração de 16 µg/mL e na concentração de 32 µg/mL exibiu pronunciada atividade fungicida, reduzindo em mais de 90% a população de leveduras de *Candida albicans* ao período final de 24 h.

5.4 Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

No ensaio para avaliar o estudo de associação dos produtos, em paralelo, foi feita a determinação da CIM, onde permaneceu de 64 µg/mL para o geraniol e 1 µg/mL para anfotericina B. Estes resultados reforçam a excelente atividade antifúngica do geraniol demonstrada nos ensaios anteriores, visto que não ocorreu qualquer mudança significativa nos valores de CIM ao ser realizado este novo ensaio.

Os ensaios demonstraram que os micro-organismos das cepas de *C. albicans* ATCC-60193 e *C. tropicalis* LM-165 não cresceram em ambiente com concentração superior nem sequer em concentração inferior a CIM isolada de qualquer uma das substâncias, sendo inibidos na concentração mínima de 64 µg/mL de geraniol e 1 µg/mL de anfotericina. Houve inibição de crescimento de *C. albicans* LM-206 frente às concentrações conjuntas de 32 µg/mL de geraniol e 1 µg/mL de anfotericina B. A cepa de *C. tropicalis* ATCC-13803 apenas foi inibida na concentração de 128 µg/mL de geraniol associado a 1 µg/mL de anfotericina B.

Tabela 2 – Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre o geraniol e a anfotericina B sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Cepas	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de Interação
	Geraniol	Anfotericina B		
<i>C. albicans</i> (ATCC-60193)	1	1	2	Indiferente
<i>C. albicans</i> (LM-206)	0,5	1	1,5	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> (ATCC-13803)	2	1	3	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> (LM-165)	1	1	2	Indiferente

Fonte: Do autor

De acordo com a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da associação, a combinação do geraniol e anfotericina B pôde ser caracterizada como do tipo indiferente para as cepas escolhidas do gênero *Candida*, mesmo com crescimento em concentrações acima da CIM isolada para o caso da cepa ATCC-13803 de *C. tropicalis* e abaixo da CIM isolada para o caso da cepa LM-206 de *C. albicans*.

A terapia combinatória é uma estratégia desejada para o combate de infecções fúngicas devido a sua capacidade de diminuição da dosagem de fármacos que podem apresentar efeitos indesejáveis podendo dificultar o tratamento. Khan, Malik e Ahmad (2012) conduziram experimentos para avaliar o perfil antifúngico do geraniol, outros fitoconstituintes e óleos essenciais em associação a outros antifúngicos como fluconazol e anfotericina B contra cepas de *C. albicans* e observaram que o monoterpene geraniol apresentou níveis variados de interação com ambos os antifúngicos, demonstrando sinergismo contra algumas cepas e indiferença contra outras. Tais observações condizem com os resultados encontrados no presente trabalho, em que o geraniol apresentou comportamento semelhante frente as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Embora pouca literatura esteja disponível para a atividade antifúngica do geraniol contra *C. tropicalis*, especialmente a respeito da terapia combinatória com outros antifúngicos, os resultados se mostram promissores, uma vez que a associação do monoterpene ao antifúngico escolhido não apresentou antagonismo, o que seria uma característica indesejável; e mesmo com o fato de que a susceptibilidade de diferentes leveduras do gênero *Candida* a agentes antifúngicos

não seja uniforme, é esperado que o geraniol mantenha sua atividade antifúngica contra variadas espécies e cepas deste fungo (KHAN; MALIK; AHMAD, 2012).

Visto isso, os dados obtidos no presente trabalho reforçam a importância do geraniol como notável substância antifúngica e estimulam sucessivas pesquisas no intuito de viabilizar sua inserção na terapêutica tradicional, partindo de estudos toxicológicos para atestar sua segurança e a continuidade dos estudos de avaliação de sua atividade farmacológica com experimentações in vivo, otimizando as estratégias contra infecções fúngicas letais e de difícil tratamento. Devido a sua atratividade comercial, pode-se conduzir estudos farmacotécnicos que viabilizem o uso do geraniol como principal componente em formulações cosméticas com possível uso direcionado a prevenção de micoses superficiais.

Com os avanços da química computacional e os estudos de relação estrutura-atividade quantitativa, também pode-se aproveitar os resultados obtidos juntamente com os de outros monoterpenos com reconhecida atividade antifúngica para se obter novas moléculas com atividade biocida semelhante ou superior, progredindo na obtenção de novas alternativas terapêuticas contra infecções fúngicas.

A seriedade das infecções e colonizações fúngicas pulmonares também levanta a necessidade de se conhecer melhor as leveduras frequentemente isoladas destes locais biológicos, procurando investigar principalmente mecanismos de resistência que dificultam o tratamento e fatores de virulência que favorecem a ocorrência destes quadros, agravando a saúde dos pacientes acometidos.

