

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

DANIELE DE FIGUEREDO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
 β - CITRONELOL SOBRE *Candida albicans***

João Pessoa

2016

DANIELE DE FIGUEREDO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
β- CITRONELOL SOBRE *Candida albicans***

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

2016

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Daniele de Figueredo.

Avaliação da atividade biológica de β - Citronelol sobre *Candida albicans* / Daniele de Figueredo Silva. - João Pessoa, 2016.

93 f.: il. -

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

1. Farmacologia. - Produtos Naturais. 2. *Candida albicans*. 3. *Candidíase*. 4. Resistência antifúngica. 5. B- citronelol. 6. Análise in silico. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Títulos.

UFPB/BC

DANIELE DE FIGUEREDO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE β -
CITRONELOL SOBRE *Candida albicans***

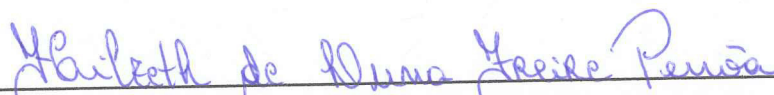
Aprovada em: 19 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.ª EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA
(UFPB - Orientadora)

Prof. Dr. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA
(UFPB - Examinador interno)



Prof. Dr.ª HILZETH DE LUNA FREIRE PESSÔA
(UFPB - Examinadora externa)

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida...

Aos meus pais, **Lucineide de Figuerêdo** e **José Francinaldo**, por ser meu alicerce, sinônimo de perseverança, força e dedicação, que me ensinaram os valores da vida.

Aos meus queridos irmãos **Denise de Figuerêdo** e **D'lánio Gabriel** pelo companheirismo, amizade e o apoio incondicional, essencial para mais essa conquista.

Agradecimientos

Á **Deus**, por ter me concedido o bem mais precioso: a vida! E por ser a essência da minha força, na idealização de novos horizontes e conquistas.

Á minha orientadora, **Prof^a. Edeltrudes de Oliveira Lima**, modelo de profissional a ser seguida, sempre muito prática e objetiva. Obrigada pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança a mim depositada.

Ao **Prof. Abrahão Oliveira**, por suas sugestões e colaboração inestimável.

Aos colegas de laboratório, **André Parente, Aratã Cortez, Cássio Ilan e Ana Luiza** por compartilhar conhecimentos e auxílio na execução dessa pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Micologia: **Fátima Carvalho e Júlio Pereira**, por tornarem o ambiente de pesquisa mais alegre e descontraído.

A minha cunhada e amiga **Francisca Laranjeira**, por estar disponível sempre, em promover as pazes com as minhas ferramentas tecnológicas (trabalho difícil) fundamentais para a construção dessa pesquisa.

A minha **turma de mestrado** que foi escolhida a “dedo”. Sem vocês, os momentos de intenso estudo das disciplinas e seminários não teriam sido tão agradáveis e nem divertida. Obrigada pela cumplicidade!

A todos os **docentes** do mestrado, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas, contribuindo no meu engrandecimento profissional e pessoal.

À **Coordenação** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, disponibilidade e praticidade na resolução de problemas e ou esclarecimentos de dúvidas.

Ao **CNPq e UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

Resumo e Abstract

SILVA, D. F. *Avaliação da atividade biológica de β - citronelol sobre Candida albicans*. 2016. 93f Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativo, área de concentração: Farmacologia) - UFPB, João Pessoa, 2016.

RESUMO

Candida albicans é a principal levedura provedora de infecções fúngicas oportunistas em humanos sadios e imunodebilitados. A alta frequência de candidíase, vinculada ao aumento de falha terapêutica, por reflexo a resistência aos agentes antifúngicos de uso comum a terapia, leva a busca de fontes alternativas para obtenção de novas drogas antifúngicas. Em destaque, os produtos naturais à base de plantas, são ótimos precursores pela diversidade de compostos moleculares ativos. Dentre eles, os monoterpenos são detentores de um enorme potencial biológico de interesse humano. Diante dessas premissas, foi avaliada a atividade biológica de β - citronelol sobre *Candida albicans*, através de ensaios microbiológicos realizados *in vitro*, por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), seguido da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e ensaios em difusão em disco em meio sólido, para estudo comparativo do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos azólicos (cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol e miconazol) e polienos (anfotericina B e nistatina) isolados e em associação ao β - citronelol. Em adição, também foram efetuados estudos dos parâmetros de ADMET por análise *in silico*. Nos estudos de atividade antifúngica, β - citronelol obteve uma CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ (forte atividade) e uma CFM de 512 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente para 75% da população das cepas fúngicas testadas. Ao estudo de associação, o sinergismo foi prevalente para todos os antifúngicos. Em destaque, a combinação de β - citronelol ao fluconazol, itraconazol e miconazol, foi constatado a modificação do perfil de resistência à sensibilidade para alguns exemplares de *C. albicans*. Na análise *in silico*, β - citronelol apresentou ter boa biodisponibilidade oral, no entanto, potencial irritante e danos ao sistema reprodutor foram revelados como possíveis efeitos toxicológicos severos a este monoterpeno. Em conclusão, o β - citronelol monoterpenoide possui ter atividade anti-*Candida albicans* de natureza fungicida, além de ser um ótimo modificador de atividade aos agentes antifúngicos quando combinados. E muito embora tenha apresentado boa biodisponibilidade oral teórica, o perfil de toxicológico variado sugere a necessidade em avaliar o risco-benefício desse composto na produção de novo medicamento antifúngico, por realização de ensaios pré- clínicos e clínicos.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Candidíase*. *Resistência antifúngica*. *β - citronelol*. *Associação*. *Sinergismo*. *Análise in silico*.

SILVA, D. F. *Evaluation of biological activity of β - citronellol on Candida albicans*. 2016. 93f. Dissertation (Masters in Natural Products and Synthetic Bioactive, area of focus: Pharmacology) CCS/ UFPB, Joao Pessoa, 2016.

ABSTRACT

Candida albicans is the main yeast provider of opportunistic fungal infections in healthy humans and immunosuppressed. The high frequency candidiasis, linked to increased therapeutic failure by reflection of resistance to antifungal agents commonly used therapy leads to search for alternative sources for obtaining new antifungal drugs. Highlighted, natural herbal products are excellent precursors for diversity of active molecular compounds. Among them, the monoterpenes are holders of a huge biological potential of human interest. Given these premises, we evaluated the biological activity of β - citronellol on *Candida albicans*, by microbiological tests performed in vitro by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), followed by the Fungicide Concentration Minimum (CFM) and disk diffusion testing solid medium, for comparative study of the susceptibility profile to azole antifungals (ketoconazole, clotrimazole, fluconazole, itraconazole and miconazole) and polyenes (amphotericin B and nystatin) isolated or as association with β - citronellol. In addition, studies were also made of ADMET parameters by in silico analysis. In studies of antifungal activity, β - citronellol obtained a MIC of 128 mg / mL (strong activity) and CFM 512 ug / mL respectively for 75% of the population of the tested fungal strains. The association study, synergism was prevalent for all antifungals. In highlighted, the combination of β - citronellol to fluconazol, itraconazole, miconazole, were found to change the sensitivity of the resistance profile for some specimens of *C. albicans*. In the *in silico* analysis, β - citronellol showed good oral bioavailability, however, irritation potential and damage to the reproductive system have been disclosed as possible severe toxicological effects to this monoterpene. In conclusion, the β - citronellol monoterpene has to have anti-*Candida albicans* activity of fungicide nature, besides being a great modifier of the antifungal activity when combined. And although it presented good theoretical oral bioavailability, varied toxicological profile suggests the need to assess the risk-benefit of this compound in the production of new antifungal medicine for conducting preclinical and clinical trials of nature.

Keywords: *Candida albicans*. Candidiasis. Antifungal resistance. β - citronellol. Association. Synergism. *In silico* analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de virulência por <i>C. albicans</i> , envolvida no processo de instalação e desenvolvimento de infecções em humano	24
Figura 2 – Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação	29
Figura 3 – Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos	30
Figura 4 – Substâncias de estudo: β - citronelol estrutura molecular	35
Figura 5 – Esquema representativo da preparação do inóculo	41
Figura 6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM. Esquema do ensaio de Microdiluição	43
Figura 7 – Representação do ensaio para a obtenção da Concentração Fungicida Mínima-CFM.	43
Figura 8 – Esquema representativo do ensaio de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> aos antifúngicos	44
Figura 9 – Representação da leitura e interpretação do estudo de associação de β - citronelol com os antifúngicos	45
Figura 10 – Perfil de sensibilidade a <i>C. a</i> LM – 125 expressos aos antifúngicos: Anfotericina B (AB) 10 mm (resistente); Cetoconazol (KET) 21mm (sensível); Clotrimazol (CTR) 21mm (sensível); Fluconazol (FLU) 0 mm (resistente); Itraconazol (ICZ) 0 mm (resistente); Miconazol (MCZ) 10 mm (resistente) e Nistatina (NY) 10 mm (resistente).	53
Figura 11 – Perfil resultante da associação de β - citronelol sobre antifúngicos para <i>C. a</i> LM – 38. As zonas de inibição expressas em mm permitem identificar a presença ou ausência de atividade modificadora para cada antifúngico. Anfotericina B (AB) 10 mm (indiferente); Cetoconazol (KET) 35 mm (sinergismo); Clotrimazol (CTR) 30 mm (sinergismo); Fluconazol (FLU) 26 mm (sinergismo); Itraconazol (ICZ) 20 mm (sinergismo); Miconazol (MCZ) 26 mm (sinergismo) e Nistatina (NY) 20 mm (antagonismo). Disco em blank (Controle) ausência de zona de inibição.	56
Figura 12 – Núcleo reconhecido <i>in silico</i> como provedor de elevado risco mutagênico e tumorigênico do itraconazol	67
Figura 13 – Núcleo <i>in silico</i> de β - citronelol, provedor de severos danos ao sistema reprodutor.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> ao fluconazol e, em combinação com β - citrionelol, avaliados pelos halos de inibição em mm.....	58
Gráfico 2 – Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> frente ao itraconazol e, em combinação ao β - citrionelol, avaliado pelos halos de inibição em mm.....	59
Gráfico 3 – Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> ao miconazol e, em combinação ao β - citrionelol, avaliado pelos halos de inibição em mm.....	60
Gráfico 4 – Potencial mutagênico do β - citrionelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.	66
Gráfico 5 – Potencial tumorigênico do β - citrionelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina	67
Gráfico 6 – Potencial irritante do β - citrionelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina	68
Gráfico 7 – Potencial de danos ao sistema reprodutor do β - citrionelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos fatores inerentes ao hospedeiro, que predispõem o surgimento de candidíases.....	25
Quadro 2 – Cepas fúngicas de <i>C. albicans</i> , relação entre o código de identificação e sua origem.....	41
Quadro 3 – Classificação dos antifúngicos em sensível e resistente segundo a classificação da zona de inibição formada-CECON.....	44
Quadro 4 – Atividades previstas do monoterpenoide no Pa > 70% representado através da ferramenta online.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de β - citrônio sobre cepas de <i>C. albicans</i> -técnica de microdiluição.....	50
Tabela 2 – Resultados da avaliação da CFM ($\mu\text{g/mL}$) de β - citrônio sobre cepas de <i>C. albicans</i>	51
Tabela 3 – Resultados do perfil de sensibilidade de <i>C. albicans</i> frente a antifúngicos licenciados (halos de inibição/mm)-difusão em ASD.....	53
Tabela 4 – Média dos resultados (em mm) do estudo de associação de β - citrônio com antifúngicos contra a cepas de <i>C. albicans</i> em meio sólido	56
Tabela 5 – Análise teórica das propriedades físico-químicas do β - citrônio envolvidas na biodisponibilidade oral da droga após a "regra de Cinco" Lipinski	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-Fluorocitosina
AB	Anfotericina B
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AIDS	Síndrome Imunodeficiência Adquirida
ALS	Agglutinin-Like Sequence
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CCLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CDR	Candida drug resistance
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
COX-2	Ciclooxigenase- 2
CSD	Caldo Saboraud Dextrose
CTR	Clotrimazol
Cu	Cobre
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fe	Ferro
FLU	Fluconazol
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HS 1/2	Hot spot 1/2
Hsps	Heat shock proteins
ICZ	Itraconazol

iNOS	Óxido Nítrico Induzível
KET	Cetoconazol
LM	Laboratório de Micologia
LPS	Lipossacarídeos
MCZ	Miconazol
MDR	Multidrug resistance
mL	mililitro
mm	milímetro
Mn	Manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-κB	Fator Nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
NY	Nistatina
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Secreted Aspartyl Proteinases
TSST1	Toxic Shock Syndrome Toxin 1
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICA.....	22
2.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO <i>Candida</i>	22
2.1.1 Candidíase	24
2.2 TERAPEUTICA ANTIFÚNGICA	27
2.3 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	29
2.4 TERAPIA COMBINADA.....	31
2.5 PESQUISA DE NOVAS DROGAS	32
2.6 ESTUDO DE TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DE COMPOSTOS NATURAIS, SUJEITO AO DIRECIONAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	34
2.7 β -CITRONELOL.....	34
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 METODOLOGIA	40
4.1 LOCAL DO TRABALHO	40
4.2 SUBSTANCIA	40
4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	40
4.3.1 Meios de cultura	40
4.3.2 Cepas fúngicas.....	40
4.3.3 Inóculo	41
4.3.4 Antifúngico.....	42
4.3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima-CIM.....	42
4.3.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima-CFM.....	43
4.3.7 Susceptibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> aos antifúngicos (discos) - Antifungigra.....	44
4.3.8 Estudo de associação de β - citranelol com anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.....	45
4.4 ENSAIOS IN SILICO	46
4.4.1 Passonline	46
4.4.2 Análise in silico dos parâmetros Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade - ADMET.....	46

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA - CIM E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA - CFM.....	49
5.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS CEPAS FÚNGICAS AOS ANTIFÚNGICOS (ANTIFUNGIGRAMA).....	52
5.3 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....	55
5.4 ANÁLISE IN SILICO DE β - CITRONELOL	62
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos, estruturalmente e metabolicamente semelhantes as células de mamíferos e mais complexo do que as bactérias (SUN et al., 2014), com capacidade em provocar infecções fúngicas.

Dos fungos considerados como patógenos humanos, os membros do gênero *Candida* são os mais frequentemente encontrados nas infecções (SILVA, et al., 2012). Particularmente, *C. albicans* é um dos principais fungos patogênicos de caráter oportunista, responsável por um amplo espectro de infecções que variam entre manifestações superficiais, a síndromes sistêmicas potencialmente fatais, especialmente em pacientes imunocomprometidos (LINARES et al., 2013).

A incidência das infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida* vem aumentando consideravelmente ao longo das décadas (SILVA et al., 2012) e com este, o constante fracasso em seu combate, que se refletem em altas taxas de morbidade e mortalidade visualizadas em todo mundo. O desafio à terapia contra candidíase se deve principalmente, ao arsenal relativamente pequeno de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções sistêmicas, como também a uma elevada toxicidade, além do crescente aumento de espécimes resistentes aos antifúngicos (KHAN et al., 2012; KIRAZ; YASEMIN, 2011).

Diante desse panorama, a descoberta de novos agentes antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos aos usuários torna-se essencial. Nesse contexto, os produtos naturais vegetais caracterizam-se em fortes aliados á descoberta de novos fármacos devido a sua (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010); diversidade química e propriedades bioativas, úteis para uma nova abordagem terapêutica.

Os monoterpênos, moléculas consideradas mais representativas dos óleos essenciais, apresentam um enorme potencial biológico e, vários de seus compostos possuem admirável ação antimicrobiana (QIU et al., 2010a; BAKKALLI, et al., 2008; ALI et al., 2005; FRIEDMAN et al., 2004) e interação benéfica com agentes antimicrobianos quando em combinação (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; ZORE et al., 2011).

Em meio a esses compostos, o β - citronelol monoterpênico, encontrado na composição de óleos essenciais de várias plantas aromáticas de emprego medicinal, tem revelado ser bioativo em muitas pesquisas e, com isso, leva a crer que ele apresente potencial

biológico contra ao agente patogênico mais prevalente no perfil de infecções fúngicas: *C.albicans*.

Dessa forma, o presente estudo teve por finalidade em avaliar o perfil biológico do β -citronelol, a fim de conduzir á descoberta de uma nova alternativa terapêutica destinada ao combate às infecções fúngicas humanas provocadas por leveduras do gênero *Candida*.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Candida*

Distribuídos largamente nos ecossistemas, *Candida* spp. classifica-se taxonomicamente no Reino *Fungi*; divisão Eumycota; subdivisão Deuteromycotina; classe Blastomycetes; família *Cryptococcacea* e gênero *Candida*, que é a principal levedura patogênica para a sp. humana, compreendendo cerca 200 espécies (SIDRIM; ROCHA, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Esses seres eucarióticos apresentam duas formas de reprodução: a fase assexuada ou anamorfa (predominante), a qual abrange a formação de blastoconídios (leveduras) pelo processo de brotamento parental e, a fase sexuada ou teleomorfa por esporos sexuais, os ascósporos, sendo este último processo não tão frequente (TORTORA; FUNKE; CASE; 2012).

Segundo López- Martínez (2010), as principais espécies de *Candida* de importância médica são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. lusitaniae*. Dentre todas essas espécies, *C. albicans* se destaca por ser a levedura com maior capacidade infectante oportunista nos seres humanos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Normalmente, esta pode residir na flora bucal, gastrointestinal e geniturinária do ser humano em estado comensal (KIM; SUBDERY, 2011). No entanto, numa disfunção da microbiota, sob o enfraquecimento imunológico do hospedeiro, expõe um caráter oportunista (BERMAN, 2012), provocando micoses superficiais e sistêmicas.

A capacidade de *C. albicans* em infectar os seres humanos é apoiada por uma ampla gama de fatores de virulência (Figura 1). Esses fatores são determinados geneticamente e somente expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições (TAMURA et al., 2007).

A habilidade em apresentar plasticidade morfológica esta diretamente relacionada a sua patogenicidade. A forma de crescimento leveduriforme, apresenta menor capacidade infectante quando comparada com as formas pseudo-hifas e ou hifas verdadeiras, que demonstram ser mais invasivas, resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e relacionadas ao agravamento de estados patológicos (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004;

BARDEBO; SGARBI, 2010; MAYER et al., 2013). Embora não tão comum e com poucas evidências, o fenômeno de *switching*, que corresponde, a transição celular do crescimento de leveduras a células alongadas e opacas, tem sido proposto como um dos fatores envolvidos na virulência de *C. albicans*; além disso, encontra-se na literatura que esta variação fenotípica pode influenciar na formação de biofilme, contribuindo assim, para o agravamento da doença (BARDEBO; SGARBI, 2010; MAYER et al., 2013).

A capacidade de adesão das leveduras a células do hospedeiro e ou a superfícies inanimadas, especialmente mediadas por proteínas adesinas como a família ALS (Sequência Semelhante à Aglutinina); subsequente ao processo de invasão, por invasinas como ALs3 (que também é uma adesina) e Ssa1 (membro da família da proteína de choque 70 - Hsp 70), vistas na endocitose induzida e, o envolvimento de outros mecanismos moleculares ainda indefinidos na invasão ativa, também participam no processo de virulência (MAYER et al., 2013; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases e proteinases aumentam a eficiência na aquisição de nutrientes extracelular, mas sobretudo, facilitam a disseminação da doença, ao provocar danos celulares. As proteinases são codificadas pela família de genes SAP (Proteases Aspartil Secretadas) atuando na degradação de estruturas proteicas encontradas na superfície de mucosas (ex. peptídeos e queratina) e itens do sistema imunológico (ex. imunoglobulina, citocinas) do hospedeiro. Enquanto que as fosfolipases são responsáveis pelas agressões à membrana das células, ao promover a hidrólise dos fosfolipídios de membrana (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Também tem sido proposto por Brand e colaboradores (2008), que o comportamento de crescimento via tigmotropismo de hifas, pode participar como um facilitador no processo de patogênese, ao identificar e penetrarem em locais infectáveis no hospedeiro.

Além disso, a capacidade de *Candida* em formar biofilme, uma estrutura tridimensional complexa multicelular de leveduras, pseudo-hifas e hifas envolvidas por uma matriz extracelular sob superfícies biológicas e abiológicas, caracteriza-se não só por ser fenotipicamente distinto de células planctônicas, mais também por acentuarem resistência a defesas imunológicas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (VANDENBOSCH et al., 2010; SILVA, S et al., 2010).

