

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

IGARA OLIVEIRA LIMA

**Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos
cital e carvacrol**

JOÃO PESSOA

2011

IGARA OLIVEIRA LIMA

Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos da defesa de doutorado para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: farmacologia

Orientadora: Profa Dra Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

JOÃO PESSOA

2011

L732a Lima, Igara Oliveira.

Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol / Igara Oliveira Lima.-- João Pessoa, 2011.
125f. : il.

Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Óleo essencial. 3. Terpenos. 4. Citral.
5. Carvacrol. 6. Cândida albicans.

UFPB/BC

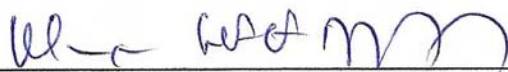
CDU: 547.9(043)

Igara Oliveira Lima

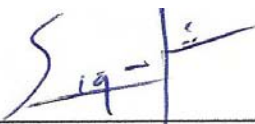
Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol

Tese de Doutorado aprovada em 11/11/2011

Banca examinadora

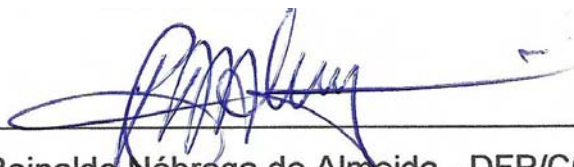


Profa Dra Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Orientadora)



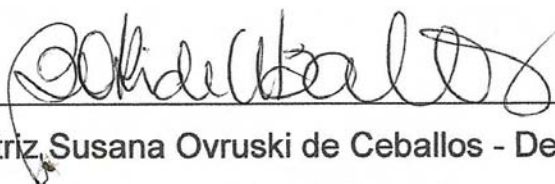
Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior - DBM/UFPB

Membro interno - Titular



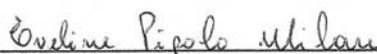
Prof Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida - DFP/CCS/UFPB

Membro interno - Titular



Profª Drª Beatriz Susana Ovruski de Ceballos - Departamento de Biologia/
CCBS/UEPB

Membro externo - Titular



Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan - Departamento de Infectologia/CCS/UFRN

Membro externo - Titular

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, pela orientação, profissionalismo e amizade;

A todos da família LABETOX, em especial o doutorando João Carlos Pita e a doutoranda Aline Xavier, que colaboraram com o experimento de toxicidade aguda;

À Profa Dra Hilzeth de Luna F. Pessoa (DBM/UFPB), pela colaboração no ensaio de estresse oxidativo e aos seus alunos;

À Profa Dra Edeltrudes de Oliveira Lima, por permitir a realização dos experimentos de atividade antifúngica no Laboratório de Micologia/DCF/CCS e a todos quem fazem parte do laboratório;

À Profa Dra Alice Costa Martins e a doutoranda Alba Fabíola Costa Torres, do Laboratório do Cultivo Celular / Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/ Faculdade de Farmácia/UFC, pela colaboração no experimento de citotoxicidade;

À Wylly A. de Oliveira, pelo constante apoio e companheirismo durante toda a minha jornada da pós-graduação;

Aos amigos e colegas da pós Kelly S. de Lira Mota, Juliana Moura Mendes, Guilherme Eduardo N. Dias e Fillipe de O. Pereira pela ajuda nos experimentos;

À minha aluna de iniciação científica Fernanda Nóbrega de Medeiros, pelo interesse e dedicação;

À José Crispim Duarte do Biotério Prof. Dr. Thomas George/LTF, pelo fornecimento dos animais e apoio técnico de fundamental importância para a execução deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro imprescindível para a execução dos experimentos;

Aos professores da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
pelas aulas e conhecimentos fornecidos;

E a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta com este trabalho.

RESUMO

LIMA, I. O. Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol. 2011. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) - UFPB/CCS, João Pessoa.

A candidíase tem sido a principal infecção fúngica relatada em ambiente hospitalar, tendo como a principal espécie envolvida a *Candida albicans*. Essa realidade tem estimulado pesquisas no intuito encontrar alternativas terapêuticas. Os terpenos tem sido fortes candidatos como agentes antifúngicos, o que necessitou investigar também sua toxicidade. O objetivo desse trabalho foi de avaliar a atividade antifúngica, o modo de ação do citral e do carvacrol, a cinética de morte microbiana e do sinergismo do carvacrol, além da toxicidade pré-clínica. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do citral foi de 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente. A CIM e CFM do carvacrol foi de 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente. O citral e o carvacrol não atuam pela via do sorbital. Apenas o carvacrol interagiu com o ergosterol, enquanto que esse e o citral foram capazes de se ligarem ao colesterol. Os monoterpenos não apresentaram sinergismo e nem antagonismo com a anfotericina B. Citral, carvacrol e anfotericina B inibiram a formação de pseudo-hifas em *C. albicans*. O citral alterou ALT e triglicerídeos dos camundongos machos, enquanto que o carvacrol alterou a AST dos mesmos no experimento de toxicidade aguda, além de terem causado alterações no consumo de água e ração dos animais. Os monoterpenos apresentaram citotoxicidade frente às células MDCKs e ambos não apresentaram efeitos oxidativos ou antioxidantes quando testados com as hemácias humanas.

Palavras-chaves: óleo essencial, terpenos, citral, carvacrol, *Candida albicans*, toxicidade aguda, MDCKs

ABSTRACT

LIMA, I. O. Antifungal activity and toxicity of monoterpenes citral and carvacrol. 2011. Thesis (PhD in Bioactive Synthetic and Natural Products, concentration area: Pharmacology) - UFPB/ CCS, João Pessoa

Candidiasis has been important fungal infection related in hospital environment, and the main specie involved is *Candida albicans*. This fact has encouraged researchers alternatives in the treatment of candidiasis. The terpenes are strong candidates like antifungal agents, however it is necessary to study the toxicity of this molecules. The aim of this study was to investigate the antifungal activity, the mode of action of citral and carvacrol, the time-kill and synergism of carvacrol, besides toxicological studies. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of citral was 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectively. The MIC and MFC of carvacrol was 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectively. These phytoconstituents did not act sorbitol view. Carvacrol interacts with ergosterol. However, the phytoconstituents citral and carvacrol are able interacting with cholesterol. The monoterpenes did not showed synergism neither antagonism with amphotericine B. They inhibited the psedo-hife formation in *C. albicans*. Citral and carvacrol altered some biochemical paramenters, water and food consumption in mice. They showed citotoxicity action in MDCKs cells and they did not have oxidative and antioxidant effect.

Key-words: essential oil, terpenes, citral, carvacrol, *Candida albicans*, acute toxicity, MDCKs

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ALT – Alanina amino-transferase

AST – Aspartato amino-transferase

ATCC – American type culture collection

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CIM – Concentração inibitória mínima

CFM – Concentração fungicida mínima

FBS – Soro bovino fetal

HCM – Hemoglobina corpuscular média

MAK – Cinase ativada por mitógeno

MDCK - Madin-Darby canine kidney

PBS – Tampão fosfato

VCM – Volume corpuscular médio

μL - Microlitros

μg – Microgramas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>C. albicans</i> . Clamidoconídios globosos no ápice das pseudo-hifas em A (400X) e B (630X)	17
Figura 2. Vias de sinalização envolvidas com a formação e desenvolvimento das hifas (via do cálcio, do AMPc e da MAPK).	17
Figura 3. Ilustração dos mecanismos de ação dos antifúngicos	21
Figura 4. Moléculas do citral (A) e do carvacrol (B).	25
Figura 5. Determinação da CFM	30
Figura 6. Estudo da cinética de morte microbiana	31
Figura 7. Estudo da associação do citral e do carvacrol com a anfotericina B	32
Figura 8. Estudo da micromorfologia do citral e do carvacrol e da anfotericina B	33
Figura 9. Ensaio de toxicidade aguda	35
Figura 10. Tempo de morte microbiana do carvacrol na concentração inibitória mínima de 256 µg/mL (C) e nas suas frações 128 µg/mL (C/2) e 64µg/mL (C/4) contra <i>C. albicans</i> (LM-13).	50
Figura 11. Tempo de morte da associação do carvacrol 256µg/mL (C) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra <i>C. albicans</i> (LM-13).	50
Figura 12. Tempo de morte da associação do carvacrol 128µg/mL (C/2) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra <i>C. albicans</i> (LM-13).	51
Figura 13. Tempo de morte da associação do carvacrol 64µg/mL (C/4) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra <i>C. albicans</i> (LM-13)	51
Figura 14. Tempo de morte microbiana do citral na concentração inibitória mínima de 512 µg/mL (C) e nas suas frações 256 µg/mL (C/2) e 128µg/mL (C/4) contra <i>C. albicans</i> (LM-13).	52
Figura 15. Tempo de morte da associação do citral 512µg/mL (C) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C),	52

0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

Figura 16. Tempo de morte da associação do citral 256µg/mL (C/2) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13). 53

Figura 17. Tempo de morte da associação do citral 128µg/mL (C/4) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13) 53

Figura 18. Aspectos da morfologia de *C. albicans*. Controle (A), no aumento de 40X e (B), no aumento de 10X; anfotericina B nas concentrações de 1 µg/mL (C) e 2 µg/mL (D), ambos em 40X; citral 512 µg/mL (E) e 1024 µg/mL (F), no aumento de 40X; carvacrol 256 µg/mL (G) e 512 µg/mL (H), no aumento de 40X 56

Figura 19. Efeito citotóxico de diferentes concentrações (512-2 µg/mL) de carvacrol em células MDCK de túbulo de rim de cachorro. A densidade inicial de células foi de 1×10^5 células/mL. O gráfico apresenta a média $\pm$ EPM (n = 3). *p < 0,001 comparado com o grupo controle 64

Figura 20. Efeito citotóxico de diferentes concentrações (512-2 µg/mL) de citral em células MDCK de túbulo de rim de cachorro. A densidade inicial de células foi de 1×10^5 células/mL. O gráfico apresenta a média $\pm$ EPM (n = 3). *p < 0,001 comparado com o grupo controle 65

Figura 21. Efeito oxidativo do citral frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença de citral nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste t' Student, *p < 0,001, comparado com PH. 67

Figura 22. Efeito antioxidante do citral frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em contato com citral nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste t' Student, *p < 0,05, ** p < 0,001, comparado com a vitamina C. 67

Figura 23. Efeito oxidativo do carvacrol frente aos eritrócitos humanos 68

tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença de carvacrol nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,001, comparado com PH

Figura 24. Efeito antioxidante do carvacrol frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença do carvacrol nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,05, ** *p* < 0,001, comparado com a vitamina C 68

Figura 25. Efeito oxidativo da anfotericina B frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em solução de anfotericina B nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,01, comparado com PH. 69

Figura 26. Efeito antioxidante da anfotericina B frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em solução de anfotericina B nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,05, ** *p* < 0,001, comparado com a vitamina C 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da CIM (n=3) de citral, carvacrol e anfotericina B contra cepas de <i>C.albicans</i> .	39
Tabela 2. Resultado da concentração fungicida mínima (CFM) dos fitoconstituintes citral e carvacrol frente às cepas de <i>C. albicans</i> .	40
Tabela 3. Determinação da CIM do carvacrol na presença e ausência do sorbitol frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e <i>C. albicans</i> LM-13.	42
Tabela 4. Determinação da CIM do citral na presença e ausência do sorbitol frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e <i>C. albicans</i> LM-13.	42
Tabela 5. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do carvacrol frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e <i>C. albicans</i> LM-13.	43
Tabela 6. Estudo do efeito do colesterol na CIM do carvacrol frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e <i>C. albicans</i> LM-13.	44
Tabela 7. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do citral frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e à <i>C. albicans</i> LM-13.	45
Tabela 8. Ensaio do colesterol com o citral frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e à <i>C. albicans</i> LM-13.	45
Tabela 9. Efeito do ergosterol na CIM da anfotericina B frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e à <i>C. albicans</i> LM-13.	47
Tabela 10. Efeito do colesterol na CIM da anfotericina B frente à <i>C. albicans</i> ATCC-40042 e à <i>C. albicans</i> LM-13.	47
Tabela 11. Consumo de água e ração dos camundongos tratados com citral (250 mg/kg) e carvacrol (250 mg/kg).	58
Tabela 12. Peso dos órgãos de camundongos machos do controle, tratados com citral (250 mg/kg, v.o.) e carvacrol (250 mg/kg, v.o.).	59
Tabela 13. Peso dos órgãos de camundongos fêmeas do controle, tratados com citral (250 mg/kg, v.o.) e carvacrol (250 mg/kg, v.o.).	59
Tabela 14. Efeito do citral (250 mg/kg) e carvacrol (250 mg/kg) frente aos parâmetros bioquímicos em camundongos machos.	60
Tabela 15. Efeito do citral (250 mg/kg) e carvacrol (250 mg/kg) frente aos	61

parâmetros bioquímicos em camundongos fêmeas.

Tabela 16. Efeito do citral (250 mg/kg) e carvacrol (250 mg/kg) frente aos parâmetros hematológicos em camundongos machos. 61

Tabela 17. Efeito do citral (250 mg/kg) e carvacrol (250 mg/kg) frente aos parâmetros hematológicos em camundongos fêmeas. 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classes de medicamentos utilizados na terapêutica antifúngica.	19
Quadro 2. Compostos terpenóides.	25

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Candidíase e <i>Candida albicans</i>	16
1.2 Epidemiologia	18
1.3 Terapêutica medicamentosa	19
1.4 Toxicologia	23
1.5 Terpenos	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Espécies fúngicas e meios de cultura	28
3.2 Produtos analisados	29
3.3 Antifúngicos-padrão	29
3.4 Inóculo	29
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)	30
3.6 Ensaio com Sorbitol	30
3.7 Ensaio do ergosterol e colesterol	30
3.8 Cinética de Morte Microbiana	31
3.9 Estudo de associação do citral e carvacrol com anfotericina B	32
3.10 Estudo do efeito dos monoterpenos e da anfotericina B sobre a micromorfologia em <i>C. albicans</i>	33
3.11 Animais e células utilizados nos ensaios de toxicidade	34
3.12 Toxicidade aguda	34
3.13 Ensaio da citotoxicidade do citral e do carvacrol frente às células MDCKs	35
3.14 Estresse oxidativo frente as hemácias	36

3.15 Análise Estatística	37
3.16 Comitês de Bioética Humano e Animal	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase e *Candida albicans*

A candidíase é uma micose ocasionada por fungos do gênero *Candida*, constituído de 81 espécies, pertencentes à família Cryptococcaceae. Dentre as espécies de *Candida*, a mais conhecida e de maior importância clínica é *C. albicans* (CAVASSANI et al., 2002).

O gênero *Candida* existe normalmente como comensal do trato gastrointestinal bem como do trato genital feminino em indivíduos sadios, entretanto as espécies em questão são patógenos oportunistas, uma vez que possuem a habilidade de causar infecções superficiais e sistêmicas (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

As leveduras formam blastoconídios por brotamento simples. Os brotos podem destacar-se da célula mãe ou permanecerem presos e alongarem-se para formar as pseudo-hifas. As pseudo-hifas diferem das hifas verdadeiras porque as células individuais são diferentes em comprimento e largura e observa-se constricção entre os blastoconídios, em contraste com as paredes paralelas e septos mais retos encontrados nas hifas verdadeiras (MINAMI, 2003; WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004; FISHER; COOK, 2001).

Uma das principais características do gênero é a versatilidade em se adaptar em diferentes ambientes e a habilidade em formar biofilmes, que correspondem à união de hifas e pseudo-hifas, o que facilita sua aderência a diversos tipos de superfícies (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004; RAMAGE et al., 2005).

A espécie *C. albicans* exibe considerável plasticidade morfogênica, sendo assim, este microrganismo pode crescer na forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras, como demonstrado na Figura 1 (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004).

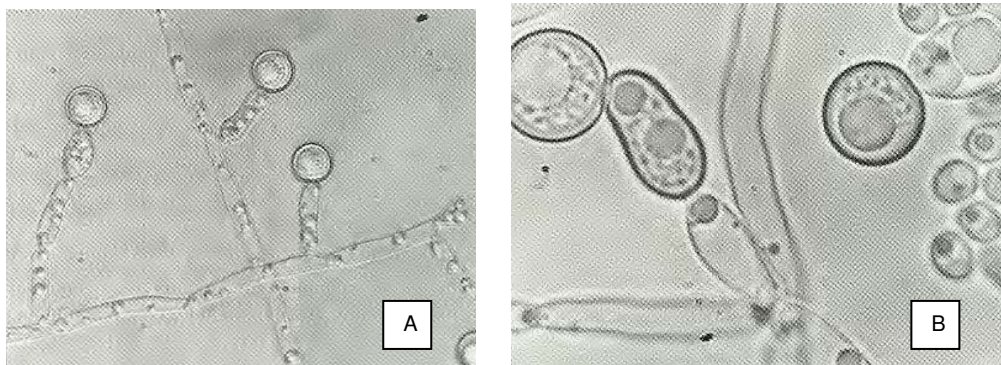


Figura 1. Cultivo de *C. albicans*. Clamidoconídios globosos no ápice das pseudo-hifas em A (400X) e B (630X) Fonte: LACAZ et al., 2002.

Os aspectos morfológicos estão correlacionados com a patogenicidade, e desta forma, os biofilmes são mais resistentes ao tratamento antifúngico (LAMFON et al., 2004). Tem sido descrito que genes específicos e vias de sinalização estão envolvidos na mudança da forma de *Candida*, como por exemplo, as vias da MAK-quinase, Ras/AMPc e a via do cálcio estão relacionadas à mudança de células isoladas para hifas e ao desenvolvimento das mesmas, conforme ilustrado na Figura 2 (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004; WHITEWAY; BACHEWICH, 2007).

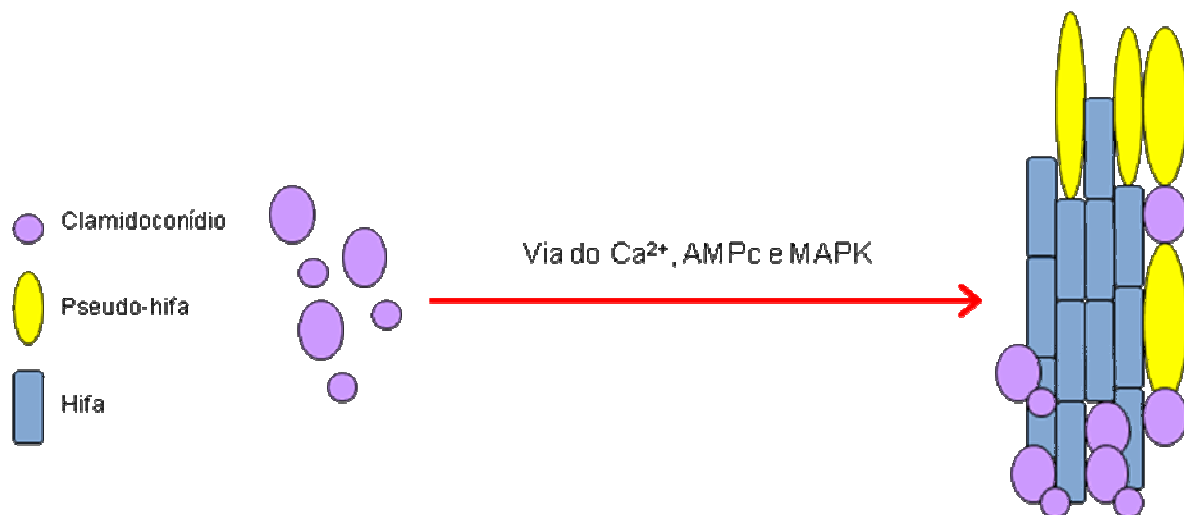


Figura 2. Vias de sinalização envolvidas com a formação e desenvolvimento das hifas (via do cálcio, do AMPc e da MAPK). Legenda: MAPK = Quinase ativada por mitógeno; AMPc = Adenosina monofosfato cíclica.

1.2 Epidemiologia

C. albicans é a causa predominante das infecções fúngicas invasivas (HORN et al., 2009), muito embora, tem sido descrito o rápido aumento de micoses causadas por espécies de *Candida* não *albicans* (RUHNKE, 2006; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011). O aumento na frequência de candidemia tem sido observado particularmente entre pacientes em uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral, e ainda naqueles pacientes expostos a múltiplos procedimentos invasivos (ZEICHNER; PAPPAS, 2006; FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008).

No Brasil, as principais espécies causadoras de candidemia são *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, diferente dos Estados Unidos da América (EUA), onde a emergência de espécies não-*albicans* parece associada ao uso de fluconazol (HINRICHSSEN, 2008). No Brasil, as espécies não-*albicans* prevalentes são sensíveis a este fármaco (HINRICHSSEN, 2008).

Tem sido relatados casos de infecções urinárias por diversos tipos de microrganismos, dentre eles as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e leveduras do gênero *Candida*, em especial, *C. albicans*. Tais investigações tem ocorrido a partir do estudo da presença desses microrganismos em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e de Unidade de Tratamento de Urgência ou UTU (MENEZES et al, 2005; GOMES et al., 2010).

Colombo et al. (2006) observaram que *Candida* spp. está entre os patógenos frequentes que são isolados em cultura de sangue, precedido por estafilococos coagulase negativos, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Nos relatos de casos, a candidemia surgiu por volta dos 19 dias, em média, após a admissão dos pacientes nas unidades hospitalares. Tais pacientes se encontravam nas UTIs, nas alas cirúrgicas ou pediátricas, apresentando a febre como principal sintoma da candidemia (COLOMBO et al., 2006). As espécies mais comuns observadas naqueles pacientes acometidos por infecções fúngicas foram a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COLOMBO et al., 2006).

1.3 Terapêutica medicamentosa

A terapêutica para tratamento das micoses por *Candida* spp. ou outras espécies fúngicas tem sido baseada na utilização de classes químicas diferentes dos antifúngicos, tal como os polienos (anfotericina B) e azólicos (fluconazol e cetoconazol), bem como equinocandinas (caspofugina), alilaminas (terbinafina) e análogos de pirimidinas (flucitosina), descritos na tabela 1 (SANGLARD;ODDS, 2002; SANGLARD, 2003; COLOMBO et al., 2006).

Quadro 1. Classes de medicamentos utilizados na terapêutica antifúngica.

Classes dos antifúngicos	Droga	Microrganismo-alvo	Modo de ação	Referência
Polienos	Anfotericina B Nistatina	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp.	Ligação ao ergosterol e desestabilização da membrana plasmática	SANGLARD;ODDS, 2002; MUKHERJEE ET AL., 2005; JOHNSON; EINSTEIN, 2007; LANIADO-LABORÍN, CABRALES-VARGAS, 2009
Azólicos	Fluconazol Itraconazol Cetoconazol Voriconazol	<i>Candida</i> spp <i>Cryptococcus</i> spp <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> spp (apenas o voriconazol)	Inibição da 14 α -lanosterol-dimetilase	SANGLARD, 2003; SANGLARD ET AL.,1998; KONTOYIANNIS; RUSSELL, 2002; MUKHERJEE ET AL., 2005
Equinocandinas	Caspofugina	<i>Aspergillus</i> spp <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida</i> spp.	Inibição da síntese da enzima β -1,3 glucana sintase	SANGLARD, 2002.
Alilaminas	Terbinafina	Maioria dos dermatofitos Baixa atividade contra <i>Candida</i> spp.	Inibição da esqualeno epoxidase	SANGLARD, 2003
Análogos de pirimidina	Flucitosina	<i>Cryptococcus</i> spp <i>Candida</i> spp	Impede a biossíntese de ácidos nucleicos	SANGLARD, 2003; MUKHERJEE et al., 2005

Os análogos da pirimidina, como a flucitosina agem impedindo a biossíntese de ácidos nucleicos pela formação do antimetabólito tóxico 5-fluoracil, que age inibindo a timidilato sintetase e consequentemente, a síntese de DNA (SANGLARD, 2003; MUKHERJEE et al., 2005). A flucitosina tem sido utilizada principalmente em associação com a anfotericina B e contra infecções sistêmicas ocasionadas por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (SANGLARD, 2003).

A caspofugina apresenta ação fungicida contra as leveduras do gênero *Candida* e ação moderada frente *Aspergillus* spp., além de pobre atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (SANGLARD; ODDS, 2002; KONTOYIANNIS; RUSSELL, 2002; MUKHERJEE et al., 2005). A mesma inibe a síntese da enzima β -1,3 glucana sintase, que resulta na inibição da síntese da parede celular (SANGLARD, 2002).