6 CONCLUSÕES

O geraniol apresentou forte atividade biocida contra as linhagens testadas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, oriundas de conteúdo pulmonar. Ao mesmo tempo, provocou alterações significativas na morfologia destes micro-organismos, diminuindo a quantidade de estruturas de resistência, tais como os blastoconídios e clamidoconídios, e eliminando grande parte de certos fatores de virulência, especialmente as pseudo-hifas, atestando o potencial fungicida do monoterpene. Em complemento, a ação fungicida do geraniol foi demonstrada no ensaio de cinética de morte microbiana, revelando um caráter concentração-dependente. Finalmente, a associação entre o geraniol com o fármaco padrão, anfotericina B, se mostrou indiferente, independentemente da concentração empregada de ambos compostos.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-ZAPATA, D.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 604 – 611, 2015.

ALVES, L. A. et al. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 3/4, p. 965 – 971, 2013.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835 – 10847, 2013.

ARSHAD, H.; GARCIA, S.; KHAJA, M. Case report of invasive, disseminated candidiasis with peripheral nodular cavitory lesions in the lung. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 20, p. 34 – 37, 2017.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71 – 79, 2016.

BENNETT, J. Agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill**, p.1103 – 1117, 2007.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218 –225, 2014.

BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 3, p. 170 – 177, 2012.

CHAKRABARTI, A. et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 285 – 295, 2015.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol: a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643 – 651, 2010.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739 – 787, 1991.

COLOMBO, A. L. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489 – 1498, 2014.

DEBENEDETTI, S.; WILSON, E. **Terpenos**. 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ub.edu.ar/bitstream/handle/123456789/6132/4317%20-%20com%20pleto%20-%20Farmacognosia%20-%20debenedetti.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy>>. Acesso em: 18/05/2017.

DENG, X. et al. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 264 – 271, 2015.

DENG, Z. et al. Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses. **Nature immunology**, v. 16, n. 6, p. 642 – 652, 2015.

DEVAKI, T. Geraniol, a component of plant essential oils: a review of its pharmacological activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 67 – 70, 2015.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. 1 – 9, 2016.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 08, p. 711 – 713, 1998.

ENOCH, D. A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols**, n. 1508, p. 17 – 65, 2017.

FEKKAR, A. et al. Rapid Emergence of Echinocandin Resistance during *Candida* kefir Fungemia Treatment with Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2380 – 2382, 2013.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 369 – 394, 2006.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix: involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 2, p. 165 – 169, 2015.

FERREIRA, G. L. S. et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist?: A systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1 – 8, 2015.

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

GONÇALVES, N. M. T. et al. Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, p. 632 – 637, 2013.
GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1 – 15, 2013.

HA, J. F. et al. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181 – 195, 2011.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 3, p. 137 – 147, 2000.

HADI, A. H. A.; DURU, M. E.; MARTIN-DIANA, A. B. Bioactive natural products. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1 –, 2013.

HAMET, M. et al. *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 8, p. 1272 – 1279, 2012.

HAN, B. et al. Antifungal activity of *Rubus chingii* extract combined with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 2, p. 82 – 92, 2016.

HERAS, B. L. et al. Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 2, p. 171 – 185, 2003.

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**, v. 15, n. 6, p. 428 – 433, 2003.

JANOUT, V. et al. Taming Amphotericin B. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2021 – 2024, 2015.

JAYACHANDRAN, M.; CHANDRASEKARAN, B.; NAMASIVAYAM, N. Geraniol attenuates fibrosis and exerts anti-inflammatory effects on diet induced

atherogenesis by NF- κ B signaling pathway. **European journal of pharmacology**, v. 762, p. 102 – 111, 2015.

JENSEN, R. H. et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551 – 2555, 2015.

KASHEM, S. W. et al. *Candida albicans* Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 356 – 366, 2015.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678 – 5698, 2012.

KAUR, R. et al. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 455 – 460, 2016.

KHAN, M. S. A.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-*Candidal* activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 33 – 42, 2012.

KIM, E.; PARK, I. Fumigant antifungal activity of Myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10459 – 10469, 2012.

KIM, S. et al. Clinical impact of time to positivity for *Candida* species on mortality in patients with *Candidaemia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2890 – 2897, 2013.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207 – 1212, 1998.

KLEPSEK, M. E. et al. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1917 – 1920, 2000.

KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1438 – 1450, 2016.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445 – 1456, 2015.

LAGUNES, L.; RELLO, J. Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy, and prevention. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1221 – 1226, 2016.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on geraniol. **Toxicologic and Dermatologic Assessment of Cyclic and Non-Cyclic Terpene Alcohols**, v. 46, n. 11, Supplement, p. S160 – S170, 2008.