Para tanto, outros fatores tais como, o poder de modulação do meio e defesa, em propósito de sobrevivência, contribuem com a sua patogenicidade. O processo de modulação envolve, alterações de pH, captação de aminoácido e traços de metais, e ainda o sequestro de

compostos de carbono (C) e nitrogênio (N). Já a defesa, caracteriza-se na produção de proteínas de choque (Hsps) em condições de estresse (MAYER et al., 2013).

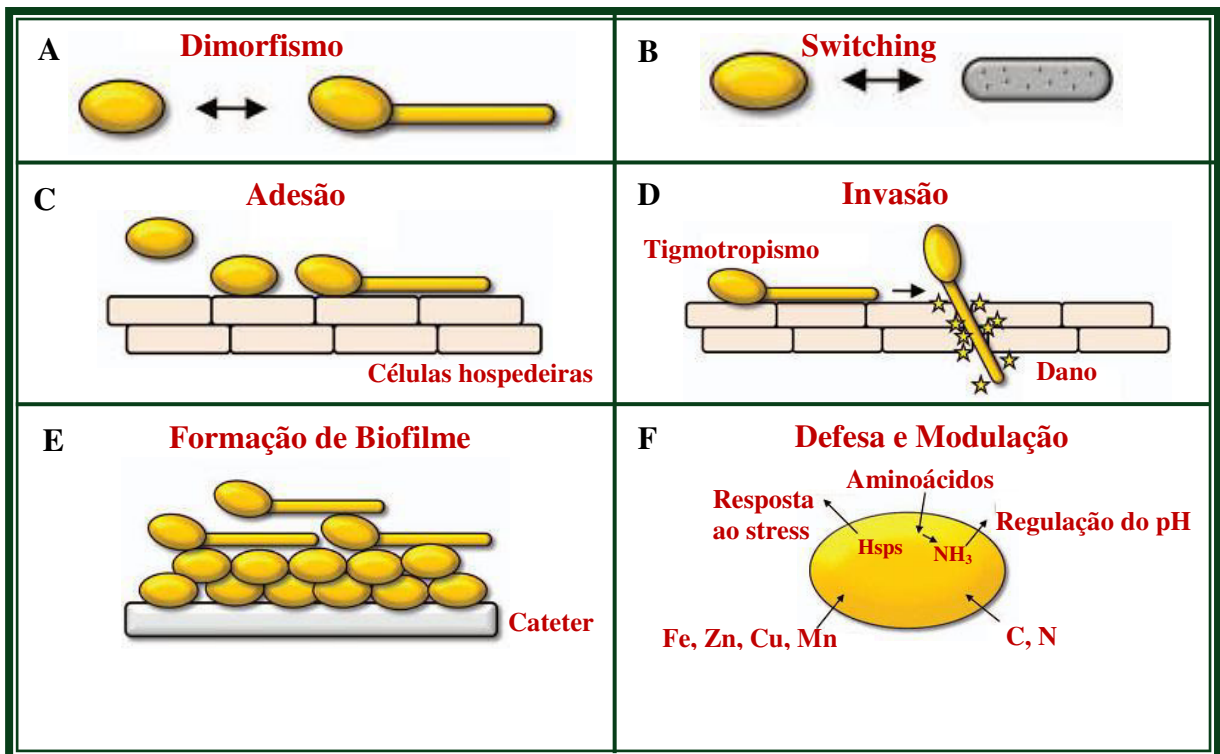


Figura 1- Mecanismos de virulência e atributos fitness de *C. albicans*. **A:** Formas virulentas envolvidas no processo infeccioso; **B:** Processo Switching com o desenvolvimento de forma opaca; **C:** Adesão das formas dimórficas de *C. albicans*. ao tecido; **D:** Invasão tecidual via tigmotropismo; **E:** Formação de Biofilme numa estrutura abiológica; **F:** Atividade defensiva e moduladora de *C. albicans*. Fonte: Adaptado de MAYER; WILSON; RUBE, 2013.

2.1.1 Candidíase

A candidíase ou candidose trata-se de um processo infeccioso micótico oportunista provocado por leveduras do gênero *Candida* (BARBEDO; SGARBI, 2010). A micose é classificada clinicamente em: superficial ou de mucosa, profunda ou sistêmica, (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010), apresentando manifestações clínicas variáveis segundo o sítio anatômico de instalação.

Inúmeros fatores predisponentes estão associados a esses quadros infecciosos, não somente depende dos mecanismos de virulência, mas as atribuições intrínsecas e extrínsecas

dirigidas ao hospedeiro (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013); conforme ilustrado no quadro 1.

FATORES INTRÍNSECOS	
Fisiológicos	Velhice, gravidez e prematuridade
Patológicos	Neoplasias, leucemias, hemopatias diversas, lúpus eritematoso disseminado, diabetes e outras endocrinopatias, tuberculose, AIDS, sarcoidose.
FATORES EXTRÍNSECOS	
Intervenções	Transplantes, uso de sondas, cateteres, aparelhos de respiração artificial alimentação parenteral, hemodiálise
Agentes físicos	Traumatismos, queimaduras e irradiações
Medicamentos	Terapêutica antimicrobiana prolongada, imunossupressores, quimioterapia, radioterapia, uso de pilulas anticoncepcionais, corticosteroides, drogas citotóxicas

Quadro1- Descrição dos fatores inerentes ao hospedeiro, que predisõem o surgimento de candidíases. Fonte: Adaptado de www.icb.ufmg.br/mic.

A levedura *C. albicans* está envolvida em dois tipos principais de infecções em humanos: candidíase superficial tipo oral ou vaginal e infecções sistêmicas com elevado risco de mortalidade (MAYER et al., 2013). No entanto, Cambuin e colaboradores (2011), ressaltam que esta espécie também está frequentemente associada aos casos de infecções em anexos a pele como as unhas.

A onicomicose é o termo atribuído à infecção no aparelho ungueal causada por agentes fúngicos como leveduras do gênero *Candida*, dermatófitos ou fungos filamentosos não dermatófitos. Esta infecção afeta tanto a população imunocompetente como a população de

imunossuprimidos e se apresenta sob diferentes formas clínicas que variam segundo a área de colonização, extensão e coloração das lesões que, são mais expressivas e intensas, quando desenvolvidas em indivíduos imunodeficientes (MARTINS et al., 2007; CAMBUIM et al., 2011).

A candidíase oral, afeta cerca de 90% dos pacientes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida HIV/ AIDS (OWOTADE; PATEL, 2014) e, atua como marcador, indicando a progressão da doença e aumento da imunossupressão (ALMEIDA et al., 2012, VIEIRA et al., 2012); apresenta-se clinicamente como aguda e crônica, com ou sem a presença de lesões associadas a outras patologias (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013); além disso, pode causar hiperplasia epitelial e gerar uma leucoplasia bucal (VIEIRA et al., 2012).

Dentre os quadros infecciosos que afetam o órgão sexual feminino, a candidíase vulvovaginal é a segunda mais frequente e, as lesões geradas, podem se estender e afetar as áreas perianal e inguinal (SILVA et al., 2014). Acredita-se que pelo menos 75% das mulheres em todo o mundo já apresentou um episódio de candidíase vulvovaginal e a probabilidade de uma recorrência é em torno de 5%, envolvendo mulheres imunocompetentes (SOBEL, 1998; ACHKAR; FRIES, 2010). *C. albicans* estar presente em 85 a 90% dos casos, quando comparados a outras espécies do gênero envolvidas: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilopsis* (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

O perfil de infecções fúngicas sistêmicas tem apresentado um aumento na incidência de forma significativa nas últimas décadas (NEGRI et al., 2012). A candidemia é a manifestação mais comum de infecção disseminada por *Candida* (PEIXOTO et al., 2014), sendo responsável por 80% dos casos em todo mundo. Em território brasileiro, 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 a apresentada por vários países do Hemisfério Norte, como França, Estados Unidos, Noruega, Hungria e Suíça (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013).

O principal mecanismo de transmissão da candidemia dá-se por meio endógeno, em que *Candida* spp. constituintes da microbiota de vários sítios anatômicos alteram seu caráter comensal para patógenos oportunistas em consequência a condições da debilidade do hospedeiro. No entanto, outra via de transmissão pode ser descrita. A via exógena ocorre em meio hospitalar, nas ações de cuidado ao paciente através das mãos de profissionais de saúde e durante o manuseio de materiais médico- hospitalares contaminados por fungos (PEIXOTO et al., 2014).

2.2 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA

Várias drogas antimicrobianas podem ser utilizadas ao tratamento das infecções causadas por fungos, porém, essa “diversidade” torna-se relativamente pequena, quando em comparação ao arsenal de drogas disponíveis no tratamento de infecções bacterianas.

Os agentes antifúngicos disponíveis a comercialização são distribuídos em classes conforme o seu alvo de atuação na célula fúngica (MURRAY et al., 2014). São eles, os polienos, inibidores da biossíntese do ergosterol (azólicos e alilaminas); antimetabólicos (flucitosina) e equinocadinas (Figura 2).

Os polienos como nistatina, anfotericina B e suas formulações lipofílicas, são reconhecidos principalmente por atuarem de forma intensa na membrana celular fúngica, afetando diretamente o ergosterol. Esta união provoca a formação de canais, induzindo assim, a perda de íons e moléculas e conseqüentemente ruptura e morte celular; além disso, são descritos outros efeitos tais como, atuação sobre a via de oxidação intracelular e efeitos imunomoduladores (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

Contemplando a maior classe de antifúngicos sintéticos, as drogas azólicas são constituídas por duas famílias que diferem no número de átomos de nitrogênio no seu anel azol: os imidazólicos (dois átomos de nitrogênio) como o miconazol, cetoconazol e clotrimazol e econazol; e os triazólicos (três átomos de nitrogênio), como fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol (MURRAY et al., 2014). De uma forma geral, esta classe impede a síntese do ergosterol (principal componente da membrana dos fungos que confere controle na permeabilidade celular), por inibir a enzima C-14- α -desmetilase, o que causa acúmulo de lanosterol (intermediário) e 14- α -metilesteróis (produto tóxico as células fúngicas), levando a inibição do crescimento fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

Com atividade semelhante aos azólicos, as alilaminas (terbinafina e naftifina) bloqueiam a síntese do ergosterol via esqualeno, causando acúmulo de esqualeno e redução na formação de ergosterol (MURRAY et al., 2014).

Pertencente à classe das pirimidinas, a flucitosina (5-fluorocitosina, 5-FC), é o único antifúngico, antimetabólico, que sua ação se dá pela conversão intracelular de 5-fluorocitosina a 5-fluoracil (5-FU) em ácido 5-fluorídico que compete com uracil na síntese de RNA, gerando assim, RNA defeituoso e bloqueio da síntese proteica (MURRAY et al., 2014).

As equinocandinas, atualmente são representadas por micafungina, caspofungina e anidulafungina e agem na parede celular inibindo a enzima β - (1,3) - D-glucano sintase, comprometendo a estabilidade dessa estrutura e, por conseguinte á morte do fungo (PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; CORTÉS; RUSSI, 2011).

A escolha da terapêutica contra candidíases é dependente de vários fatores interligados, como, o local e a agressividade da infecção, a susceptibilidade do antifúngico, o estado clínico do paciente e a espécie de *Candida* envolvida.

No que diz respeito, ao tratamento de onimicoses causadas por *Candida* spp., a terapia medicamentosa envolve a utilização de antifúngicos de aplicação tópica, como clotrimazol e nistatina; drogas de ação sistêmica, como terbinafina, itraconazol ou fluconazol e, a depender do caso considera-se possível combinação das terapias (PEIXOTO et al., 2014; DIAS et al., 2013).

Para candidíase bucal, a nistatina na forma de suspensão é considerada a droga de primeira escolha, devido sua eficácia e reduzidos efeitos colaterais para efeito local. Também podem ser considerados, clotrimazol, miconazol e anfotericina B para um efeito tópico e fluconazol, itraconazol e cetoconazol para uma ação sistêmica (WILLIANS et al., 2011; CORRALOA; HERAS-ALONSOA; ACEBESB, 2014).

A candidíase vulvovaginal são indicados dose única dos antifúngicos fluconazol ou itraconazol por via oral, enquanto para efeito local são empregados miconazol ou clotrimazol (SCHEINFELD, 2015).

Já para a candidemia, a terapêutica é realizada com antifúngicos de ação sistêmica como fluconazol, anfotericina B, voriconazol e equinocandinas (PEREIRA; PAIVA, 2010). Dentre esses, os triazólicos são considerados os antifúngicos mais indicados no tratamento da candidíase sistêmica, em razão, da baixa toxicidade quando comparado com a anfotericina B e o menor custo em relação as equinocandinas. No entanto, quando se considera a presença de fatores de risco ao paciente, a espécie de *Candida* e a sua susceptibilidade aos azólicos; as equinocandinas, anfotericina B e ou suas formulações lipofílica são indicadas (PEREIRA; PAIVA, 2010).

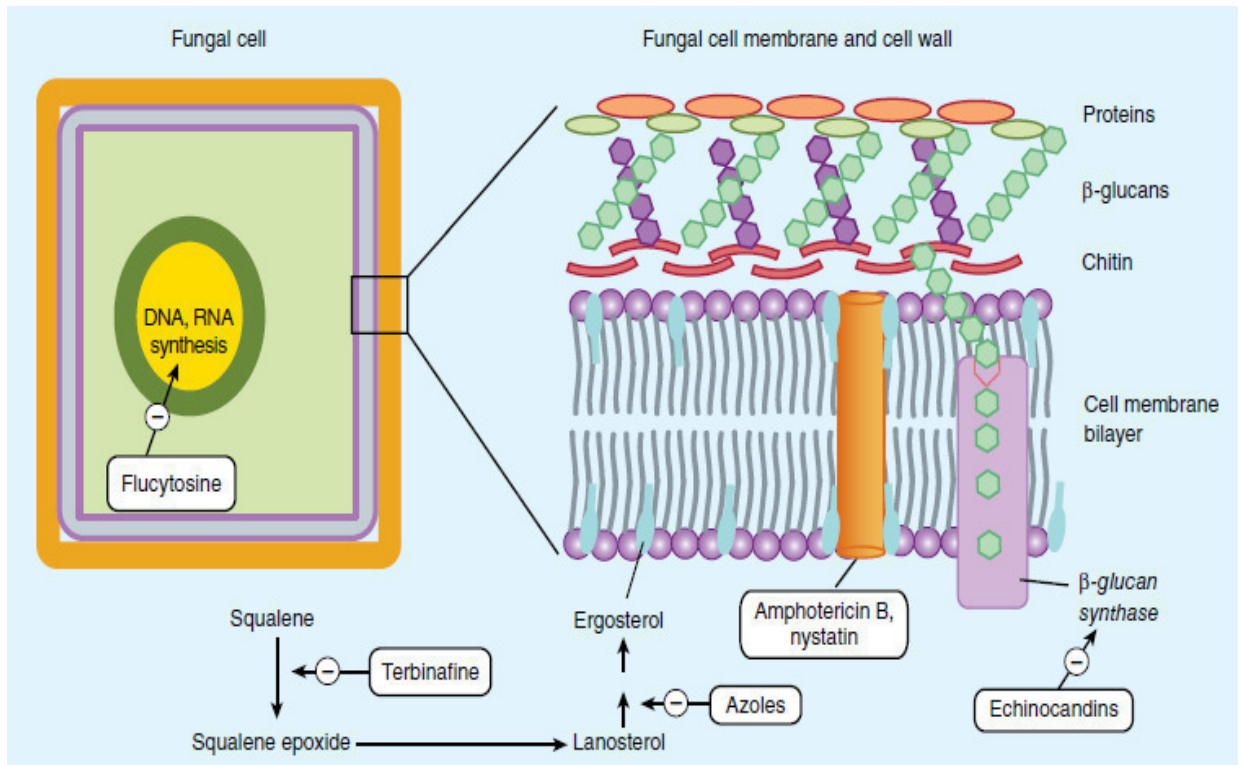


Figura 2 - Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação. A flucitosina bloqueia a síntese de DNA no fungo. As alilaminas assim como os azólicos, inibem a síntese do ergosterol. As alilaminas atuam via esqualeno bloqueando esqualeno epoxidase e, os azólicos agem por bloquear a enzima C-14- α -desmetilase, impossibilitando a conversão de lanosterol a ergosterol. Os polienos ligam-se diretamente ao ergosterol na membrana fúngica, induzindo a formação de canais, perda de íons e demais moléculas, provocando ruptura da integridade da membrana e morte da célula fúngica. As equinocandinas inibem a síntese de parede celular por bloqueio da enzima β - (1,3) - D-glucano sintase. Fonte: KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012.

2.3 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

O “fenômeno” resistência, aos agentes antifúngicos é primário ou secundário e está relacionada a características intrínsecas ou adquiridas do fungo patogênico, a que interferem na obtenção de sucesso terapêutico.

De uma forma geral, diversos mecanismos bioquímicos contribuem para o desenvolvimento do fenótipo de resistência a drogas nos fungos (Figura 3). Alterações no alvo molecular do fármaco, superexpressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, “sobre expressão” da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas degradantes do fármaco, fazem parte desse perfil (GHANNOUM; RICE, 1999; SANGLARD; ODDS, 2002).

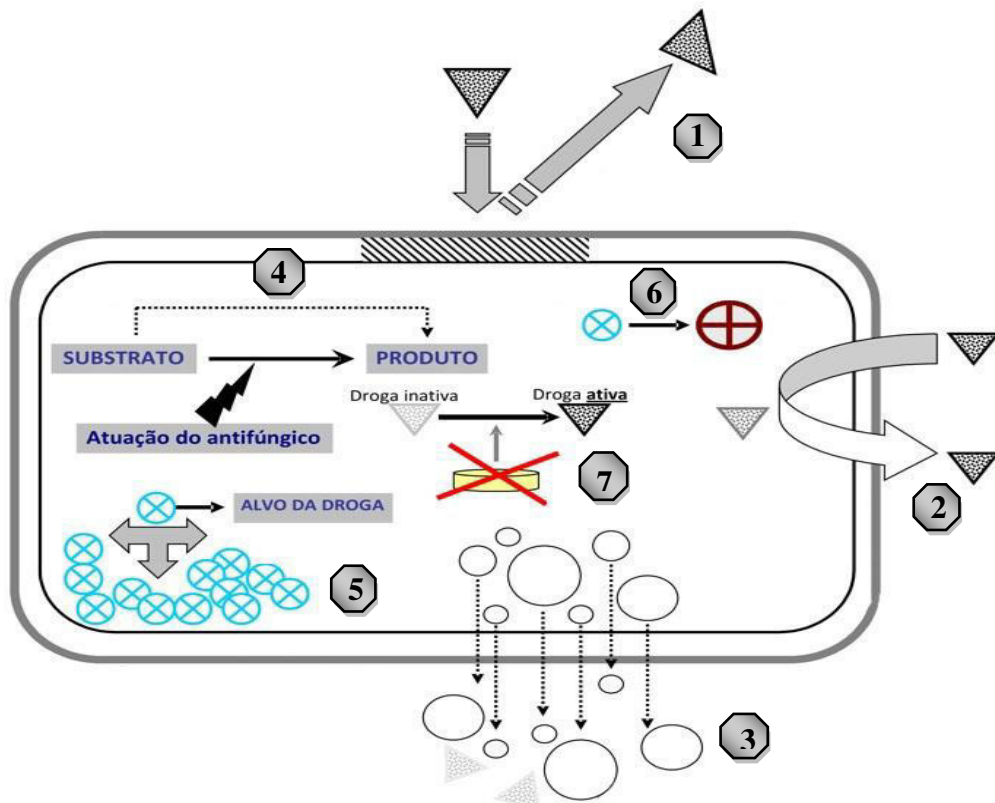


Figura 3- Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos. **1**-Bloqueio da entrada do antifúngico; **2**- Bombeamento da droga para o meio extracelular; **3**-Produção e ação de enzimas que degradam o fármaco inativando-o; **4**-Via metabólica alternativa que“burla”a via do qual o antifúngico apresentaria atividade; **5**- Superprodução do alvo do antifúngico; **6**-Alteração do alvo;**7**- Inativação de enzimas necessárias para obtenção da forma ativa da droga. Fonte: adaptado de LOURENÇO, 2015.