Sanglard et al. (1998); Kontoyiannis; Russell, (2002) e Mukherjee et al. (2005) relataram que os antifúngicos azólicos (itraconazol, cetoconazol e fluconazol) agem inibindo a enzima citocromo P450 14 α -lanosterol-dimetilase causando a inibição da síntese de ergosterol. Tais agentes têm sido utilizados para o tratamento de infecções fúngicas superficiais e profundas (SANGLARD, 2003).

O uso do fluconazol tem sido voltado para micoses causadas por leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. Sendo este azólico menos eficaz contra a espécie *Candida glabrata* e inativo para *C. krusei* e fungos filamentosos (KONTOYIANNIS; RUSSELL, 2002; SANGLARD, 2003). Entretanto o itraconazol e o voriconazol apresentam ação antifúngica contra alguns fungos filamentosos, a exemplo do *Aspergillus* spp (SANGLARD, 2003).

Os polienos, a exemplo da anfotericina B, interagem com o ergosterol presente na membrana dos fungos, causando formação de canais na membrana tendo como resultado a despolarização e aumento da permeabilidade da mesma aos prótons e cátions monovalentes e por conseguinte, saída do conteúdo citoplasmático pelos canais e morte celular (SANGLARD; ODDS, 2002; MUKHERJEE et al., 2005; JOHNSON; EINSTEIN, 2007; LANIADO-LABORÍN, CABRALES-VARGAS, 2009). A anfotericina B tem sido amplamente utilizada para o tratamento de micoses profundas (SANGLARD; ODDS, 2002). Na figura 3, apresenta-se o esquema do modo de ação geral de cada classe antifúngica.

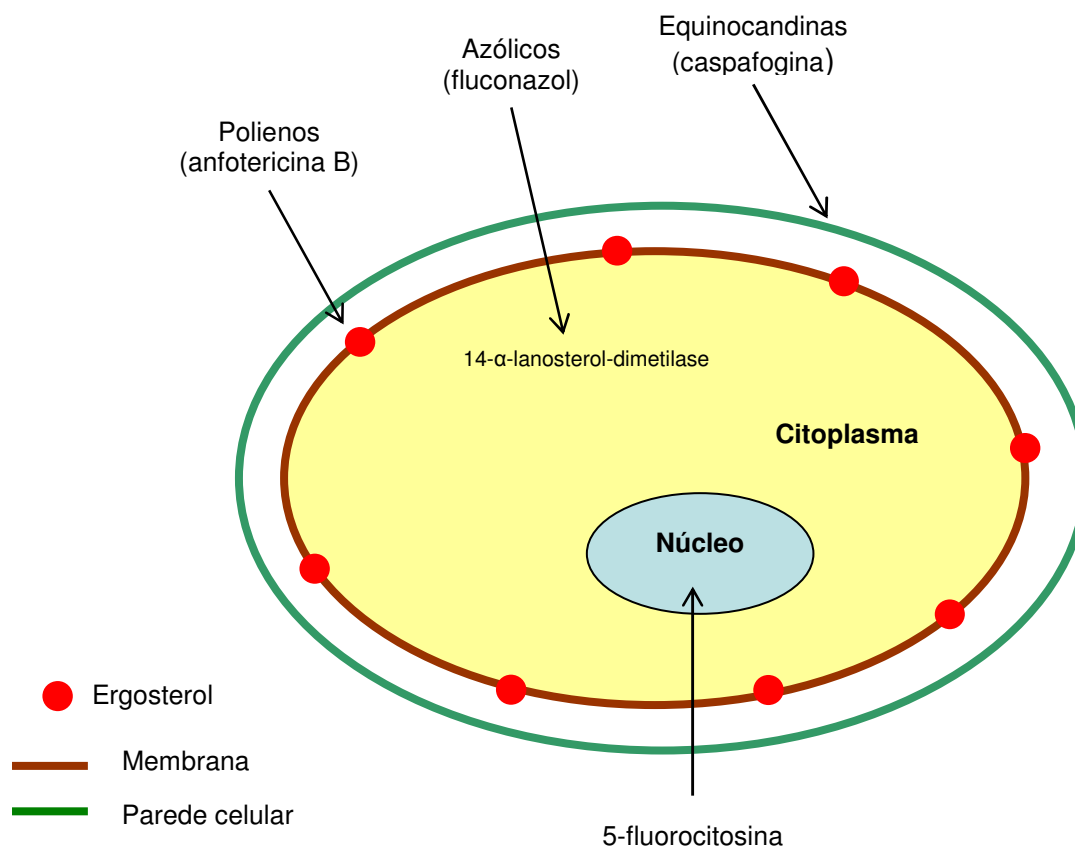


Figura 3. Ilustração dos mecanismos de ação dos antifúngicos. Esquema baseado na referência de Mukherjee et al. (2005).

Efeitos tóxicos estão presentes em diversos tipos de medicamentos, e neste sentido, deve-se buscar o tratamento mais eficaz e menos tóxico para o paciente.

Tem sido desenvolvido preparações lipídicas da anfotericina B na tentativa de diminuir seus efeitos tóxicos, entretanto, em função do alto custo e da existência de tratamento antifúngico com azólicos e equinocandinas, tais preparações tem sido uma terapia de segunda linha (FLÜCKIGER et al., 2006).

Efeitos tóxicos agudos da anfotericina B como náusea, vômitos, febre, hipertensão/hipotensão e hipóxia tem sido relatados (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Além desses, manifestações clínicas relacionadas ao sistema renal tem sido descritas e incluem insuficiência renal, hipocalcemia e perda de magnésio (BAGNIS; DERAY, 2002). Outros efeitos indesejados como a anemia, que ocorre em mais de 75% dos pacientes em tratamento com a anfotericina B,

sendo acompanhada com trombocitopenia, tem sido outro fator preocupante na terapêutica antifúngica com tal fármaco (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Os azólicos, em especial o itraconazol, têm demonstrado hepatotoxicidade grave, sendo este um fator importante a ser considerado na terapêutica antifúngica (BENNET, 2006). Além disso, tem sido relatado os efeitos teratogênicos em animais de laboratório, tendo como exemplo anormalidades craniofaciais, malformações do esqueleto axial e defeitos no sistema límbico (GIAVANI; MENEGOLA, 2010).

A flucitosina, por exemplo, pode deprimir a medula óssea e levar a leucopenia e trombocitopenia, e tal efeito adverso é mais freqüente em pacientes que possuem algum tipo de distúrbio hematológico ou ainda tratados com radioterapia ou fármacos que lesionam a medula óssea (BENNET, 2006).

A resistência microbiana tem sido outro fator preocupante nas infecções fúngicas. O uso inadequado dos antimicrobianos, de uma forma geral, tem resultado no surgimento de microrganismos resistentes, tais como bactérias, fungos e protozoários. Dentro deste contexto, surgem conseqüências na clínica médica em que os pacientes com infecções fúngicas não obtêm respostas no tratamento contra tais enfermidades.

A resistência clínica é considerada um tipo de resistência antifúngica, a qual se refere à falha do antifúngico em eliminar uma determinada cepa, que foi sensível nos testes *in vitro* de sensibilidade, entretanto, a terapêutica não é eficaz (KONTOYIANNIS; RUSSELL, 2002; SANGLARD; ODDS, 2002). Este tipo de resistência tem sido relatado mais comumente em pacientes com o sistema imunológico comprometido, em função de enfermidades como a AIDS ou tratamento com medicamentos que venham causar uma falha no sistema imunológico (ALEXANDER; PERFECT, 1997; KONTOYIANNIS; RUSSELL, 2002).

Existem vários mecanismos envolvidos com o processo da resistência fúngica, como o aumento da regulação das bombas de efluxo, alteração da seqüência de aminoácidos da enzima citocromo P450 14 α -lanosterol-dimetilase e alteração do perfil de membrana (SANGLARD; ODDS, 2002).

1.4 Toxicologia

O estudo toxicológico pré-clínico de uma substância é uma etapa importante para o uso seguro dessa substância na saúde humana, uma vez que tem como objetivo caracterizar os efeitos toxicológicos a partir de sua administração (EATON; KLAASSEN, 1996).

Além disso, estudos toxicológicos pré-clínicos buscam, entre outras, informações sobre quais doses são capazes de causar efeitos tóxicos em animais de laboratório (BRITO, 1996). Assim, segundo os princípios básicos da toxicologia, toda substância pode comportar-se como um agente tóxico, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo de frequência de exposição e das vias de administração (BARROS; DAVINO, 2008).

Produtos naturais sejam extratos, frações ou fitoconstituintes, devem ser estudados através de métodos idênticos que avaliem a segurança e a eficácia, de modo semelhante aos compostos sintéticos. Desse modo, tais métodos incluem ensaios pré-clínicos e clínicos, sendo este último conduzido de acordo com regulamentações federais (TALALAY; TALALAY, 2001).

Dentre os vários métodos ou testes empregados para avaliar efeitos colaterais e toxicológicos o teste de toxicidade aguda tem a finalidade de definir a toxicidade intrínseca do composto; identificar órgãos-alvos da substância ou amostras estudadas; e selecionar doses para estudo de longa duração (SÁ; ALMEIDA, 2006)

A Resolução RE 90 (2004) determina que para se avaliar os efeitos tóxicos agudos de amostras vegetais, deve-se utilizar a mesma via de administração proposta para o uso do produto, usar machos e fêmeas mamíferos e de idade adulta. Devem ser avaliados sinais de toxicidade durante as primeiras 24 horas e também a variação de peso dos animais e o consumo de água e ração; além destas recomendações, os animais sobreviventes devem ser eutanasiados e autopsiados, a fim de realizar procedimentos que permitam estudos dos órgãos acometidos.

A Triagem Comportamental permite avaliar se uma determinada droga modifica a atividade cerebral, através do registro de alguns sinais ou alterações de condutas apresentados pelos animais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Assim, esse modelo permite avaliar se determinadas drogas apresentam toxicidade,

possibilitando o estudo farmacológico de plantas e/ou fitoconstituintes com uma determinada margem de segurança (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

A citotoxicidade tem sido definida como os efeitos adversos resultantes da interferência dos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e funções comuns a todas as células do organismo (EKWALL, 1995). Os estudos de citotoxicidade fornecem informações a respeito da ação potencial tóxica de moléculas estudadas de forma mais rápida e com menos custo que os estudos *in vivo*. Neste tipo de ensaio, pode ser avaliada a morte, a viabilidade, os aspectos morfológicos, a integridade da membrana celular, o crescimento e a proliferação das células (CASTAÑO; LECHÓN, 2005).

Para expressar a citotoxicidade basal, utiliza-se a IC_{50} , ou seja, a concentração que afeta 50% das células comparado com as células não-tratadas (controle) com a substância (CASTAÑO; LECHÓN, 2005). Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações das substâncias a serem estudadas por um determinado tempo, depois do qual, o grau de inibição das funções celulares basais é avaliado (CASTAÑO; LECHÓN, 2005). Existem vários métodos utilizados para se testar a toxicidade nas pesquisas de toxicologia *in vitro*. Um dos métodos mais utilizados é a avaliação da citotoxicidade basal por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazol (MTT) (CASTAÑO; LECHÓN, 2005).

No estudo *in vitro*, pode ser utilizado tipos celulares diferentes, como células derivadas dos túbulos distais de rins de cachorro (MDCK), que são células epiteliais de revestimento do túbulo distal do néfron (ZHANG; SUZUCK; TOHYAMA, 1995); eritrócitos humanos em que pode ser avaliada a capacidade da droga em estudo causar hemólise, estresse oxidativo ou possuir ação antioxidante (ARBOS et al., 2008).

1.5 Terpenos

Os óleos essenciais, obtidos de plantas, são misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas. Os mesmos possuem outras características como sabor acre ou ácido; cor ligeiramente amarelada ou incolor; são instáveis na presença da luz, calor, umidade e metais. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas,

fenóis, ésteres até compostos com enxofre (SPITZER, 2004). Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes amplamente distribuídos na natureza (SPITZER, 2004; VILLA et al., 1998).

Os terpenos são constituintes que fazem parte da composição dos óleos essenciais, que por sua vez são empregados na indústria na produção de perfumes e cosméticos, além de apresentarem efeitos farmacológicos (EDRIS, 2007).

Os compostos terpenóides têm sua origem biossintética das unidades do isopreno, que por sua vez é originado a partir do ácido mevalônico (SPITZER, 2004). Os compostos terpênicos são divididos, de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C); triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenóides (n C) (SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Nº de Unid.	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	isopreno
2	10	monoterpenóides
3	15	sesquiterpenóides
4	20	diterpenóides
5	25	sesterpenos
6	30	triterpenóides
8	40	tetraterpenóides
n	n	polisoprenóides

Quadro 2. Compostos terpenóides. Fonte: SPITZER,2004.

O citral e o carvacrol (Figura 4) são terpenos presentes em diversos óleos essenciais, e no caso de alguns óleos, correspondem ao constituinte majoritário (BAKKALI et al., 2008).



Figura 4. Moléculas do citral (A) e do carvacrol (B).

Garcia et al. (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana do citral frente às espécies fúngicas *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium subglutinans*. Tal fitoconstituente tem apresentado ação contra cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer* (SADDIQ; KHAYYAT, 2010).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, que possui o citral como constituinte majoritário, apresentou ação frente à cepas clínicas do gênero *Malassezia* isoladas de pacientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (CARMO, 2011).

O carvacrol é um monoterpeno que possui diversos estudos biológicos contra diferentes microrganismos. Nostro et al (2004) demonstraram a ação antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes. O mesmo foi capaz de inibir a formação de biofilmes de espécies do gênero *Candida* (DALLEAU et al., 2008)

Tem sido registrada a ação antibacteriana do carvacrol contra 13 sorotipos de *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2007), bem como a ação antimicrobiana do óleo essencial do *Origanum vulgare*, em que o carvacrol corresponde ao constituinte majoritário, contra fungos do gênero *Aspergillus* (BASILICO;BASILICO, 1999).

Diante das considerações, se faz necessária a realização pesquisas na perspectiva de se investigar novos fármacos para o tratamento das doenças fúngicas, além de avaliar a toxicidade dos monoterpenos acima relatados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica e toxicológica de monoterpenos citral e carvacrol.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) dos fitoconstituintes citral e carvacrol;
- Analisar a ação dos constituintes citral e carvacrol sobre a parede celular e avaliar da interferência do ergosterol e colesterol frente à CIM no intuito de nortear o possível mecanismo de atividade;
- Determinar a cinética de morte microbiana e estudar a possível interação dos constituintes e da anfotericina B utilizando a cinética de morte microbiana;
- Investigar a toxicidade pré-clínica dos fitoconstituintes, através dos estudos de citotoxicidade frente às células MDCKs e da realização do ensaio de toxicidade aguda em camundongos;
- Estudar o efeito antioxidante e oxidativo do citral e carvacrol utilizando eritrócitos humanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies Fúngicas e Meios de Cultura

As cepas de leveduras de *Candida albicans* (ATCC-40042, ATCC 13803, ATCC 76485) utilizadas pertenceu à Micoteca do Laboratório de Micologia / Departamento de Ciências Farmacêuticas / CCS / UFPB.

As demais cepas de *C. albicans* (LM-13, LM- 36, LM-39, LM-41, LM-45, LM-52, LM-57, LM-67, LM-68, LM-70, LM-77, LM-84, LM-86) são de origem clínica, fazem parte da Coleção do Laboratório de Microbiologia e foram cedidas pelo Prof Dr. Everardo Albuquerque Menezes e Francisco Afrânio Cunha, do Laboratório de Microbiologia / Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Ceará.

A cepa LM - 67 foi obtida de lavado broncoalveolar, LM - 70 de urina, LM - 84 da secreção vaginal e as demais de sangue de pacientes HIV-negativos do Hospital Geral de Fortaleza. A identificação foi realizada pela técnica de micromorfologia em Ágar Arroz Tween 80, produção do tubo germinativo e identificações bioquímicas, bem como por testes moleculares (MENEZES et al., 2009; GOMES et al., 2010, VASCONCELOS-JÚNIOR,2011)

As mesmas foram estocadas em Ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO) e mantidas a 28 -30 °C (temperatura ambiente) e a 4º C.

Na execução dos testes para avaliação da atividade antifúngica dos produtos, foram utilizados meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, caldo Sabouraud Dextrose e Ágar Arroz (DIFCO - Laboratories Ltda). O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em placas e/ou tubos de ensaios adequados para os ensaios microbiológicos.

3.2 Produtos analisados

Os produtos citral e carvacrol foram obtidos comercialmente da Sigma Aldrich. Para solubilizar os monoterpenos, foi utilizado tween 80 (Sigma Aldrich) a 1%, concentração que não interfere no crescimento fúngico.

3.3 Antifúngicos-padrão

Para o controle positivo da atividade antifúngica do citral e do carvacrol testados, foi utilizada a anfotericina B obtida pela indústria Sigma Aldrich.

3.4 Inóculo

As cepas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 (ou até 72) horas a 37 °C, ajustada para a escala 0,5 McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

Os ensaios para a avaliação da atividade antimicrobiana dos produtos naturais e sintéticos sobre fungos foram realizados conforme os Protocolos de CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI 2002; ELOFF, 1998.

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados foi realizada pela técnica da microdiluição em Placa de 96 orifícios e fundo em “U” para cada uma das cepas. Através da diluição seriada a uma razão de 2, foram obtidas as concentrações de 1024 a 1 µg/mL, efetuadas na própria placa, da coluna 1 até a 11. A última coluna (12) foi reservada para o controle de crescimento do microrganismo (caldo Sabouraud dextrose, sem o produto testado). Foi realizado o controle com o antifúngico padrão sintético (anfotericina B).

Em seguida, foi adicionado 10µL do inóculo (fungo a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 37°C no período de 24-48 horas para *C. albicans*. Após o tempo de incubação adequado, 20 µL de cloreto de trifeniltetrazolio-TTC a 1% (SIGMA), indicador colorimétrico de óxido-redução para leveduras foi adicionado (DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE et al., 2005) e a leitura foi procedida, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da observação da mudança da coloração da solução de incolor para rosa/vermelho indicando crescimento do microrganismo.

Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador.

Para determinar a CFM, 10µL de volume foi retirado da cavidade em que não houve crescimento fúngico (CIM/2, CIM e 2xCIM) e este volume foi semeado em placas com Agar Saouroud Dextrose, conforme ilustrado na figura 5. O material foi incubado a 35°C durante 24-48 horas e em seguida, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs). A CFM foi considerada como a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento fúngico até o número de três UFCs (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999; CANTÓN et al., 2003; COSTA et al., 2008).

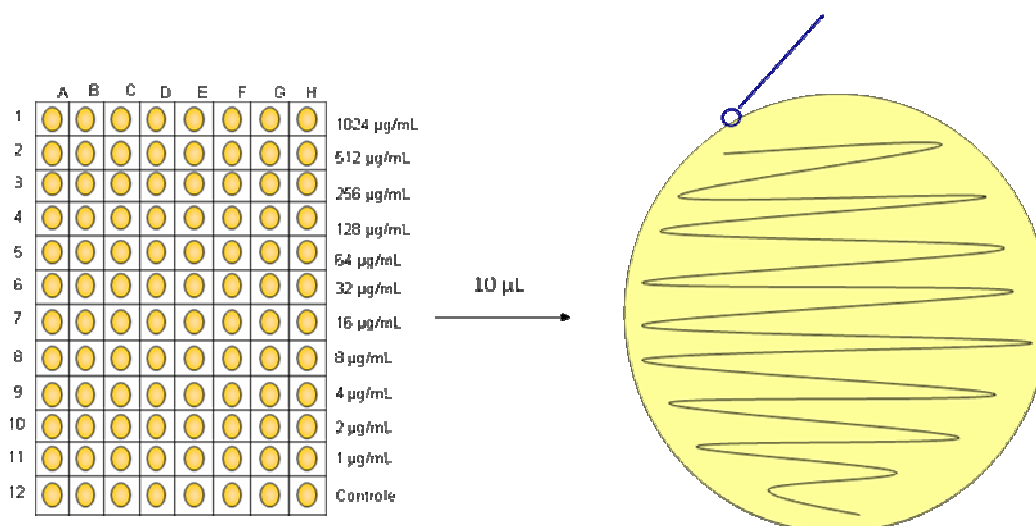


Figura 5. Determinação da CFM.

3.6 Ensaio com Sorbitol

Para investigar o modo de ação dos fitoconstituintes, foi utilizado o ensaio de sorbitol através da técnica de microdiluição. O citral e carvacrol foram testados na presença e ausência do sorbitol 0,8M (Sigma-Aldrich®), utilizando as cepas ATCC-40042 e LM - 13 (CLSI, 2002, FROST et al., 1995).

3.7 Ensaio do ergosterol e colesterol

Este ensaio foi realizado pelo método de microdiluição (CLSI M27-A2) e de acordo com ESCALANTE et al. (2008) com algumas modificações. A CIM do citral e

carvacrol frente às cepas ATCC-40042 e LM - 13 foram determinados pela técnica de microdiluição na presença e ausência do ergosterol (Sigma-Aldrich®) e colesterol (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizada a anfotericina B e o controle que foi constituído de meio de cultura com veículo e inóculo.

3.8 Cinética de Morte Microbiana

O comportamento dos terpenos ao longo do tempo foi estudado utilizando cepa viável de *C. albicans* LM - 13, através da contagem de tais células na presença ou ausência de carvacrol (CIM/2; CIM; 2x CIM), durante o período de 0, 2, 4, 8, 24h, conforme ilustrado na figura 6 (KEELE et al., 2001; ERNST et al., 1996; ERNST et al., 1999; KLEPSEK et al., 1998).

Para avaliar a ação fungistática e fungicida do carvacrol e do citral, foi realizada a comparação do efeito deste fitoconstituente na quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do carvacrol e do citral no tempo de 24 horas com seu respectivo inóculo inicial (tempo zero). Desta forma, foi considerada ação fungicida quando a redução foi maior que $3\log_{10}$ ou 99,9% de UFC comparado com o inóculo inicial (KLEPSEK et al., 1998; LEWIS et al., 2000).

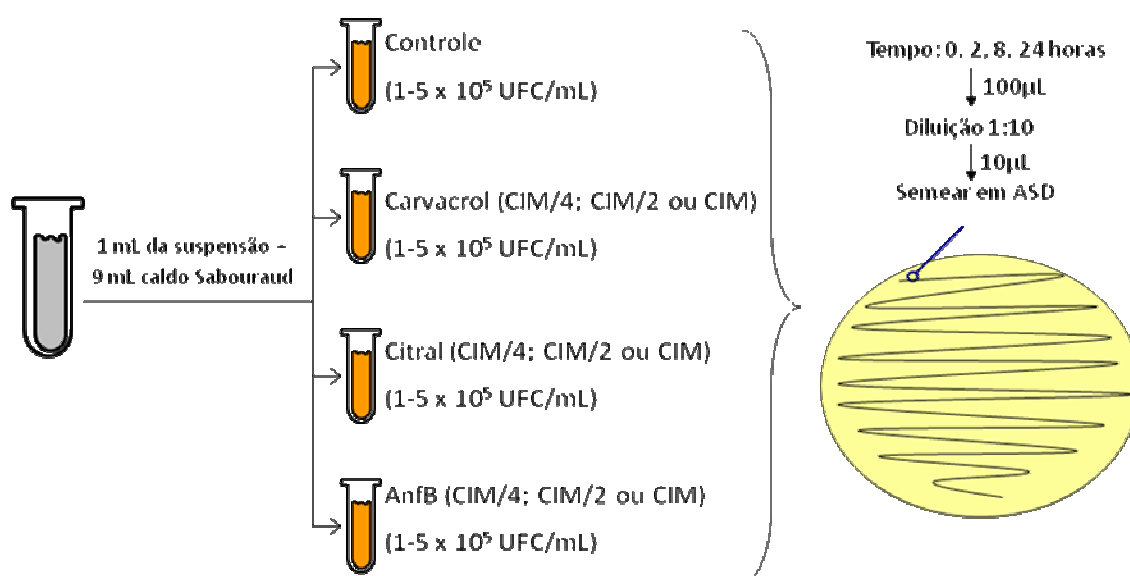


Figura 6. Estudo da cinética de morte microbiana.

3.9 Estudo de associação do citral e do carvacrol com anfotericina B

O estudo de interferência do fitoconstituente selecionado sobre a viabilidade das cepas microbianas foi realizado através do método de contagem de células viáveis para os fungos leveduriformes. Neste ensaio foi observado o comportamento da cepa de levedura frente à associação do carvacrol ou citral com a anfotericina B (CIM e CIM/2). Inicialmente, 0,5 mL da suspensão microbiana foi inoculada em 4,5 mL de caldo Sabouraud a 37°C. Nos intervalos de 0, 2, 4, 8, 24 horas pós-incubação, uma alíquota de 10µL da suspensão foi uniformemente inoculada em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose, conforme ilustrado na figura 7. O controle foi constituído por caldo Sabouraud adicionado do inóculo para solubilizar o citral e o carvacrol (KEELE et al., 2001; ERNST et al., 1996; ERNST et al., 1999; KLEPSE et al., 1998).