LEITE, M. C. A. et al. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275 – 284, 2015.

LIMA, B. et al. Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 924 – 936, 2011.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134 – 140, 2017.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402 – 414, 2016.

MARCOS-ARIAS, C. et al. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 119 –, 2011.

MARINÉ, M. et al. Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1295 – 1298, 2006.

MESINI, A. et al. *Candida* infections in paediatrics: Results from a prospective single-centre study in a tertiary care children's hospital. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 118 – 123, 2017.

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

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics-A Highway to New Drugs or a Dead End? **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1378 – 1388, 2012.

NAKAMURA, H. M.; CLADEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. de. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49 – 58, 2013.

NASCIMENTO-JÚNIOR, B. J. et al. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 57 – 66, 2016.

NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratories Standards. Document M27-A2. 2002.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797 – 1806, 2008.

NEGRI, M. et al. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925 – 2956, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629 – 661, 2016.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561 – 570, 2010.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1 – 1, 2003.

OLAECHEA, P. M. et al. Economic Impact of *Candida* Colonization and *Candida* Infection in the Critically Ill Patient. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 23, n. 4, p. 323 – 330, 2004.

OLIVEIRA, J. D. S.; MACHADO, K. D. C.; FREITAS, R. M. D. Produtos naturais aplicados a doenças negligenciadas: prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 2, p. 729 – 734, 2014.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301 – 307, 2008.

PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase-Uma Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 75 – 82, 2014.

- PEREIRA, F. de O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228 – 234, 2015.
- PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl.6, p. S612 – S617, 2015.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133 – 163, 2007.
- RANG, H. P. Fármacos Antifúngicos. **Farmacologia de Rang & Dale**, n. 7, p. 758 – 763, 2012.
- ROSA, C. da; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311 – 318, 2011.
- RUIZ, L. da S.; RICHINI, V. B. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. **Instituto Adolfo Lutz**, n. 26, 2016.
- SALIE, F.; EAGLES, P. F. K.; LENG, H. M. J. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 1, p. 27 – 33, 1996.
- SALOMÃO, R. et al. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso - controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 145 – 157, 2011.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275 – 280, 2004.
- SERRANO, C. et al. Neumonitis por hipersensibilidad tras exposición a *Candida* spp. **Archivos de Bronconeumología**, v. 46, n. 5, p. 275 – 277, 2010.
- SHARMA, Y.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 26, n. 3, p. 244 – 254, 2016.
- SHIN, S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389 – 393, 2003.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237 – 243, 2013.

SLAVIN, M. et al. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 111 – 120, 2004.

SOBRAL, M. V. et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1 – 35, 2014.

SOYER, N. et al. Epidemiology and analysis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a single-center real-life experience. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 47, n. 5, p. 1535 – 1542, 2017.

SU, K. et al. Measuring (1, 3)- β -D-glucan in tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage fluid, and serum for detection of suspected *Candida* pneumonia in immunocompromised and critically ill patients: a prospective observational study. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 252 – 260, 2017.

TAMAI, K. et al. Fatal community-acquired primary *Candida* pneumonia in an alcoholic patient. **Internal Medicine**, v. 51, n. 22, p. 3159 – 3161, 2012.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339 – 345, 2005.

TAN, X. et al. *Candida albicans* airway colonization facilitates subsequent *Acinetobacter baumannii* pneumonia in a rat model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3348 – 3354, 2016.

TARAFDER, S. et al. Species identification of *Candida* isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital. **Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University Journal**, v. 9, n. 1, p. 20 – 25, 2016.

TERRANEO, S. et al. Impact of *Candida* spp. isolation in the respiratory tract in patients with intensive care unit-acquired pneumonia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 94.e1 – 94.e8, 2016.

THOMSON, P. et al. Combined antifungal therapy against systemic murine infections by rare *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 112 – 117, 2017.

TOLEDO, G. L. D. et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1 – 16, 2016.

WILLE, M. P. et al. Historical trends in the epidemiology of *Candidaemia*: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 288 – 292, 2013.

WILLIAMSON, D. R. et al. The relationship between *Candida* species cultured from the respiratory tract and systemic inflammation in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. **Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie**, v. 58, n. 3, p. 275 – 284, 2011.

WITTIG, C. et al. Geraniol suppresses angiogenesis by downregulating vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR-2 signaling. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. 1 – 19, 2015.

XISTO, M. I. D. S. et al. Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 988 – 992, 2017.

XU, W. et al. The serum glucan level and pathological changes of antifungal treatment for lower respiratory tract infection of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 153 – 159, 2015.

XU, W. et al. A novel antifungal peptide from foxtail millet seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1630 – 1637, 2011.

YANG, Y. et al. Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. 1 – 7, 2012.