No entanto, especificamente para os azólicos são descritos três mecanismos de resistência por as espécies de *Candida*. O primeiro trata-se da indução de bombas de efluxo pelos genes CDR (*Candida* Resistente a Drogas) e MDR(Resistência a Multidrogas), levando a redução da concentração de azólicos intracelular necessária para produzir efeito suficiente satisfatório; outro mecanismo de resistência consiste em mutações em genes ERG11, responsável pela codificação de enzima alvo C-14- α -desmetilase. Mutações nesse gene, induzem a alterações ou sobre-regulação sobre esta enzima, impedindo a ligação dos azólicos ao sítio enzimático. O terceiro mecanismo envolve o desvio de via do ergosterol por mutações em ERG3. A não formação de 14- α -metil-3,6-diol (produto tóxico) e sim a substituição por 14- α -methilfecosterol, promove a anulação dos efeitos perturbadores causados na membrana pelos os azólicos (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

Com relação aos polienos, nistatina e anfotericina B pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência. Acredita-se que em *Candida* spp., a resistência a anfotericina B está relacionada também a mutações no gene ERG3 (ESPINEL-INGROFF, 2008); assim como, na presença de possíveis alterações em outros genes reguladores de enzimas formadoras do ergosterol (ERG1, ERG25) e beta-1,6-glucano (SKN1, e KRE1) em *C. albicans* formadora de biofilmes (KHOT et al., 2006).

Os mecanismos de resistência a flucitosina envolvem mudança na enzima citosina permease (codificada pelo gene FCY2), responsável pela internalização da droga na célula fúngica; ou alterações na enzima citosina desaminase (codificada pelo gene FCY1), responsável pela conversão de flucitosina a 5 - fluorouracil; ou mudanças na enzima uracila fosforibosil transferase, que é responsável pela transformação de 5-fluorouracil em monofosfato de 5-fluorouridina (codificada pelo gene FUR1), que impossibilita o comprometimento a nível de RNA e síntese proteica da célula fúngica (ESPINEL-INGROFF, 2008). O que vem sendo observado é que especificamente a maioria destes mecanismos é direcionado a *C. albicans*, porém resistência em *C. glabrata*, também vem sendo evidenciada, por mutações em outros genes (WHITE, 2007; PFALLER, 2012).

A resistência as equinocandinas ainda é rara. A diminuição de susceptibilidade *in vitro* a caspofungina, anidulafungina, e micafungina pela CIM elevada para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. glabrata* foram evidenciados (MAZUELOS; RODRIGUEZ-TUDELO, 2008; PFALLER, 2012); No entanto, são descritas que mutações pontuais em duas regiões “*hot-spot*” (HS1 e HS2) do gene FKS1 (codificador do complexo β -1,3-D-glucano sintase) e em menor proporção em FKS2 que estão associadas ao mecanismo de resistência a esses antifúngicos (PARK et al, 2005; PERLIN, 2007; PFALLER, 2012).

2.4 TERAPIA COMBINADA

A terapia combinada de antifúngicos é um atrativo recurso aplicado frente às limitações da monoterapia as infecções fúngicas. Esta estratégia busca sempre em poder ampliar o espectro de eficácia terapêutica, minimizando o desenvolvimento e evolução de resistência, redução de dose o que refletirá efetivamente em menor toxicidade, maior segurança, tolerabilidade e melhorias a taxas de cura ao paciente (MUKHERJEE et al., 2005; HA et al., 2011).

Na literatura encontram-se dispostos vários estudos com associação de drogas antifúngicas a produtos naturais. São revelados, por exemplo, que a combinação ente óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* a itraconazol, produziu sinergismo sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. stellatoidea*. Para o cetoconazol, esse óleo essencial também revelou um caráter sinérgico sobre *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea* e somente antagônico para *C. albicans* (OLIVEIRA, et al., 2007).

O óleo essencial de *Myrtus commumis*, quando em associado com anfotericina B, mostrou em sinergismo a cepas fúngicas de *C. albicans* e *Aspergillus niger* (MAHBOUBI; BIDGOLI, 2010).

No trabalho de Guo e colaboradores (2010) envolvendo alicina principal componente biologicamente ativo do extrato de alho fresco esmagado, fluconazol e cepas de *C. albicans* com perfil de resistência e sensibilidade a fluconazol, mostraram que a combinação resultante de alicina e fluconazol mostraram em um ótimo efeito sinérgico a 23 das 26 cepas de *C. albicans* ensaiadas.

Nobrega e Oliveira (2012) revelou que a combinação de carvacrol com anfotericina B e cetoconazol produziu sinergismo para cepas de *C. guilliermondi* e com fluconazol para *C. parapsilosis*.

2.5-PESQUISA DE NOVAS DROGAS ANTIMICROBIANAS

Desde a antiguidade, a busca de drogas eficazes a erradicação de doenças, é paralelo ao desenvolvimento do homem.

Em meados século XX, as indústrias fármaco-químicas visavam solucionar por meio do desenvolvimento de drogas sintéticas, todas as moléstias que acometem os seres vivos, bem como, proporcionar a sua prevenção, mas esse anseio não foi totalmente alcançado com sucesso, já que não obtiveram todas as substâncias sintéticas necessárias para cura e prevenção de todas as enfermidades (SMITHY, 1998).

Nesse contexto, uma enorme gama de antimicrobianos que agem sobre diferentes micro-organismos patogênicos foram desenvolvidos (LÔBO et al., 2010); porém, devido o uso indiscriminado e excessivo desses agentes, tem levado ao surgimento de formas patogênicos com perfil de multirresistência (OLIVEIRA et al., 2010).

Explorando a capacidade dos produtos naturais, inúmeros estudos desenvolvidos, vêm apresentando resultados positivos contra essa realidade. Em exemplo, ensaios *in vitro* envolvendo extratos de *L. camara* e *L. montevidensis*, apresentaram um grande potencial modulador de resistência de aminoglicosídeos quando em associação, além de mostrar atividade inibitória a bactérias “padrão” e multirresistentes gram-positivas e gram-negativas testadas (SOUSA et al., 2011).

Os estudos com decoctos de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), *Punica granatum* Linn (romã) e *Cinnamomum zeylanicum* Breym (canela) obtidos de feiras livres, frente a diferentes tipos de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*), apresentaram atividade antifúngica de forma diversa para as cepas ensaiadas (ABÍLIO et al., 2014).

O extrato hidroalcoólico e o óleo essencial das folhas *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta), mostraram resultados satisfatórios contra *Candida* spp., porém o seu óleo apresentou maior potencial farmacológico ao promover melhor atividade antifúngica (BATISTA et al., 2013).

Não somente, ensaios com decoctos, extratos e óleos essenciais têm revelado bons resultados voltados para o estudo da atividade antimicrobiana, também ensaios com fitoconstituintes também vem se mostrando promissores nas pesquisas. O flavonoide 5.7.4'-trimetoxiflavona isolado da fase clorofórmica de *Praxelis clematidea*, mostrou ser sensível para todas as cepas bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 13150, *Pseudomonas aeruginosa* P 03, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* 5) com uma CIM de 128µg/mL (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013).

A diidroqueleritrina um alcaloide isolado do extrato metanólico de *Zanthoxylum stelligerum*, apresentou uma ampla atividade contra cepas padrão e isolados clínicos de bactérias e fungos no ensaio de difusão em disco (SILVA, C et al., 2010).

Em outros estudos, o carvacrol e timol (fitoconstituintes de muitos óleos essenciais) mostraram um forte efeito fungicida contra todos os isolados de *Candida*. Segundo o autor esta atuação pode ter como origem a inibição da biossíntese do ergosterol e a ruptura da integridade da membrana (AHMAD et al., 2010a).

Em acordo ao que foi evidenciado, pesquisas a partir compostos naturais, que revelem propriedades antimicrobianas pode ser a solução, juntamente ao auxílio de ferramentas científicas, tecnológicas o que inclui as computacionais e recursos humanos, para obtenção de novos fármacos naturais, semissintéticos ou sintéticos, de uso seguro e eficaz (GUILHERMANO et al., 2010; MENDES et al., 2011).

2.6 ESTUDO DE TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DE COMPOSTOS NATURAIS, SUJEITO AO DIRECIONAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Os produtos naturais cada vez mais vêm recuperando espaço e importância nas indústrias farmacêuticas ao serem fortes aliados ao desenvolvimento de novas drogas. No entanto, o planejamento de novos fármacos é um processo árduo, que requer tempo e investimento aplicado a pesquisa e o desenvolvimento. Calcula-se que para obter uma nova droga segura e eficaz ao consumo humano, seja necessário entre 15- 25 anos, com um gasto de 1,4 a 800 bilhões de dólares (GELDENHUYS et al., 2006). Uma das razões participativas na delonga a esse processo trata-se do insucesso apresentado em 50% do desenvolvimento de um novo fármaco em decorrência do perfil farmacocinético e toxicológico inapropriado.

Assim, promover a determinação dos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) para moléculas em estudo, são importantes, para definir quanto a sua biodisponibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da molécula, o que contribui na redução de tempo e custo no processo de investigação e desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al, 2004).

Neste contexto, estudos com modelos *in silico*, assistidas por computador, vem se destacando, uma vez, que estão sendo direcionada a avaliação de toxicidade de moléculas no meio metabólico de mamíferos, onde sua utilização é admitida por se encontrar num ambiente regulatório e estimulada pela legislação recente (MARCHANT, 2012; ANVISA, 2014).

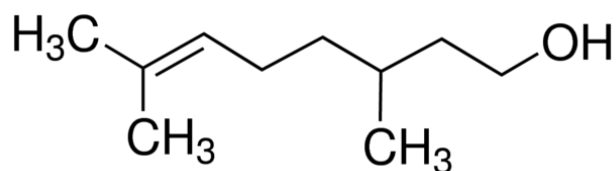
2.7 TERPENOS

Os óleos essenciais, um complexo aromático que contém uma mistura de diversas moléculas orgânicas, oriundos do metabolismo secundário das plantas; já revelaram e continuam a revelar em todo o mundo inúmeras propriedades biológicas exercidas sobre animais, plantas e seres humanos (BASER; BUCHBAUER, 2010); sendo este perfil, um reflexo a sua rica composição química, que varia entre dois grupos de estruturas de baixo peso molecular: os terpenos e terpenoides (grupo I) e compostos aromáticos alifáticos (grupo II) (BAKKALLI et al., 2008) . Os terpenos se enquadram como o grupo mais importante na composição dos óleos essenciais. Biossinteticamente são derivados de condensação de unidade de isopreno C₅ a partir da via do ácido mevalônico. Os terpenos são classificados segundo a quantidade de

unidades isoprênicas existente no seu esqueleto de carbono. Os terpenos mais frequentemente encontrados são monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀). No entanto, a partir do momento, em que esses contêm compostos de oxigênio na molécula, tais como grupos de hidroxilo, carbonila, cetona e aldeído, resultam em compostos denominados como terpenóides (BAKKALLI et al., 2008).

Várias propriedades farmacológicas sobre terpenoides encontram-se dispostos na literatura, com destaque para os monoterpenoides. Pesquisas com citral e uma derivação sua, o citral-epoxi, apresentaram uma boa atividade antimicrobiana, mostrando ser mais eficaz contra cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) do que os antibióticos ácido nalidíxico, ampicilina e nitrofurantoina (SADDIQ; KHAYYAT, 2010). O timol oriundo do óleo de *Lippia gracilis* Schauer, revelou atividade anti-inflamatória e cicatrizante em roedores (RIELLA et al., 2012). Em outro estudo, as concentrações subinibitórias de eugenol foram capazes de reduzir a produção de exotoxinas SEA e SEB, TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) e α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA), bem como de sua forma sensível (MSSA), detectados por avaliação das expressões transcricionais e níveis fenotípicos (QIU et al., 2010b).

Enfatizando a enorme bioatividade apresentada pelos os monoterpenoides, o β -citronelol/ citronelol, o 3,7-dimetil-6-octeno-1-ol (Figura 4), encontrado nos óleos de plantas aromáticas, empregadas na medicina popular como as espécies de *Cymbopogon citratus* (campim-santo), *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon winterianos* (conhecidas como citronela) (KPOVIESSI et al., 2014; ANDRADE et al., 2012); *Eucalyptos citriodora* (eucalipto) (OLIVERO-VERBEL; NERIO; STASHENKO, 2010) e *Lippia alba* (erva-cidreira-de-busto) (TAVARES et al., 2005), vem mostrando ser um provedor de inúmeros efeitos farmacológicos.



β - citronelol

Figura 4 - β - citronelol, estrutura molecular.

Em exemplo, no estudo de uma possível ação anti-inflamatório, sobre o processo inflamatório induzido por Lipossacarídeos (LPS) em macrófagos RAW2647, o citronelol mostrou uma boa atividade anti-inflamatória, ao interferir numa série de fatores envolvidos no processo que leva a inflamação, como a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E₂ (PGE₂), bloqueio da atividade enzimático da Sintase de Óxido Nítrico induzível (iNOS), atenuação dos genes de cicloxigenase-2 (COX-2) e inibição da degradação e translocação de IκB/ Fator Nuclear κB p65 (NF-κB p65) respectivamente (SU et al., 2010).

Em outro estudo, β - citronelol, foi considerado uma molécula antiespasmódica e provedora de miorrelaxamento do músculo liso respiratório, ao ter capacidade em reduzir o acoplamento eletromecânico (VASCONCELOS, 2013).

Também são descritos, outras ações farmacológicas com resultados satisfatórios, o que inclui, atividade anticonvulsivante (SOUSA et al., 2006) e ação vasodilatadora (BASTOS et al., 2009).

Portanto, o β - citronelol, considerada molécula de valor comercial, configurada ao papel de ingrediente em perfumes, produtos de higiene, cosméticos e em alimentos como flavorizantes (BELSITO et al., 2008); somada ao perfil ativo do qual vem sendo relatado, permite vislumbrar o seu grande potencial ao desenvolvimento de um novo medicamento com possível propriedade antifúngica e que possa ser utilizado na terapêutica de infecção por leveduras do gênero *Candida*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica de β - citrionelol sobre cepas de *C. albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de β - citrionelol sobre as cepas *C. albicans*;
- Verificar a susceptibilidade das cepas de *C. albicans* aos antifúngicos licenciados: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina;
- Avaliar a atividade de associação de β - citrionelol aos azólicos (cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol e miconazol) e aos polienos (anfotericina B e nistatina);
- Investigar os parâmetros farmacológicos, toxicológicos e possíveis espectros de atividade do β - citrionelol *in silico*.

Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO TRABALHO

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 SUBSTÂNCIA

A substância (\pm) - β - citronelol 95% (SIGMA-ALDRICHT/USA) foi solubilizado em tween 80 a 0,02%, a dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 0,5% e completada com água destilada esterilizada (q.s.p. 5 mL), para obter uma emulsão na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ (NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de avaliação da atividade antifúngica foram Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (DIFCO LABORATORIES/ USA/FRANCE) e RPMI 1640-L-glutamina sem bicarbonato (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes. Anterior à utilização, os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.3.2 Cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (quadro 2). Estas pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em ASD, incubados a 35 \pm 2 °C.

Código de identificação das cepas de <i>C. albicans</i>	Origem (cepas padrão/ isolados clínicos)
ATCC - 76485	Coleção de Culturas Norte Americana
ATCC - 74645	Coleção de Culturas Norte Americana
.....LM - 178	Cavidade bucal
.....LM - 615	Unha
LM - 37	Unha
LM - 38	Cavidade bucal
.....LM - V42	Unha
LM - 52	Sangue
LM - 70	Unha
LM - 92	Sangue
LM - 86	Cavidade bucal
LM - 125	Unha

Quadro 2- Cepas fúngicas de *C. albicans*: relação entre o código de identificação e sua origem.

4.3.3 Inóculo

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas das cepas de *C. albicans* em ASD, foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril. Suspensões obtidas foram devidamente agitadas em aparelho vórtex e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, para primeiramente obter um inóculo de 10^6 UFC/mL e em seguida diluída em solução salina numa proporção de 1:10, para enfim resultar numa suspensão fúngica contendo 10^5 UFC/mL que foi utilizada nos ensaios (Figura 5) (KONEMAN et al., 2008; OSTROKY et al., 2008).

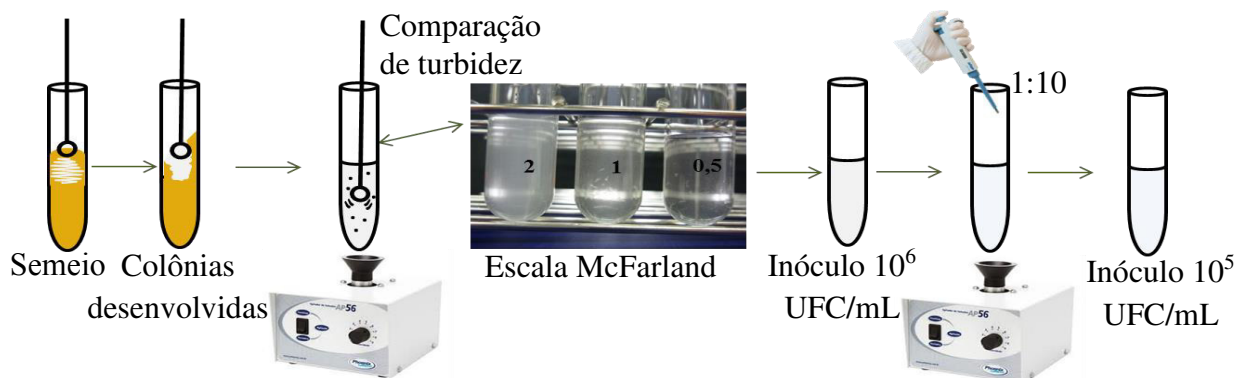


Figura 5- Esquema representativo da preparação do inóculo.

4.3.4 Antifúngicos

Os antifúngicos anfotericina B (AB), cetoconazol (KET), clotrimazol (CTR), fluconazol (FLU), itraconazol (ICZ), miconazol (MCZ), e nistatina (NY) (CECON/SÃO PAULO-SP) foram usados nos testes identificação do perfil de sensibilidade das cepas fúngicas (Antifungigrama) e no estudo de associação com β - citrionelol. Além disso, nistatina (SIGMA-ALDRICH®/SÃO PAULO-SP) foi utilizada nos ensaios de atividade biológica, servindo como controle droga padrão.

4.3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleeland; Squires (1991), Hadacek; Greger (2000) e NCCLS/CLSI (2002). A determinação da CIM de β -citrionelol, sobre cepas de *Candida* foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços (Figura 6). Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de CSD/RPMI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μ L da emulsão do produto teste duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024 μ g/mL até 4 μ g/mL. Por fim, foi adicionado 10 μ L dos inóculos de *C. albicans* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foram realizados controles de viabilidade das leveduras, com nistatina (100 UI) como controle droga padrão e CSD/RPMI com inóculo de leveduras. As placas preparadas e assepticamente fechadas foram submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do produto, capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando em comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas no ensaio realizado em duplicata.

A atividade antifúngica do β - citrionelol foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 μ g/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 μ g/mL= moderada atividade; > acima de 1500 μ g/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

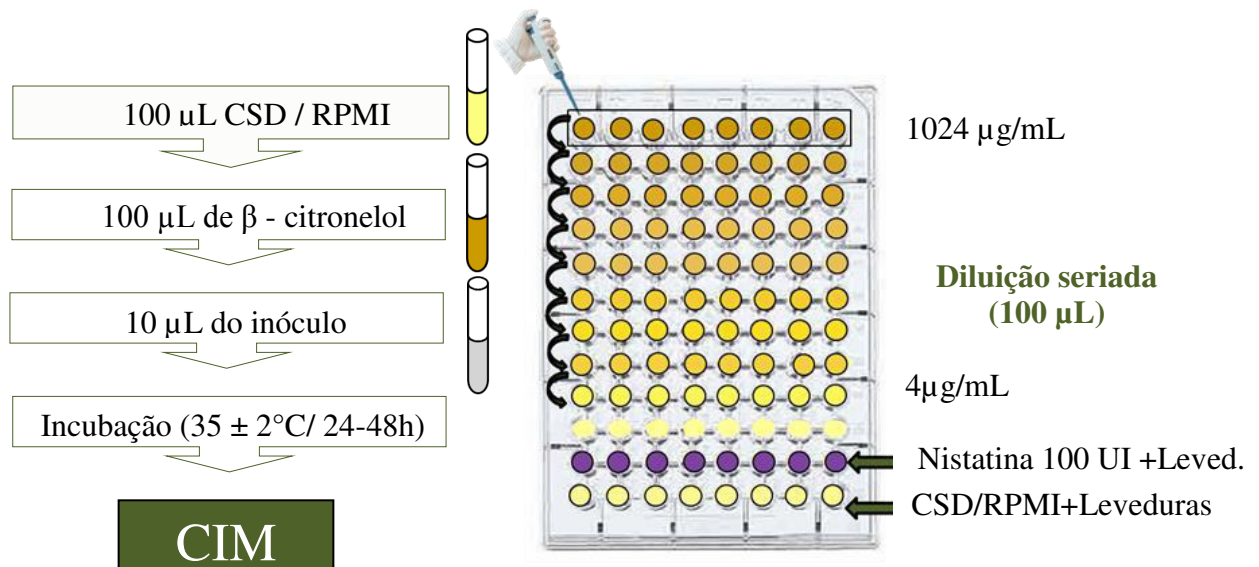


Figura 6- Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM. Esquema do ensaio de Microdiluição.