Foi considerado efeito sinérgico quando a diferença entre a UFC/mL da combinação (fitoconstituente e antifúngico) e a UFC/mL do constituinte mais ativo no tempo de 24 horas foi maior ou igual que $2\log_{10}$. Quando esta diferença foi entre 2 e $1\log_{10}$, a ação foi classificada como aditiva, quando foi inferior à $1\log_{10}$, foi considerada indiferente. Foi considerado antagonismo, quando a diferença do valor da UFC/mL da combinação comparado com o valor da UFC/mL da droga mais ativa foi superior a $2\log_{10}$. (WHITE et al., 1996; KEELE et al. 2001; LEWIS et al 2002; ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996).

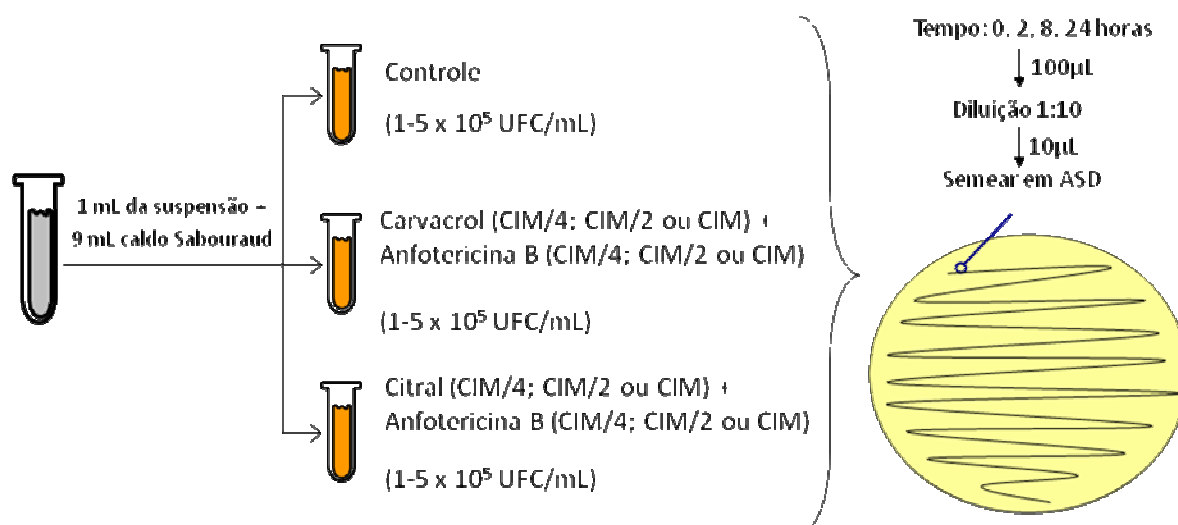


Figura 7. Estudo da associação do citral e do carvacrol com a anfotericina B.

3.10 Estudo do efeito dos monoterpenos e da anfotericina B sobre a micromorfologia em *C. albicans*

Para observação das alterações morfológicas das cepas de *C. tropicalis* foi empregada a técnica do microcultivo para leveduras, utilizando o meio Ágar Arroz em câmara úmida (SIDRIM; ROCHA, 2004; KURTZMAN; FELL, 1998). Considerando os resultados que foram obtidos na determinação das CIMs dos produtos avaliados sobre as mesmas cepas deste estudo, foram adicionadas quantidades suficientes das emulsões do óleo essencial e anfotericina B, ao meio de cultura agar-arroz, nas variadas concentrações dos produtos no referido meio (CIM e 2 x CIM).

Foi depositado 3 mL de Ágar Arroz, associados aos produtos teste, nas respectivas concentrações, fundidos sobre uma lâmina estéril, contida sobre um suporte (outra lâmina) dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, foi semeada a levedura, com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo 02 estrias paralelas. As estrias foram cobertas com lamínulas esterilizadas. Para evitar ressecamento do meio, durante o período de incubação, foi preparada uma câmara úmida, acrescentando 2 mL de água destilada sobre o papel de filtro (3x3 cm) estéril na placa, conforme ilustrado na figura 8. A placa foi fechada e após 24 h, a preparação foi examinada em microscópio óptico, a fim de observar a presença de estruturas características como pseudo-hifas e blastoconídios.

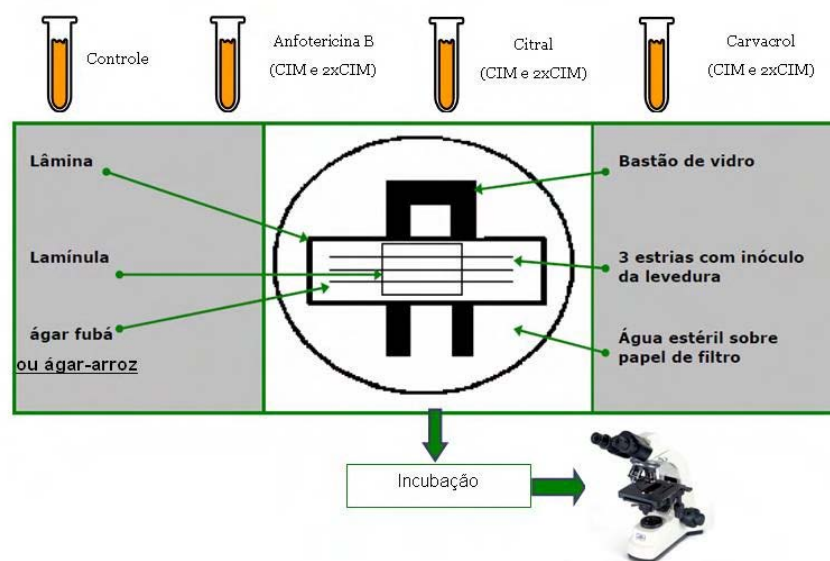


Figura 8. Estudo da micromorfologia do citral e do carvacrol e da anfotericina B (Fonte: ANVISA, 2004).

3.11 Animais e células utilizados nos ensaios de toxicidade

Para a realização do ensaio de toxicidade aguda, foram utilizados camundongos *Mus musculus* linhagem Swiss do Biotério Thomas George. Os animais foram mantidos a uma temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e em ciclos de claro e escuro de 12h.

Os eritrócitos humanos utilizados para a realização do experimento de estresse oxidativo em hemácias foram obtidos a partir de bolsas de sangue adquirida do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW). Estes experimentos foram realizados no laboratório Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR) / DBM/CCEN/UFPB.

As células (Madin-Darby canine kidney) foram cedidas pela Profa Júlia Manso Alves, Laboratório de Bioquímica / Instituto de Química / USP. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular / Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/UFC.

3.12 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado na RE 90/2004 e em ALMEIDA et al., 1999. Para avaliar o efeito toxicológico dos fitoconstituintes, foram utilizados 6 camundongos Swiss machos e 6 fêmeas não-gravídicas para cada dose preparada. Os animais foram distribuídos em gaiolas, de forma aleatória, e separados em grupos controle e teste. Nos grupos teste, foi administrada a substância através da via oral. Os animais foram observados durante 14 dias, avaliando os parâmetros comportamentais (anexo A), sinais clínicos de toxicidade e a presença ou ausência de mortes, no intuito de determinar a DL_{50} (ALMEIDA et al., 1999; RE 90/2004). Após os 14 dias de avaliação, foi coletado o sangue dos animais para realizar os exames de avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos; os órgãos (coração, pulmão, baço, fígado, rins) foram pesados e avaliados macroscopicamente. Os animais serão eutanasiados por deslocamento cervical, no intuito de diminuir o sofrimento dos mesmos.

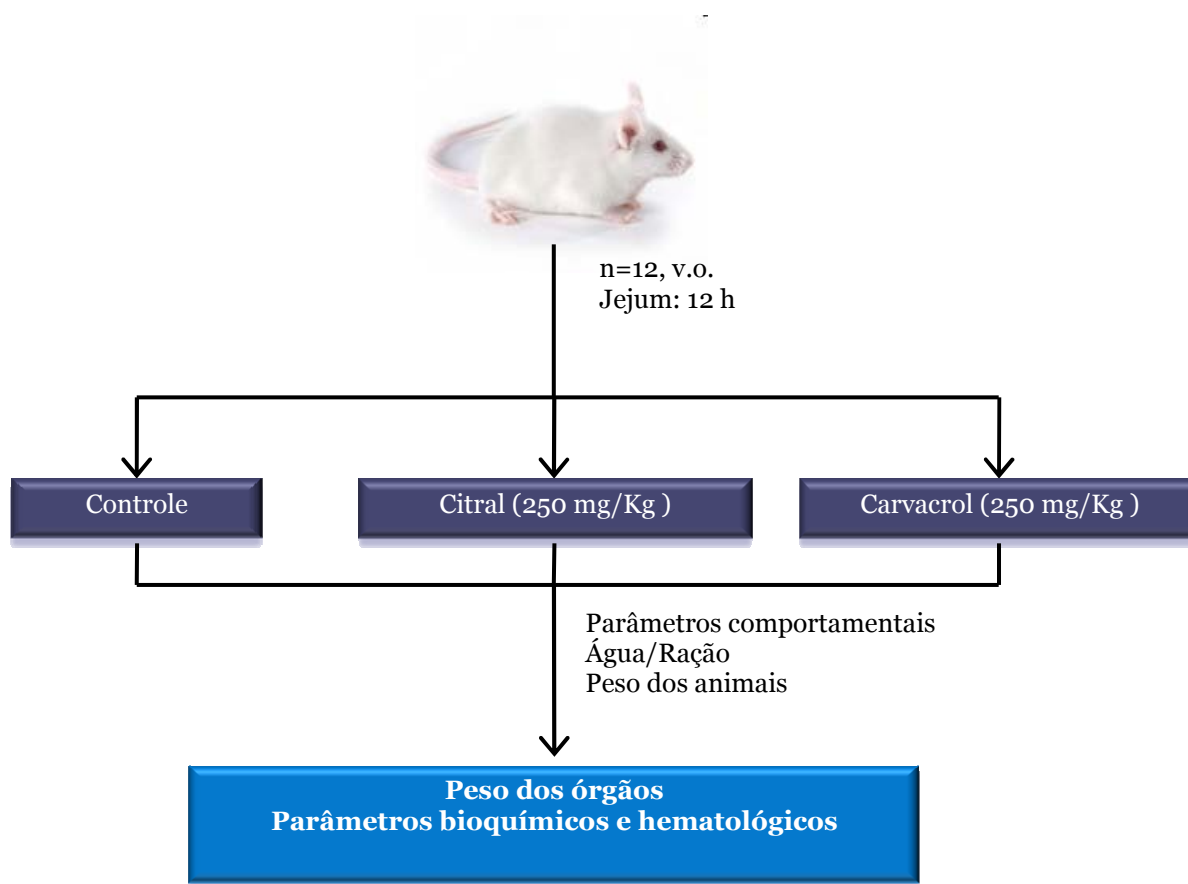


Figura 9. Ensaio de toxicidade aguda.

3.13 Ensaio da citotoxicidade do citral e do carvacrol frente às células MDCK

As células MDCK (Madin-Darby canine kidney) foram cultivadas em placas de 96 poços em quantidade padrão de 1×10^5 células/mL, em meio RPMI-1640 suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS a 10%), penicilina e estreptomicina, durante 24 horas em temperatura de 37°C e CO₂ a 5% (MOSMANN, 1983).

Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS), em seguida, foram tratadas com os fitoconstituintes nas concentrações de 2 a 512 µg/mL por 24h a 37°C. Após o tratamento das células, foram aspirados 100 µL de sobrenadante de cada poço, e então foi adicionado 10 µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) e incubado por 4h (MOSMANN, 1983).

Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (cristal de formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 4 horas, os cristais de formazan foram dissolvidos com a adição de 90µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01N. Em seguida as placas foram incubadas por 17 horas e a leitura realizada em espectrofotômetro (570nm) (MOSMANN, 1983). Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição dos fitoconstituintes por 20µL de tween (pH 7,2) (MOSMANN, 1983).

3.14 Estresse oxidativo em hemácias

Para a realização deste experimento, foi utilizado sangue humano submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C com a finalidade de realizar a lavagem com solução salina. Em seguida, o sangue foi suspenso em solução tampão (NaH₂PO₄ 2H₂O 123 nmol/L, Na₂HPO₄ 27 nmol/L, NaCl 123 nmol/L) para um hematócrito final de 35%, em seguida, foi adicionado glicose na concentração 200mg/dL (ARBOS et al., 2008).

Para avaliar o efeito oxidante dos fitoconstituintes, o material biológico foi colocado na presença dos fitoconstituintes e foi realizado um controle negativo (suspensão de sangue e veículo) e o controle positivo (suspensão de sangue e vitamina C). O material foi submetido à leitura através do espectrofotômetro à 630nm (ARBOS et al., 2008).

Para avaliar o efeito antioxidante dos constituintes estudados, a suspensão de sangue foi submetida a um processo de estresse oxidativo, através da ação da fenilhidrazina. Foram adicionados os fitoconstituintes nos tubos em que se encontravam a suspensão sanguínea e a fenilhidrazina. Foram realizados o controle negativo (suspensão de sangue, fenilhidrazina e veículo) e controle positivo (suspensão de sangue, fenilhidrazina e vitamina C). O material foi submetido à leitura através do espectrofotômetro à 540 nm (ARBOS et al., 2008).

A determinação da metahemoglobina (metHb) foi realizada através da seguinte equação:

$$\text{metHb (\%)} = \text{D.O. (630nm} \times 100) : \text{D.O. (630nm)} + \text{D.O. (540nm} \times 10)$$

3.15 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e o teste estatístico utilizado foi *t* – Student. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.0

3.16 Comitês de Bioética Humano e Animal

Os experimentos realizados com eritrócitos humanos foram aprovados pelo Comitê de Bioética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley, com número de certidão 604/10. Os experimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB com o número CEUA 102/11.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A humanidade tem utilizado, desde a antiguidade, produtos naturais para a cura de diversos tipos de enfermidades, dentre as quais se encontram aquelas causadas por agentes infecciosos (KAMBOJ, 2000).

Os óleos essenciais, os quais são agentes flavorizantes para alimentos, possuem um amplo espectro antimicrobiano sendo estas características atribuídas ao alto conteúdo de derivados fenólicos a exemplo do carvacrol (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010). Óleos essenciais obtidos de algumas espécies vegetais como *Origanum vulgari*, *O. virens*, *Cymbopogon winterianus*, *Zingiber officinale* e *Rosmarinus officinalis* possuem atividade antimicrobiana bastante conhecida (BAKKALI et al., 2008; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

Os óleos essenciais consistem de metabólicos secundários baseados na estrutura do isopreno, denominados terpenos. Tais fitoconstituintes são responsáveis pelas ações antimicrobianas desses óleos (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010), sendo de grande relevância o estudo destes compostos isolados frente à microrganismos, além da investigação da toxicidade de tais constituintes.

A resistência dos microrganismos tem sido um fato preocupante e apresenta implicações drásticas nos processos infecciosos. Neste contexto, as infecções fúngicas vêm conquistando importância na clínica, em especial aquelas infecções sistêmicas, como a candidíase (SANGHAR; ODDS, 2002).

Nesta perspectiva, têm sido relatados estudos com produtos naturais na objetivando investigar novos agentes com ação antifúngica, e para tal finalidade, são adotadas várias técnicas, como difusão em disco ou microdiluição.

Os resultados dos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) encontram-se descritos na Tabela 1. A CIM foi de 512 µg/mL e de 256 µg/mL para o citral e o carvacrol, respectivamente.

A anfotericina B foi utilizada na determinação da CIM como controle positivo. O valor da CIM foi de 1,0 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da CIM (n=3) da anfotericina B, citral e carvacrol contra cepas de *C.albicans*.

Cepas	Controle (Microrganismo)	Anfotericina B	Citral	Carvacrol
ATCC 40042	+	1 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
ATCC 13803	+	1 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
ATCC 76485	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
LM-13	+	1 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
LM-36	+	4 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
LM-39	+	1 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
LM-41	+	2 µg/mL	512 µg/mL	128 µg/mL
LM-45	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
LM-52	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
LM-57	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
LM-67	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
LM-70	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
LM-77	+	1 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
LM-84	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
LM-86	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
LM-88	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	128 µg/mL

+ : Presença de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Silva et al. (2008) utilizaram a técnica de difusão em disco para determinar a atividade antifúngica do citral e do óleo essencial *Cymbopogon citratus* contra cepas de *Candida*, e demonstraram que ambos os produtos exibiram halos de inibição satisfatórios. Sabe-se que tal óleo essencial possui o citral como um dos principais constituintes, sendo este, o provável responsável pela ação antimicrobiana do *C. citratus* (SILVA et al., 2008).

Em estudos que avaliaram a ação antifúngica do citral contra *C. krusei* e *A. fumigatus*, verificou-se que o fitoconstituente em questão, apresentou a CIM de 39,7 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente (MESA-ARANGO et al., 2009). No presente estudo, a CIM para o citral foi de 512 µg/mL, sendo este valor diferente daquele obtido por Mesa-Arango et al (2009).

Manohar et al. (2001) demonstraram que o óleo essencial do *Origanum vulgare* (orégano) e o carvacrol (um dos fitoconstituintes majoritários) apresentaram uma CIM de 125 e 250µg/mL, respectivamente, frente cepa padrão de *C. albicans* (ATCC-48274). Ainda neste estudo, a CFM do óleo essencial do orégano e do carvacrol foi de 250 e 500 µg/mL, respectivamente.

Recentemente, Ahmad et al. (2011) demonstraram que o carvacrol inibiu o crescimento de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes (isolados clínicos) ao fluconazol bem como cepas padrão de *C. albicans*. A CIM do carvacrol variou de 75 a 90 µg/mL para as cepas sensíveis ao fluconazol e para aquelas resistentes ao mesmo antifúngico, a CIM variou de 75 à 100 µg/mL.

De acordo com Aligiannis et al. (2001), o valor da concentração de um produto em estudo é considerado forte quando varia de 0,65 a 1,27mg/mL, e fraco, quando varia de 1,81 e 8,85mg/mL. Desta forma, os valores encontrados da CIM do citral e carvacrol são considerados satisfatórios.

Após a determinação da CIM do citral e do carvacrol, foi realizado o experimento da determinação da concentração fungicida mínima (CFM), de acordo com a metodologia de Ernst et al. (1996) e Ernst et al (1999). Os mesmos encontram-se registrados na Tabela 3.

Foi considerada CFM como o menor valor da concentração necessária para causar a redução de 99,9% unidades formadoras de colônias (UFCs) do inóculo inicial (ERNST et al., 1996; ERNST et al., 1999). Foi utilizado o controle de cada cepa no intuito de verificar a viabilidade das mesmas em meio sólido. A CFM para o citral foi de 1024 µg/mL e para o carvacrol foi de 512 µg/mL, sendo estes valores correspondentes ao dobro de suas respectivas CIM (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da concentração fungicida mínima (CFM) dos fitoconstituintes citral e carvacrol frente às cepas de *C. albicans*.

Cepas	Controle	Citral	Carvacrol
ATCC 40042	+	1024 µg/mL	512 µg/mL
ATCC 13803	+	512 µg/mL	256 µg/mL
ATCC 76485	+	1024 µg/mL	512 µg/mL
LM-13	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-36	+	1024 µg/mL	512 µg/mL
LM-39	+	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-41	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-45	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-52	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-57	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-67	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-70	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-77	+	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-84	+	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-86	+	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-88	+	512 µg/mL	256 µg/mL

+ : Presença de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Uma vez estabelecido o valor da CIM e da CFM, os experimentos que se seguem possuem o objetivo de investigar o modo de ação dos fitoconstituintes citral e carvacrol, além de verificar seu efeito sobre a curva de crescimento fúngico e de realizar o estudo da associação dos fitoconstituintes com antifúngico-padrão (anfotericina B).

Nos experimentos realizados para investigar o possível modo de ação do citral e do carvacrol foram utilizadas a cepa-padrão (ATCC-40042) e uma cepa clínica (LM-13) de *C. albicans* para verificar se os fitoconstituintes atuam na parede celular (através do ensaio com sorbitol), na ligação com o ergosterol ou se interagem com o colesterol. Sendo este último ensaio importante por dar indícios de possível toxicidade.

O bioensaio do sorbitol é baseado na medida dos danos que um determinado produto possa causar aos componentes da parede celular fúngica, e provoca lise das células na ausência do sorbitol, que funciona como um osmoprotetor (FROST et al., 1995). Desta forma, a CIM da droga em estudo é avaliada na ausência e na presença do sorbitol, e se, na presença deste composto a CIM for aumentada, esse fato é um indício de que a droga em questão pode estar agindo na parede do fungo (FROST et al., 1995).

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da CIM do carvacrol mediante a presença do sorbitol e ausência do mesmo. Observa-se que o valor da CIM é o mesmo em ambas situações.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da CIM do citral mediante a presença do sorbitol e ausência do mesmo. Os resultados indicam que não houve alteração no valor da CIM do citral mediante a presença do sorbitol.

Neste ensaio, não foi observada nenhuma alteração do valor da CIM do citral e do carvacrol frente às cepas testadas (Tabelas 4 e 5). Desta forma, os fitoconstituintes inibem o crescimento fúngico ou causam sua morte por outros mecanismos, que provavelmente, não envolvam a desestabilização da parede fúngica ou inibição da síntese da mesma.

Tabela 3. Determinação da CIM do carvacrol na presença e ausência do sorbitol frente *C. albicans* ATCC40042 e *C. albicans* LM-13.

Carvacrol (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042		<i>C. albicans</i> 13	
	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol
2048 µg/mL	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-
128 µg/mL	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Tabela 4. Determinação da CIM do citral na presença e ausência do sorbitol frente *C. albicans* ATCC40042 e *C. albicans* LM-13.

Citral (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042		<i>C. albicans</i> 13	
	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol
2048 µg/mL	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-
256 µg/mL	+	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Diante do exposto, o experimento realizado após o ensaio do sorbitol foi investigar as vias que envolvem o ergosterol, esterol presente apenas em membranas fúngicas, utilizando a metodologia de Escalante et al. (2008).

Além de expor o microrganismo ao citral e ao carvacrol na presença do ergosterol, foi realizado um bioensaio em paralelo em que os fitoconstituintes foram

colocados na presença de colesterol, esterol presente na membrana de células de mamíferos (ZACCHINO, 2001).

Neste sentido, pode-se observar que a CIM do carvacrol aumentou na presença do ergosterol e do colesterol, nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL (Tabela 5 e Tabela 6).

A CIM do carvacrol aumentou em 2 vezes, quando na presença do ergosterol na concentração de 100 µg/mL; em 4 vezes, na presença de 200µg/mL de ergosterol e 8 vezes, na presença de 400 µg/mL do esteróide fúngico, quando testado na cepa ATCC – 40042 (Tabela 5). Neste mesmo teste, realizado com *C. albicans* LM-13, observa-se que a CIM do carvacrol aumentou em 4 vezes, quando testadas na presença de 100, 200 e 400 µg/mL de ergosterol (Tabela 5).

Tabela 5. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do carvacrol frente *C. albicans* ATCC40042 e *C. albicans* LM-13.

Carvacrol (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	+	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	+	+	-	+	+	+
256 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Na tabela 6, observa-se que o carvacrol teve sua CIM alterada na presença do colesterol. Na cepa ATCC-40042 observa-se que a CIM aumentou em 2 vezes na concentração de 100 µg/mL do colesterol, e nas concentrações de 200 e 400 µg/mL a CIM do citral foi aumentada em 8 vezes (Tabela 6). Durante este ensaio, foi utilizada *C. albicans* LM-13 e verificou-se que a CIM aumentou em 4 e 8

vezes quando testadas na presença de 200 e 400 µg/mL de colesterol, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Estudo do efeito do colesterol na CIM do carvacrol frente *C. albicans* ATCC40042 e *C. albicans* LM-13.

Carvacrol (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol (400µg/mL)	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	+	+	-	-	-	+
512 µg/mL	-	-	+	+	-	-	+	+
256 µg/mL	-	+	+	+	-	-	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico

A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Nas tabelas 7 e 8 pode-se observar o efeito do ergosterol e do colesterol nas mesmas concentrações anteriormente testadas frente às CIMs do citral. Pode-se verificar que o citral não teve sua CIM alterada mediante a presença do ergosterol (tabela 7), entretanto, na presença do colesterol sua CIM foi aumentada cerca de duas vezes (tabela 8).