4.3.6 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 x 2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram semeadas em placas (90x15mm) contendo ASD e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas (Figura 7). A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento ou que o crescimento for inferior a 3 colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos dois ensaios (ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

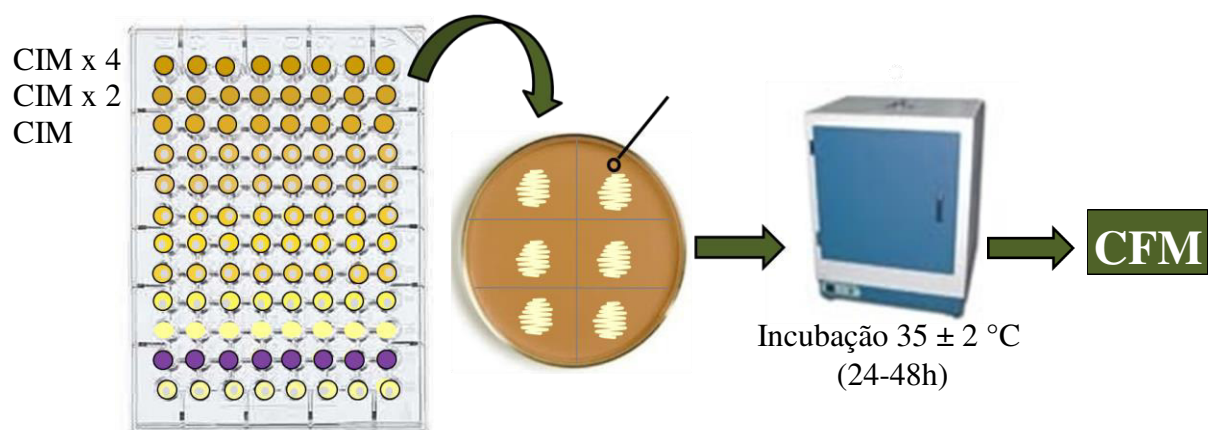


Figura 7- Representação do ensaio para a obtenção da Concentração Fungicida Mínima – CFM..

4.3.7 Susceptibilidade das cepas de *C. albicans* aos antifúngicos (discos) - Antifungigrama

O teste de susceptibilidade das cepas de *Candida albicans* aos antifúngicos foi realizado por difusão em disco (BARRY; THORNSBERRY, 1991), como mostra figura 8. Um volume de aproximadamente 1mL de cada suspensão fúngica foi devidamente semeado com alça bacteriológica descartável sobre a superfície sólida de ASD contidos em placas lisas estéreis (INLAB - 90x15mm). Discos de papel com diâmetro de 6,35 mm impregnados com o antifúngico, em concentrações específicas, foram aplicados sobre ASD. Em seguida, as placas foram incubadas a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24-48h. A leitura procedeu por avaliação do halo de inibição de crescimento do micro-organismo frente aos antifúngicos. Estes foram classificados como sensível e resistente, segundo as especificações recomendadas pelo fabricante, o Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP (quadro 3).

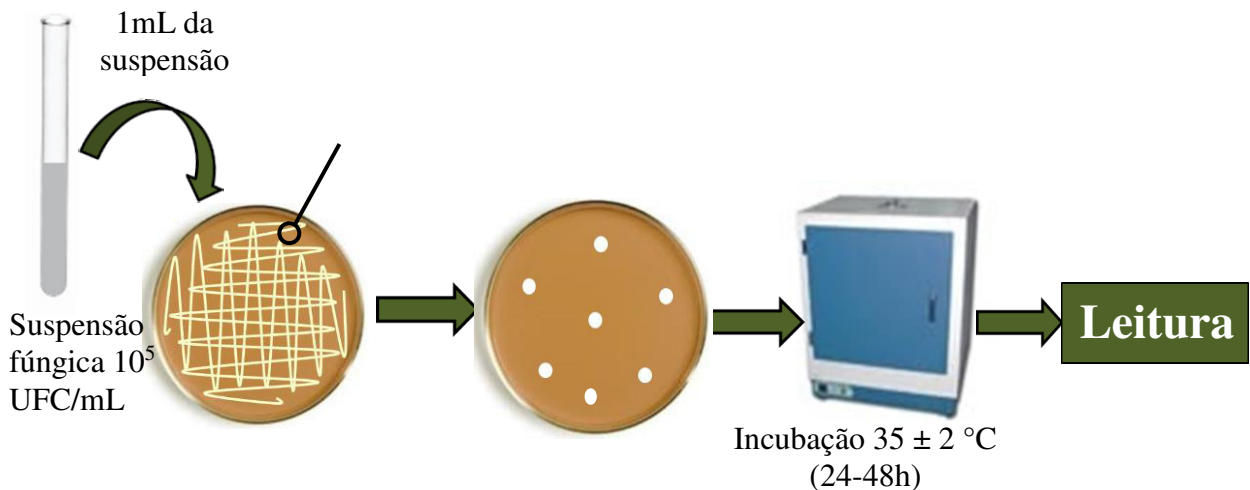


Figura 8- Esquema representativo do ensaio de susceptibilidade de *C. albicans* aos antifúngicos.

Antifúngicos	Classificação da zona de inibição
Anfotericina B 100 μg	> 10 sensível; ≤ 10 resistente
Cetoconazol 50 μg	> 20 sensível; ≤ 20 resistente
Clotrimazol 50 μg	>20 sensível; ≤ 20 resistente
Fluconazol 25 μg	≥ 19 sensível; < 19 resistente
Itraconazol 10 μg	≥ 20 sensível; < 20 resistente
Miconazol 50 μg	> 20 sensível; ≤ 20 resistente
Nistatina 100 UI	> 10 sensível; ≤ 10 resistente

Quadro 3 - Classificação dos antifúngicos em sensível e resistente segundo a classificação da zona de inibição formada-CECON.

4.3.8-Estudo da associação de β - citronelol com anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina

Para o estudo de associação de β - citronelol com os antifúngicos foi realizado por meio da técnica de difusão em disco em meio sólido utilizando discos de papel filtro (KONEMAN et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006). Em placas de petri foram adicionadas 18 a 20 mL de ASD. Em seguida, 1mL da suspensão de cada levedura foi devidamente inoculada e espelhada sobre o meio de cultura. Os discos antifúngicos foram embebidos com 10 μ L da CIM do produto teste e em seguida alocados em placas de Petri estéreis lisa contendo ASD. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 \pm 2 °C por 24-48h, seguido da realização de sua leitura. O efeito interferente da combinação β -citraonelol com os antifúngicos (Figura 9), foi avaliado conforme a metodologia descrita por Cleeland; Squires (1991) e Lima e colaboradores (2003):

- **Efeito sinérgico:** ocorre quando o halo de inibição ao crescimento microbiano, apresenta um diâmetro maior ou igual a 2mm, em comparação ao do antifúngico isolado;
- **Efeito antagônico:** considera-o quando a combinação fitoconstituente com o antifúngico resulta em um halo de inibição com um diâmetro menor do que o obtido pelo o antifúngico.
- **Efeito indiferente:** determina-o, quando a formação do halo de inibição resultante da combinação, obtém o mesmo diâmetro do antifúngico quando avaliado individualmente.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados foram obtidos pela média aritmética dos diâmetros formados nos dois ensaios paralelamente.

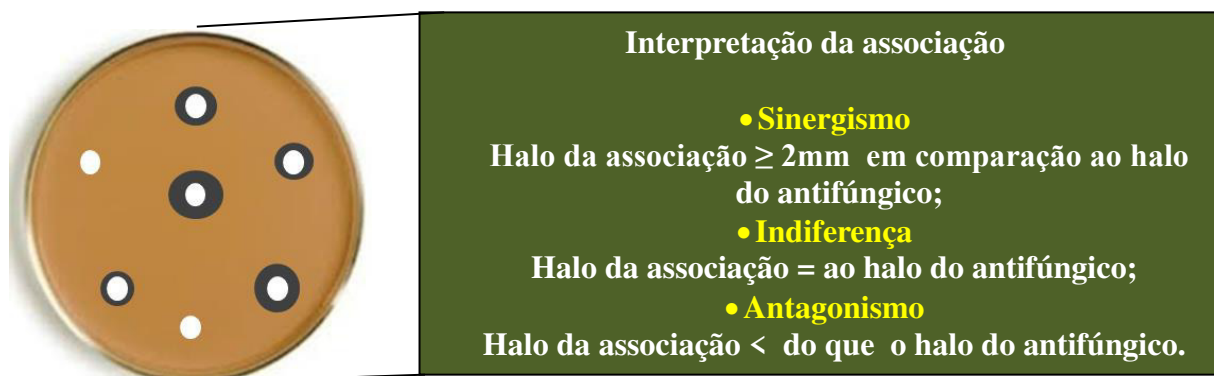


Figura 9- Representação da leitura e interpretação do estudo de associação de β - citronelol com os antifúngicos.

4.4-ENSAIOS *IN SILICO*

4.4.1 Passonline

Previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online é um software destinado para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos. O espectro de atividade biológica de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de atividade biológica, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. *Pass online* dá várias facetas da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

4.4.2 Análise *in silico* dos parâmetros absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade-ADMET

Para a análise dos parâmetros farmacológicos e toxicológicos teórico do β - citrônio, foi realizada a avaliação *in silico* dos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade).

Na análise dos parâmetros farmacológicos, foi avaliado a biodisponibilidade oral teórica de β -citrônio, pela “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos deva ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos sejam absorvidos, devem possuir peso molecular 500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) 5, número de aceptores de ligação hidrogênio (nALH) 10 e número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) 5 (LIPINSKI et al., 2001). A esta predição, foi empregada o programa Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Aos parâmetros toxicológicos foi efetuado o estudo teórico de efeito mutagênico, tumorigênico, irritante e efeito sobre sistema reprodutor (ABREU, 2008); pelo o programa Osiris Property Explorer (<HTTP://www.organicchemistry.org/prog/peo/drugScore.html>).

Nesta análise, os resultados foram classificados a partir de uma escala de 1 a 3, onde: 1 significa toxicidade ausente, 2 toxicidade moderada e 3 toxicidade severa.

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Ao tratamento estatístico dos dados, foi empregado o teste o t de Student para a análise entre colunas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. A análise dos dados foi por utilização da ferramenta estatística GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, San Diego, CA, EUA .

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA- CIM E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA- CFM

A prática do estudo com produtos naturais representam grandes perspectivas na descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas, o que inclui os que apresentem atividade antimicrobiana, os quais possam ser direcionados na produção de novos fármacos eficazes e seguros a terapêutica contra doenças infecciosas.

Nesse contexto, vários métodos podem ser aplicados para estudo de atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas (BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008); e por sua vez, também são ampliados aos seus fitoconstituintes. Assim, buscando conhecer o perfil antifúngico acerca de β - citrionelol, foi avaliado a sua atividade frente a cepas de *C. albicans*, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM.

A técnica de microdiluição em caldo foi o procedimento executado para determinação da CIM. Considerada simples, econômica e reprodutível, requer uma pequena quantidade de amostras variadas a ser trabalhada para um maior número de repetições. Pode ser aplicada tanto para substâncias solúveis em água como as de perfil lipossolúvel, dispondo de resultados quantitativos e tem uma sensibilidade de trinta vezes maior do que os demais métodos disponíveis na literatura. Além disso, este método tem ainda a vantagem em disponibilizar informações sobre a CFM (OSTROSK et al., 2008; ZACCHINO, 2001).

Os resultados do ensaio de avaliação de atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans* estão expressos na Tabela 1. Valores da CIM encontrados para o β - citrionelol, mostra que o fitoconstituente até a concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento de 9 (75%) das 12 cepas de *C. albicans*. E até 256 $\mu\text{g/mL}$ todas as 12 cepas (100%) da levedura apresentaram-se sensíveis ao β – citrionelol.

Tabela 1- Resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de β - citrionelol sobre cepas de *C. albicans* – técnica de microdiluição.

Cepas fúngicas	β - citrionelol CIM ($\mu\text{g/ mL}$)	Controle nistatina (100 UI)	Controle da levedura
<i>C.a</i> ATCC - 76485	128	-	+
<i>C.a</i> ATCC - 76645	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 178	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 615	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 37	256	-	+
<i>C.a</i> LM - 38	128	-	+
<i>C.a</i> LM - V42	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 52	256	-	+
<i>C.a</i> LM - 70	256	-	+
<i>C.a</i> LM - 86	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 92	128	-	+
<i>C.a</i> LM - 125	128	-	+

(-) ausência do crescimento de leveduras; (+) presença do crescimento de leveduras.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com aqueles já obtidos por Tampiere e colaboradores (2005). Os pesquisadores fizeram uma avaliação de dezesseis óleos essenciais e quarenta e dois compostos puros isolados e mostram que o β - citrionelol pelo o ensaio de Susceptibilidade Antifúngica em Agar Semissólido (SAAS), apresentou uma CIM de 100 ppm (ou 100 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, para as leituras efetuadas em 48 horas e 7 dias.

Em outro caso, Pereira et al. (2014), evidencia que o β - citrionelol teve efeito contra 14 cepas de *Trichophyton rubrum* causador mais comum de dermatofitose crônica em humanos, com uma CIM variando entre 8 a 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Já por Bezerra et al., (2013) foi registrado atividade contra micro-organismos isolados de biofilme dental, pelo método de difusão em disco. Para tanto, a formação de halo de inibição contra *Streptococcus mutans* (10.7 mm), *S. salivarius* (10 mm) e *S. oralis* (9.8 mm), permitiu com que este tenha sido considerado, indicativo a prevenção e tratamento de cárie dentária.

A falta de padronização para os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana, com produtos naturais e seus derivados (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003; BONA et al., 2014); dificulta numa avaliação comparativa desses resultados com outros obtidos em diferentes pesquisas.

No entanto, para todas as situações supracitadas é possível observar o potencial bioativo que este fitoconstituente possui, do qual também foi evidenciado ao revelar uma ótima CIM contra *C. albicans* para esta pesquisa.

Com a necessidade de averiguar maiores aspectos quanto a real dimensão de seu potencial antifúngico, foi realizado o ensaio de Concentração Fungicida Mínima - CFM. Para este, os resultados encontram-se distribuídos na tabela 2.

Tabela 2- Avaliação da Concentração Fungicida Mínima de β - citrônio sobre cepas de *C. albicans*- técnica de microdiluição.

Cepas fúngicas	β - citrônio CFM ($\mu\text{g/mL}$)	Controle nistatina (100 UI)	Controle leveduras
<i>C.a</i> ATCC-76485	ND*	-	+
<i>C.a</i> ATCC-76645	512	-	+
<i>C.a</i> LM- 178	256	-	+
<i>C.a</i> LM- 615	128	-	+
<i>C.a</i> LM- 37	512	-	+
<i>C.a</i> LM- 38	256	-	+
<i>C.a</i> LM- V42	ND*	-	+
<i>C.a</i> LM- 52	ND*	-	+
<i>C.a</i> LM- 70	512	-	+
<i>C.a</i> LM- 86	128	-	+
<i>C.a</i> LM- 92	128	-	+
<i>C.a</i> LM- 125	256	-	+

ND* Não Detectado; (-) ausência do crescimento de leveduras; (+) presença do crescimento de leveduras.

A CFM de β - citrônio contra cepas de *C. albicans*, mostrou-se variável entre 128 a 1024 $\mu\text{g/mL}$. Esse comportamento de sensibilidade diversa das cepas está relacionado quanto a particularidades individuais, ao que tudo indica a variabilidade genotípica de cada exemplar. Para tanto, foi considerado que a CFM de β - citrônio correspondeu a 512 $\mu\text{g/mL}$ em 75% da população de *C. albicans*.

Uma substância com atividade antifúngica pode ter um efeito fungistático ou fungicida e, de acordo com Siddiqui e colaboradores (2013), se calcularmos a razão entre CFM/CIM podemos descobrir a natureza de sua ação. Caso a razão resulte num valor ≤ 4 o efeito é fungicida, no entanto se for > 4 a substância tem perfil fungistático. Ao analisar a natureza da ação antifúngica de β - citrônio foi revelado que esta é do tipo fungicida (e não fungistático), já que a razão obtida entre $\text{CFM}_{75\%} / \text{CIM}_{75\%}$ foi igual a 4.

É fundamental também esclarecer que ao relevante perfil fungicida anti - *C. albicans*, deve-se ao fato de β - citrionelol atender os pré-requisitos necessários para esse efeito: ser uma molécula de cadeia aberta com 10 átomos carbonos, dotada de pouca insaturação e com função orgânica alcoólica primária (TAMPIERI et al., 2005).

Ainda vale ressaltar que clinicamente para que o um antimicrobiano tenha efetividade, é necessário que este alcance o foco da infecção e detenha ou promova a inibição do desenvolvimento exponencial de micro-organismos, facilitando a atuação de defesas imunológicas do hospedeiro no controle a infecção (CLEELAND; SQUIRES, 1991). Em situações em que o hospedeiro apresenta o seu sistema imunológico não deficiente, a determinação da CIM é útil para nortear a terapia antifúngica. E dessa forma, a mesma fundamenta-se na quantidade necessária, que é alcançada no sítio da infecção, para atuar como um inibidor potencial do crescimento de micro-organismos. Porém, em casos em que o indivíduo encontra-se imunodebilitado decorrente a processos infecciosos, a CFM é mais eficaz na orientação da terapia (KONEMAN et al., 1993).

5.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS CEPAS FÚNGICAS AOS ANTIFÚNGICOS (ANTIFUNGIGRAMA)

O teste de sensibilidade das doze cepas de *C. albicans* para antifúngicos escolhidos, foi realizado com a pretensão de nortear a sensibilidade das cepas; do qual foi válido, para estudo e compreensão dos ensaios de associação a ser evidenciados posteriormente.

Neste ensaio, o teste difusão em disco, foi escolhido por ser um dos protocolos mais utilizados na clínica para acompanhar a evolução de resistência fúngica de *Candida* spp. Muito embora não emita CIM, mas fornece resultados quantitativos (zona de inibição) e qualitativos (sensível ou resistente) que não comprometem na avaliação de sensibilidade para os diversos espécimes de *Candida* o que inclui a do presente estudo (JUNIOR-VASCONCELOS; MENEZES; CUNHA 2011; JUNIOR-VASCONCELOS et al., 2012).

Os resultados do ensaio de susceptibilidade das cepas de *C. albicans* aos antifúngicos encontram-se na tabela 3. E na figura 10 pode ser visualizado para um isolado *C. albicans*, resistência predominante a quase todos os antifúngicos testados.

Tabela 3 – Resultados do perfil de susceptibilidade de *C. albicans* frente a antifúngicos licenciados (halos de inibição/mm) - difusão em ASD.

Cepas fúngicas	Antifúngicos							Controle da levedura
	Anfotericina B 100 µg	Cetoconazol 50 µg	Clotrimazol 50 µg	Fluconazol 25 µg	Itraconazol 10 µg	Miconazol 50 µg	Nistatina 100 U.I	
<i>C.a</i> ATCC-76485	10 ^(R)	30 ^(S)	26 ^(S)	20 ^(S)	16 ^(R)	26 ^(S)	14 ^(S)	+
<i>C.a</i> ATCC-76645	15 ^(S)	33 ^(S)	21 ^(S)	23 ^(S)	8 ^(R)	30 ^(S)	20 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 178	0 ^(R)	30 ^(S)	30 ^(S)	20 ^(S)	0 ^(R)	25 ^(S)	26 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 615	15 ^(S)	17 ^(R)	22 ^(S)	15 ^(R)	12 ^(R)	24 ^(S)	18 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 37	0 ^(R)	21 ^(S)	25 ^(S)	0 ^(R)	10 ^(R)	21 ^(S)	20 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 38	10 ^(R)	25 ^(S)	25 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	21 ^(S)	23 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- V42	0 ^(R)	30 ^(S)	24 ^(S)	0 ^(R)	10 ^(R)	18 ^(R)	16 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 52	11 ^(S)	30 ^(S)	28 ^(S)	16 ^(R)	20 ^(S)	26 ^(S)	20 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 70	20 ^(S)	21 ^(S)	25 ^(S)	0 ^(R)	10 ^(R)	21 ^(S)	17 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 86	12 ^(S)	15 ^(R)	23 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	18 ^(R)	19 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 92	10 ^(R)	21 ^(S)	21 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	16 ^(R)	15 ^(S)	+
<i>C.a</i> LM- 125	10 ^(R)	21 ^(S)	21 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	10 ^(R)	10 ^(R)	+

(S): Sensível; (R): Resistente; (+) Presença do crescimento de leveduras no meio de cultura.