Tabela 7. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do citral frente *C. albicans* ATCC40042 e à *C. albicans* LM-13.

Citral (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico. A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Tabela 8. Ensaio do colesterol com o citral frente *C. albicans* ATCC40042 e à *C. albicans* LM-13.

Citral (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol I (400µg/mL)	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	+	-	+	+	+
256 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
16 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
8 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
4 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
2 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
1 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico. A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o carvacrol interage com o ergosterol, fato interessante, uma vez que tal esterol é específico das células fúngicas e ausentes nas células de mamíferos. Entretanto, o carvacrol e o citral também possuem interação com o colesterol, e neste caso, tal resultado constitui um indício de que os fitoconstituintes possuem toxicidade frente às células humanas, sendo necessária, portanto, uma avaliação toxicológica das drogas em estudo.

Hidrocarbonetos, como cicloalcanos e terpenos, são tóxicos aos microrganismos, e este efeito está correlacionado pela provável ação na membrana citoplasmática, processo não totalmente elucidado (SIKKEMA; BONT; POOLMANN, 1994).

Os óleos essenciais, ricos em terpenos, causam danos em lipídios e proteínas, quebram as paredes e membranas celulares e sendo assim, todo esse processo resulta em lise celular. Nas células eucarióticas, os óleos essenciais desestabilizam a membrana mitocondrial e danificam proteínas de membrana plasmática (BAKKALI et al., 2008).

O ensaio do ergosterol foi realizado com a anfotericina B, controle positivo, uma vez que já é conhecido o mecanismo de ação deste antifúngico. Em ambas as cepas, a CIM da anfotericina B aumentou em 16 vezes na presença de ergosterol nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL (Tabela 10). No caso do efeito do colesterol sob a CIM da anfotericina B, pode-se observar que houve um aumento em 8 vezes do valor da CIM desse antifúngico para a *C. albicans* ATCC-40042 e para *C. albicans* LM-13 (Tabela 10).

Faz-se necessário ressaltar que foram realizados durante estes experimentos testes da viabilidade do inóculo e de verificação da contaminação do meio de cultura (dados não mostrados) e que os mesmos indicaram que as cepas estavam viáveis e o meio estéril.

Tabela 9. Efeito do ergosterol na CIM da anfotericina B frente *C. albicans* ATCC40042 e à *C. albicans* LM-13.

Anfotericina B (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)	Ausência do ergosterol	Ergosterol (100µg/mL)	Ergosterol (200µg/mL)	Ergosterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
8 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
4 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
2 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
1 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico. A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Tabela 10. Efeito do colesterol na CIM da anfotericina B frente *C. albicans* ATCC40042 e à *C. albicans* LM-13.

Anfotericina B (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC-40042				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol (400µg/mL)	Ausência do colesterol	Colesterol (100µg/mL)	Colesterol (200µg/mL)	Colesterol (400µg/mL)
2048 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
4 µg/mL	-	+	+	+	-	-	-	-
2 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+
1 µg/mL	-	+	+	+	-	+	+	+

+ : crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico. A CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

A anfotericina B apresentou CIM aumentada em até 32 vezes na presença do ergosterol e na presença do colesterol, em até 4 vezes, e este resultado corrobora com aqueles obtidos por Baran; Borowski; Mazerski (2009), que preconizam que a anfotericina B possui uma fraca afinidade pelo colesterol e forte afinidade pelo ergosterol. A explicação afinidade da anfotericina B com o ergosterol é devido a existência de uma ligação dupla na estrutura química do ergosterol, aumentando a densidade eletrônica na sua cadeia (BAGINSKI; BRUNI; BOROWSKI, 1994; BARAN; BOROWSKI; MAZERSKI, 2009). Esta situação não acontece com a molécula do colesterol e consequentemente, a estabilidade de sua ligação é baixa (BARAN; BOROWSKI; MAZERSKI, 2009).

Após ter investigado o modo de ação, foi realizado o estudo do efeito do carvacrol sobre cepas ao longo dos tempos de 0, 2, 4, 8 e 24 horas. O estudo da cinética microbiana ou metodologia *time-kill* permite avaliar a extensão da atividade antifúngica da droga em estudo durante o tempo, além de ser uma metodologia utilizada para realizar o estudo de associação de antifúngicos (KEELE et al., 2001).

Alguns antifúngicos possuem atividade fungicida dependente da concentração, como por exemplo a anfotericina B, enquanto outros, como o fluconazol, não aumentam significativamente sua atividade com incrementos na concentração do antifúngico. Estas informações podem ser evidenciadas pela interpretação do gráfico do tempo de morte do microrganismo quando exposto à várias concentrações do antifúngico (KLEPSEK et al., 1997). Clinicamente, devido a estas características, o aumento da concentração de antifúngicos como fluconazol podem não alterar a extensão da erradicação do fungo (ERNST et al. 1996).

Existem algumas limitações do estudo da cinética microbiana; uma vez que este sistema não representa de forma fidedigna o interior do organismo (LEWIS; KLEPSEK; PFALLER, 1999) e o fato de ser dispendioso para o laboratório (WHITE et al., 1994). Por estas razões, os resultados dos estudos *in vitro* devem ser considerados como um indicativo do potencial efeito dentro de um sistema *in vivo* (KEELE et al., 2001), e consequentemente, sendo necessários maiores estudos em animais de laboratório.

Foram realizados estudos de associação entre o carvacrol e o citral e a anfotericina B por ensaios do tempo de morte (Gráficos 1 e 2). A atividade fungicida de uma droga é definida como aquela capaz de reduzir 99,9% ou mais do inóculo

inicial (o que corresponde a 3 Log₁₀UFC/mL). Uma diminuição menor do que esta corresponde à atividade fungistática (KEELE et al., 2001).

Nessa metodologia, as drogas testadas em associação foram classificadas de acordo com a contagem da quantidade de UFC/mL. Foi calculada a diferença entre o Log₁₀UFC/mL das drogas em combinação e do constituinte isolado mais ativo após 24 horas. Desta forma, uma diminuição maior ou igual a 2 Log₁₀UFC/mL foi considerado sinergismo, diminuição maior a 1 Log₁₀UFC/mL foi considerado aditismo, uma diminuição menor que 1 Log₁₀UFC/mL foi considerado indiferente e um aumento maior ou igual a 2 Log₁₀UFC/mL foi considerado como efeito antagônico (KEELE et al., 2001).

É interessante introduzir alguns conceitos, como sinergismo e antagonismo. Do ponto de vista da microbiologia, o termo sinergismo é compreendido como uma interação positiva em que dois agentes em combinação exercem um efeito inibitório maior que a soma de cada agente isolado (CUENCA-ESTRELLA, 2004; KLEPSE et al., 1998; ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996). Antagonismo é a interação negativa observada quando o efeito combinado da droga é marcadamente inferior ao efeito das mesmas isoladas (CUENCA-ESTRELLA, 2004; KLEPSE et al., 1998; ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996).

Aditismo é observado quando o resultado do efeito combinado de duas drogas é o mesmo que a soma desses efeitos quando as drogas agem isoladamente, enquanto que indiferença sugere que o efeito das drogas combinadas é o correspondente do efeito da droga mais ativa (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

A anfotericina B tem sido utilizada, durante 40 anos, para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, devido seu amplo espectro de ação, entretanto, seu uso tem sido limitado devido aos seus efeitos tóxicos (BENNETT et al., 1979). O tratamento de infecções em associação utilizando antimicrobianos em baixas doses tem como objetivo otimizar a terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos de ambos (KEELE et al., 2001). E neste sentido, é importante que se realizem estudos de associação entre antifúngico e produtos naturais, através dos vários existentes, como “checkerboard”, “E-test” ou cinética microbiana (“time-kill”).

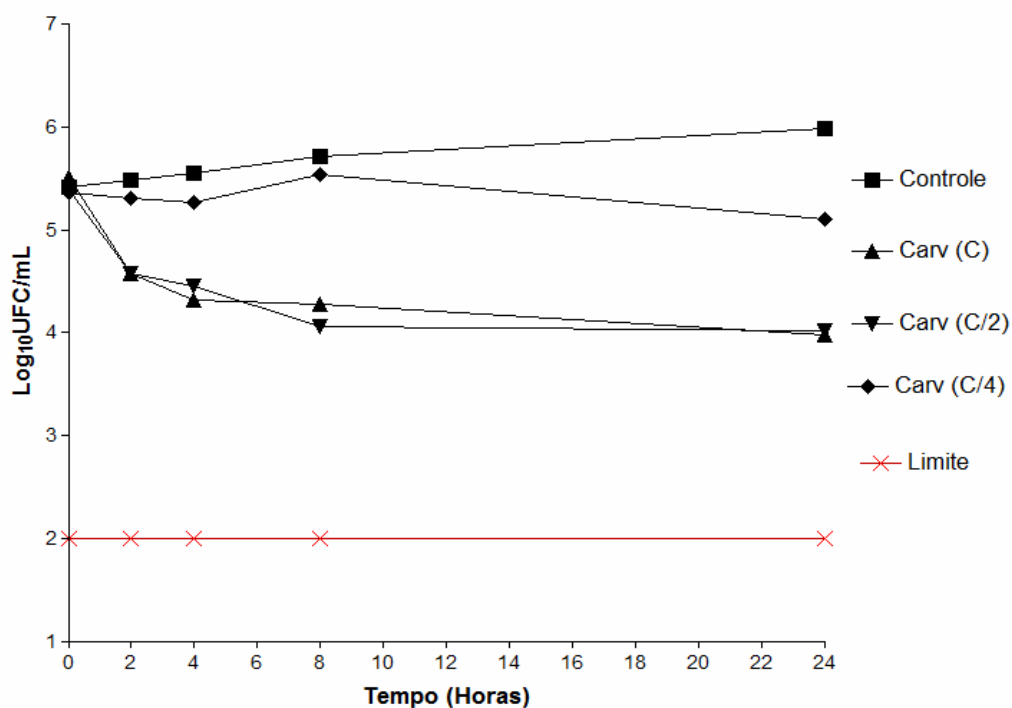


Figura 10. Tempo de morte microbiana do carvacrol na concentração inibitória mínima de 256 µg/mL (C) e nas suas frações 128 µg/mL (C/2) e 64µg/mL (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

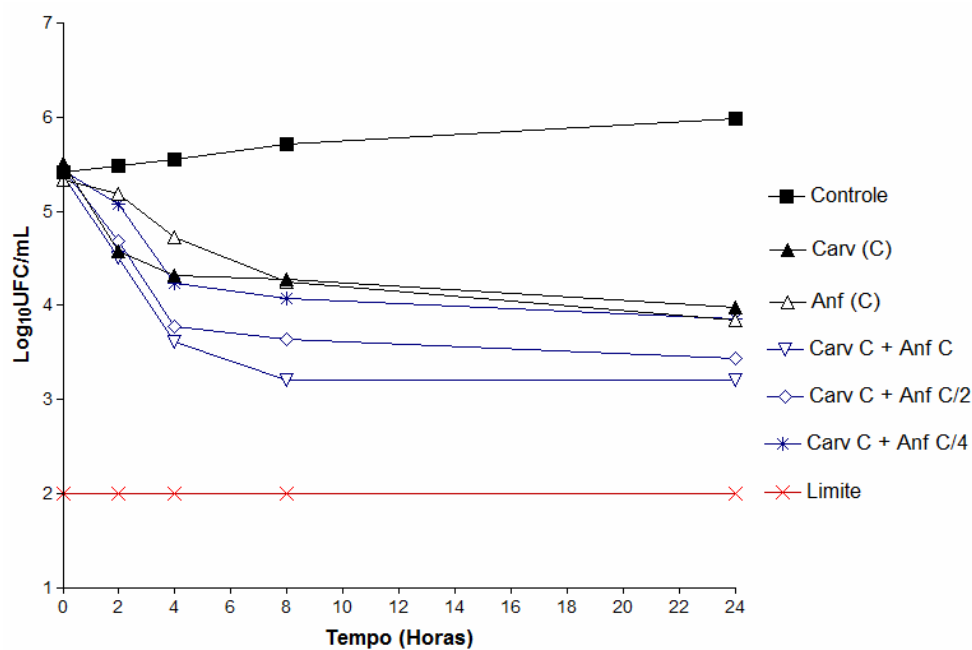


Figura 11. Tempo de morte da associação do carvacrol 256µg/mL (C) em associação com a anafotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

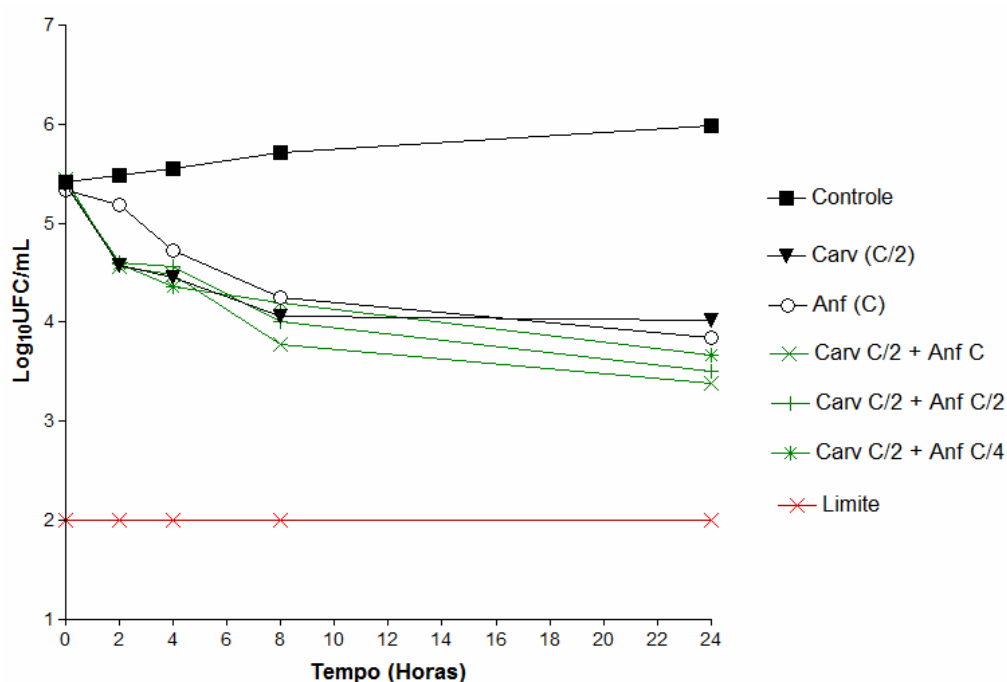


Figura 12. Tempo de morte da associação do carvacrol 128µg/mL (C/2) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

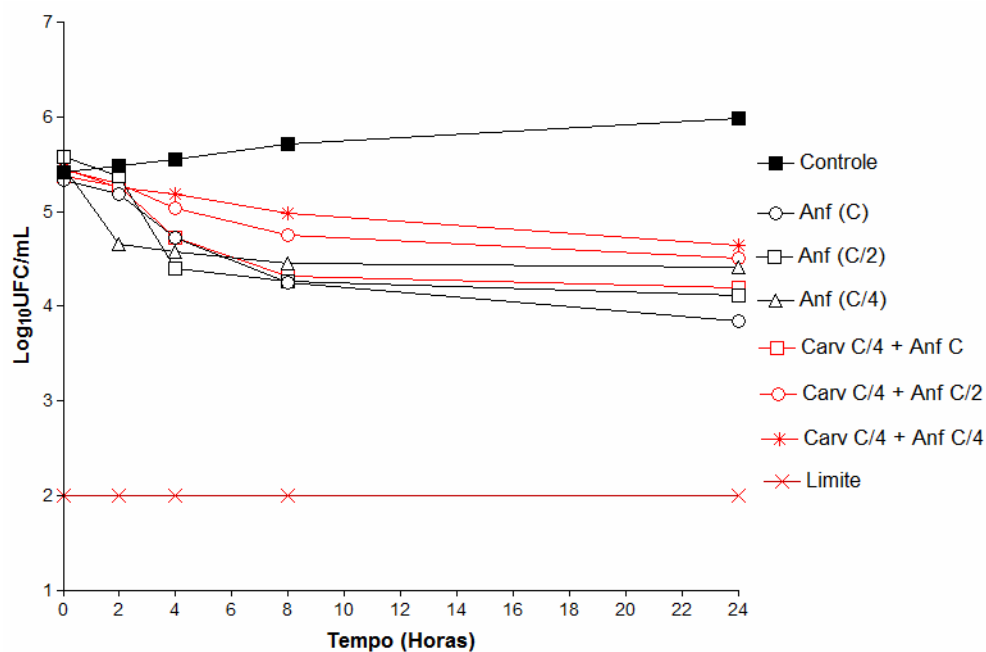


Figura 13. Tempo de morte da associação do carvacrol 64µg/mL (C/4) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

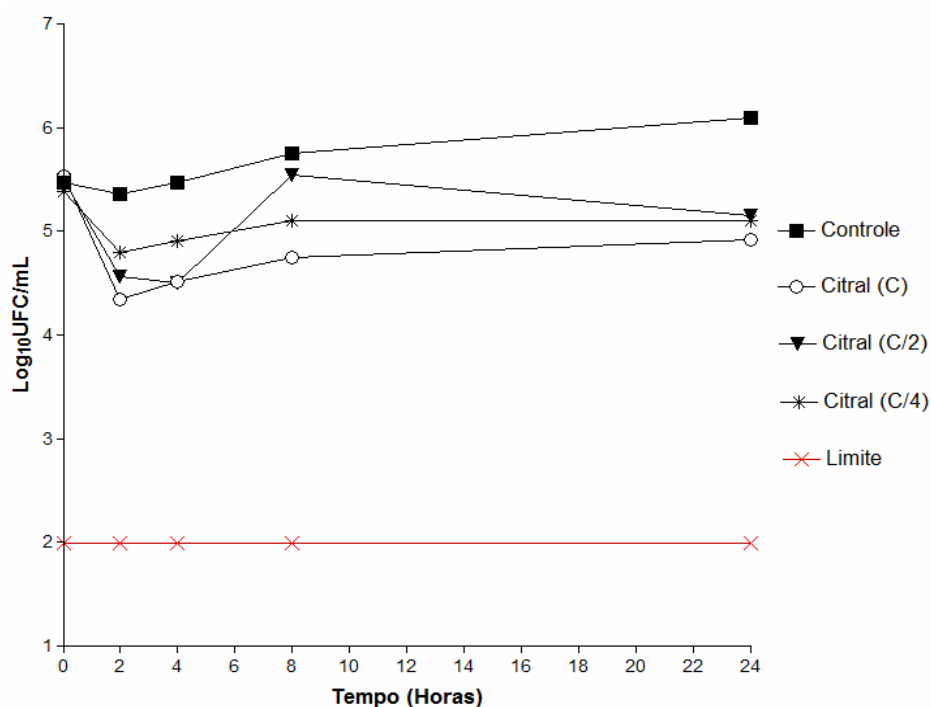


Figura 14. Tempo de morte microbiana do citral na concentração inibitória mínima de 512 µg/mL (C) e nas suas frações 256 µg/mL (C/2) e 128µg/mL (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

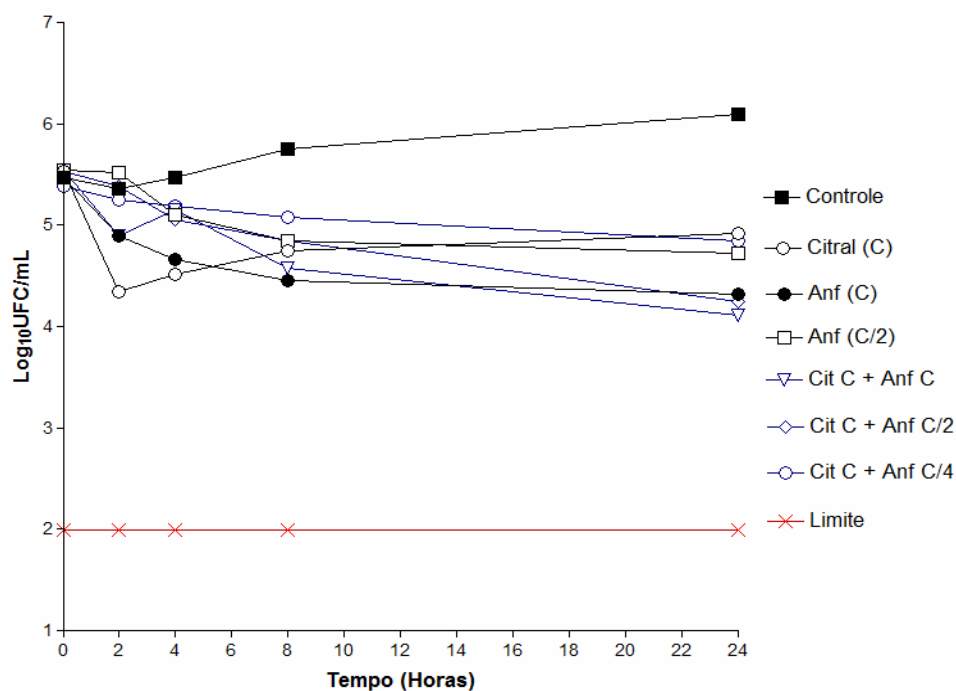


Figura 15. Tempo de morte da associação do citral 512µg/mL (C) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

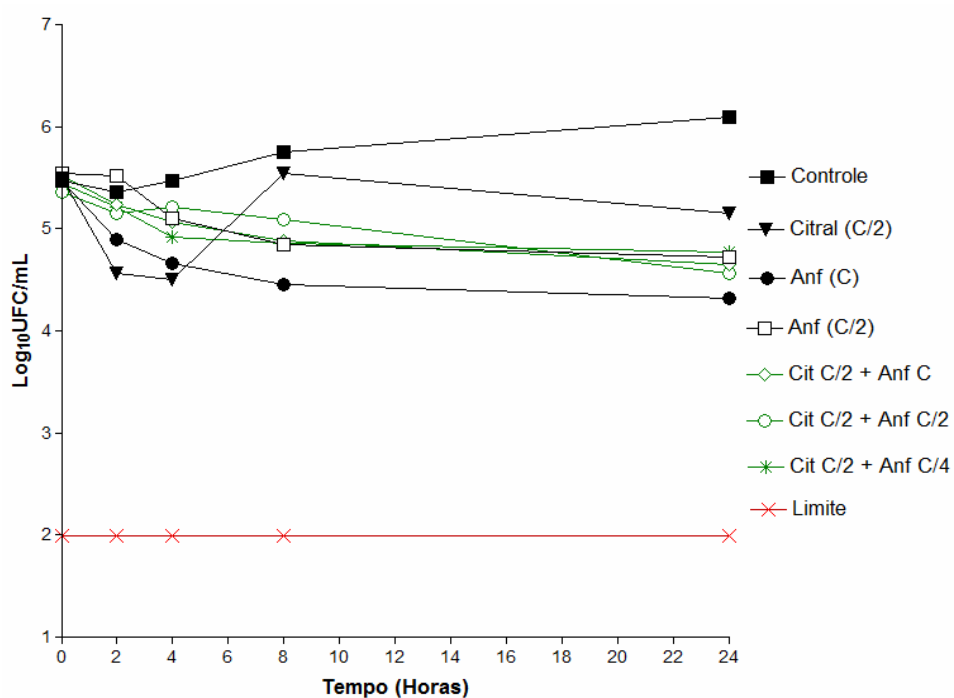


Figura 16. Tempo de morte da associação do citral 256µg/mL (C/2) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

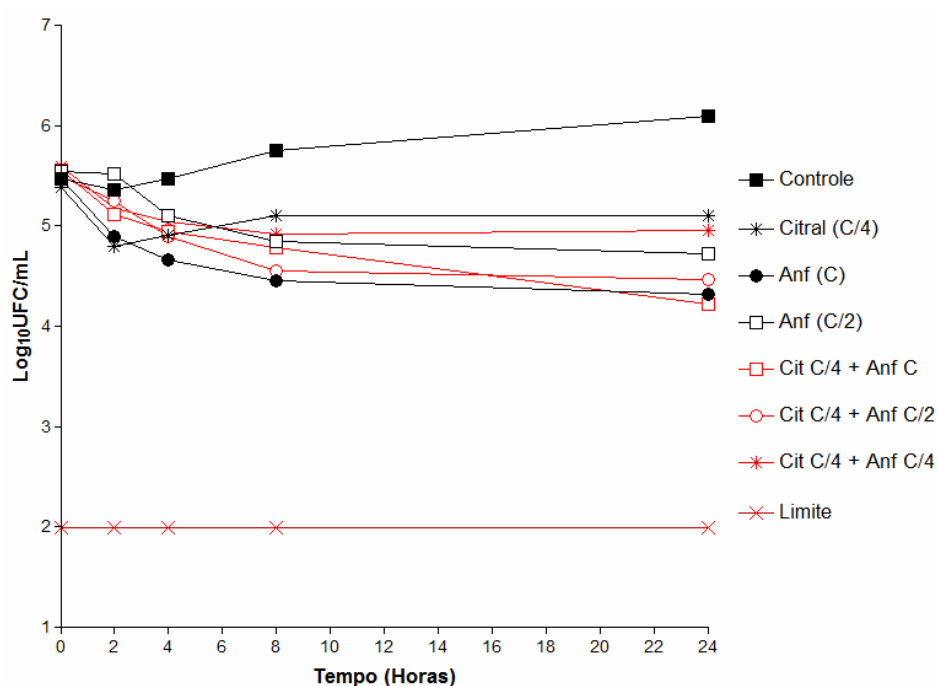


Figura 17. Tempo de morte da associação do citral 128µg/mL (C/4) em associação com a anfotericina B em diferentes concentrações 1 µg/mL (C), 0,5µg/mL (C/2) e 0,25 (C/4) contra *C. albicans* (LM-13).