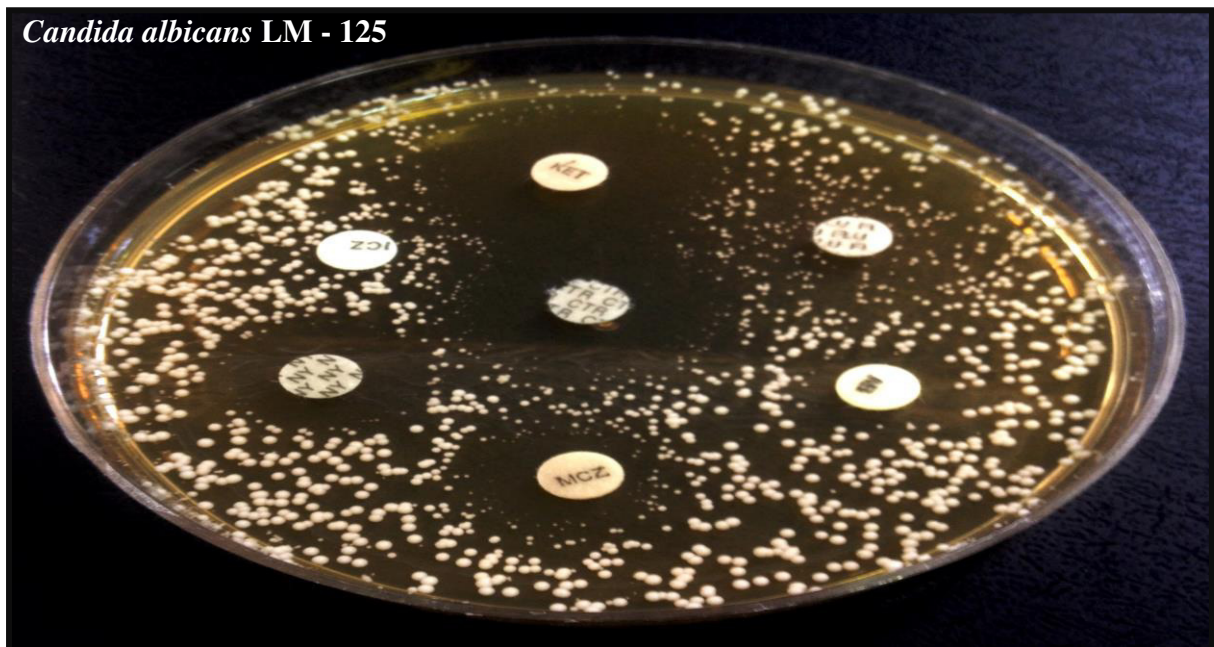


Figura 10 - Perfil de sensibilidade a *C. albicans* LM – 125 expressos aos antifúngicos: Anfotericina B (AB) 10mm (resistente); Cetoconazol (KET) 21mm (sensível); Clotrimazol (CTR) 21mm (sensível); Fluconazol (FLU) 0mm (resistente); Itraconazol (ICZ) 0mm (resistente); Miconazol (MCZ) 10mm (resistente) e Nistatina (NY) 10mm (resistente).

Os dados expressos na Tabela 3 mostram perfis de susceptibilidade diversos. O itraconazol 91,67% (11 cepas), fluconazol 75% (9 cepas) e anfotericina B 58,33% (7 cepas) caracterizam os antifúngicos que apresentaram maior resistência. Enquanto clotrimazol 100% (12 cepas), nistatina 91,67% (11 cepas), cetoconazol 83,33% (10 cepas), e miconazol 66,67% (8 cepas) representam os antifúngicos com maior sensibilidade.

Aos triazólicos, são visualizados que a susceptibilidade reduzida ao itraconazol, já vem sendo observada a mais de 10 anos (PASSOS et al., 2007); com visualização de resistência cruzada a isolados de *C. albicans* e não *albicans*, pela exposição antecedente e prolongada ao fluconazol (KELLY S., ARNOLDI; KELLY D, 1993; NUNES et al., 2011).

Ao fluconazol, a presença de isolados resistentes por *Candida* spp. de diferentes sítios anatômicos (vulvovaginal, bucal, sangue), vem sendo muito difundido na literatura (DALAZEN et al., 2011; ADESIJI et al., 2011; MARR et al., 2000). Contudo é possível observar em pesquisas como as de Abaci; Haliki-Uztan (2011) e Benedetti; Fornari; Scherviniski (2011), que as amostras clínicas de *C. albicans* ensaiadas, apresentaram uma alta frequência de resistência ao fluconazol (respectivamente 59,6% e 67%), a qual de forma semelhante aqui foi evidenciada.

Com relação aos imidazólicos, a alta percentagem de sensibilidade revelada no estudo, condiz com outras pesquisas. Como exemplo, Leite e colaboradores (2015), mostra que 82,4% dos isolados de *C. albicans* obtidos de indivíduos com estomatite protética foram suscetíveis ao miconazol. Em um estudo com amostras clínicas oriundas de infecção vaginal, todas as cepas de *Candida* spp. identificadas a incluir *C. albicans* foram sensíveis aos imidazóis miconazol como também ao clotrimazol (MAHMOUDABADI; NAJAFYAN; ALIDADI, 2010). Em outro caso, foram evidenciados que 83% das cepas de *C. albicans* obtidos de mucosa bucal e pele foram sensíveis ao cetoconazol (BENEDETTI; FORNARI; SCHERVINISKI, 2011).

Quanto aos polienos, o surgimento de resistência é algo ainda não muito detalhado na literatura (GHANNOUM; RICE, 1999); ela pode aparecer em casos isolados (MAROSZYŃSKA et al., 2013), como foi observado para a nistatina nessa pesquisa; no entanto, para anfotericina B, vem sendo revelado uma outra face, uma modificação do perfil de sensibilidade com o surgimento frequente de resistência, como pôde ser exposto por Dalazen e colaboradores (2011). Na pesquisa a resistência a anfotericina B, foi quase que unanime para todos os isolados de *Candida* (*albicans*, *krusei*, *tropicalis* e *glabrata*),

representado por 96,6% de resistência para aqueles que foram obtidos de pacientes com recidivas de candidíase oral e 100% de resistência para os isolados de candidíase vulvovaginal.

Numa avaliação geral, ter conhecido o perfil de susceptibilidade dos antifúngicos, acrescenta à situação clínica, quanto realmente esta se tornando cada vez mais difícil o combate de infecções por *Candida* com o emprego da monoterapia e, dessa forma, torna-se um alerta para o desenvolvimento de estratégias alternativas para tratar de forma eficaz os agentes patogênicos resistentes e, nessas condições a terapia de combinação pode ser um grande aliado (ALI et al., 2012).

5. 3 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

A combinação de produtos naturais vegetais e antimicrobianos vem gerando a descoberta de agentes modificadores de atividade antimicrobiana. O fato das combinações realizadas mostrarem efeitos sinérgicos (SOUSA et al., 2011; COUTINHO et al., 2008); vislumbram a capacidade dessas combinações representarem um avanço contra os mecanismos de resistência impostos pelos micro-organismos; bem como, a capacidade de ampliar as aplicações terapêuticas dos agentes antifúngicos (AHMAD et al., 2010b), com maior segurança e eficácia.

Assim, após a finalização dos ensaios de atividade antifúngica do β – citrionelol e do perfil de sensibilidade dos antifúngicos licenciados, foi posto em prática o estudo de associação desses produtos idealizando avaliar a capacidade de β – citrionelol como modificador de atividade antifúngica. Para esse estudo, os resultados encontram-se expostos na tabela 4. E na figura 11, pode ser visualizado o perfil resultante da interação do fitoconstituente sobre os antifúngicos para um representante clínico de *C. albicans* testada no ensaio.

Tabela 4 – Média dos resultados (em mm) do estudo de associação de β -citronelol com antifúngicos contra cepas de *C. albicans* em meio sólido.

Cepas fúngicas	β - citronelol + Antifúngicos							Controle disco “blank”
	Anfotericina B 100 μ g	Cetoconazol 50 μ g	Clotrimazol 50 μ g	Fluconazol 25 μ g	Itraconazol 10 μ g	Miconazol 50 μ g	Nistatina 100 U.I	
<i>C.a</i> ATCC-76485	13 \uparrow	48 \uparrow	40 \uparrow	30 \uparrow	20 \uparrow	35 \uparrow	17 \uparrow	0
<i>C.a</i> ATCC-76645	15*	40 \uparrow	30 \uparrow	30 \uparrow	8*	30*	22 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 178	15 \uparrow	35 \uparrow	32 \uparrow	15 \downarrow	8 \uparrow	31 \uparrow	25 \downarrow	0
<i>C.a</i> LM- 615	20 \uparrow	22 \uparrow	30 \uparrow	28 \uparrow	26 \uparrow	22 \downarrow	20 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 37	17 \uparrow	35 \uparrow	30 \uparrow	25 \uparrow	15 \uparrow	26 \uparrow	22 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 38	10*	35 \uparrow	30 \uparrow	26 \uparrow	20 \uparrow	26 \uparrow	20 \downarrow	0
<i>C.a</i> LM- V42	10 \uparrow	38 \uparrow	30 \uparrow	18 \uparrow	10*	25 \uparrow	20 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 52	10 \downarrow	38 \uparrow	34 \uparrow	14 \downarrow	20*	35 \uparrow	16 \downarrow	0
<i>C.a</i> LM- 70	10 \downarrow	34 \uparrow	30 \uparrow	23 \uparrow	18 \uparrow	30 \uparrow	21 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 86	8 \downarrow	20 \uparrow	20 \downarrow	0*	0*	21 \uparrow	20*	0
<i>C.a</i> LM- 92	8 \downarrow	21*	20 \downarrow	8 \uparrow	16 \uparrow	28 \uparrow	26 \uparrow	0
<i>C.a</i> LM- 125	10*	28 \uparrow	22*	0*	8 \uparrow	21 \uparrow	22 \uparrow	0

\uparrow Sinergismo; \downarrow Antagonismo; * indiferença. “Disco blank” (Controle) ausência de zona de inibição para o crescimento fúngico.

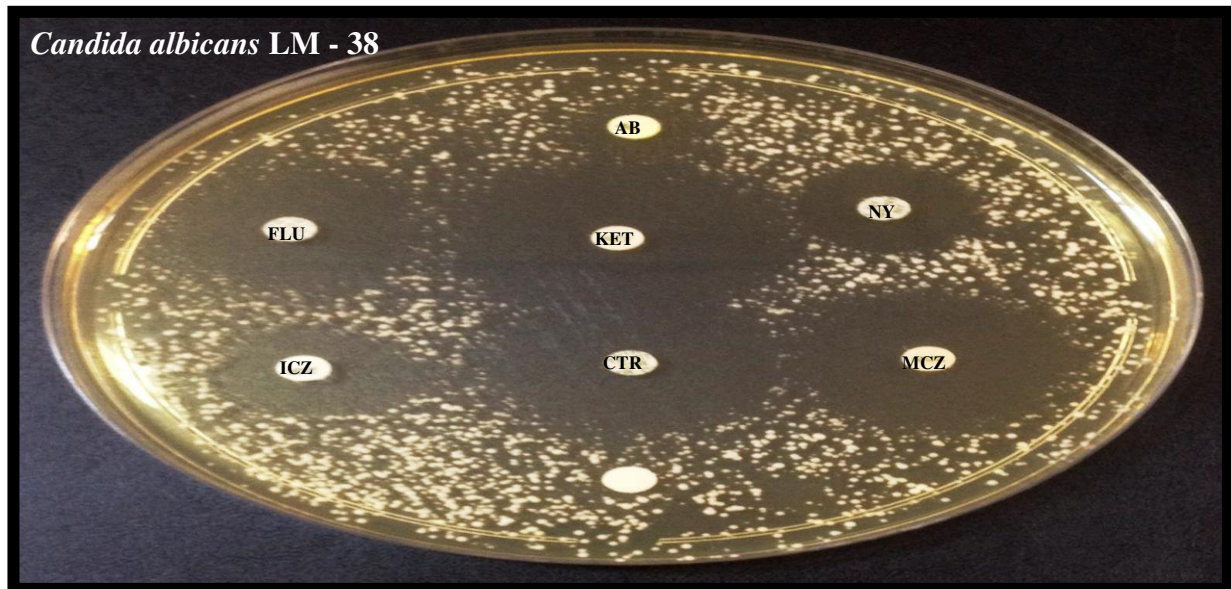


Figura 11- Perfil resultante da associação de β - citronelol sobre antifúngicos para *C. albicans* LM – 38. As zonas de inibição expressas em mm permitem identificar a presença ou ausência de atividade modificadora para cada antifúngico. Anfotericina B (**AB**) 10 mm (indiferente); Cetoconazol (**KET**) 35 mm (sinergismo); Clotrimazol (**CTR**) 30 mm (sinergismo); Fluconazol (**FLU**) 26 mm (sinergismo); Itraconazol (**ICZ**) 20 mm (sinergismo); Miconazol (**MCZ**) 26 mm (sinergismo) e Nistatina (**NY**) 20 mm (antagonismo). Disco em blank (Controle) ausência de zona de inibição.

Os resultados da associação (Tabela 4) mostram de uma forma geral, que a ação exercida pelo β – citronelol sobre os antifúngicos variou conforme o tipo de antifúngico e a cepa de *C. albicans* testada no ensaio.

No entanto, percebeu-se que o β - citronelol revelou ser um agente modificador de atividade antifúngica. Para a combinação do monoterpenoide e cetoconazol, o efeito sinérgico foi observado para 11 cepas (91,67%) de *C. albicans*; e miconazol para 10 cepas (83,33%); e clotrimazol para 9 cepas (75%); fluconazol e itraconazol para 8 cepas (66,67%).

Com relação a nistatina, o fitoconstituinte potencializou a atividade desse antifúngico para 8 cepas (66,67%); e ao anfotericina B, a interação resultou em sinergismo para 5 cepas (41,67%) ensaiadas de *C. albicans*. Porém, ainda foi avaliado que em comparação aos demais antifúngicos, uma frequência mais evidente de efeito antagônico representado por 3 cepas (25%) e 4 cepas (33,33%) foram observados para a combinação de β – citronelol - nistatina e β – citronelol - anfotericina B.

A prática de como a combinação de um produto natural e/ou derivado natural a um agente antimicrobiano pode resultar em antagonismo, é relatada (OLIVEIRA et al., 2006; ALVES et al., 2011); mas não tão explorada, uma vez, que a prevalência de sinergismo pela combinação sobressai na presença dos outros efeitos interferentes, pela a possibilidade de estar se deparando a um potencial candidato a fitofármaco modificador do perfil negativo atribuído a monoterapia antimicrobiana.

Levando em consideração a presença de sinergismo com a modificação do perfil de resistência, para exemplares de *C. albicans*; a combinação de β - citronelol ao fluconazol, itraconazol e miconazol se destacaram.

Para o fluconazol, o perfil de resistência antes apresentado por *C. albicans* LM - 615; *C. albicans* LM - 37, *C. albicans* LM - 38 e *C. albicans* LM - 70, cujas zonas de inibição foram 15 mm para o primeiro exemplar e aos demais correspondente a 00 mm; tornaram-se sensíveis quando combinado ao β - citronelol, uma vez que os halos de inibição foram 28 mm, 25 mm, 26 mm e 23 mm respectivamente (Gráfico 1)

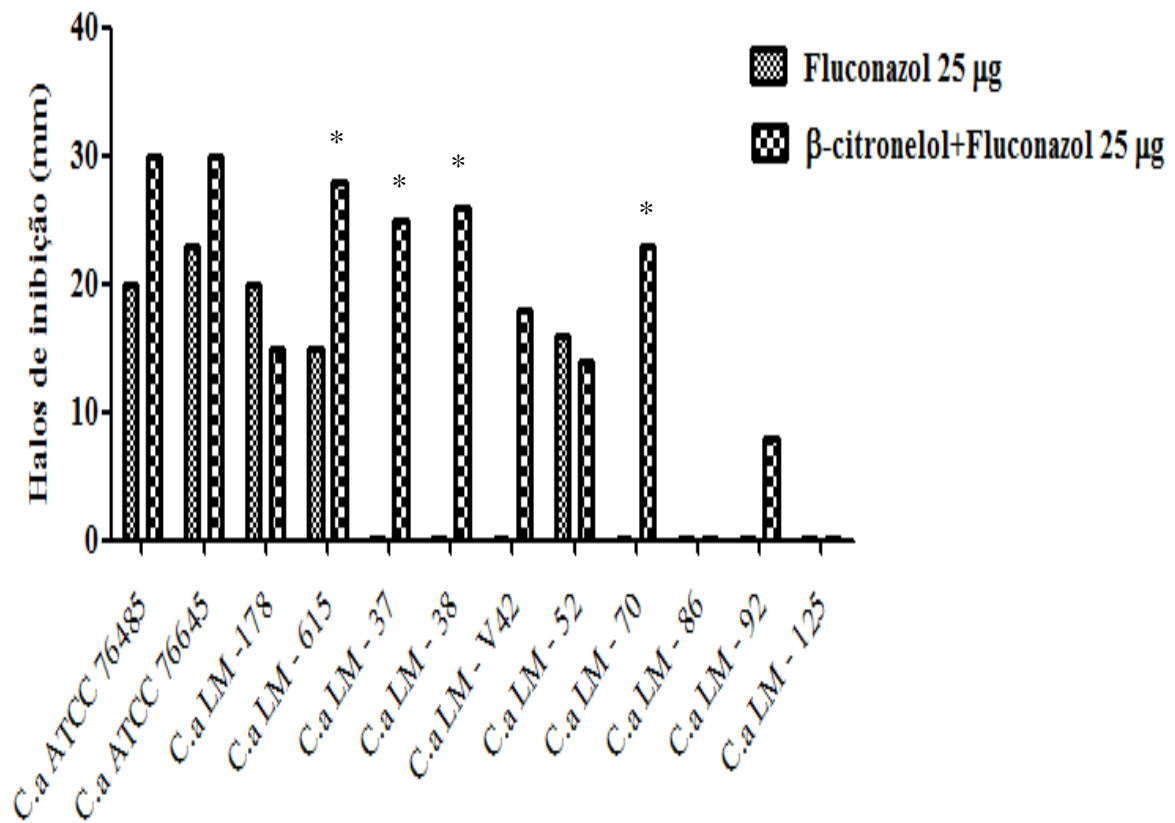


Gráfico 1 – Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* ao fluconazol e, em combinação com β-citronelol, avaliados pelos halos de inibição em mm. *p < 0,05 quando a associação resultou na mudança do perfil de resistência a sensibilidade das cepas ensaiadas.

Ao itraconazol, a mudança de resistência quando associado ao β - citronelol foi observada para *C. albicans* ATCC - 76485 (16 mm/20 mm), *C. albicans* LM - 615 (12 mm / 26 mm) e *C. albicans* LM - 38 (0 mm / 20 mm), conforme gráfico 2.

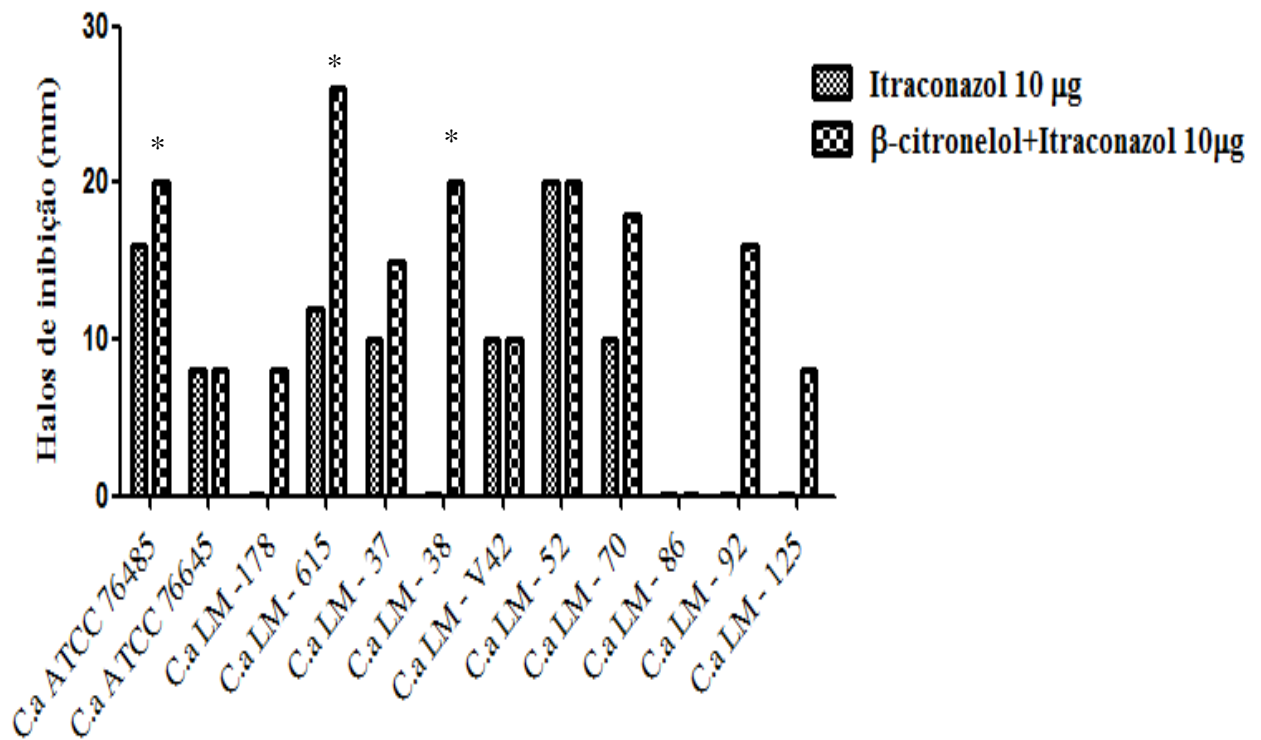


Gráfico 2 – Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* frente ao itraconazol e, em combinação ao β - citronelol, avaliado pelos halos de inibição em mm. *p < 0,05 quando a associação resultou na mudança do perfil de resistência a sensibilidade das cepas ensaiadas.

Associação de miconazol ao β - citronelol resultou, na mudança de resistência a *C. albicans* LM -V42 (18 mm / 25 mm), *C. albicans* LM - 86 (18mm / 21mm), *C. albicans* LM - 92 (16 mm / 28 mm) e *C. albicans* LM -125 (10 mm / 21 mm), como encontra-se no gráfico 3.

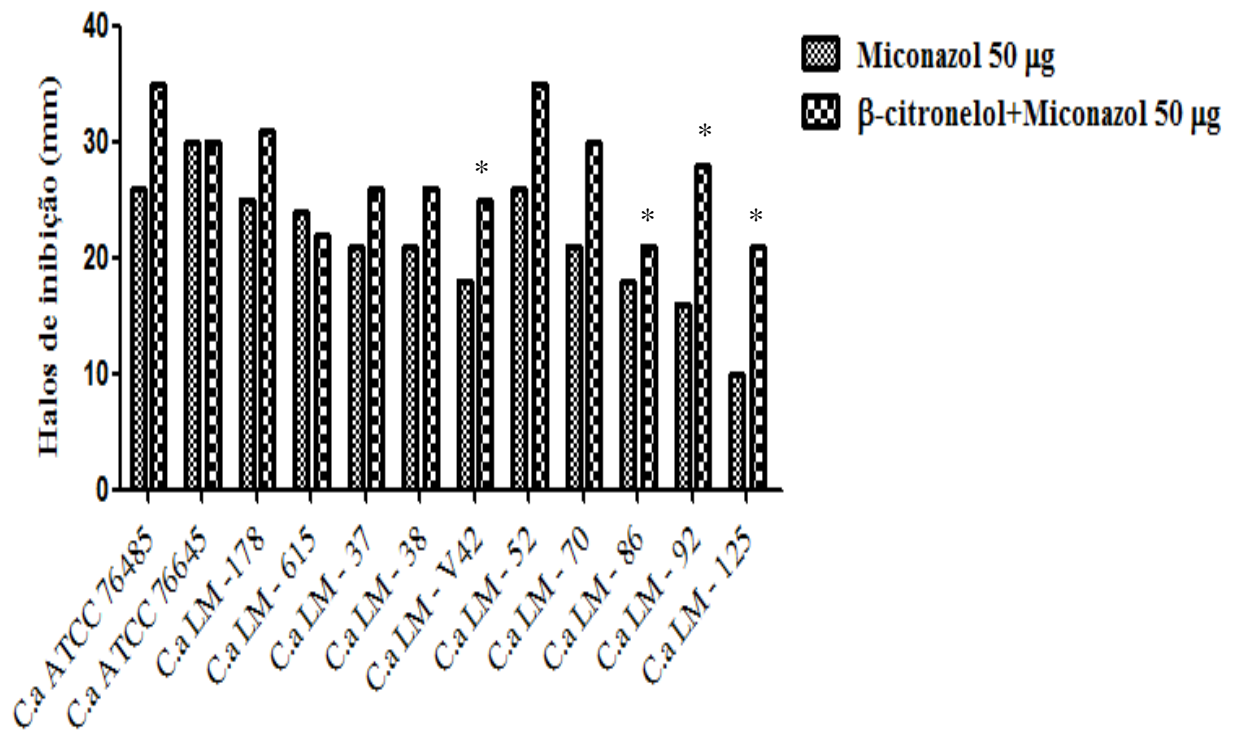


Gráfico 3 – Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* ao miconazol e, em combinação ao β - citronelol, avaliado pelos halos de inibição em mm. *p < 0,05 quando a associação resultou na mudança do perfil de resistência a sensibilidade das cepas ensaiadas.

A capacidade de terpenoides produzir sinergismo quando em combinação a antimicrobiano frente à *Candida* spp. já foi relatado. Ahmad e colaboradores (2010b) num estudo envolvendo eugenol e metileugenol pelo o método checkerboard, utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), para determinar sinergismo ($FICI \leq 0,5$), antagonismo ($FICI > 4$) ou indiferença ($0,5 > FICI \leq 0,4$), revela que os dois terpenoides em combinação com fluconazol emitiu um ótimo sinergismo frente a um grande número de cepas de *Candida* spp., resistentes e sensíveis ao fluconazol. Os autores sugerem que o sinergismo resultante, pode estar relacionado em alterações provocadas por eugenol e metileugenol sobre a membrana das células de *Candida* spp. a qual induziu em maior sensibilidade do antifúngico.

O fato dos autores terem relacionado o sinergismo com os danos na membrana citoplasmática das leveduras por esses compostos, esta vinculada com a capacidade ativa de terpenoides promoverem essa ação, já descritos na literatura.

Pina e colaboradores (2004) constataram que as células de *C. albicans*-M1 e *C. krusei*-H9, tratadas com concentrações crescentes de carvacrol, timol, p-cimeno, bem como, dos óleos de diferentes espécies de *Thymus* do qual esses primeiros foram isolados, revelaram

induzir lesões primárias na membrana celular, em um curto espaço de tempo indicada pela maior absorção de iodeto de propídio (indicador de danos à membrana), por análise em citometro de fluxo.

Em outro caso, um estudo de Braga e colaboradores (2007) mostram por meio de microscopia eletrônica de varredura, que células de *C. albicans*, sofreram fortes alterações morfológicas na superfície celular, quando na presença da CIM de timol e eugenol isoladas e em combinação, após 4 horas de exposição. Essas alterações também se estenderam em menor grau, quando as células de *Candida* foram incubadas com a CIM's (1/2 e 1/4) isoladas e as CIM's (1/2+1/2; 1/4+1/4; 1/8+1/8) quando combinadas. Os autores consideraram que o efeito produzido, deve-se pelo caráter lipofílico dos compostos, que permitiu uma interação entre as cadeias de ácido graxo da membrana, alterando sua fluidez e permeabilidade, bem como, ter interferido na regulação de enzimas ligadas a síntese de β -glucanos, mananas e quitina, importantes para a manutenção da parede celular dos fungos.

Desta forma, é possível inferir, que β - citrionelol, mesmo não sendo um terpenoide cíclico, mas por conferir aspecto molecular lipofílico, penetrou sobre as barreiras celulares das cepas de *C. albicans*, interagiu com componentes graxos de membrana, alterando a conformação de bicamada lipídica e ainda interferiu sobre o sistema enzimático envolvido na síntese de polímeros glúcidos, que conferem estabilidade da parede celular; comprometendo assim, funções e integridade dos envoltórios, a qual ocasionou maior sensibilidade aos antifúngicos, refletidos por maiores zonas de inibição formadas. Além do mais, esta máxima pode se estender para os casos em que a resistência foi revertida a sensibilidade como revelado nos gráficos 1, 2 e 3.

Para tanto, se faz necessário obter maiores esclarecimentos sobre real atuação desse monoterpenoide contra *C. albicans*, pela à realização de ensaios com alvo específico, como os ensaios de sorbitol e interação de ergosterol, úteis na verificação de ação do produto sobre a parede celular e membrana fúngica respectivamente.

5. 4 ANÁLISE *IN SILICO* DE β - CITRONELOL

Em prospecções tecnológicas, é visualizado que terpenos são reportados ao desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas, refletidas pelo elevado número de registros de patente (OLIVEIRA et al., 2014, FREITAS et al., 2015).

Em todos os ensaios microbiológicos realizados nessa pesquisa, β -citronelol mostrou a capacidade ativa que realmente sua classe apresenta. Portanto, cogitando a capacidade de β -citronelol monoterprenoide, de ser um candidato promissor ao desenvolvimento de novos fármacos, foi empregado o estudo *in silico*.

Abordagens assistidas por computador (*in silico*) são ferramentas que desempenham um papel essencial quanto a se enquadrar no repertório proposto de modelos alternativos para avaliação de características farmacológicas como toxicológicas de um composto, além de modelos *in vitro*. Por isso, podem ser aplicadas para estudo de moléculas naturais bem como, hipotéticas, realizados de forma rápida, reprodutível, normalmente baseado em reguladores humanos, fornecendo resultados que podem levar a progressão de novas aplicações terapêutica (SRINIVAS et al., 2014; ANGELO; MAX; MARKUS, 2006).

Desta forma, foi aplicada a análise *in silico* para prever: o espectro de atividade biológico, biodisponibilidade oral de β -citronelol e seus riscos toxicológicos.

A análise das possibilidades de atividade a β - citronelol, mostraram que a molécula como um fármaco, foi semelhante com 44 possibilidades de atividade no $Pa > 70\%$ (Quadro 4) e numerosas propriedades com $Pa > 30\%$, o que inclui atividade antifúngica (Pa : 0,584 e Pi : 0,020); atividade antibacteriana (Pa : 0,404 e Pi : 0,029), atividade antiviral (Herpes) (Pa : 0,428 e Pi : 0,025) e atividade anticarcinogênica (Pa : 0,328 e Pi : 0,048), obtidas pela ferramenta PASS on-line.

Pa	Pi	Atividade
0,746	0,015	Inibidor de 5-O-(4-coumaroil)-D-quinato 3'-mono-oxigenase
0,711	0,011	Inibidor de Acetilesterase
0,789	0,023	Inibidor de Acrocilindropepsina
0,784	0,020	Inibidor de Alcenilo glicerofosfocolina hidrolase
0,708	0,019	Inibidor de Alquil Acetil glicerol fosfatase
0,728	0,007	Anti-hipercolesterolêmicos
0,804	0,004	Anti-secretora
0,715	0,005	Anti-ulcerativa
0,835	0,024	Inibidor Aspulvinona dimetilalil transferase
0,721	0,003	Inibidor da expressão de BRAF
0,768	0,004	Inibidor de Beta-caroteno 15,15'-mono-oxigenase
0,704	0,053	Inibidor de CDP-glicerol glicerol fosfotransferase
0,810	0,018	Substrato de CYP2J
0,731	0,026	Substrato de CYP2J2
0,723	0,016	Inibidor de Taq Carboxipeptidase
0,789	0,023	Inibidor de Quimosina
0,720	0,003	Inibidor de Dolichil-fosfatase
0,745	0,005	Inibidor da Ecdisona-20-mono-oxigenase
0,709	0,011	Inibidor de Acil-CoA sintetase
0,741	0,013	Inibidor da Fragilisina
0,719	0,004	Inibidor da Gastrina
0,708	0,006	Inibidor da Lactase
0,755	0,008	Inibidor da linoleate diol sintase
0,788	0,006	Regulador do metabolismo lipídico
0,703	0,005	Inibidor da peroxidase lipídica
0,716	0,011	Inibidor da lipase lipoproteica
0,796	0,005	Agonista do Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
0,804	0,035	Agonista da integridade de membrana
0,841	0,010	Protetor de Mucomembranosa
0,851	0,017	Tratamento de distúrbios fóbicos
0,798	0,006	Inibidor da Fosfatidilcolina-retinol- O-aciltransferase
0,826	0,001	Inibidor da Plastoquinona-Plastocianina Redutase
0,709	0,005	Estimulante da Agregação Plaquetária
0,745	0,030	Inibidor de Polipropepsina
0,907	0,002	Inibidor da Prenil-difosfatase
0,835	0,006	Inibidor da Proteina-disulfureto redutase (glutaciona)
0,705	0,002	Inibidor do retinol desidrogenase
0,789	0,023	Inibidor da Saccharopepsina
0,798	0,017	Inibidor de açúcares fosfatasas
0,778	0,013	Potenciador da expressão de TP53
0,846	0,015	Inibidor da Testosterona 17beta-dehidrogenase (NADP+)
0,900	0,005	Inibidor da Ubiquinol-citocromo-C redutase
0,815	0,003	Inibidor da Undecaprenil-fosfato mannosiltransferase
0,759	0,003	Inibidor da Vitamin-K-epóxido redutase (warfarina-insensível)

Quadro 4- Atividades previstas do monoterpeneoide no Pa > 70% representado através do da ferramenta PASS-online.

Estas múltiplas atividades possíveis ao β - citronelol estão de acordo com as atividades benéficas propostas ao monoterpenoides na prevenção de diversas doenças (PADUCH et al., 2007; WEN-LIN, et al., 2012). Em exemplo, a possível atividade antiulcerativa direcionada ao fitoconstituente, vista na Pa > 70%, já foram revelados ao geraniol por Carvalho (2012), revelando ser um gastroprotetor por atuar sobre mecanismos que favorecem a proteção a mucosa e induzir o fortalecimento de atividade antioxidante em modelos de úlcera ensaiada em animais. Para a hipotética atividade antiviral do tipo anti-herpes simplex virus-1, também são cotados vários mecanismos de ação pelos monoterpenoides cineol, borneol e estereoisômeros de isoborneol (PADUCH et al., 2007).

Para tanto, a previsão de atividade antifúngica ao β - citronelol foi compatível aos resultados positivos ensaiados no modelo *in vitro* no presente estudo.

Em adição, a análise de biodisponibilidade oral teórica do β - citronelol presente na tabela 5. Mostra que o fitoconstituente apresenta o mesmo número de doadores (nDLH) e aceptores (nALH) de ligações de hidrogênio, sendo ambos igual a 1, seu peso molecular (Da) correspondeu a 156,27 e coeficiente de partição octonal/água (cLogP) 3,15. Esses dados estão dentro do ponto de corte determinada pela regra dos cinco Lipinski, e portanto, pela avaliação conjunta desses resultados, é passível inferir que o composto teoricamente tem uma boa biodisponibilidade oral e hipoteticamente significa que este é apto a ser um medicamento administrado por esta via (LIPINSKI, 2001).

Tabela 5- Análise teórica das propriedades físico-químicas do β - citronelol envolvidas na biodisponibilidade oral da droga após a "regra de Cinco Lipinski".

Substância	nDLH	nALH	Da	cLogP
β - citronelol	1	1	156.27	3,15
Padrão "Regra dos cinco" Lipinski	= 5	= 10	< 500	< 5

Na avaliação de atividade Toxicológica de β - citronelol foi determinado o efeito mutagênico, tumorigênico e danos ao sistema reprodutor, através da ferramenta OSIRIS. Segundo Vieira e colaboradores (2009), os efeitos mutagênicos, são observados pela formação de micronúcleos, que são fragmentos que contém ácido desoxirribonucleico (DNA). situados no citoplasma, são resultantes de quebras cromossômicas, gerando fragmentos acên-

tricos ou com sequências de cromossomos inteiros que não se incorporam ao fuso mitótico, não sendo direcionados aos pólos das células na divisão celular seja durante a mitose ou a meiose.

Os resultados para o efeito mutagênico de β – citrionelol (gráfico 4), mostra que este não apresentou potencial mutagênico, assim como os demais antifúngicos, com exceção de itraconazol que revelou mutagenicidade severa.

Dados antimutagênicos ao β - citrionelol são desconhecidos. No entanto, habilidades antioxidantes já foram relatadas pelo ensaio de eliminação ao radical DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil), radical hidroxilo (OH) e superóxido (O_2^-) (SINGH et al., 2009; JAGDALE et al., 2015); e dessa forma, o fato deste ser um sequestrador de radicais livres, faz inferir que também possa ser capaz de impedir a ação de agentes genotóxicos provocadores de mutações no DNA. Por conseguinte, reflete, quanto ao *in silico*, demonstrar segurança ao uso deste composto como droga em relação a futuros danos sobre o DNA celular.

Quanto ao resultado negativo revelado ao itraconazol, pelo seu potencial efeito mutagênico, vê-se que as previsões de toxicidade pelo teste de AMES, evidenciadas no Drugbank também corroboram (DRUGBANK, 2014). O fato deste ser uma droga comercializada e escalada para o tratamento de infecções fúngicas a mais de 25 anos; não impede por meio de estudos *in silico* de toxicidade, a evidenciação de algum fragmento ou núcleo estrutural reconhecido como subestrutura de compostos nocivos, ou faça parte dos 12% de fragmentos de medicamentos comercializados reconhecidos com potencial mutagênico no seu acervo de dados (OSIRIS, 2014). Assim, essa máxima, direciona a outra visão, quanto seria apropriado re-testes para avaliação de riscos mutagênicos, cancerígenos entre outros, de medicamentos aos seres humanos, uma vez, que são escassos estudos epidemiológicos que possam contribuir para um maior embasamento do perfil de toxicidade para os produtos farmacêuticos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

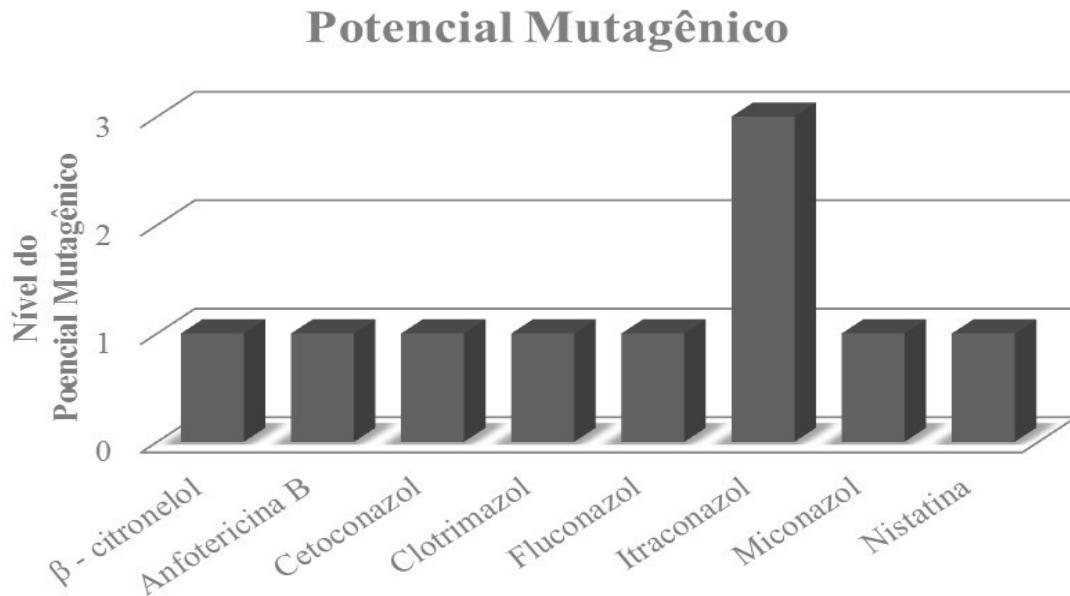


Gráfico 4 - Potencial mutagênico do β - citronelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.

Segundo informações do INCA (2015), a cada ano mais de 12,7 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer e 7,6 milhões de pessoas morrem vítimas dessa doença. Sendo assim, medidas devem ser desenvolvidas a fim de evitar a utilização de fármacos que tenham potencial cancerígeno (INCA, 2015). A formação tumoral envolve um maquinismo biológico complexo e ainda enigmática e, portanto, conseguir identificar marcadores para determinar quais células realmente apresentam potencial tumorigênico é um processo árduo. (VALEJO, 2010).