Quando o carvacrol e o citral nas concentrações correspondentes a CIM, CIM/2 e CIM/4 foram testados sozinhos (Figuras 10 e 14), apresentaram efeito fungistático (diminuição menor que 99,9% em UFC/mL do inóculo inicial, o que corresponde a uma redução menor que $3\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$). Mesmo em combinação com a anfotericina B, as substâncias mantiveram o efeito fungistático apresentado anteriormente (Figuras 11, 12, 13, 15, 16 e 17).

Os resultados apresentados nas Figuras 11, 12, 13, 15, 16 e 17 demonstraram que não houve sinergismo ou aditismo entre a associação de cada substância com a anfotericina B. As combinações estudadas foram indiferentes contra *C. albicans*. É importante que não haja antagonismo do efeito antimicrobiano quando duas drogas são associadas, isto se deve por que em algumas circunstâncias é necessário combinar duas drogas diferentes, como por exemplo, quando se é necessário reduzir a concentração de um ou dos dois agentes de uma associação para diminuir os efeitos tóxicos, quando a associação dos dois agentes previne a emergência de resistência ou ainda quando a combinação das drogas resulta em um amplo espectro de atividades que não seria possível apenas com as drogas simples (KEELE et al., 2001).

Estudos mostraram que o óleo essencial de *Thymus maroccanus* cujo principal constituinte é o carvacrol (89,15%) apresentou sinergismo com a anfotericina B e com o fluconazol contra *C. albicans* (Saad et al., 2010). O carvacrol em associação com a tetraciclina e a eritromicina apresentou sinergismo contra *Salmonella typhimurium* (Palaniappan; Holley, 2010). O óleo essencial de *Origanum vulgare*, que possui carvacrol na sua constituição, demonstrou efeito sinérgico juntamente com a anfotericina B contra *C. albicans* (ROSATO et al., 2008).

Foi demonstrado que o citral possui atividade antifúngica contra *C. albicans* (FERREIRA et al., 2009), e que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (que possui citral) também possui atividade contra *C. albicans* (SCHUCK et al., 2001). Zore et al., 2011 demonstrou que o citral possui efeito sinérgico com o fluconazol contra cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, sendo que a atividade do citral é devida a danos causados à membrana da célula do microrganismo.

Ahmad et al. (2011) demonstrou que o carvacrol, nas concentrações de 4xCIM apresentou ação fungicida no tempo de 12h frente a cepas de *Candida*

sensíveis e resistentes ao fluconazol, tendo como valor, respectivamente, 300 e 400 mg/mL, nas condições avaliadas.

Tem sido relatados estudos de combinação entre os antifúngicos, como a anfotericina B e flucitosina utilizando a técnica de cinética microbiana (KEELE et al., 2001), bem como tem sido recomendado a utilização dos antifúngicos em associação no tratamento de diversas micoses (CUENCA-ESTRELLA, 2004; BADDLEY;PAPPAS, 2007; SEGAL; STEINBACH, 2007). Entretanto, estudos de associações entre produtos naturais (óleo essencial, fitoconstituintes ou ainda, extrato de plantas) têm sido pouco explorado (AHMAD;AHMAD, 2011).

Experimentalmente, efeitos da combinação entre anfotericina B e flucitosina, *in vitro*, tem variado entre sinergismo e antagonismo e se modifica de acordo com as espécies e até mesmo cepas testadas (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Na maioria das espécies de *Aspergillus* não tem sido relatado sinergismo entre flucitosina e anfotericina B, e o efeito antagônico entre esses dois antifúngicos foi encontrado em seis das 26 espécies de *Aspergillus* testadas por Denning et al. (1992).

Estudos têm demonstrado que a combinação de anfotericina B e flucitosina, através da técnica de cinética microbiana (*time-kill*), apresentou efeito indiferente contra *Candida albicans* (KEELE et al., 2001; OH et al., 1995), enquanto que tal combinação tem apresentado sinergismo contra cepas de *Cryptococcus neoformans* (KEELE et al., 2001).

Recentemente, o estudo da associação de óleos essenciais (*Syzygium aromaticum*) ou fitoconstituintes (eugenol, cinamaldeído) com fluconazol, utilizando a técnica de *checkerboard* frente às cepas de *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum* demonstrou que os produtos em estudo apresentaram sinergismo (AHMAD; AHMAD, 2011). O cinamaldeído foi o produto mais efetivo na combinação com o fluconazol, uma vez que houve sinergismo em baixas concentrações de ambas substâncias testadas (AHMAD;AHMAD, 2011).

Há relato de estudo na literatura do efeito sinérgico de dois fitoconstituintes, o 1,8-cineol e do aromadendreno, através do método de *checkerboard* e da cinética microbiana, frente a bactéria *Streptococcus pyogenes* (MULYANINGSIH et al., 2010). Este estudo revelou que houve efeito sinérgico entre os dois terpenos presentes no óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (MULYANINGSIH et al., 2010).

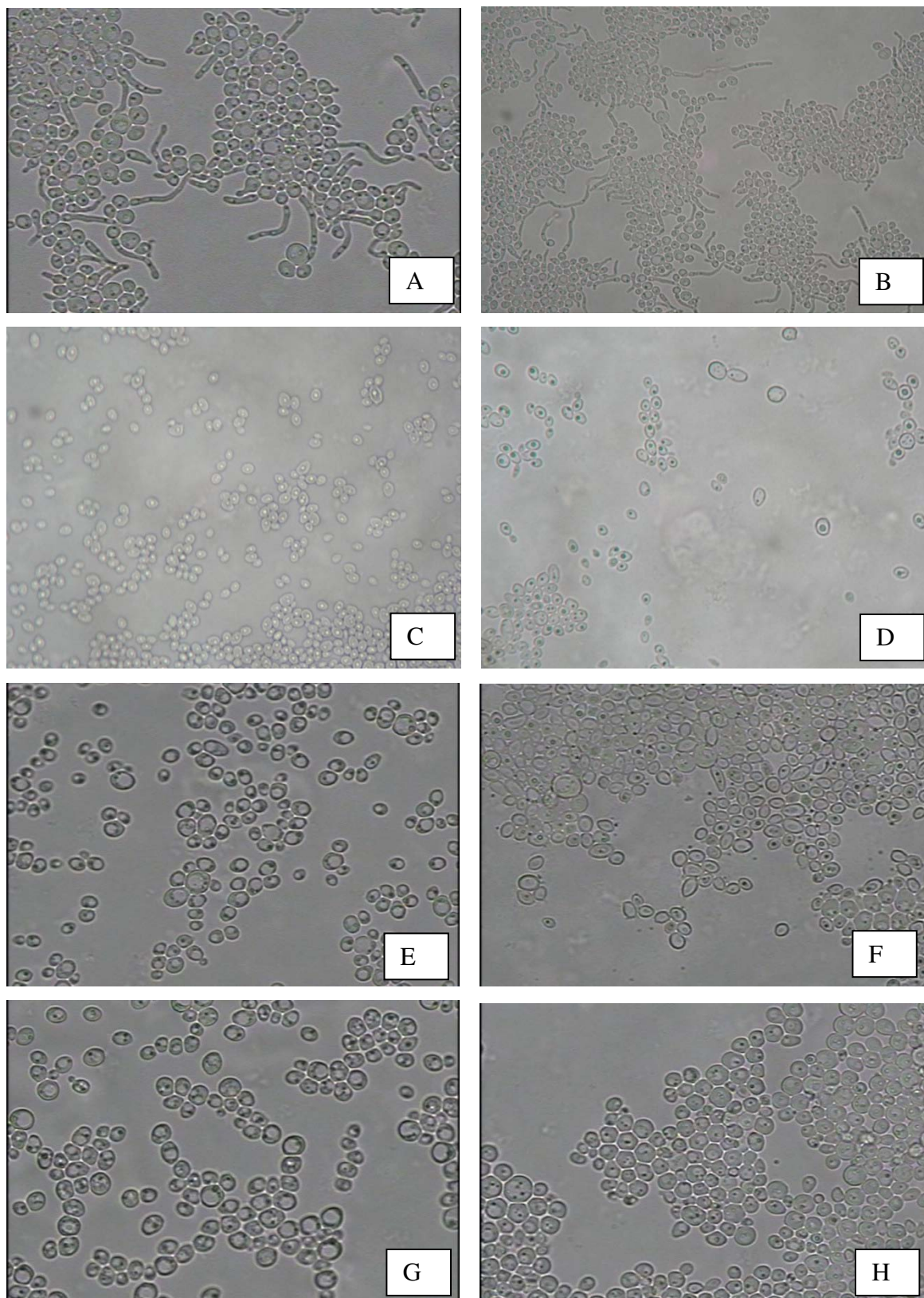


Figura 18. Aspectos da morfologia de *C. albicans*. Controle (A), no aumento de 40X e (B), no aumento de 10X; anfotericina B nas concentrações de 1 µg/mL (C) e 2 µg/mL (D), ambos em 40X; citral 512 µg/mL (E) e 1024 µg/mL (F), no aumento de 40X; carvacrol 256 µg/mL (G) e 512 µg/mL (H), no aumento de 40X.

Os estudos de associação entre produtos naturais e antifúngicos utilizados na clínica objetivam a diminuição da dose de tais antifúngicos, em especial a anfotericina B e fluconazol, bem como dos fitoconstituintes, óleos essenciais ou extratos, na perspectiva de diminuir seus efeitos tóxicos (AHMAD; AHMAD, 2011; ROSATO et al., 2008). Entretanto, apesar de alguns resultados serem positivos, estudos *in vivo* devem ser realizados para avaliar o potencial terapêutico de tais combinações (ROSATO et al., 2008).

O estudo da ação dos monoterpenos frente aos aspectos morfológicos de *Candida albicans* foi realizado através da técnica de microcultivo, em que pode ser observado a presença ou ausência de hifas e/ou pseudo-hifas, sendo essas relatadas como fatores de virulência expressos por fungos do gênero *Candida*. Quando uma cepa desta espécie forma pseudo-hifas ou hifas, as mesmas representam um obstáculo para a fagocitose, resultando na sobrevivência do fungo no tecido epitelial (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004).

Na figura 5, observa-se que a anfotericina B nas concentrações (1 e 2 µg/mL), o citral (512 e 1024 µg/mL) e o carvacrol (256 e 512 µg/mL) foram capazes de inibir a formação de pseudo-hifas quando comparado com o grupo controle, em que podem ser observadas tais estruturas.

Após a avaliação da ação antifúngica, os estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* foram realizados com a finalidade de avaliar o potencial toxicológico dos monoterpenos citral e carvacrol, uma vez que os mesmos apresentaram a CIM elevada na presença de colesterol.

Estudos *in vivo* de toxicidade permitem avaliar efeitos sistêmicos e colaterais, interações entre tecidos e órgãos e efeitos dos metabólitos formados, sendo estes parâmetros ausentes nos estudos *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade de constituintes tem como vantagens a redução dos efeitos sistêmicos, da variabilidade entre experimentos, menor gasto de droga e tempo, redução dos testes em animais, além de permitir estudos em células humanas (SPIELMANN et al., 2008).

Foi realizada a avaliação comportamental dos animais que receberam veículo e aqueles tratados com citral e carvacrol na dose de 250 mg/Kg. No período entre trinta minutos e de três horas após a administração do citral, observou-se que os camundongos machos apresentaram diminuição do tônus muscular e força para

agarrar. As fêmeas tratadas com carvacrol apresentaram perda do reflexo corneal, durante os primeiros trinta minutos após a administração da droga.

Durante os 14 dias, foi avaliado o consumo de água e ração, e verificou-se que o citral diminuiu de forma significativa o consumo de água e ração das fêmeas e o consumo de ração dos machos. O carvacrol causou uma diminuição do consumo de água nas fêmeas e nos machos (Tabela 11).

Tabela 11. Consumo de água e ração dos camundongos tratados com citral (250 mg/Kg) e carvacrol (250 mg/Kg).

		Controle (Machos)	Citral (Machos)	Controle (Fêmeas)	Citral (Fêmeas)
Consumo de água	de	13,6 ± 0,9	13,0 ± 0,5	9,7 ± 0,4	8,2 ± 0,5**
Consumo de ração	de	9,2 ± 0,3	7,7 ± 0,3	9,0 ± 0,5	7,3 ± 0,2**
		Controle (Machos)	Carvacrol (Machos)	Controle (Fêmeas)	Carvacrol (Fêmeas)
Consumo de água	de	13,6 ± 0,9	11,6 ± 0,6***	9,7 ± 0,4	8,2 ± 0,3***
Consumo de ração	de	9,2 ± 0,3	8,4 ± 0,3	9,0 ± 0,5	8,4 ± 0,3

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 14). *p < 0,05; **p<0,01; *** p<0,001 comparado com o grupo controle.

O monoterpeno citral diminuiu, de forma significativa, o peso dos camundongos machos, entretanto o mesmo efeito não foi observado nas fêmeas e nos animais tratados com o carvacrol (dados não mostrados).

Com relação aos pesos dos órgãos, não houve alteração de forma significativa nos pesos do fígado, pulmão, coração, rins e baço dos camundongos machos tratados com o citral (250mg/Kg) ou com o carvacrol (250mg/Kg), quando comparado com o grupo controle que recebeu o veículo, ambos pela via oral (tabela 12).

Tabela 12. Peso dos órgãos de camundongos machos do controle, tratados com citral (250 mg/Kg, v.o.) e carvacrol (250 mg/Kg, v.o.).

Órgãos (g)	Controle	Citral	Carvacrol
Fígado	2,26 ± 0,14	2,04 ± 0,09	2,06 ± 0,19
Pulmões	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,01
Coração	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,005
Rins	0,53 ± 0,04	0,43 ± 0,03	0,43 ± 0,02
Baço	0,16 ± 0,009	0,27 ± 0,05	0,14 ± 0,01

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

O citral e o carvacrol, administrados pela via oral, nas doses de 250 mg/Kg não foram capazes de alterar os pesos dos órgãos dos camundongos fêmeas (tabela 13).

Tabela 13. Peso dos órgãos de camundongos fêmeas do controle, tratados com citral (250 mg/Kg, v.o.) e carvacrol (250 mg/Kg, v.o.).

Órgãos (g)	Controle	Citral	Carvacrol
Fígado	2,00 ± 0,05	1,89 ± 0,11	1,72 ± 0,10
Pulmões	0,20 ± 0,005	0,26 ± 0,07	0,18 ± 0,01
Coração	0,14 ± 0,008	0,14 ± 0,008	0,13 ± 0,009
Rins	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,34 ± 0,02
Baço	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Ao final do experimento de toxicidade aguda ainda foram avaliados as alterações macroscópicas nos órgãos e os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais.

O citral alterou as características morfológicas dos rins de um camundongo macho e o fígado de duas fêmeas, sendo assim, ambos os órgãos apresentaram manchas esbranquiçadas. Dois animais fêmeas tratadas com o carvacrol apresentaram manchas brancas no fígado.

Os camundongos machos que receberam citral apresentaram os níveis de triglicerídeos diminuídos com relação ao grupo controle, entretanto o monoterpeno em questão aumentou a atividade a alanina amino-transferase (ALT), quando comparado com o grupo controle (tabela 14).

O carvacrol, por outro lado, induziu o aumento da atividade a aspartato amino transferase (AST) de forma significativa, quando comparado com o grupo controle, que recebeu o veículo, sendo um indício de hepatotoxicidade (tabela 14).

Os camundongos machos não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos frente ao tratamento com citral e carvacrol (tabela 15).

O citral diminuiu a quantidade de linfócitos nas fêmeas, entretanto, não alterou os demais parâmetros hematológicos avaliados (tabela 16). As fêmeas tratadas com carvacrol não apresentaram mudanças nos parâmetros hematológicos (tabela 16).

Tabela 14. Efeito do citral (250 mg/Kg) e carvacrol (250 mg/Kg) frente aos parâmetros bioquímicos em camundongos machos.

Determinação	Controle	Citral	Carvacrol
Uréia (mg/dL)	51 ± 6,8	64,6 ± 5,5	49,2 ± 3,5
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,03
Ácido úrico (mg/dL)	1,9 ± 0,4	2,4 ± 0,4	3,1 ± 0,5
Colesterol (mg/dL)	117 ± 7,3	122,6 ± 6,5	109,8 ± 7,0
HDL (mg/dL)	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,4
Triglicerídeos (mg/dL)	131,0 ± 11,1	79,2 ± 15,3*	140,2 ± 24,3
Aspartato amino transferase (AST) - (U/L)	162,8 ± 9,7	196,8 ± 15,9	209,3 ± 14,3*
Alanina amino transferase (ALT) - (U/L)	53,8 ± 6,9	73,8 ± 1,9*	57,0 ± 2,3
Proteínas (g/dL)	5,3 ± 0,2	5,8 ± 0,3	5,2 ± 0,2
Albumina (g/dL)	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,03	2,2 ± 0,06

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Tabela 15. Efeito do citral (250 mg/Kg) e carvacrol (250 mg/Kg) frente aos parâmetros bioquímicos em camundongos fêmeas.

Determinação	Controle	Citral	Carvacrol
Uréia (mg/dL)	45,0 ± 4,0	43,0 ± 9,0	49,2 ± 5,5
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,04	0,4 ± 0,05	0,7 ± 0,2
Ácido úrico (mg/dL)	3,2 ± 0,7	2,1 ± 0,7	2,6 ± 0,3
Colesterol (mg/dL)	101,3 ± 4,3	94,3 ± 6,6	107,5 ± 8,9
HDL (mg/dL)	1,4 ± 0,08	1,9 ± 0,09	1,3 ± 0,09
Triglicerídeos (mg/dL)	74,5 ± 6,3	106,8 ± 25,6	136,0 ± 35,2
Aspartato amino transferase (AST) - (U/L)	131,2 ± 17,3	139,0 ± 14,0	147,5 ± 18,7
Alanina amino transferase (ALT) - (U/L)	96,5 ± 26,0	66,5 ± 3,7	50,0 ± 4,8
Proteínas (g/dL)	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2
Albumina (g/dL)	2,5 ± 0,03	2,4 ± 0,09	2,4 ± 0,08

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Tabela 16. Efeito do citral (250 mg/Kg) e carvacrol (250 mg/Kg) frente aos parâmetros hematológicos em camundongos machos.

Determinação	Controle	Citral	Carvacrol
Hemácias – RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	8,2 ± 0,3	7,8 ± 0,3	8,7 ± 0,3
Hemoglobina (HGB) – g/dL	11,5 ± 0,5	10,2 ± 0,5	11,7 ± 0,5
Hematócrito (HCT) - %	40,3 ± 1,2	37,5 ± 1,8	42,2 ± 1,4
VCM - μ^3	49,0 ± 1,4	48,2 ± 1,3	48,8 ± 1,2
HCM - $\mu \mu\text{g}$	14,0 ± 0,3	13,1 ± 0,3	13,6 ± 0,2
CHCM – (%)	28,5 ± 0,5	27,3 ± 0,7	27,7 ± 0,6
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,9 ± 0,6	5,5 ± 1,5	7,0 ± 0,8
Bastonetes (%)	-	-	-
Segmentados (%)	32,8 ± 3,2	42,0 ± 3,8	23,5 ± 4,2
Linfócitos (%)	60,4 ± 5,6	48,2 ± 3,1	73,0 ± 3,9
Monócitos (%)	2,6 ± 0,4	3,4 ± 0,7	3,4 ± 0,6
Eosinófilos (%)	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,25	0,2 ± 0,2
Basófilos (%)	-	-	-
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	624,4 ± 22,0	748,0 ± 90,0	773,2 ± 61,3

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Tabela 17. Efeito do citral (250 mg/Kg) e carvacrol (250 mg/Kg) frente aos parâmetros hematológicos em camundongos fêmeas.

Determinação	Controle	Citral	Carvacrol
Hemácias – RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	$9,0 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,2$
Hemoglobina (HGB) – g/dL	$12,3 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,4$	$12,2 \pm 0,6$
Hematócrito (HCT) – %	$47,1 \pm 4,9$	$41,9 \pm 2,2$	$44,4 \pm 2,1$
VCM - μ^3	$47,0 \pm 1,2$	$45,7 \pm 0,6$	$47,9 \pm 1,3$
HCM - $\mu \mu\text{g}$	$13,7 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,3$	$13,2 \pm 0,3$
CHCM – (%)	$29,5 \pm 0,9$	$28,8 \pm 0,8$	$27,6 \pm 0,7$
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$3,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,8$
Bastonetes (%)	-	-	-
Segmentados (%)	$19,5 \pm 3,7$	$27,4 \pm 1,8$	$23,6 \pm 3,7$
Linfócitos (%)	$79,5 \pm 2,6$	$67,3 \pm 2,5^*$	$69,0 \pm 3,1$
Monócitos (%)	$2,7 \pm 0,9$	$2,6 \pm 1,1$	$3,8 \pm 0,5$
Eosinófilos (%)	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
Basófilos (%)	-	-	-
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	$723,8 \pm 79,4$	$777,0 \pm 57,0$	$720,0 \pm 56,0$

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 5-6). *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Estudos de toxicidade aguda com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, que apresenta como constituinte majoritário o citral, demonstraram que nas doses de 5 a 1500 mg/Kg, pela via oral em camundongos suíços, não houve morte dos animais nem sinais de toxicidade, como contorções abdominais, alterações da locomoção, convulsões dentre outros (COSTA et al., 2011). Esses dados corroboram, em parte, com os dados obtidos, uma vez que no presente estudo foram detectadas pequenas alterações nos órgãos e parâmetros bioquímicos promovidos pelo citral.

A mistura de carvacrol (93%) e timol (7%) tem sido estudado na dose de 1,5 mM/Kg (225 mg/Kg) pela via oral, entretanto não se tem registros de que o mesmo cause alterações significativas em parâmetros bioquímicos, hematológicos e nos pesos dos animais e dos órgãos (VINCENZI et al., 2004). Este estudo não corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que o carvacrol

promoveu pequenas alterações nos órgãos e nos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Após a avaliação da toxicidade aguda, partiu-se para os testes de citotoxicidade em células MDCK e eritrócitos humanos.

De modo geral, os rins são os primeiros alvos de danos tóxicos das drogas, dos xenobióticos ou dos produtos químicos, uma vez que os mesmos possuem um alto fluxo sanguíneo circulante, pois são os órgãos que filtram o sangue e devido à presença de transportadores de íons nas células epiteliais que compõem o néfron, sendo este a unidade morfofisiológica dos rins (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998).

Os efeitos indesejados dos xenobióticos podem ser avaliados mediante técnicas de cultura de células isoladas de rins dos animais, a exemplo das células que compõem o ducto distal como a MDCK (Madin-Darby canine kidney) (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998).

Vários fármacos causam lesões nefrotóxicas e estudos apontam esses efeitos indesejados em animais e humanos de substâncias como a anti-inflamatórios não esteroidais, aminoglicosídeos, cisplatina, heroína, cefalosporinas, tetraciclinas e anfotericina B (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998).

Nesta perspectiva, foi realizado o estudo da toxicidade do carvacrol e do citral mediante às células MDCK (Figuras 19 e 20). O carvacrol apresentou IC₅₀ de 42,5 µg/mL, causando uma diminuição de células viáveis nas concentrações a partir de 8 µg/mL (Figura 19), sendo estas concentrações inferiores à CIM obtida (256 µg/mL), indicando um alto potencial tóxico frente as células MDCK. Esse resultado não corrobora com os resultados obtidos na toxicidade aguda, uma vez que não foram observadas alterações macroscópicas nos rins dos camundongos tratados com o carvacrol.

Essas observações podem ser justificadas mediante o metabolismo hepático do monoterpeno carvacrol, uma vez que o mesmo no organismo sofre reações de fase 1 e fase 2 pelo fígado. As reações de fase 2 (reações de conjugação) transformam o carvacrol em metabólitos mais hidrossolúveis que são os conjugados em forma de glicuronato e sulfato, muito embora, parte do carvacrol seja eliminada de forma inalterada (VINCENZI et al., 2004).

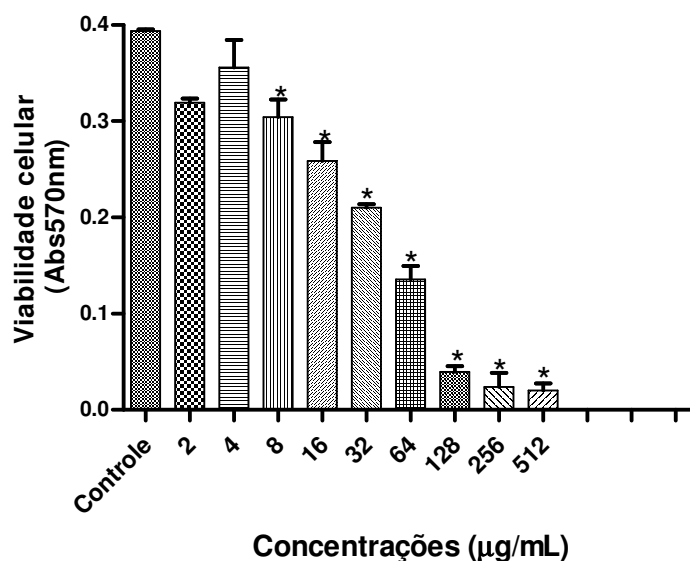


Figura 19. Efeito citotóxico de diferentes concentrações (512-2 µg/mL) de carvacrol em células MDCK de túbulo de rim de cachorro. A densidade inicial de células foi de 1×10^5 células/mL. O gráfico apresenta a média $\pm$ EPM ($n = 3$). * $p < 0,001$ comparado com o grupo controle. $IC_{50} = 42,5$ µg/mL

A citotoxicidade do citral frente às células MDCKs foi avaliada e teve como resultado da IC_{50} o valor de 32,8 µg/mL, apresentando a capacidade de interferir na viabilidade celular na concentração a partir de 8 µg/mL (Figura 20), sendo esses valores bastante inferiores aos valores da CIM obtido (512 µg/mL). Esses dados corroboram com as observações realizadas no experimento de toxicidade aguda, em que um animal tratado com citral apresentou alterações macroscópicas nos rins.

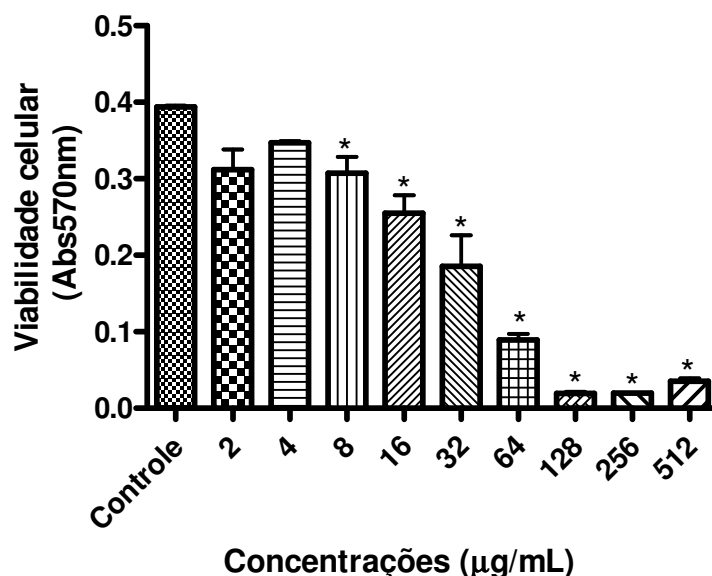


Figura 20. Efeito citotóxico de diferentes concentrações (512-2 µg/mL) de citral em células MDCK de túbulo de rim de cachorro. A densidade inicial de células foi de 1×10^5 células/mL. O gráfico apresenta a média $\pm$ EPM (n = 3). *p < 0,001 comparado com o grupo controle.

IC₅₀ = 32,8 µg/mL

Os experimentos seguintes tiveram como finalidade investigar o efeito oxidativo e antioxidante dos monoterpenos em estudo, tendo em vista que a destruição de membranas pode ser mediada através de uma ação oxidante e prevenida mediante uma substância antioxidante (ARBOS et al., 2008; EDRIS, 2007).

No metabolismo normal do organismo são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs), a exemplo de hidroxila, alcóxila ou radicais superóxido; além de peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. As EROs possuem funções importantes no metabolismo, como no processo inflamatório, no qual as EROs possuem ação antimicrobiana, além de outras ações, como a regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (ARBOS et al., 2008).

Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) causam oxidação de biomoléculas, incluindo proteínas, aminoácidos, lipídios insaturados e DNA, e estão correlacionados com o processo de envelhecimento e de enfermidades como arteroesclerose e câncer (GARDNER, 1997); além de doenças como anemia e talassemia (ARBOS et al., 2008).

O organismo humano contém com o sistema de defesa antioxidante que neutraliza os radicais livres e EROs e está presente em todas as células. Quando a produção desses radicais e EROs supera o sistema antioxidante, tem-se o estresse oxidativo (McCORD, 2000). Nesta situação, um suplemento externo de droga antioxidante é necessário para restabelecer o equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes (EDRIS, 2007).

O mecanismo antioxidante também é importante para manter o transporte de oxigênio através da hemoglobina, presente nos eritrócitos. A hemoglobina possui o Fe em sua molécula e que quando exposto à quantidades altas de oxigênio se torna oxidado e a hemoglobina se transforma em metemoglobina (metHb). Esta última é incapaz de transportar o oxigênio, e para exercer esta atividade, o sistema antioxidante faz com que o Fe retorne ao seu estado redox inicial (ARBOS et al., 2008).

A efetividade da ação de óleos essenciais como agentes antioxidantes tem sido atribuída à presença de terpenos fenólicos, como carvacrol ou ainda, de monoterpenos álcoois, cetonas e aldeídos (EDRIS, 2007). Mímica-Dukic e colaboradores (2004) sugeriram que a atividade antioxidante e de varredura dos radicais livres do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. é devido à presença de constituintes como o neral/geranial (cital), citronelal, isometona e metona.

Sokmen e colaboradores (2004) demonstraram a ação antioxidante do óleo essencial de *Thymus spathulifolius* e atribuíram tal ação devido à presença do conteúdo de timol e carvacrol. Diante desse contexto, foi investigado o potencial oxidante e antioxidante dos monoterpenos citral e carvacrol frente aos eritrócitos humanos, na presença e ausência da fenilhidrazina, ferramenta farmacológica que induz a formação de metemoglobina (metHB).

A figura 21 expressa a percentagem de metemoglobina por tratamento com o citral ou vitamina C ou fenilhidrazina (agente oxidante). Pode-se verificar que o citral não apresentou efeito oxidativo quando comparado com o grupo controle positivo (PH). O citral não demonstrou ação antioxidante quando comparado com o grupo tratado com a vitamina C (antioxidante padrão), de acordo com a figura 22.

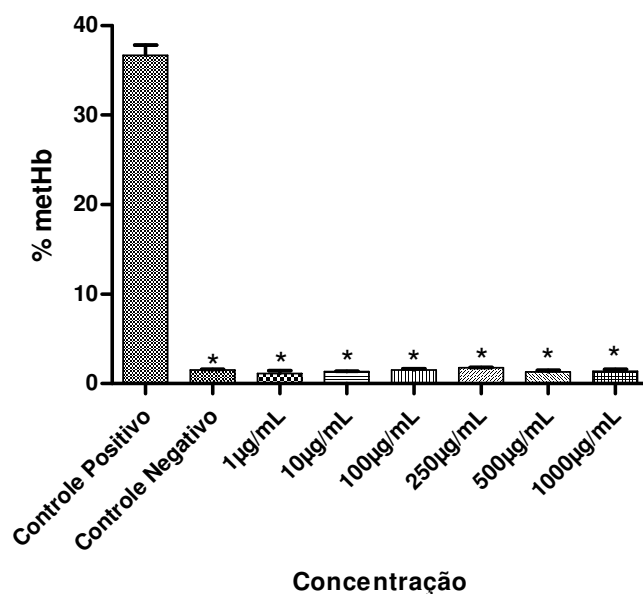


Figura 21. Efeito oxidativo do citral frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença de citral nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t* Student, **p* < 0,001, comparado com PH.

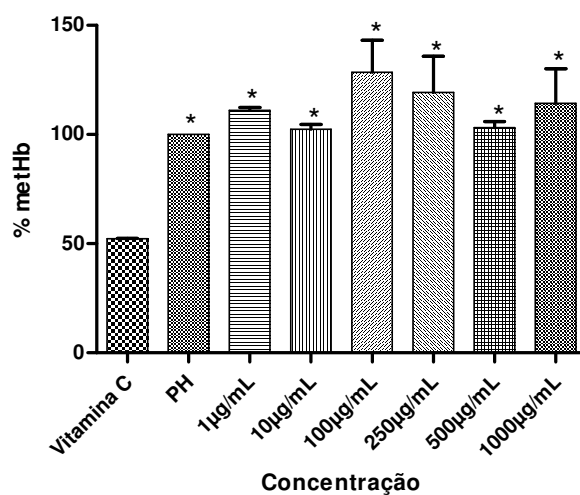


Figura 22. Efeito antioxidante do citral frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em contato com citral nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t* Student, **p* < 0,05, ** *p* < 0,001, comparado com a vitamina C.

O carvacrol não apresentou efeito oxidativo quando comparado com o grupo controle positivo (PH) e o mesmo não demonstrou ação antioxidante quando comparado com o grupo tratado com a vitamina C (antioxidante padrão), conforme expresso nas figuras 23 e 24, respectivamente.

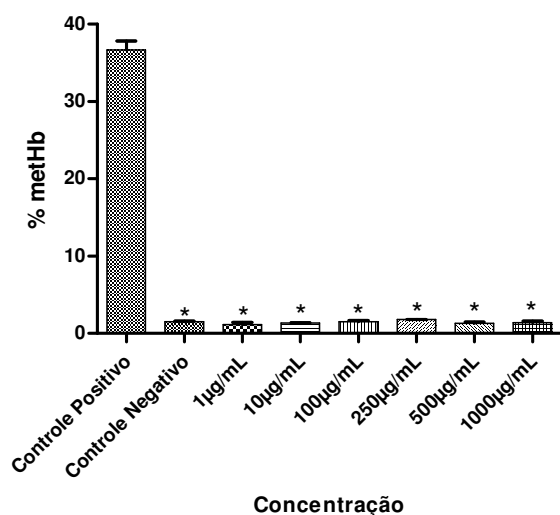


Figura 23. Efeito oxidativo do carvacrol frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença de carvacrol nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,001, comparado com PH.

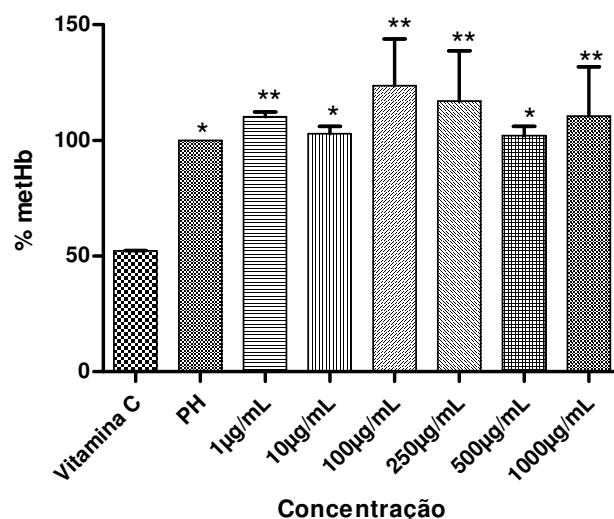


Figura 24. Efeito antioxidante do carvacrol frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos na presença do carvacrol nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t*'Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,001, comparado com a vitamina C.

A anfotericina B não ocasionou ação oxidante frente às hemácias humanas (Figura 25), e também não demonstrou ação antioxidante (Figura 26).

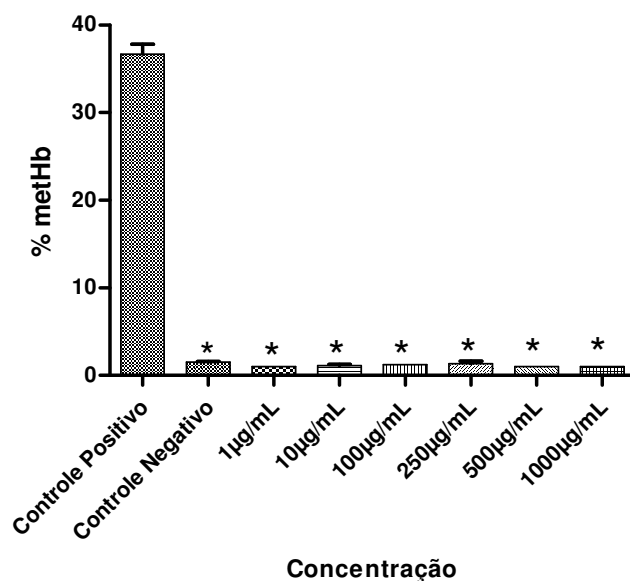


Figura 25. Efeito oxidativo da anfotericina B frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em solução de anfotericina B nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t* Student, **p* < 0,01, comparado com PH.

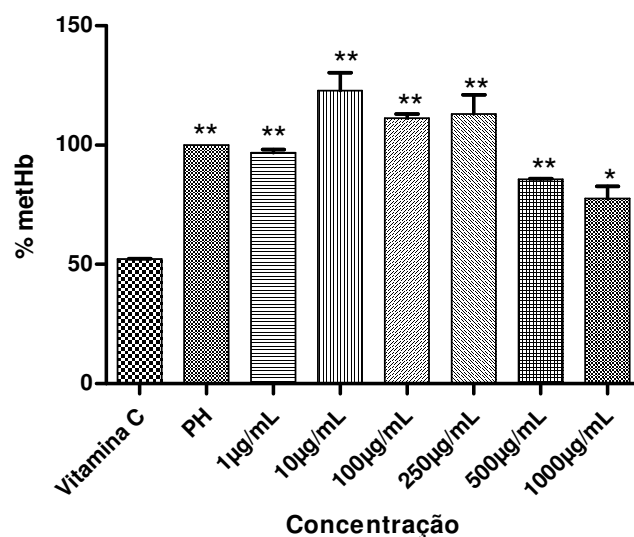


Figura 26. Efeito antioxidante da anfotericina B frente aos eritrócitos humanos tratados com a fenilhidrazina (PH), substância indutora da formação de metemoglobina (metHb). Os eritrócitos foram suspensos em solução de anfotericina B nas concentrações de 1, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL ou vitamina C (20 mmol/L). A comparação entre os grupos foi analisada por teste *t* Student, **p* < 0,05, ***p* < 0,001, comparado com a vitamina C.

Camargo et al (2007) consideram que os valores normais de metemoglobina variam de 1,9 a 3,8% e acima de 4% considera-se elevada. Diante deste dado encontrado na literatura, sugere-se que o citral, o carvacrol e a anfotericina B não apresentaram efeitos oxidantes, assim, tais drogas não induzem a formação de metHb, apresentando baixa toxicidade nas condições avaliadas.

Os resultados referentes ao experimento de estresse oxidativo em eritrócitos humanos obtidos demonstram que nas condições avaliadas, os monoterpenos e a anfotericina B não apresentam efeito antioxidante. Os dados encontrados não corroboram com os dados encontrados por Dukic e colaboradores (2004) e Sokmen e colaboradores (2004), os quais sugeriram que o citral e o carvacrol apresentam ação antioxidante. Entretanto, é importante salientar que os monoterpenos testados não demonstraram efeito oxidativo.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir:

- ✖ Nas condições avaliadas, o carvacol e o citral apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans*;
- ✖ A ação antifúngica dos fitoconstituintes independe da interação com a parede fúngica;
- ✖ O carvacrol parece atuar na membrana fúngica através da interação com ergosterol;
- ✖ Os monoterpenos estudados apresentaram ação indiferente com a anfotericina B, no estudo de associação;
- ✖ O citral e o carvacrol interagiram com colesterol, sendo este, um indício da toxicidade frente às células de mamíferos;
- ✖ Os monoterpenos apresentaram baixa toxicidade frente ao experimento de toxicidade aguda e nas condições avaliadas;
- ✖ O citral e o carvacrol apresentaram ação tóxica mediante células de mamíferos (MDCKs) e não demonstraram efeito antioxidante nem oxidante, dentro das condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p.1083-1094, 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 and Infectious Diseases**, v. 30, p. 41-50, 2011.
- ALEXANDER, B. D.; PERFECT, J. R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. **Drugs**, v. 54, p. 657–78. 1997.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, L. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 4168-4170,2001.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem Farmacológica Comportamental. Em: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2006, p. 131-137.
- ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008
- BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Combination antifungal therapy for the treatment of invasive yeast and mold infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, p. 448–456, 2007.
- BAGINSKI, M.; BRUNI, P.; BOROWSKI, E. Comparative analysis of the distribution of the molecular electrostatic potential for cholesterol and ergosterol, **Journal of Molecular Structure: Theochem**. v. 311, p. 285–296. 1994.

BAGNIS, C. I.; DERAY, G. Amphotericin B nefrotoxicity. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 13, p. 481-491, 2002.

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

BARAN, M.; BOROWSKI, E.; MAZERSKI, J. Molecular modeling of amphotericin B – ergosterol primary complex in water II. **Biophysical Chemistry**, v. 141, p. 162-168, 2009.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 3^a ed., São Paulo: Atheneu 2008, p. 59-70.

BASILICO, M. Z.; BASILICO, J. C. Inhibitory effects of some species essential oil on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p.238-241, 1999.

BENNET, J. E. Agentes antimicrobianos – agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11^a ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

BENNETT, J. E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBBS, C.G.; WARNER, J.F.; ALLING, D.W. A comparison of amphoterecin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptoccal meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 301, p.126-131, 1979.

BRITO, A. R.M. S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Da Universidade Estadual Paulista, 1996, p. 99-108.

CAMARGO, T.M.; ALVES, M.I.F.; OLIVEIRA, S. J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 95-98, 2007.

CARMO, E. S. **Ensaio pré-clínicos com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. para tratamento de pitiríase versicolor.** João Pessoa – PB. Tese de Doutorado, 2011.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J; VIUDES, A; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CAVASSANI, V. G. S.; SOBRINHO, J. A.; HOMEM, M. G. N.; RAPOPORT, A. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, p. 630-634, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p.739-788.

CLSI 2002. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Method M27-A2, 2ª ed. Wayne Ed.; v. 22, p. 1-29.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatterioopsis* species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1895-99. 2008.

COSTA, C.A.R.A.; BIDINOTTO, L.T.; TAKAHIRA, R. K.; SALVADORI, D.M.F.; BARBISAN, L.F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2268-2272, 2011.

CASTAÑO, A.; LECHÓN, M. J. G. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literatura survey. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 695-705, 2005.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854–860, 2004.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGES, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 572–576, 2008.

DENNING, D. W.; HANSON, L.H.; PERLMAN, A. M.; STEVENS, D. A. *In vitro* susceptibility and synergy studies os *Aspergillus* species to conventional and new agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 21-34, 1992.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thumb) Ohwi & Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, n. 3, p.409-417, 1997.

DIAZ, M. A.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 724-728, 2010.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In : KLAASSEN, C. D. ; AMDUR, M. O.; DOUR, J. **Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons**. 5^a ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996, p. 13-34.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytoterapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EKWALL, B. The basal cytotoxicity concept. In: GOLDBERG, A.M.; VAN ZUPTHEN, L. F. M. **The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing**. vol. 11. New York: Mary Ann Liebert, 1995, p. 721-725.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELERING, R. C. JR. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (Eds). **Antibiotics in laboratory medicine**, 4th Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-13. 1998.

ERNST, E.J.; KLEPSE, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M.A. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 33, p. 75-80, 1999.

ERNST, M. E., KLEPSE, M. E., WOLFE, E. J., PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 26, p. 125-131, 1996.

ERNST, M.E.; KLEPSE, M. E.; WOLFE, E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 033366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagnostic microbiology and infections disease**, v. 26, p. 125-131, 1996.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence of the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-25. 2008.

FISCHER, F.; COOK, N. B. **Micologia – Fundamentos e Diagnóstico**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2001.

FLÖCKIGER, U.; MARCHETTIB, O.; BILLE, J.; EGGIMANN, P.; ZIMMERLI, S.; IMHOF, A. GARBINO, J.; RUEF, C.; PITTET, D.; TÄUBER, M.; GLAUSER, M.; CALANDRA, T. Treatment options of invasive fungal infections in adults. **Swiss Med Wkly**, v. 136, p. 447-463, 2006.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 23-28, 2008.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 306-10, 1995.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIEGAS, A.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B.; Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p.163-168, 2008.

GARDNER, P. Superoxide-driven aconitase. **Bioscience Rap.**, v. 17, p. 33-42, 1997.

GIAVANI, E.; MENEGOLA, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? **Toxicology letters**, v. 198, p. 106-111, 2010.

GOMES, C. L.; CAVALCANTE, J. E.; CUNHA, F. A.; AMORIM, L. N.; MENEZES, E. A. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. **Revista Brasileira de Análises Clínica**, v. 42, p. 223-25, 2010.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; REGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases** v. 48, p. 1695–703, 2009.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN, H. E. Amphotericin B and coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 434-341, 2007.

KAMBOJ, V. P. Herbal medicine. **Current Science**, v. 78, p.35-39, 2000.

KEELE, D. J.; DELALLO, V. C.; LEWIS, R. E.; ERNST, E. J.; KLEPSE, M. E. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic microbiology and infections disease**, v. 41, p. 121-126, 2001.

KLEPSE, M. E., WOLFE, E. J., JONES, R. N., NIGHTINGALE, C. H., PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1392-1995, 1997.

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

KLEPSE, M.E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal of standardized methods. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 1207-1212, 1998.

KONTOYIANNIS, D. P.; RUSSELL, E. L. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, v. 359, p.1135–44, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N. T. Leveduras de interesse médico. In: **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9ª ed., São Paulo, Editora Sarvier, 2002.

LANFON, H.; PORTER, S. R.; MCCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 383-385, 2004.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 223-227, 2009.

LEWIS, R. E.; KLEPSE, M. E.; PFALLER, M. A. Combination systemic antifungal therapy for cryptococcosis, candidiasis, and aspergillosis. **Journal of Infectious Disease Pharmacotherapy**, v. 3, p. 61-83, 1999.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, M. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345-351, 2002.

LUNDE, C.; KUBO, I. Effect of Polygodial on the Mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 1943-53. 2000.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, p. 111-117, 2001.

McCORD, J. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American J. Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H.F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon** v. 23: p. 955-962, 1985.

MENEZES, E. A.; CARNEIRO, H. M.; CUNHA, F. A.; OLIVEIRA, I. R. N.; ÂNGELO, M. R. F.; SALVIANO, M. N. C. Frequência de microrganismos causadores de infecções urinárias hospitalares em pacientes do Hospital Geral de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, p. 243-246, 2005.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, p. 354-55, 2009.

MESA-ARANGO, A. C.; RAMOS, J. M.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878-884, 2009.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Disease**, v.11, p. 142-151, 2011.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2485-2489, 2004.

MINAMI, P. S. Micologia – Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. 1ª ed. Ed. Manole. São Paulo, 2003.

MITSCHER, L.A.; LEU, R.P.; BATHALA, M.S.; WU, W.N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants-Introduction, rationale, and methodology. **Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods** 65, 55–63, 1983.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical microbiology reviews**, v.18, p. 163-194, 2005.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMAN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globules* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1061-1066, 2010.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters** v. 230, p.191-195, 2004.

OH, K. B.; YANG, H. C.; MATSOUKA, H.; YAMAMOTO A, KURATA H. Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hyphal growth of *Candida albicans*

estimated at a single hypha level. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 191-195, 1995.

PALANIAPPAN, K., HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 164-168, 2010.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing *in vitro* – what we know and what we need to know. **Environment Health Perspectives**, v. 106, p. 559-568, 1998.