Com relação ao potencial tumorigênico, é possível observar através dos dados expostos no gráfico 5, que o β - citronelol não possui nenhum efeito tumorigênico, como os demais antifúngicos, exceto novamente ao itraconazol que revelou tumorigenicidade severa.

Na pesquisa realizada por Fogang e colaboradores (2012), mostra que β - citronelol teve um ativo efeito citotóxico sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas, as T98G representante de glioblastoma, MDA-MB 231 representante de adenocarcinoma de mama, A375 linhagem de melanoma maligno e células HCT116 que conferem o carcinoma de cólon. Portanto, não conferindo um perfil tumorigênico, como evidenciado *in silico* nesse estudo.

Além disso, para o potencial tumorigênico de itraconazol segue as mesmas considerações para o resultado anterior, uma vez que o núcleo de toxicidade tumorigênico foi

o mesmo para o risco elevado de mutagenicidade (Figura 12).

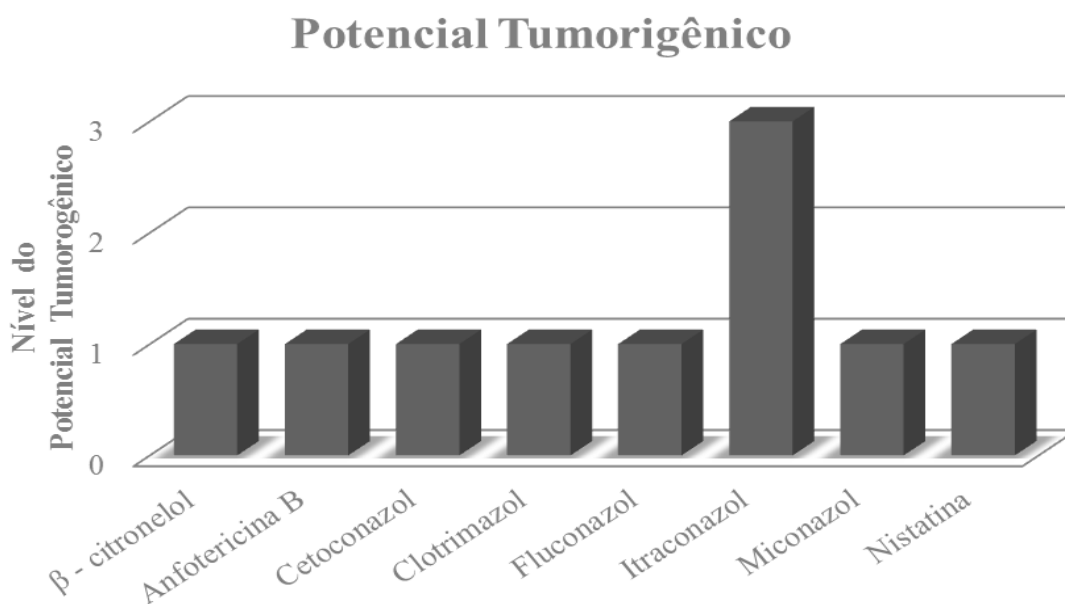


Gráfico 5 – Potencial tumorigênico do β - citronelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.

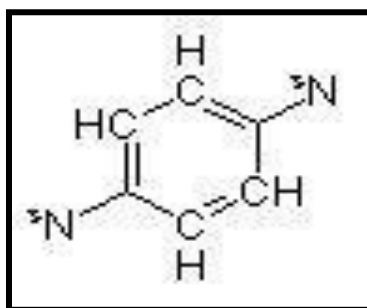


Figura 12- Núcleo reconhecido *in silico* como provedor de elevado risco mutagênico e tumorigênico do itraconazol.

A irritação tecidual corresponde a um processo inflamatório, provocada pelo contato direto com a substância. Este quadro pode ser caracterizado por reações de intensidade variada, com surgimento de reações de desconforto como ardor, pinicação e coceira e em casos em que a resposta é mais acentuada, há a corrosão e destruição do tecido (BRASIL, 2012).

Para o estudo do potencial tóxico - irritante, pôde-se evidenciar que o β - citrônolol apresentou um severo efeito irritante. E para todos os antifúngicos, foi revelado ausência deste efeito (Gráfico 6).

O potencial do β - citrônolol como um provedor irritante, tem sido analisada em estudos que avaliam a sua capacidade de produzir irritação da pele em animais e humanos. Em modelos animais vem sendo observado irritação de pele, por aplicações tópicas de preparações não diluídas de β -citrônolol sob condições semi-oclusivas (RIFM, 1989; RIFM, 1985). Para tanto em humanos, o estudo de Basketter e colaboradores (2004), revela nenhum tipo de reação irritante aos voluntários submetidos a teste epicutâneos de 4h exposição por β -citrônolol.

Estas duas faces levam a seguinte consideração, que uma substância para ser irritante é dependente da frequência, concentração e a quantidade com qual vai ser administrada e a sensibilidade do indivíduo (BRASIL, 2012). E, portanto, esses dados acrescentam a um real perfil de β - citrônolol quanto a ser cogitada a produção de uma droga por via tópica. No entanto fica ressalvo a necessidade de avaliar seu comportamento irritante para outras vias de administração.

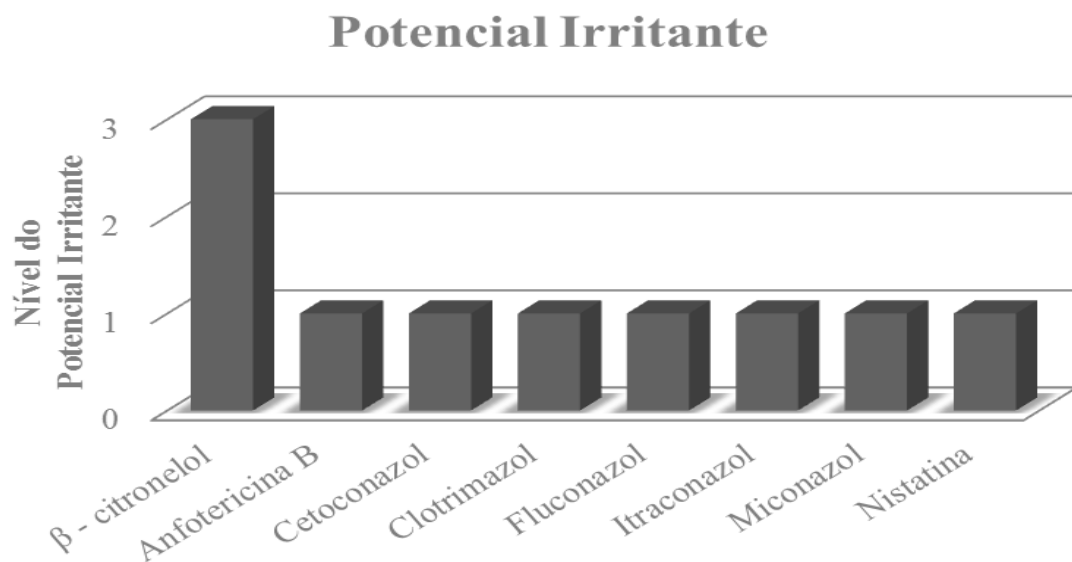


Gráfico 6 - Potencial irritante do β - citrônolol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.

A exposição a agentes tóxicos podem causar distúrbios ao sistema reprodutor, masculino e feminino (BOROVSKAYA et al., 2004; FOSTER; BRICENO, CYRY, 2011). Em toxicidade de reprodução, podem ser visualizadas, alterações sobre a maturação e funcionalidade de gametas, do qual refletem em “Crise de fertilidade” ou infertilidade. Por exemplo, danos ao aparelho reprodutor masculino, podem ocasionar em interferência sobre a maturação de espermátides, com declínio na produção e qualidade e sobrevivência de espermatozoides e alteração no trânsito pelo os epidídimos (LUNCINDA et al., 2010).

Para a análise do potencial tóxico ao sistema reprodutor, foi exposto ao β - citrionelol, severo danos ao sistema reprodutor e para todos os antifúngicos, efeito ausente (Gráfico 7).

Na literatura, não foram constatados a prática de ensaios direcionados ao estudo sobre a interferência desse fitoconstituente sobre o sistema reprodutor. No entanto, a análise *in silico*, mostra que a previsão de causar este severo efeito estar ligado ao fragmento que se encontra na figura 13.

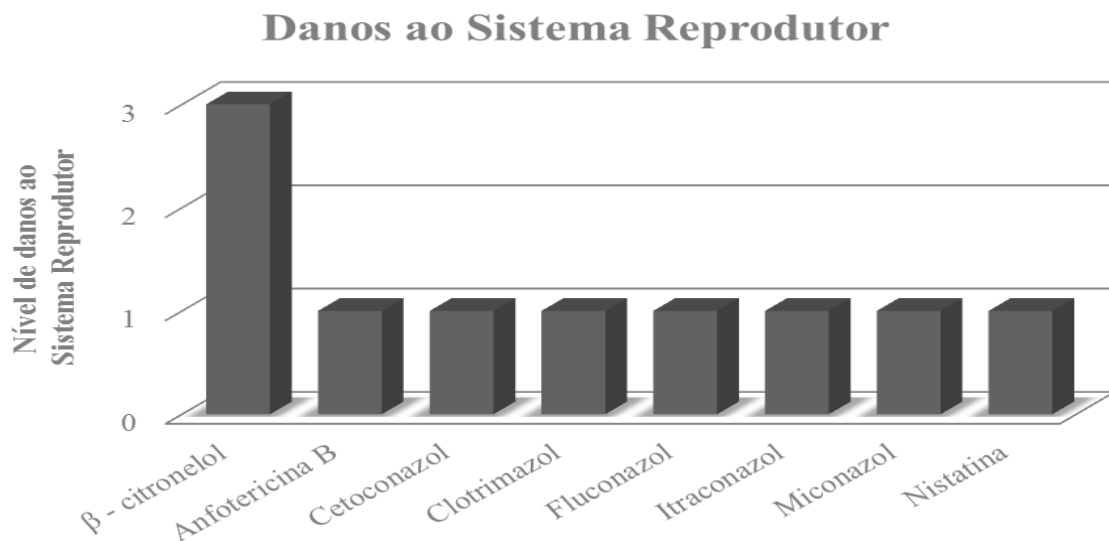


Gráfico 7 - Potencial de danos ao Sistema Reprodutor do β - citrionelol e antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina.

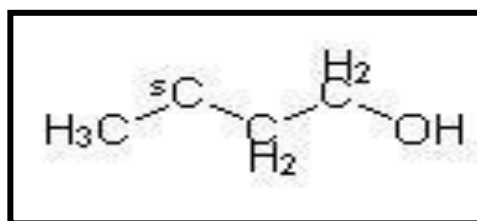


Figura 13 – Núcleo in silico de β - citrionelol, provedor de severos danos ao sistema reprodutor.

O estudo *in silico* de toxicidade ao β - citronelol evidenciou alguns níveis tóxicos que supostamente poderão ser desenvolvidos pela molécula quando em contato ao organismo. Dessa forma, faz-se necessário a realização de uma série de ensaios pré-clínicos e especialmente clínicos, para obter um maior esclarecimento sobre a real ação de efeitos toxicológicos e então poder certificar se o fitoconstituente poderá ser empregado para a produção de um futuro medicamento, inclusive para um novo antifúngico.

Conclusões

CONCLUSÕES

Com base aos resultados obtidos nas metodologias aplicadas, é possível ter como conclusão a este estudo, que a pequena biomolécula orgânica β - citrionelol apresentou ação fungicida contra *C. albicans* e ótima atividade moduladora dos agentes antifúngicos quando em associação.

Pôde-se também observar que o monoterpeneoide embora tenha apresentado boa biodisponibilidade oral teórica, revelou um perfil toxicológico variado. Sugerindo assim, a necessidade de avaliar o risco-benefício desse composto na produção de novo medicamento antifúngico, por realização de ensaios toxicológicos de cunho não - clínicos e clínicos.

Referências

REFERÊNCIAS

ABACI, O.; HALIKI-UZTAN, A. Investigation of the susceptibility of *Candida* species isolated from denture wearers to different antifungal antibiotics. **African Journal of Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1398-1403, 2011.

Agentes Etiológicos das Micoses Oportunistas. Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG - **Net Micro**. Disponível em: < www.icb.ufmg.br/mic >. Acesso em: 23 de junho de 2014.

ABÍLIO, V. M. F.; MESQUITA, B. S.; SILVA, E. D.; CARVALHO, F. V. Q.; MACÊDO, L. L. A.; CASTRO, R. D. Actividad antifúngica de productos naturales indicados por vendedores de hierbas (*raizeiros*) para el tratamiento de la candidiasis oral. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.

ABREU, P.A. **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas**. Dissertação do curso de Pós graduação em Neuroimunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008.

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

ADESIJI, Y. O.; NDUKWE, N.; OKANLAWON, B. M. Isolation and Antifungal Sensitivity to *Candida* Isolates in Young Females. **Central European Journal of Medicine**, v. 6, n. 2, p.172- 176, 2011.

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2010a.

AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 1178-1184, 2010b.

ALI, I.; WANI, W. A.; KHAN, A.; HAQUE, A.; AHMAD, A.; SALEEM, K.; MANZOOR, N. Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper(II) and nickel(II) complexes with conventional antifungals. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, n. 1, p. 66-73, 2012.

ALI, S. M.; KHAN, A. A.; AHMED, I.; MUSADDIQ, M.; AHMED, K. S.; POLASA, H.; RAO, L. V.; HABIBULLAH, C. M.; SECHI, L. A.; AHMED, N. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 20, p. 1-7, 2005.

ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; JÚNIOR, R. L.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D. Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de *Candida*. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 26, n. 2, p. 99-106, 2012.

ALVES, L. A.; FREIRE, I. A.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L.F. D.; CASTRO, R. D. Interferência de óleos essenciais sobre antibióticos utilizados no tratamento de infecções da cavidade oral. **International Journal of Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 26-31, 2011.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANGELO, V.; MAX, D.; MARKUS, A. L. The Challenge of Predicting Drug Toxicity in silico. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 195-208, 2006.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST- Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissível**, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2010.

BAKKALLI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p.446–475, 2008.

BRAGA, P. C.; SASSO, M. D.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 396-400, 2007.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils : science, technology, and applications**. Nova Yorque: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p. 235-280.

BASKETTER, D. A.; YORK, M.; MCFADDEN, J.P.; ROBINSON, M. K. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. **Contact Dermatitis**, v. 51, n. 1, p.1-4, 2004.

BASTOS, J. F. A.; MOREIRA, I. J. A.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. V. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331-337, 2009.

BATISTA, R. S. A.; SILVA, G. S.; MACHADO, S. E. F.; VIEIRA, K. V. M. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida spp*. **Agropecuária técnica**, v. 34, p. 40-49, 2013.

BENEDETTI, V. P.; FORNARI, G.; SCHERVINISKI, N. R. Avaliação da Suceptibilidade a antifúngicos de diferentes espécies de leveduras *Candida* isoladas de mucosa bucal e pele. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 93-95, 2011

- BERMAN, J. *Candida albicans*. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. 620-622, 2012.
- BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPSES, J.H.; TAMAGI, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 1-71. 2008.
- BEZERRA, L. M. D.; FERREIRA, G. L. S.; SILVA, I. C. G.; CASTRO, R. D. Atividade Antibacteriana *In Vitro* de Fitoconstituintes Sobre Microrganismos do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 1, p.79-84, 2013.
- BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo Instituto Biológico São Paulo**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.
- BOROVSKAYA, T. G.; GOLDBERG, V. E.; FOMINA, T. I.; PAKHOMOVA, A. V.; KSENEVA, S. I.; M. E. POLUEKTOVA, M. E.; D. GOLDBERG, E. D. Morphological and Functional State of Rat Ovaries in Early and Late Periods after Administration of Platinum Cytostatics. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137, n. 4, p. 331-335, 2004.
- BRAND, A.; VACHARAKSA, A.; BENDEL, C.; NORTON, J.; HAYNES, P.; HENRY-STANLEY, M.; WELLS, C.; ROSS, K.; GOW, N. R.; GALE, C. An Internal Polarity Landmark Is Important for Externally Induced Hyphal Behaviors in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 12-20, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2012. Brasília, DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 de Julho de 2015.
- BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 209–229, 2009.
- CAMBUIM, I. I. F. N.; MACÊDO, D. P. C.; DELGADO, M.; KEDMA DE MAGALHÃES LIMA, K. M.; MENDES, G. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J.; MAGALHÃES, O. M. C.; QUEIROZ, L. A.; NEVES, R. P. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.
- CARVALHO, K. I. M. **Efeito do geraniol sobre a doença ulcerosa péptica experimental**. 2012. 79f. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociencia de Botucatu, 2012.
- KONEMAN
CORRALOA, D. S.; HERAS-ALONSOA, M. E.; ACEBESB, L. O. Protocolo terapéutico empírico de las infecciones cutâneas. **Medicine**, v. 11, n. 47, p. 2806-2809, 2014.

CORTÉS, J. A. L.; RUSSI, J. N. A. Echinocandins. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 28, n. 6, p. 529-536, 2011.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antifúngica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p.58-66, 2009.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 670-675, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistências. **Revista Española Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169-176, 2010.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de susceptibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DIAS, M. F. R. G.; QUARESMA-SANTOS, M. V. P.; BERNARDES-FILHO, F.; AMORIM, A. G. F. SCHECHTMAN, R. C.; AZULAY, D. R. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p.764-774, 2013.

DRUGBANK. Itraconazole DB01167. 2014. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2015.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M. G. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3776-3781, 2002.

FEUERSCHUETTE, O. H. M.; SILVEIRA, S. K.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA** [periódico na internet], v. 38, n. 2, p. 31-36, 2010.

FOGANG, H. P. D.; TAPONDJOU, L. A.; HILAIREM.WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G. MAGGI, F.; PAPA, F.; VITTORIC, S. BARBONID, L. Characterization and biological activity of essential oils from fruits of *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam. and *Z. leprieurii* Guill. & Perr. two culinary plants from Cameroon. **Flavour Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p. 171–179, 2012.

FOSTER, W. G.; BRICEÑO, S. M.; CYR, D.G. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 6, p. 2893-2905, 2011.

.FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E.; MANDRELL, R.E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 6042–6048, 2004.

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**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GELDENHUYS, W.J.; GAASCH, K.E.; WATSON, M.; ALLEN, D.D.; VAN DER SCHYF, C. J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 3-4, p.127-132. 2006.

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.

GUO, N.; WU, X.; YU, L.; LIU, J; MENG, R.; JIN, J.; LU, H.; WANG, X.; YAN, S.; DENG, X. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 193–201, 2010.

GUILHERMANO, L. G.; LOPES, M. H. I.; SCHWARTSMANN, L. C. B.; SERRES, J. C. P. **Páginas da história da Medicina**. 1ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. p. 62.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SOPHIA SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. 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, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S.B.; KURUP, A. BIOORG. QSAR and ADME. **Medicinal Chemistry**. v. 12, n. 1, p. 3391–3400, 2004.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16 , n. 11, p. 997–1005, 2009.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS -FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

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.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing, an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

INCA. Declaração mundial contra o câncer. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/internacional/declaracao_mundial_contra_cancer. Acesso em 13/08/15.

JAGDALE, A. D.; KAMBLE, S. P.; NALAWADE, M. L.; ARVINDEKAR, A. U. Citronellol: a potential antioxidant and aldose reductase inhibitor from *Cymbopogon citratus*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 203-209, 2015.

JAYATILAKE, J.A. M. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental superficial candidiasis on tissue models. **Mycoses**, v. 53, n. 4, p. 285-295, 2010.

JUNIOR- VASCONCELOS, A. A.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A. • Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of *Candida* spp. Isolated from Urine. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 125-130, 2011.

JUNIOR- VASCONCELOS, A. A.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. S. O.; BRAZ, B. H. L.; CAPELO, L. G.; SILVA, C. L. F. Comparison of microdilution broth and disk diffusion for antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 135-142, 2012.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Pharmacology Examination & Board Review**. 10 ed. New York (NY): Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2012. p. 420.

KELLY, S. L.; ARNOLDI, A.; KELLY, D. E. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 4, p. 1034-1038, 1993.

KHAN, S.M.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.

KHOT, P. D.; SUCI, P. A.; MILLER, R. L.; NELSON, R. D.; TYLER, B. J. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and β -1,6-glucan pathway genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3708-3716, 2006.