QUIRINO, M. R. S. BIRMAN, E. G.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; SOUZA, V. M. Distribution of oral yeast in controlled and uncontrolled diabetic patients. **Revista de Microbiologia**, v. 25, p. 37-41, 1994.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 633–38, 2005.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S. M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

RESOLUÇÃO RE 90, de 16 de março de 2004. Acesso em <<http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Proplam/RE90.pdf>>, 31 de agosto de 2011.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALENZANO, L.; MALLAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, p. 635-638, 2008.

RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. **Current Drug Targets** v. 7, p. 495–504, 2006.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 124-130.

SAAD, A., FADLI, M., BOUAZIZ, M., BENHARREF, A., MEZRIOUI, N. -E. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1057-1060, 2010.

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

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 283-294, 2010

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, p. 74-78, 2003.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p.241-253, 1998.

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

SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J. Combination antifungals: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, p. 883–892, 2007.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMANN, B. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membran. **The Journal of Biochemical Chemistry**, v. 269, p.8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMANN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.201-222, 1995.

SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 63-66, 2008.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, A. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627-634, 2004.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and toxicology Pathology**, v. 60, p. 225-233, 2008.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 467-495.

TALALAY, P.; TALALAY, P. The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**. v. 76(3), p. 238-247, 2001.

VASCONCELOS – JÚNIOR, A. A.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A. Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of *Candida* spp. isolated from Urine. **Mycopathologia**, v. 171, p. 1-6. 2011.

VILLA, A. L.; VOS, P. D. E.; MONTES, C.; JACOBS, P. A. Selective epoxidation of monoterpenes with methyltrioxorhenium and H₂O₂. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 8521-8524, 1998.

VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, p. 1914-1918, 1996.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p. 529–53, 2007.

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

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ZEICHNNER, L. O.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiases in the intensive care unit. **Journal of Critical Care Medicine** v. 34, p. 857-863, 2006.

ZHANG, B.; SUZUKI, J. S.; NISHIMURA, N.; TOHYAMA, C. Difference in Cadmium Two Kidney Cell Lines MDCK) with Special Cytotoxicity in (LLC-PK1 and Reference to Metallothionem. **Toxicology in vitro**, v. 9, p. 765-772, 1995.

ANEXOS

PROTOCOLO - TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações

complementares: _____

Responsável Técnico

ARTIGOS SUBMETIDOS

1. JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH

“ Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains”

2. PHARMACEUTICAL BIOLOGY

“ Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action”

Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains

Igara Oliveira Lima

*Post-Graduation Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Pharmaceutical Technology
Laboratory, Health Sciences Center, Paraíba Federal University, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

Fillipe de Oliveira Pereira

*Post-Graduation Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Pharmaceutical Technology
Laboratory, Health Sciences Center, Paraíba Federal University, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

Wylly Araújo de Oliveira

*Post-Graduation Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Pharmaceutical Technology
Laboratory, Health Sciences Center, Paraíba Federal University, João Pessoa, Paraíba, Brazil
Health and Education Center, Campina Grande Federal University, Cuité, Paraíba, Brazil*

Edeltrudes de Oliveira Lima

Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Paraíba Federal University Brazil

Everardo Albuquerque Menezes

Department of Clinical Analysis, Ceará Federal University, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Francisco Afrânio Cunha

Department of Clinical Analysis, Ceará Federal University, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz

Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Paraíba Federal University Brazil

Abstract

In this study, the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC) and mode of action of carvacrol were determined. MIC was determined according to the standard broth microdilution method, and MFC was considered as the lowest concentration in culture plates with SDA in which growth was less than 3 colony-forming units. The effect of ergosterol or sorbitol on carvacrol was investigated using the broth microdilution method. MIC was 256 µg/mL and MFC was 512 µg/mL. This phytoconstituent acts by binding to the fungal membrane sterol and does not act by modifying the fungal cell wall. This study is important because it shows the mode of action of carvacrol. However, more studies are necessary to define the exact mechanism of action.

Key Word Index

Candida albicans, natural product, terpene, carvacrol, ergosterol, sorbitol.

Introduction

Candida spp. are human commensals that can cause superficial and invasive infections, candidiasis (1). This disease is an infection by *Candida albicans*; however, other species of *Candida* (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) may account for infections in humans. The clinical profile of candidiasis includes mucocutaneous, systemic or vaginal candidiasis or onychomycosis (2).

The increase in invasive opportunistic mycoses occurs due to an expanding population of patients with immunosuppressive conditions, including solid-organ transplant, cancer or AIDS, premature birth, advanced age and others (3). The Brazilian Network Candidemia Study reported an overall incidence of 2.49 cases of candidiasis per 1000 hospital admissions or 0.37 cases per 1000 patient-days (4). In the northeast of Brazil, the incidence is 3.9 cases of candidiasis per 1000 hospital admissions (5).

A small number of antifungal classes are available for treating serious mycoses, based on their chemistry and antifungal action (6). The triazoles, which specifically inhibit fungal ergosterol biosynthesis, fluconazole, itraconazole, and ketoconazole, are used to treat various types of life-threatening fungal disease (6). Flucytosine inhibits DNA and RNA synthesis in pathogenic yeasts (*Candida* and *Cryptococcus* spp) and has been available for many years for use in combination with polyenes or triazoles (6). Among the polyenes, which interact with ergosterol in fungal membranes and alter their permeability, amphotericin B is the most widely used agent for deep-seated mycoses (6). The toxicity of polyenes provided the impetus to develop alternative compounds that enable systemic therapy (7).

Frequently, there is some difficulty in treating fungal infections, which is related to the increase in resistance to antifungals (8). Natural products, such as medicinal plants, are a source of starting material for the synthesis of new bioactive substances (9). The molecular diversity of medicinal plants represents a challenge to chemists working on the isolation and determination of the structure of active compounds (10). Terpenes are compounds found in essential oils from several aromatic plants and form structurally and functionally different classes (11). They are made from combinations of several 5-carbon-base (C5) units called isoprenes (11). The main terpenes are the monoterpenes (C10) and sesquiterpenes (C15), and terpenes with an oxygen are called terpenoids (11). They possess various functional groups: carbures (myrcene), alcohols (geraniol), aldehydes (geranial), ethers (1,8-cineole), and phenols (carvacrol) (11).

Carvacrol is a phenolic monoterpene, and it has various biological activities against different microorganisms. Carvacrol has antimicrobial action against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) (12), and has been shown to inhibit the growth of *Vibrio cholerae* in food (13). This phytoconstituent has demonstrated activity against *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* biofilms (14). The presence of a phenolic hydroxyl group in carvacrol accounts for its activity against pathogens such as *Bacillus cereus* (15).

The aim of this work was to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of carvacrol and to investigate its mode of action using sorbitol and ergosterol assays.

Experimental

Drugs: The substances used in this work were acquired from commercial sources:

carvacrol (Sigma-Aldrich®); ergosterol (Sigma-Aldrich®), sorbitol (Sigma-Aldrich®) and amphotericin B (Sigma-Aldrich®). In addition, Sabouraud dextrose broth (SDB) and Sabouraud dextrose agar (SDA) were purchased from Difco (Detroit, USA).

Fungal strains: The strains of *C. albicans* tested belong to the collection of the Mycology Laboratory, Federal University of Paraíba and include ATCC 40042, ATCC 13803, ATCC 76485 and clinical strains (13, 35, 36, 39, 41 45, 52, 57, 67, 68, 70, 77, 84, 86) provided by Professor Everardo Albuquerque Menezes (Department of Clinical Analyses, Ceará Federal University).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC):

MIC was determined by the microdilution method. Cultures of *Candida albicans* were placed on Sabouraud dextrose agar (SDA) and incubated for 24-72 hours at 37°C. Colonies of this culture were suspended in sterile 0.85% NaCl, and the inoculum was standardized to 0.5 on the McFarland scale ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL). Sabouraud broth and carvacrol at concentrations of 1024 µg/mL (initial concentration) to 1 µg/mL (final concentration) were added to a 96-well plate. MIC was determined with approximately $1-5 \times 10^5$ CFU/mL of the microorganism in each well. The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours, at which time fungal growth was visually evident. To determine MFC, 10 µL of each of the wells with no fungal growth were seeded on a plate containing SDA, and the SDA plates were incubated at 37°C for 24-48

hours. Negative control (without drugs) was performed to confirm cell viability (16-17). A sensitivity control to Tween 80 was performed at the same concentrations used to dissolve the products.

MFC was considered as the lowest concentration present in the plate with SDA in which growth was less than 3 CFU. Afterwards, 20 µL of 0.5% TTC (triphenyl tetrazolium chloride) were added to each of the 96 wells for MIC determination, and the plate incubated for 24 hours. MIC was determined as the lowest carvacrol concentration that inhibited visible growth of the microorganism, also indicated by TTC reduction and reading the 96-well plates. Three independent experiments were carried out on different occasions (18).

Sorbitol assay: MIC of carvacrol was determined with *Candida albicans* (ATCC 40042 and 13) using the broth microdilution method (16). Sorbitol was added to the culture medium to give a final concentration of 0.8 M. Following incubation at 25 °C, the plates were read at 48 h and after seven days (19-20). This assay was carried out in duplicate and the geometric mean values were calculated.

Effect of ergosterol on MIC of carvacrol: To determine if carvacrol interacts with ergosterol, the MIC of carvacrol against *Candida albicans* (ATCC 40042 and 13) was determined by the microdilution method (16), in presence and absence of different concentrations of ergosterol at concentrations of 100, 200 and 400 µg/mL. This assay was carried out in duplicate and the geometric mean values were calculated. Amphotericin B was used as the positive control drug (19-20).

Results and Discussion

Substances from plants are used in the treatment of various diseases, but the potential of plants as a source of new drugs is still insufficiently explored. Of the estimated number of plant species, only a small percentage have had their pharmacological properties studied (21), thus there is a need to

search for new drugs from plants that have therapeutic potential.

The resistance of microbes to antimicrobial agents has potentially serious implications for the control of infections (6). Therefore, it is necessary to study plants or their extracts or phytoconstituents.

Essential oils, which are used as food flavoring agents, possess a broad spectrum of antimicrobial activities attributed to the high

content of phenolic derivatives, such as carvacrol and thymol (22). Origanum oil, which is rich in carvacrol, is used for systemic and superficial fungal infections, and further studies revealed anti-*Candida albicans* activity (23).

MIC and MFC of carvacrol were determined by the broth microdilution technique (Table I). MIC was found to be between 128 and 256 µg/mL. The concentration of 256 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 128 µg/mL was able to inhibit 44% of the strains tested. MFC in the microorganisms was between 256 and 512 µg/mL, the latter being fungicidal for all strains tested. MIC of amphotericin B (positive control) was 0.5-1 µg/mL. Control cultures showed the absence of fungal growth inhibition by Tween 80, and fungal growth in broth without the addition of drugs was detectable (negative control). (see Table 1).

INSERT TABLE I HERE

The sorbitol assay consisted of determining MIC in the presence and absence of 0.8 M sorbitol. The present work showed no difference in MIC of carvacrol in the absence and presence of sorbitol. (see Table II). The results suggests that the carvacrol does not act on sorbitol, which has an osmoprotective function and is essential for fungal growth, when fungi are in the presence of drugs that act on the cell wall (19). In the present assay, MIC of carvacrol against *Candida albicans* yeast was 256 µg/mL in the presence and absence of sorbitol, suggesting that this phytoconstituent does not act by modifying the fungal cell wall.

INSERT TABLE II HERE

The next step of this work was to determine if carvacrol acts by affecting ergosterol in the fungal cell. Figures I and II respectively show that MIC of carvacrol and amphotericin B increased in the presence of ergosterol. The results suggest that carvacrol can act on ergosterol. When the MIC of a compound is increased in the presence of sorbitol or ergosterol, it means that this substance interferes with the function of these cell wall or membrane (24). An important characteristic of essential oils and their

phytochemicals (e.g. monoterpenes) is their hydrophobicity, and consequently, they can interact with the fungal cell membrane, interfering with its integrity. They can partition into lipids of the fungal membranes rendering them more permeable, damaging their integrity and ultimately causing mycelial death (25).

INSERT FIGURES I AND II HERE

There is some evidence that carvacrol acts by interacting with the cell membrane, making it permeable (26). Carvacrol is able to disintegrate the outer membrane of gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides (LPS) and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to ATP (27). The presence of magnesium chloride has been shown to have no influence on this action, suggesting a mechanism other than chelation of cations in the outer membrane (27).

Studies with *Bacillus cereus* have shown that carvacrol interacts with the cell membrane, where it dissolves in the phospholipid bilayer and is assumed to align between the fatty acid chains (29). This distortion of the physical structure would cause expansion and destabilization of the membrane, increasing membrane fluidity, which in turn would increase passive permeability (30). Other studies with carvacrol demonstrated that this compound is able to change the membrane fatty acid composition of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* strains (30).

It is possible that carvacrol is able to bind to the fungal membrane sterol (31). The structure and function of the plasma membrane of fungal cells is essential for the survival of these microorganisms (31). Changes in the synthesis or maintenance of the cell membrane results in damages and, consequently, death of the fungus (31). That is why this work is interesting, but it is necessary to investigate other mechanisms of action of carvacrol. This study shows that carvacrol has anti-*Candida* activity and it is able to act by altering the membrane structure of the fungal cell (see Figure III).

INSERT FIGURE III HERE

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for financial support and Paraíba Federal University. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

References

1. I. Hassan, G. Powell, M. Sidhu, W. Hart and D. Denning, Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. *Journal of Infectology*, **59**, 360–365 (2009).
2. E. Anaissie, Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a Cancer Center and review. *Clinical Infectology Disiases*, **14**, 43-53 (1992).
3. T. J. Walsh, E.J. Anaissie, D.W. Denning, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J. A. Burik, R. Wingard, F. Patterson. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectology Disease*, **46**, 327–360 (2008).
4. A. L. Colombo, M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouér, B. Arthington-Skaggs, D. A. Matta, D. Warnock, J. Morggan, Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 2816–2823 (2006).
5. S. L. Hinrichsen, E. Falcao, S. Vilella, A. L. Colombo, M. Nucci, L. Moura, L. Rêgo, C. Lira, L. Almeida, Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **41**, 394–398 (2008).
6. D. Sanglard, F. C. Odds, Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, **2**, 73–85 (2002).
7. D. W. Denning, W.W. Hope, Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*, **18**, 195-204 (2010)
8. J. C. L. V. Araújo, E. O. Lima, B. S. O. Ceballos, K. R. L. Freire, E. L. Souza, L. Santos-Filho, Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*, **33**, 55-64 (2004).
9. R. N. Almeida, D. S. Navarro, J. M. Barbosa-Filho, Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, **8**, 310-322 (2001).
10. M. Hamburger, K. Hostteman, Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874 (1991).
11. F. Bakkali, S. Averbek, D. Averbek, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemistry Toxicology*, **46**, 446–475 (2008).
12. A. Nostro, A. R. Blanco, M. A. Cannatelli, V. Enea, G. Flamini, I. Morelli, A. S. Roccaro, V. Alonzo, Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, **230**, 191-195 (2004).
13. P. Rattanachaikunsopon, P. Phumkhachorn, Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**, 614–619 (2010).
14. S. Dalleau, E. Cateau, T. Berges, J. M. Berjeaud, C. Imbert. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**, 572–576 (2008).
15. A. E. Edris, Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, **21**, 308-323 (2007).
16. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Method M27-A2, 2nd ed. Wayne Ed.; 22: 1-29. NCCLS, and method M38-A, 2nd ed, Wayne Ed.; 22: 1-27.
17. J.N. Eloff, A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, **64**, 711-713 (1998).

18. E. J. Ernst, M. E. Klepser, M. E. Ernst, S. A. Messer, M. A. Pfaller, In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Mycology*, **33**, 75-80 (1999).
19. D. J. Frost, K. D. Brandt, D. Cugier, R. J. Goldman, A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *Journal Antibiotic*, **48**, 306-310 (1995).
20. A. Escalante, M. Gattuso, P. Pérez, S. Zacchino. Evidence of the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, **71**, 1720-1725 (2008).
21. S. M. K. Rates. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-613 (2001).
22. R. P. Samy, P. Gopalakrishnakone, Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **7**, 283–294 (2010).
23. Manohar V, Ingram C, Gray J. Antifungal activities of origanum oil against. *Candida albicans*. *Molecular Cell Biochemistry*, **228**, 111–117 (2001).
24. S. H. Lee, J. R. Lee, C. S. Lunde, I. Kubo, In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. *Planta Medica*, **65**, 204-208 (1999).
25. J. Sikkema, J. A. M. De Bont, B. Poolan, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Review*, **59**, 201-222 (1995).
26. R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. Coote, G.-J.E. Nychas, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453–462 (2001).
27. I. M. Helander, H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, A. Von Wright, Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3590–3595 (1998).
28. A. Ultee, E. P. W. Kets, M. Alberda, F. A. Hoekstra, E. J. Smid. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, **174**, 233–238 (2000).
29. A. Ultee, M. H. J. Bennink, R. Moezelaar, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, **68**, 1561–1568 (2002).
30. R. Di Pasqua, N. Hoskins, G. Betts, G. Mauriello, Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **54**, 2745-2749 (2006).
31. R. A. Calderone, R. L. Cihlar, *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. Nova York (EUA): Marcel Dekker: (2002).

Table I. Minimum inhibitory concentration (MIC) of amphotericin B and carvacrol and minimum fungicidal concentration (MFC) in $\mu\text{g/mL}$ of carvacrol for the yeasts *C. albicans*.

<i>Candida albicans</i> samples	Control	Amphotericin B MIC	Carvacrol MIC	Carvacrol MFC
ATCC 40042	+	1 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$
ATCC 13803	+	1 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
ATCC 76485	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
13	+	1 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
36	+	4 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
39	+	1 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
41	+	2 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
45	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
52	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
57	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
67	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
70	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
77	+	1 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
84	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
86	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
88	+	0,5 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$

+: Fungal growth

Table II. Sorbitol assay with carvacrol different concentrations against *Candida albicans* strains (ATCC40042 and 13).

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	ATCC-40042		13	
	Presence of sorbitol (0.8M)	Absence of sorbitol (0.8M)	Presence of sorbitol (0.8M)	Absence of sorbitol (0.8M)
2048 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-
1024 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-
512 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-
256 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-
128 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-
64 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
32 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
16 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
8 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
4 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
2 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
1 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+

+ : fungical growth

- : absence of fungical growth

FIGURE LEGENDS

Figure I. Effect of different concentrations of exogenous ergosterol (100-400µg/mL) on the MIC of carvacrol and amphotericin B against *C. albicans* strain (ATCC 40042).

Figure II. Effect of different concentrations of exogenous ergosterol (100-400µg/mL) on the MIC of carvacrol and amphotericin B against *C. albicans* strain (13).

Figure III. The diagram illustrates the part of cell membrane of *Candida albicans* and the action of the carvacrol. This compound probably interacts with the sterol membrane, causing the death of the *C. albicans*, according the results obtained in this work.

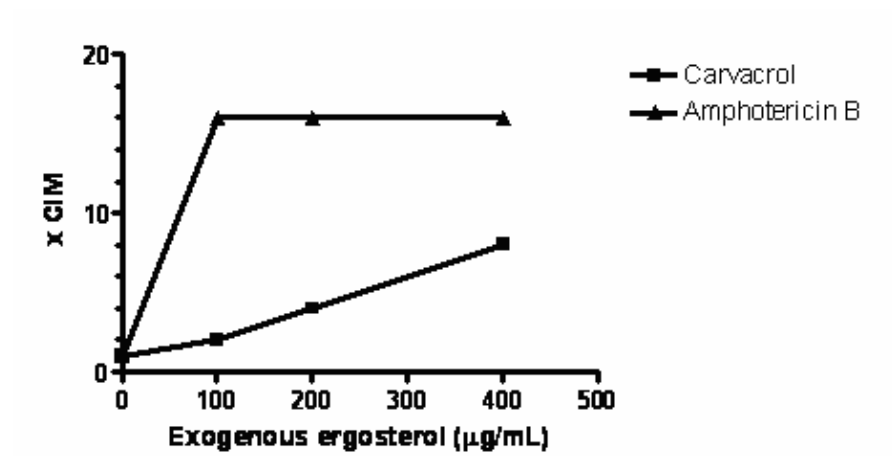


Figure I. Effect of different concentrations of exogenous ergosterol (100-400µg/mL) on the MIC of carvacrol and amphotericin B against *C. albicans* strain (ATCC 40042).

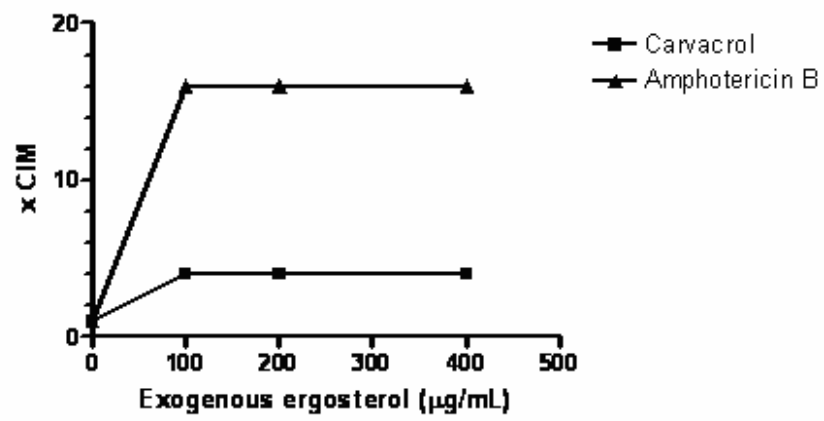


Figure II. Effect of different concentrations of exogenous ergosterol (100-400μg/mL) on the MIC of carvacrol and amphotericin B against *C. albicans* strain (13).

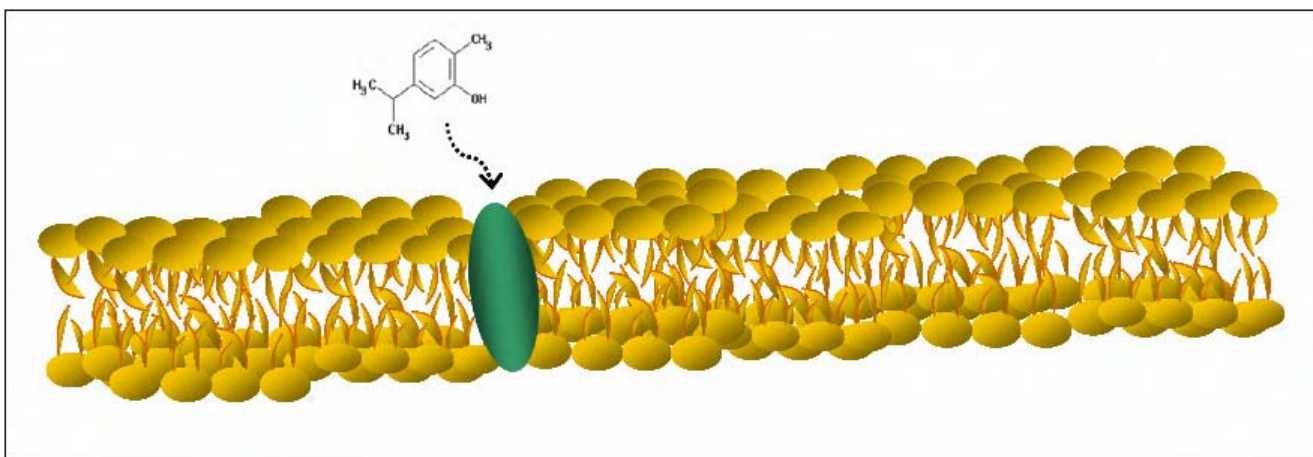


Figure III. The diagram illustrates the part of cell membrane of *Candida albicans* and the action of the carvacrol. This compound probably interacts with the sterol membrane, causing the death of the *C. albicans*, according the results obtained in this work.

Pharmaceutical Biology



Anti-Candida albicans effectiveness of citral and investigation of mode of action

Journal:	<i>Pharmaceutical Biology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lima, Igara; Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos Nóbrega, Fernanda; Universidade Federal da Paraíba Oliveira, Wylly; Universidade Federal de Campina Grande Lima, Edeltrudes; Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Departamento de Ciências Farmacêuticas Menezes, Everardo; Universidade Federal do Ceará, Departamento de Análises Clínicas Cunha, Francisco; Universidade Federal do Ceará, Departamento de Análises Clínicas Diniz, Margareth de Fátima; Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas
Keywords:	Candida albicans, Citral, Terpenes, Ergosterol, Sorbitol, Cholesterol, Antifungal activity, Mycology, Natural Products

SCHOLARONE™
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb> Email: pezzuto@hawaii.edu

Anti-Candida albicans effectiveness of citral and investigation of mode of action

Igara Oliveira Lima¹; Fernanda de Medeiros Nóbrega²; Wylly Araújo de Oliveira³,
Edeltrudes de Oliveira Lima⁴, Everardo Albuquerque Menezes⁵, Francisco Afrânio Cunha⁵,
Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz⁴.

¹Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de
Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba,
Brasil.

²Graduanda do curso de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPB,
João Pessoa, Paraíba, Brasil.

³Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba,
Brasil.

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

⁵Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

* Corresponding author:

Igara Oliveira Lima

Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Paraíba Federal University
(UFPB)

Campus I, Castelo Branco, Zip Code 58051-970, João Pessoa/PB, Brazil

Phone: 00 55 083 3216 7003

e-mail: igaralima@yahoo.com.br

Abstract

Context:

Candidiasis is a mycosis caused by *Candida* species, which is of clinical importance due to the increase in resistant yeasts. *Candida* infection has been a serious health problem due to the inappropriate use of antibiotics. Therefore, it is necessary to study molecules with an antifungal action. Citral is a monoterpene with known pharmacological properties, including antimicrobial action.

Objective:

The aim of this work was to determine the MIC and MFC of citral and the probable mode of action.

Materials and methods:

The MIC of citral was determined by the broth microdilution method using Sabouraud dextrose medium. Additionally, the interference of citral in cell wall (sorbitol assay) and the binding of citral to ergosterol and cholesterol were studied, carried out by broth microdilution method.

Results:

The MIC and MFC of citral were 512 and 1024 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The MIC of amphotericin B was 1 $\mu\text{g/mL}$. The mechanism of action did not involve either the cell wall or ergosterol. However, the presence of cholesterol increased the MIC of citral to 1024 $\mu\text{g/mL}$, indicating there is some interaction between citral and cholesterol. Amphotericin B was used as the positive control, and it showed a high MIC in the presence of ergosterol (32 $\mu\text{g/mL}$), while in the presence of cholesterol MIC increased to 4 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusion:

Citral inhibits the growth of *C. albicans*. The probable mechanism of action did not involve the cell wall or ergosterol. Citral is able to interact with cholesterol. More studies are necessary to describe their effects completely.

Keywords: *Candida albicans*, citral, terpenes, ergosterol, sorbitol, cholesterol, antifungal activity, mycology, natural products.

Introduction

Disseminated candidiasis is associated with a mortality in excess of 25%. *Candida* spp. is a normal commensal of the skin and gastrointestinal and genitourinary tracts, and *Candida albicans* is the most frequent species isolated from clinical specimens (Kett et al., 2011, Enoch et al., 2006). Among the *Candida* species, *C. albicans* is associated with bloodstream infections in 44% of cases in Latin America and 62% in Europe (Richardson & Lass-Flörl, 2008).

Prior surgery, acute renal failure, previous yeast colonization, neutropenia, antibacterial agents, parenteral nutrition and central nervous catheters are associated with an increased risk of invasive candidiasis (Eggimann et al., 2003).

The incidence of invasive opportunistic mycoses occurs due to an expanding population of immunosuppressed patients, including patients with cancer, diabetes, AIDS, solid-organ transplant, hematopoietic stem cell transplant, premature neonates and patients recovering from major surgery (Nucci et al., 2010).

The resistance of microbes to antimicrobial agents has potentially serious implications for the management of infections (Sanglard & Odds, 2002). Existing antifungals can treat mucosal fungal infections, but very few treatments are available for invasive diseases. (Cohen, 1998). The polyenes cause serious host toxicity. The azoles are fungistatic and their

prolonged use contributes to the development of drug resistance in *C. albicans* and other related species (Sanglard et al., 2003). Overexpression of efflux genes is the most common mechanism of resistance to azoles in *Candida* species, and has also been associated with cross-resistance within the class. Progressive loss of echinocandin activity has been observed in *Candida* species with prolonged exposure to echinocandin. The most common mechanism of echinocandin resistance is associated with mutation in the FSK1 gene, a gene that produces the FSK1 protein for β -1,3-d-glucan synthase (Kriengkauykit et al., 2011). For these reasons, new drugs and other therapies are necessary for the treatment of infections caused by *C. albicans*.

Terpenes are compounds found in essential oils from several aromatic plant and form structurally and functionally different classes. They are made of combinations of several 5-carbon-base (C5) units called isoprene. The main terpenes are the monoterpenes (C10) and sesquiterpenes (C15), and terpenes with oxygen are called terpenoids (Bakkali et al., 2008).

Citral is the name given to a natural mixture of two isomeric acyclic monoterpene aldehydes: geranial (trans-citral, citral A) and neral (cis-citral, citral B). This phytoconstituent is active against HSV-1 *in vitro* and it has anti-inflammatory action, where it blocks the NF- κ B pathway (Adorjan & Buchbauer, 2010).

Garcia et al. (2008) demonstrated the activity of citral against the fungi *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas*. Citral is active against of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Penicillium italicum* and *Rhizopus stolonifer* (Saddiq & Khayyat, 2010).

The aim of this work was to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) and to investigate the mode of action of this phytoconstituent against *C. albicans* by sorbitol, ergosterol and cholesterol assays.

Methods

Phytoconstituents and substances

The following substances used in this work were acquired commercially: citral, ergosterol, sorbitol, cholesterol and amphotericin B (all from Sigma-Aldrich). Furthermore, Sabouraud dextrose broth (SDB) and Sabouraud dextrose agar (SDA) were purchased from Difco (Detroit, USA).

Cell strains used

The assays were performed with 13 strains of *Candida albicans*. The strains were isolated from blood (LM-13, LM-36, LM-39, LM-41, LM-45, LM-52, LM-57, LM-68, LM-77, and LM-86), urine (LM-70), respiratory tract (LM-67) and vaginal secretion (LM-84) and are part of the Collection of the Laboratory of Microbiology of Yeasts, College of Pharmacy, Federal University of Ceará (LMY/CF/UFC). The strains were streaked on potato agar (Himedia Mumbai-India) and incubated at 37°C for 24 h. They were then plated on CHROMagar Candida (Himedia Mumbai-India) to assess purity. Identification was done by micromorphology on rice agar Tween 80, germ tube production, fermentation and assimilation of carbohydrates, and molecular tests as well as (Menezes et al., 2009; Gomes et al., 2010; Vasconcelos-Júnior, Menezes & Cunha, 2011).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

MIC was determined by the microdilution method, according NCCLS (2008) with some modifications. Cultures of *Candida albicans* were placed on Sabouraud dextrose and incubated for 24-72 h at 37°C. Colonies of this culture were suspended in sterile 0.85% NaCl, and the inoculum was standardized to 0.5 on the McFarland scale (1.5×10^6 CFU/mL).

Sabouraud broth containing citral at concentrations of 1024 to 1 µg/mL was added a 96-well plate. The plates were incubated at 37°C for 24-48 h, at which time fungal growth was observed (NCCLS, 2008).

To determine the MFC, 10 µL of each of the wells with no fungal growth were seeded on plates containing Sabouraud dextrose agar (SDA), which were then incubated at 37°C for 24-48 h. Negative control (without drugs) was performed to confirm cell viability (Ernst et al., 1999; Costa et al., 2008; Eloff, 1998). Sensitivity control to Tween 80 was performed at the same concentrations used to dissolve the products.

MFC was considered as the lowest concentration in plate with SDA at which growth was less than 3 CFU. Afterwards, 20 µL of 0.5% TTC (triphenyl tetrazolium chloride) were added to each of 96 wells for MIC determination, and the plate incubated for 24 h. MIC was defined as the lowest citral concentration that inhibited visible growth of the microorganism, as also indicated by TTC by reading 96-well plates. Three independent experiments were performed on different occasions (Klepser, Wolfe & Pfaller, 1998; Ernst et al., 1999; Costa et al., 2008).

Sorbitol assay

The MIC of citral was determined with *Candida albicans* (13) using the broth microdilution method (CLSI M27-A2). Sorbitol was added to the culture medium to give a final concentration of 0.8 M. Following incubation at 25 °C, the plates were read at 48 h and after seven days (Frost et al., 1995). This assay was carried out in duplicate and the geometric mean values were calculated.

Effect of ergosterol and cholesterol on MIC of citral

This experiment was performed according to the method of Lunde and Kubo, (2000) and Escalante et al. (2008), with some modifications. The MIC of citral against *C. albicans* (13) was determined by the microdilution method (CLSI M27-A2), in the presence and absence of ergosterol and cholesterol at concentrations of 100, 200 and 400 µg/mL. This assay was carried out in duplicate and the geometric mean values were calculated. Amphotericin B was used as a control drug in the ergosterol assay.

Results

MIC and MFC were determined by the broth microdilution technique, which are shown in Table 1. The MIC of citral ranged between 256 and 512 µg/mL. The concentration of 512 µg/mL inhibited the growth of all of the strains tested, while 256 µg/mL inhibited approximately 50% of the strains tested (MIC₅₀). MFC in these microorganisms ranged between 256 and 1024 µg/mL, the latter being fungicidal for all strains tested. The MIC of the amphotericin B against *C. albicans* strains ranged between 0.5 and 4 µg/mL. The growth of most of the strains studied was inhibited by 0.5 µg/mL amphotericin B (Table 1).

According to the above results, the strain LM-13 was chosen for the other tests, the MICs of citral and amphotericin B against this strain were 256 to 1 µg/mL, respectively. The sorbitol assay consists of determining MIC in the presence and absence of 0.8M sorbitol. The present work showed no difference between MICs of citral against strain LM 13 in the absence or presence of sorbitol, the MIC remained 256 µg/mL (Table 2).

No alterations in MIC of citral was observed in the presence of various ergosterol concentrations (100, 200 and 400 µg/mL). In the presence of various cholesterol concentrations (100, 200 and 400 µg/mL), the MIC of citral increased from 512 to 1024 µg/mL (Table 3). Table 4 shows an increase in MIC of amphotericin B value when ergosterol

was added to the medium, where the MIC increased from 1 to 32 $\mu\text{g/mL}$ with all concentrations of ergosterol tested. The presence of the cholesterol in the medium increased the MIC of amphotericin B to 4 $\mu\text{g/mL}$ (Table 4).

Discussion

The high incidence of *Candida albicans* infections and emergence of resistance indicate the need to study new sources of antifungals, such as natural products and their phytoconstituents. Essential oils are important because of their various pharmacological activities, including antifungal, antibacterial and antiparasitic (Bakkali et al., 2008, Rates, 2001)

The present work studied the activity of citral against *Candida albicans* and its mode of action. A concentration of 512 $\mu\text{g/mL}$ inhibited the growth all strains, and 1024 $\mu\text{g/mL}$ was fungicidal to all strains (Table 1). The control consisted of the strains, medium and vehicle, where the last did not inhibit fungal growth.

It has been reported that citral, a major constituent of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) and the essential oil of *C. citrates*, shows antifungal activity against *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and especially *C. albicans* (Silva et al., 2008).

Lima et al (2005) showed the antifungal action of citral against *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*. Dellau et al (2008) demonstrated that citral has antibiofilm activities against *C. albicans*.

Park et al. (2009) observed that citral was able to cause prominent hyphal degeneration, the separation of membrane from cell wall, and the disintegration of mitochondria in *Trichophyton mentagrophytes*.

1
2
3 In this context, it is important to investigate the mode of action of citral. In this work
4
5 we investigated the effect of citral on the cell wall by sorbitol assay and the binding of citral
6
7 to ergosterol and cholesterol.
8

9
10 The sorbitol has an osmoprotector function and is essential for fungal growth, when
11
12 fungi are in the presence of drugs that act on the cell wall (Frost et al., 1995). Sorbitol-
13
14 protected cells can grow in the presence of an inhibitor of fungal cell wall synthesis, while
15
16 fungi are growth-inhibited in its absence. This effect is detected by the great difference
17
18 observed between the MICs obtained with and without sorbitol (Svetaz et al., 2007). The
19
20 protection of growth with sorbitol is not limited to β -(1,3) glucan synthesis inhibitors but can
21
22 also be applied to inhibitors of the synthesis of other cell wall polymers and of the
23
24 mechanisms controlling cell wall synthesis. The sorbitol protection assay is a broad spectrum
25
26 screen that can identify not only agents that directly affect cell wall synthesis and assembly
27
28 but also regulatory mechanisms involved in this process, including signal transduction
29
30 pathways such as protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and
31
32 mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) (Frost et al., 1995). In this work, the MIC
33
34 of citral was not altered in the presence of sorbitol, suggesting that citral does not act by
35
36 modifying the fungal cell wall, but probably by affecting another target.
37
38
39

40
41 Ergosterol is a sterol of the fungal cell, while cholesterol is a sterol of mammalian
42
43 cells (Paquet et al., 2002). If the activity of the compound were due by binding to ergosterol,
44
45 the exogenous ergosterol would prevent binding to ergosterol in the fungal membrane, and as
46
47 a consequence, it would cause an increase in MIC in the presence of exogenous ergosterol
48
49 with respect to the control assay (Escalante et al., 2008). The effect of ergosterol on the MIC
50
51 of citral and amphotericin B was determined. In the presence of ergosterol, the MIC value of
52
53 amphotericin B increased 32 times (Table 4); however, the same was not observed for the
54
55 MIC of citral (Table 3). This indicates that this phytoconstituent does not bind to ergosterol.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

According to above findings, if the compound binds to cholesterol, it increases MIC in the presence of exogenous cholesterol. In the presence of cholesterol, the MIC value of citral increased to 1024 μ g/mL (twofold), and the MIC of amphotericin B increased four times, as shown in Table 3 and 4. Amphotericin B has a strong affinity for ergosterol while it has a weak affinity for cholesterol, and this is due to the double bond in the ergosterol molecule increasing the stability of interaction between amphotericin B and ergosterol (Baran et al., 2009).

It was demonstrated that a direct interaction can occur between sterol and a polyene antibiotic. The structure required for this effect is similar to that needed to prevent the biological action of polyenes, and the addition of sterols will prevent the antifungal activity of the polyenes (i.e., the presence of sterols increases the antifungal concentration required for growth inhibition). The interaction of the sterol and polyene reduces the effective concentration of the antibiotic and in this manner increases the amount that must be used to inhibit growth or metabolic activity of the fungus (Lampen et al., 1960).

This work demonstrated that citral inhibits the growth of *C. albicans*. The probable mechanism of action does not involve either cell wall synthesis or ergosterol. It is important to know the mode of action of a drug, because this information can be used to increase the effectiveness of the substance. A drug interaction with cholesterol can result in toxic effects to mammalian cells; however, it is necessary to study its effect against human cells to confirm it. Considering that the incidence of both community-acquired and nosocomial fungal infections has significantly increased over the past few decades, the search for new alternatives for treatment of fungal diseases is important, and natural products, especially from plants, can be a source of new drugs.

The authors are grateful to CNPq for financial support and Universidade Federal da Paraíba. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

References

Adorjan B, Buchbauer G. (2010). Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour and Frag J*, 25, 407-26.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*, 46, 446-75.

Baran M, Borowski E, Mazerski J. (2009). Molecular modeling of amphotericin B – ergosterol primary complex in water II. *Biophys Chem*, 141, 162-68.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Method M27-A2, 2nd ed. Wayne Ed.; 22: 1-29. NCCLS, and method M38-A, 2nd ed, Wayne Ed.; 22: 1-27.

NCCLS (2008). Performance standards of antimicrobial susceptibility testing: ninth informational supplement. NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, pp.120-126.

Cohen BE. (1998). Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharmacol*, 162, 95-106

Costa EV, Teixeira SD, Marques FA, Duarte MCT, Delarmelina C, Pinheiro MLB, Trigo JR, Maia BHLNS. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. *Phytochemistry*, 69, 1895-99.

Dellau S, Cateaus E, Berges T, Berjeaud J-M, Imbert C. (2008). In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms *Inter J of Antim Agents*, 31, 572-76.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*, 3, 685-702.

Eloff JN. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64, 711-13.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. (2006). Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*, 55, 809-818.

Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. (1999). *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Mycology*, 33, 75-80.

Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. (2008). Evidence of the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*, 71,1720-25.

Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman RJ. (1995). A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiotic*, 48,306-10.

Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Viegas A, Fernandes AAR, Santos RB, Ventura J. A, Fernandes PMB. (2008). Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J of Microbiol*, v. 39,163-68.

Gomes CL, Cavalcante JE, Cunha FA, Amorim LN, Menezes EA. (2010). Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. *R Bras Anal Clin*, 42, 223-25.

Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. (2011). *Candida* bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in a intensive care unit study. *Crit Care Med*, 39, 1-6.

Klepser, ME, Wolfe EJ, Pfaller MA. (1998). Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob Chemotherapy*, 41, 397-401.

Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. (2011). Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol*, 3, 175-191.

Lampen JO, Arnow PM, Safferman RS. (1960). Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J Bacteriol*, 80, 200-206.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Farias NP, Navarro DF. (2005). Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Braz J of Pharm Sci*, 41, 199-203.

Lunde C, Kubo I. (2000). Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1943-53.

Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. (2009). Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2, 354-55.

Nucci M, Telles FQ, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*, 51, 561-70.

Paquet M-J, Fournier I, Barwicz J, Tancrede P, Auger, M. (2002). The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol - containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ^2H NMR. *Chem Physics Lipids*, 119, 1-11.

1
2
3 Park M.J, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. (2009). Effect of
4 citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton*
5
6 *mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 80, 290–96.
7
8
9

10
11 Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
12
13

14
15
16 Richardson M, Lass-Flörl C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections.
17
18 *Clin Microbiol Infect*, 14 (Suppl. 4), 5-24.
19
20

21
22
23 Saddiq AA, Khayyat S.A. (2010). Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral.
24
25 *Pesticide Bioch and Phys*, 98, 89–93.
26
27

28
29 Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. (2003). *Candida albicans* mutations
30
31 in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents.
32
33 *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2404-12.
34
35

36
37
38 Sanglard D, Odds FC. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular
39
40 mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*, 2, 73–85.
41
42

43
44
45 Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. (2008). Antifungal activity of the
46
47 lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *The Braz J of Infect Dis*, 12 (1), 63-66.
48
49

50
51
52 Svetaz L, Agüero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Tapia A, Zacchino S (2007).
53
54 Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: Evidence for the mechanism of action.
55
56 *Planta*, 73, 1-7.
57
58
59
60

Vasconcelos-Júnior AA, Menezes EA, Cunha FA. (2011). Chromogenic medium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. isolated from urine. *Mycopathologia*, 171, 1-6.

For Peer Review Only

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) of citral and amphotericin B and minimum fungicidal concentration (MFC) in µg/mL of citral against *C. albicans*.

<i>C. albicans</i> strains	Control	Amphotericin B	Citral (MIC)	Citral (MFC)
LM-13	+	1 µg/mL	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-36	+	4 µg/mL	512 µg/mL	1024 µg/mL
LM-39	+	1 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
LM-41	+	2 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-45	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-52	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-57	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-67	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL
LM-70	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-77	+	1 µg/mL	256 µg/mL	512 µg/mL
LM-84	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
LM-86	+	0,5 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
LM-88	+	0,5 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL

+ : Presence of growth.

Table 2: Sorbitol assay with citral of different concentrations against *C. albicans* (LM-13).

Concentration	Citral in presence of sorbitol	Citral in absence of sorbitol
2048 µg/mL	-	-
1024 µg/mL	-	-
512 µg/mL	-	-
256 µg/mL	-	-
128 µg/mL	+	+
64 µg/mL	+	+
32 µg/mL	+	+
16 µg/mL	+	+
8 µg/mL	+	+
4 µg/mL	+	+
2 µg/mL	+	+
1 µg/mL	+	+

+ :Growth fungal

- :Absence of growth fungal

Table 3: Ergosterol and cholesterol assay with citral of different concentrations against *C. albicans* (LM-13).

Citral ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. albicans</i> LM-13					<i>C. albicans</i> LM-13				
	Absence of ergosterol	Ergosterol (100 $\mu\text{g/mL}$)	Ergosterol (200 $\mu\text{g/mL}$)	Ergosterol (400 $\mu\text{g/mL}$)	Absence of cholesterol	Cholesterol (100 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (200 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (400 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (200 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (400 $\mu\text{g/mL}$)
2048 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
256 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
128 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ :Growth fungal

- :Absence of growth fungal

Table 4: Ergosterol and cholesterol assay with amphotericin B of different concentrations against *C. albicans* (LM-13).

Amphotericin B ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. albicans</i> LM-13				<i>C. albicans</i> LM-13			
	Absence of ergosterol	Ergosterol (100 $\mu\text{g/mL}$)	Ergosterol (200 $\mu\text{g/mL}$)	Ergosterol (400 $\mu\text{g/mL}$)	Absence of cholesterol	Cholesterol (100 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (200 $\mu\text{g/mL}$)	Cholesterol (400 $\mu\text{g/mL}$)
2048 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
1024 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
512 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
256 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
128 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
64 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
32 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-
16 $\mu\text{g/mL}$	-	+	+	+	-	-	-	-
8 $\mu\text{g/mL}$	-	+	+	+	-	-	-	-
4 $\mu\text{g/mL}$	-	+	+	+	-	-	-	-
2 $\mu\text{g/mL}$	-	+	+	+	-	+	+	+
1 $\mu\text{g/mL}$	-	+	+	+	-	+	+	+

+ :Growth fungal

- :Absence of growth fungal

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS



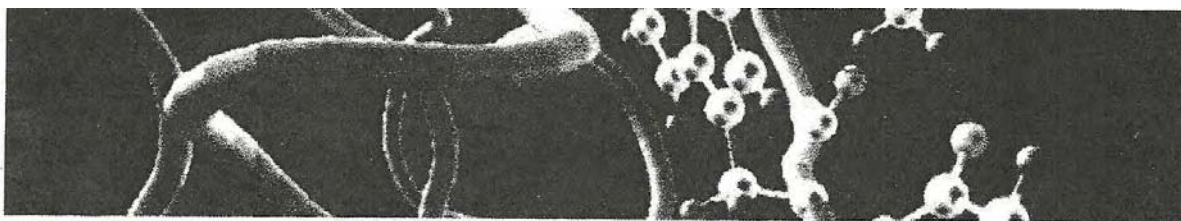
FeSBE 2011

24 a 27 de agosto de 2011
Rio de Janeiro – RJ

Certificamos que o resumo 26.065 - **"ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CARVACROL AGAINST CANDIDA ALBICANS STRAINS"**, autoria de LIMA, I. O. ; PEREIRA, F. O. ; OLIVEIRA, W. A.,; LIMA, E. O. ,; MENEZES, E. A. ; CUNHA, F. A. ; DINIZ, M. D. F. F. M. ,, foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.

Comissão Organizadora





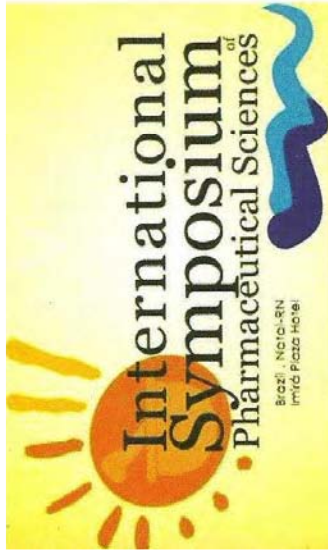
FeSBE 2011

24 a 27 de agosto de 2011
Rio de Janeiro - RJ

Certificamos que o resumo 26.029 - **"ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CITRAL AGAINST CANDIDA ALBICANS STRAINS"**, autoria de LIMA, I. O. ; NÓBREGA, F. M. ; OLIVEIRA, W. A. ,; LIMA, E. O. ; MENEZES, E. A. ; CUNHA, F. A. ; DINIZ, M. F. F. M., foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.

Comissão Organizadora





International
Symposium
of
Pharmaceutical Sciences

Brazil - Natal-RN
Imirã Plaza Hotel

Post-Graduate Program
on Pharmaceutical
Sciences - UFRN

“Challenge and opportunities for
new diagnosis methods and
pharmaceutical products”



Certificate

We certify that

Geisa Nobre Oliveira

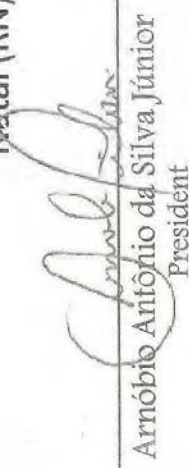
Presented the poster entitled:

ACUTE TOXICITY OF CARVACROL

Lima, I. O.; Oliveira, G. N.; Nóbrega, F. M.; Dias, G. E. N.; Oliveira; Thompson L.;
Diniz, M. F. F. M.

During a Poster Session of the II International Symposium of
Pharmaceutical Sciences, held on November 3-5, 2011, in the Imirá
Plaza Hotel, Brazil.

Natal (RN), November 5, 2011


Arnóbio Antônio da Silva Júnior
President


Maria das Graças Almeida
Executive Committee