KIM, J.; SUBDERY, P. *Candida albicans* Major Human Fungal Pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KIRAZ, N. U.; YASEMIN, O. Z. A distribuição das espécies e susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Candida* de um hospital universitário na Turquia ao longo de um período de 5 anos. **Medical Mycology February**. v. 49, n. 2, p. 126–131, 2011.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN, W. C. J. **Diagnostic microbiology**. Texto Atlas. Editora médica Panamericana 2ed. 1993. p. 452-485.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN, W. C. J. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. São Paulo: Médica e Científica Ltda, 2008. p. 1565.

KPOVIESSI, S.; BERO, J.; AGBANI, P.; GBAGUIDI, F.; KPADONU-KPOVIESSI, B.; SINSIN, B.; ACCROMBESSI, G.; FREDERICH, M.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal, Ethnopharmacology**, v. 151, p. 652–659, 2014.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 44, p. 12-17, 2015.

LIMA, C. S. A. AMORIM, E. L. C.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A. H. Gentry (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 77-81, 2003.

LINARES, C. E.; GIACOMELLI, S. R.; ALTENHOFEN, D.; ALVES, S. H.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M. R. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 752–758, 2013.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DIMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p.227-233, 2010.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178–184, 2010.

LOURENÇO, A. Microbiologia, 2015. Disponível em: <<http://www.microbiologia.vet.br>>. Acesso em: 24 de Fevereiro de 2015.

- LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. R.; MAYCON M. REBOREDO, M. M.; VINÍCIUS C. FARIA, V. C.; SÁ, R. C. S. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia férrea*. **Anais da Academia Brasileira Ciências**, v. 82, n. 4, p. 907- 914, 2010.
- MAHBOUBI, M.; BIDGOLI F. G. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 771-774, 2010.
- MAHMOUDABADI, A. Z.; NAJAFYAN, M.; ALIDADI, M. CLINICAL STUDY OF CANDIDA VAGINITIS IN AHVAZ, IRAN AND SUSCEPTIBILITY OF AGENTS TO TOPICAL ANTIFUNGAL. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 607-610, 2010.
- MARCHANT, C. A. Computational toxicology: a tool for all industries. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 2, n.3, p. 424-434, 2012.
- MAROSZYŃSKA, M.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; KATARZYNA RAJKOWSKA, K.; MAROSZYŃSKA, I. Antibiotics sensitivity of Candida clinical and food-borne isolates. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 719-724, 2013.
- MARR, K. A.; SEIDEL, K.; WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A. Candidemia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients: Evolution of Risk Factors after the Adoption of Prophylactic Fluconazole. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 309–16, 2000.
- MARTINS, E. A.; GUERRER, L. V.; CUNHA, K. C.; SOARES, M. M. C. N.; ALMEIDA, M. T. G. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 5, p. 596-598, 2007.
- MAZUELOS, E. M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Actividad in vitro de anidulafungina. Comparación con la actividad de otras equinocandinas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 14, p. 7-13, 2008.
- MAYER, F. L.; HUBE, B.; WILSON, D. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDOÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S.; ROLIM-NETO, P. J. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.
- MUKHERJEE, P. K., SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163 – 194, 2005.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 627- 642.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidence of fungic infections in surgery patients: a retrospective approach. **Revista Associação Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico-SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49-58, 2013.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

National Committee for Clinical Laboratories Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Nccls 17: Document m 27-A2. NCCLS, 2002.

NEGRI, M.; SILVA, S. HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1399-1412, 2012.

NOBREGA, J. R.; OLIVEIRA, W. A. Estudo da associação entre o carvacrol e antifúngicos contra espécies de *candida não-albicans*. **XI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**, 2012.

NUNES, E. B.; MONTEIRO, J. C. M. S.; NUNES, N. B., PAES, A. L. V. Antifungal sensitivity profile for the *Candida* genus in a reference hospital in Northern Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A. A.; FERNANDES, H. M. B.; SOUSA, J. P.; MAIA, G. L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, T. L. Antibacterial activity of flavonoid 5.7.4⁷-trimethoxyflavone isolated from *Praxelis clematides* R.M. King & Robinson. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 4, 2013.

OLIVEIRA, M. A.; BARRETO, A. A. O.; JÚNIOR, L. J. Q.; GUIMARÃES, A. G. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC**, v. 4, n. 4, p. 1292-1298, 2014.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIERA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p.77-82, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; WELLINGTON L. VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N.. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 186-190, 2007.

OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; DE SOUZA, I. A.; CORNEJO, L. C. Z. Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 60-64, 2010.

OLIVERO-VERBEL, J.; NERIO, L. S.; STASHENKO, E. E. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. **Pest Management Science**, v. 66, n. 6, p. 664-668, 2010.

OSIRIS. **ORGANIC CHEMISTRY PORTAL**. 2014 Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2015.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OWOTADE, F. J.; PATEL, M. Virulence of oral *Candida* isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. **Oral Medicine**, v. 118, n. 4, p. 455-460, 2014.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J. N.; ROBLES, J.; HSU, M. J.; REGISTER, E.; LI, W.; VYAS, V.; FAN, H.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; GILL, C.; CHREBET, G.; PARENT, S. A.; KURTZ, M.; TEPPLER, H.; DOUGLAS, C. M.; PERLIN, D. S. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264-3273, 2005.

PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO, C. R.; NASCIMENTO, E. S.; SOUSA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; SALES, W. S.; SILVA, M. R. R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. Bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 145-51, 2007.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. CANDIDÍASE - UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2014.

PEREIRA, J. M.; PAIVA, J. A. Tratamento da Candidíase Invasiva no Doente Crítico. **Revista Portuguesa de Medicina Intensiva**, v. 7, n. 1, p. 23-30, 2010.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandins class antifungal drugs. **Drug Resistance updates**, v.10, n.1, p. 121-130, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **American Journal Medicinal**, v. 125, n. 1, p. 3–13, 2012.

PIGATTO, M. C.; UCHOA, F. T.; COSTA, T. D. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, p. 86-94, 2009.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 1, p. 73-78, 2004.

QIU, J.; WANG, D.; XIANG, H.; FENG, H.; JIANG, Y.; XIA, L.; DONG, J.; LU, J.; YU, L.; DENG, X. Subinhibitory Concentrations of Thymol Reduce Enterotoxins A and B and α -Hemolysin Production in *Staphylococcus aureus* Isolates. **PLOS ONE**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2010a.

QIU, J.; FENG, H.; LU, J.; XIANG, H.; WANG, D.; DONG, J.; WANG, J.; WANG, X.; LIU, J.; DENG, X. Eugenol Reduces the Expression of Virulence-Related Exoproteins in *Staphylococcus aureus*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 76, n. 17, p. 5846- 5851, 2010b.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656–663, 2012.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials Inc.). Acute dermal irritation/corrosion study of DL-citronellol in rabbits. Unpublished Report from BBA, February. Report Number 12333. RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA, 1989.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials Inc.). Primary skin irritation tests. RIFM Report Number 3099. RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA, 1985.

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 89–93, 2010.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, (Suppl. 2), p. 2–13, 2015.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. 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.

SCHEINFELD, N. S. Cutaneous Candidiasis Treatment & Management. Medscape, 2015. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1090632-treatment> >. Acesso em: 29 de dezembro de 2015.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; T.N. MOHAMMED MUSTHAFA, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, D. R.; FERRAZ, C. M. L.; NETO-PEREIRA, B. B.; PARREIRA, D. S.; LUIZ, W.S. A CANDIDIASE NA BIBLIOGRAFIA: UM PANORAMA SINTÉTICO. **Revista Multidisciplinar Do Nordeste Mineiro**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2014.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZERED, J. In Vitro Biofilm Activity of Non-Candida albicans Candida Species. **Current Microbiology**, v. 61, p. 534-540, 2010.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, H. Infecções por Candida spp na Cavidade Oral. **Revista Odontológica Clínica Científica**, v. 12, n. 1, p. 19-22, 2013.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. Characterization and Antioxidant Activity of Essential Oils from Fresh and Decaying Leaves of Eucalyptus tereticornis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6962–6966, 2009.

SMITHY, R. Action on antimicrobial resistance. **British Medical Journal**, v. 317, n. 7161, p. 764-770, 1998.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J.; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D.; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOUSA, D. P.; GONCALVES, J. C. R.; QUINTANS-JUNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231–23, 2006.

SOUSA, E. O.; FRANCISCO STEFÂNIO BARRETO, F. S.; FABIÓLA FERNANDES GALVÃO RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira Biociência**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2011.

SRINIVAS, N. SANDEEP, K. S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B. N. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. **International Invention Journal Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 2, p. 20-29, 2014.

SUN, L. M.; LIAO, K.; LIANG, S.; YU, P. H.; WANG, D. Y. Synergistic activity of magnolol with azoles and its possible antifungal mechanism against *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 826-838, 2014.

SU, Y. W.; CHAO, S. H.; LEE, M. H.; OU, T. Y.; TSAI, Y. C. Inhibitory Effects of Citronellol and Geraniol on Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Macrophages. **Planta Medica**, v. 76, n. 15, p. 1666–1671, 2010.

TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCIONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (*Verbenaceae*) cultivados em condições semelhantes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 332.

VALEJO, F. A. M. **Transição epitélio- mesenquimal e presença de células CD44+ e CD24- como fatores de predição de metástase axilar no câncer de mama inicial**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

VANDENBOSCH, D.; BRAECKMANS, K.; NELIS, H. J. AND TOM COENYE, T. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. Biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 694-700, 2010.

VASCONCELOS, T. B. **Efeitos antiespasmódico e miorrelaxante do β -citronelol em músculo liso traqueal de ratos: potencial ação na hiper-reatividade após desafio antigênico e elucidação de mecanismo de ação**. 2013. 118f. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VIEIRA, A.; GUIMARÃES, M. A.; DAVID, G. Q.; KARSBURG, I. V.; CAMPOS, A. R. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. **Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 1, p. 8-13, 2009.

VIEIRA, T. T. P.; SOUSA, J. P.; SOARES, M. S. M.; LIMA, E. O.; PAULO, M. Q.; CARVALHO, M. F. F. P. Candidose bucal em paciente HIV positivo: relato de caso. **Odontologia Clínico- Científica**, v. 11, n. 2, p. 169-171, 2012.

WEN-LIN, L.; HE-SHING, C.; MENG-HWAN, L.; CHIA-LI, W.; CHIN-FU, L.; YING-CHIEH, T. Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 by Thymol-Related Monoterpenoids. **Planta Medica**, v. 78, n. 15, p. 1636–1638, 2012.

WILLIAMS, D. W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S., MALIC, S.; LEWIS, M. A. O. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 250-265, 2011.

WHITE, T. C. Mechanisms of resistance to antifungal agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. Washington: ASM Press, 2007. p. 1961-1971.

WHITEWAY, M.; OBERHOLZER, U. Candida morphogenesis and host-pathogen interaction. **Current Opinium in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 350-357, 2004.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit Candida albicans growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181– 1190, 2011.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE -CITRONELOL SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS**, autores **DANIELE DE FIGUEREDO SILVA (PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS-UFPB); ARATA OLIVEIRA CORTEZ COSTA (PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS-UFPB); ANDRÉ PARENTE DE BRITO BEZERRA (PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS-UFPB); ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO (DOUTOR EM FARMACOLOGIA (UFPB)/ PROFESSOR DA UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ CSTR/UFCG); EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA (PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS-UFPB)**, foi apresentado no XVIII Congresso da Federação Farmacêutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, com carga horária de 28 horas, que abordou como tema "A prescrição farmacêutica e os novos paradigmas da profissão" e teve como eixo central "Atuação clínica do farmacêutico", de 15 a 17 de outubro de 2015, no Centro de Convenções SulAmérica, no Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2015.


 Dr. Marcus Vinícius Romano Athila
 Presidente do CRF-RJ


 Dr. Carlos Santarem
 Presidente do Congresso


 Dr. Robson Roney Bernardo
 Presidente da Comissão Científica






CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico **ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE -CITRONELOL AO ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS**, autores DANIELE DE FIGUEREDO SILVA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ANA LUIZA ALVES DE LIMA PEREZ(UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); CASSIO ILAN SOARES MEDEIROS(UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ARATÁ OLIVEIRA CORTEZ COSTA(UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO(UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE); EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA(UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA);, foi apresentado no XVIII Congresso da Federación Farmacêutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, com carga horária de 28 horas, que abordou como tema "A prescrição farmacêutica e os novos paradigmas da profissão" e teve como eixo central "Atuação clínica do farmacêutico", de 15 a 17 de outubro de 2015, no Centro de Convenções SulAmérica, no Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2015.


 Dr. Marcus Vinícius Romano Athila
 Presidente do CRF-RJ


 Dr. Carlos Santarem
 Presidente do Congresso


 Dr. Robson Roney Bernardo
 Presidente da Comissão Científica



CAE: 10576.92-1 - V: 1



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico **ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE -CITRONELOL AO ANTIFUNGICO MICONAZOL SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS.**, autores DANIELE DE FIGUEREDO SILVA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); CASSIO ILAN SOARES MEDEIROS (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ANDRÉ PARENTE DE BRITO BEZERRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ANA, LUIZA ALVES DE LIMA PEREZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA); ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE); EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA);, foi apresentado no XVIII Congresso da Federação Farmacêutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, com carga horária de 28 horas, que abordou como tema "A prescrição farmacêutica e os novos paradigmas da profissão" e teve como eixo central "Atuação clínica do farmacêutico", de 15 a 17 de outubro de 2015, no Centro de Convenções SulAmérica, no Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2015.


Dr. Marcus Vinicius Romano Athila
Presidente do CRF-RJ


Dr. Carlos Santarem
Presidente do Congresso


Dr. Robson Roney Bernardo
Presidente da Comissão Científica



CAE: 10576.94-1 - V: 1



Article

Synthesis and Antifungal Activity Against *Candida* Strains of Mesoionic System Derived From 1,3-Thiazolium-5-thiolate

Isabelle N. Peixoto,* Helivaldo D. S. Souza,* Bruno F. Lira,* Daniele F. Silva,*
Edeltrudes O. Lima,* José M. Barbosa-Filho* and Petrônio F. de Athayde-Filho**

*Departamento de Química and **Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

A series of ten new compounds have been synthesized in satisfactory yields (8.5-93%) through the treatment of isopropyl mesoionic 1,3-thiazolium-5-thiolate with 2-chloro-*N*-arylamides and characterized by elemental analysis, infrared (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies. The newly synthesized compounds were evaluated as new drug candidates in *in silico* study and for their antifungal activity against several strains of *Candida albicans*. *In silico* study indicates that no compound has potential to be a new drug while four compounds showed medium to strong activity with minimum inhibitory concentration (MIC) range of 256-1024 µg mL⁻¹.

Keywords: isopropyl mesoionic derivatives, antifungal activity *in silico*

Introduction

Mesoionic compounds have a special place in medicinal chemistry, as they present a wide range of biological activities such as analgesic, antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, antiplatelet, antihypertensive, trombolytic, trypanocidal and leishmanicidal activities.¹⁻³ Such applications could be attributed to their peculiar chemical characteristics such as their betainic and planar characters, which allow strong interactions with biomolecules, their relatively small size, and the separation of the electron density (positive in the ring and negative in the exocyclic side chain), giving them amphiphilic properties.⁴

Among all those applications, the antimicrobial activity has been highlighted in the last decades especially due to the development of resistant fungus strains associated with drugs that are no longer effective. Because of this, nowadays, an increase in research for new antimicrobial agents is observed, in an attempt to control the significant increase of fungus infection in recent years, which has resulted in morbidity and mortality.^{5,10}

In the present study, the potential of mesoionic derivatives of 1,3-thiazolium-5-thiolate system (specifically 2-(*γ*-chlorophenyl)-3-methyl-4-(*γ*-isopropylphenyl)-1,3-thiazolium-5-(*N*-arylamide)thiochloridates) 7a-j

against five strains of *Candida albicans* was evaluated, as well as their theoretical potential as new drug candidates through *in silico* studies evaluating Lipinski's rule of five, topological surface area (TPSA), solubility (log S), adsorption percentage (%AB S), drug likeness and drug score.

Experimental

Chemistry

All used reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich, and used without further purification. The purification of compounds mesoionic isopropyl 1,3-thiazolium-5-thiolate 5 and 2-chloro-*N*-arylamides 6a-j were performed by re-crystallization in ethanol and water (1:1). The structures of the new compounds 7a-j were confirmed by elemental analysis on an Cado Erba EA 1110 elemental analyzer; infrared spectra (IR) on a Shimadzu IR Prestige-21 FTIR spectrometer (using KBr pellets); ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra obtained on a Varian Mercury 200 MHz; and melting range on an MQA PF-3 hotplate. Deuterated chloroform (CDCl₃) was used as the solvent and tetramethylsilane (TMS) was used for the internal standard. Chemical shifts (δ) were measured in parts per million (ppm), and the coupling constants (J) in hertz (Hz).

*e-mail: athayde-filho@quimica.ufpb.br



Activity anti-*Candida albicans* and Effects of the Association of β -citronellol with Three Antifungal Azoles

Daniele F. SILVA*, Ana C.L. SILVA, Hermes DINIZ-NETO,
Helôisa M.B.F. OLIVEIRA, Cassio I.S. MEDEIROS, Júlio A. PEREIRA,
Janiere P. SOUSA, Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO & Edeltrades O. LIMA

Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2 University Hospital Ana Bezerra,
Federal University of Rio Grande of Norte, Santa Cruz, Rio Grande of Norte, Brazil.

SUMMARY. *Candida albicans* is the main yeast agent provider opportunistic fungal infections in healthy and immunocompromised humans. This work evaluated the antifungal potential of the monoterpene β -citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) against twelve *C. albicans* strains as well as the effects of its association with three azoles. β -citronellol showed a MIC_{50%} of 128 μ g/mL, being established as strong antifungal activity and MFC_{50%} of 256 μ g/mL. High resistance rate against itraconazole (91,67%) and fluconazole (75%) was exhibited by the yeasts while it was sensitive to micónazole (66,67% of the yeasts showed growth inhibition). Synergism was prevailing on the association tests with all three azoles (66,67% for both fluconazole and itraconazole and 83,33% for micónazole). Association with the monoterpene also decreased the yeast's resistance against the azoles. β -citronellol showed activity against *C. albicans* strains, displaying optimum fungicidal potential and good interfering effect, which allows it to be considered a candidate for the development of new antifungal formulations.

RESUMEN. *Candida albicans* es la principal levadura que proporciona infecciones fúngicas oportunistas en humanos sanos e inmunocomprometidos. Este trabajo evaluó el potencial antifúngico del monoterpene β -citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) contra doce cepas de *C. albicans*, así como los efectos de su asociación con tres azoles. El β -citronelol mostró una MIC_{50%} de 128 μ g/mL, que se estableció como una fuerte actividad antifúngica y MFC_{50%} de 256 μ g/mL. Las levaduras exhibieron una alta tasa de resistencia contra itraconazol (91,67%) y fluconazol (75%) mientras que eran sensibles a micónazol (66,67% de las levaduras mostraron inhibición del crecimiento). La sinergia prevaleció en las pruebas de asociación con los tres azoles (66,67% para fluconazol e itraconazol y 83,33% para micónazol). La asociación con el monoterpene también disminuyó la resistencia de la levadura contra los azoles. β -citronelol mostró actividad contra las cepas de *C. albicans*, demostrando un potencial fungicida óptimo y un buen efecto de interferencia, lo que permite que se lo considere un candidato para el desarrollo de nuevas formulaciones antifúngicas.

INTRODUCTION

Candida yeasts are the most common fungi found in human fungal infections¹. Notably, *Candida albicans* is one of the main opportunistic pathogens, responsible for a wide range of infections varying from superficial mycosis to potentially fatal systemic syndromes, specially in immunocompromised patients².

A variety of antifungal agents are directed at treating candidiasis, they are divided into natural and synthetic, having diverse activities according to their targets^{3,4}. However, the occurrence of the resistance phenomenon, which

can be classified as microbiological (acquired or intrinsic resistance) or clinical (involving multiple factors related to the host, to the pathogenic fungus itself or to the antifungal agent), is becoming increasingly relevant due to its direct involvement with the therapeutic ineffectiveness^{5,6}. Remarkably, the azoles, one of the most used antifungal classes, are displaying an unfavorable outcome regarding the treatment of infections caused by *Candida spp.* due to this resistance effect^{6,7}. In contrast however, natural products present great molecular diversity, and a positive outlook for discoveries of new drugs

KEY WORDS: anti-*C. albicans*, association, β -citronellol.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: danielefgaroto31@gmail.com