



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



ARATÁ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

**ESTUDO *In vitro* E *In silico* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
DOS ISÔMEROS R-(+)- E S-(-)-CITRONELAL SOBRE FUNGOS
DO GÊNERO *Cryptococcus*.**

João Pessoa, PB

2017

ARATÃ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

**Estudo *in vitro* e *in silico* da atividade antifúngica dos isômeros r-
(+)-e s-(-) citronelal sobre fungos do gênero *Cryptococcus*.**

Dissertação 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 para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

JOÃO PESSOA – PB

2017

C838e Costa, Aratã Oliveira Cortez.

Estudo *in vitro* e *in silico* da atividade antifúngica dos isômeros
r-(+) e s-(-) citronelal sobre fungos do gênero *Cryptococcus* /
Aratã Oliveira Cortez Costa.- João Pessoa, 2017.

52 f. : il.-

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. *Cryptococcus*. 3. Citronelal.
4. *In silico*. 5. Associação. 6. Cinética de Morte. I. Título.

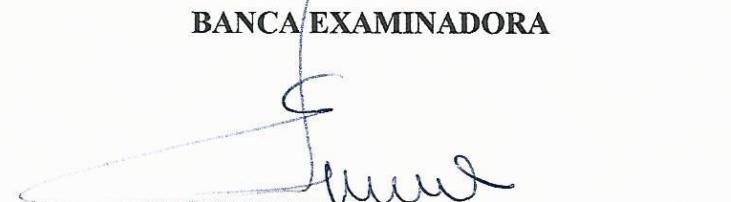
ARATÃ OLIVEIRA CORTEZ COSTA

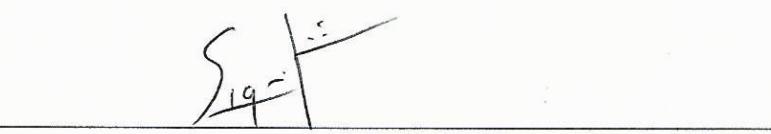
ESTUDO *in vitro* E *in silico* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ISÔMEROS R-(+) E S-(-) CITRONELAL SOBRE FUNGOS DO GÊNERO *Cryptococcus*.

Dissertação de mestrado 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 para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em 10 de Venerno de 2017

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora- UFPB


Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior
Avaliador Interno


Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
Avaliador Externo

JOÃO PESSOA – PB

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos por todo suporte, apoio e paciência em tempos difíceis e que quando precisei estavam sempre lá.

Sou grato imensamente à minha orientadora Prof. Edeltrudes, por todos esses ensinamentos e correções, durante todo esse tempo que sou seu orientando e aluno, foram diversos aprendizados na área científica e na vida.

À toda a equipe do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB, pelo suporte e ajuda durante todos esses anos e trabalhos realizados.

A todos os professores e servidores do Programa PgPNSB, pela honra de nos disponibilizar seus conhecimentos e pelo tempo e esforço gasto com nosso aprendizado.

RESUMO

COSTA, A.O.C.. Estudo *in vitro* e *in silico* da atividade antifúngica dos isômeros R-(+) e S-(-) citronelal sobre fungos do gênero *Cryptococcus*. 2017. 52f. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia). UFPB/CCS – João Pessoa – PB.

Cryptococcus neoformans é uma levedura patogênica oportunista, com ampla distribuição geográfica, capaz de infectar os mais variados tipos de animais. No homem, a criptococose acomete principalmente o sistema nervoso central e pulmões, com menor frequência a pele, apresentando-se de uma forma geral com evolução grave e fatal. Indivíduos com o sistema imunológico comprometido são mais suscetíveis de desenvolver a criptococose, principalmente os acometidos pelo vírus da imunodeficiência humana. O tratamento convencional da criptococose utiliza antifúngicos potencialmente tóxicos por longos períodos e que vêm sendo alvo de resistência desses micro-organismos, além dos elevados custos com o tratamento. Diante desse panorama, a busca por produtos naturais com propriedades antifúngicas têm sido uma alternativa promissora, com grande atenção dos estudiosos quanto à análise dos óleos essenciais e seus constituintes. Dessa forma, a atual pesquisa, teve por finalidade avaliar o efeito biológico dos isômeros R e S do fitoconstituente citronelal, sobre fungos do gênero *Cryptococcus*, o que poderá conduzir à descoberta de uma molécula ao desenvolvimento de um novo antifúngico, além disso, contribuir para a obtenção de maiores informações sobre o potencial farmacológico desse fitoconstituente. Foi determinada CIM e a CFM, dos compostos sendo 64 e 64 os valores para o R-(+) citronelal respectivamente, e 256 e 512, respectivamente, para o S-(-) citronelal, sobre fungos do gênero *Cryptococcus*; Foi realizado o antifungograma das cepas de *Cryptococcus* Sp. com os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e fluorcitosina onde observou-se uma resistência por parete do fluconazol e da flucitosina; Com isso foi investigado a possível interferência dos monoterpenos em estudo associados à atividade desses antifúngicos, observando que o R citronelal não apresentou efeito sinérgico aparente, enquanto o S apresentou um efeito bem mais sinérgico, capaz até de inibir as resistências causadas com o fluconazol; Foi determinada a curva de morte microbiana dos isômeros R-(+) e S-(-) do fitoconstituente citronelal, sobre uma cepa previamente escolhida (FGF-3) e foram observados os efeitos fungicidas do isômero S citronelal e efeito fungicida dependente de concentração do R citronelal; suas variáveis *In silico* foram de boa prospecção. Concluindo que as substâncias exibiram uma boa atividade biológica e correlação com outros antifúngicos, apresentando efeitos sinérgicos no estudo de associação e suas variáveis *In silico* foram de boa prospecção, caracterizando assim essas substâncias totalmente viáveis para que sejam continuados seus estudos.

Palavras chave: *Cryptococcus*; Citronelal; *In silico*; Associação; Cinética de morte

ABSTRACT

COSTA, A.O.C. *In vitro* and *in silico* evaluation of the antifungal activity of the R- (+) and S-(-) citronelal isomers, against fungi of the genus *Cryptococcus*. 2017. 52f. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia). UFPB/CCS – João Pessoa – PB.

Cryptococcus neoformans is an opportunistic pathogenic yeast with a wide geographical distribution, capable to infect the most varied types of animals. In humans, cryptococcosis mainly affects the central nervous system and lungs, less frequently the skin, presenting in general a serious and fatal evolution. Individuals with deficient immune systems are more likely to develop cryptococcosis, especially those afflicted with the human immunodeficiency virus. The conventional treatment of cryptococcosis uses potentially toxic antifungals for long periods and they have been target of resistance of these microorganisms, besides the high costs with the treatment. Given this panorama, the search for natural products with antifungal properties has been a promising alternative, with great attention of the students regarding the analysis of the essential oils and their constituents. Thus, the present research aimed to evaluate the biological effect of the R and S isomers of the citronellal phytoconstituent on fungi of the genus *Cryptococcus*, which could lead to the discovery of a molecule to the development of a new antifungal, besides contributing to obtain more information on the pharmacological potential of this phytoconstituent. MIC and MFC were determined, of the compounds, being 64 and 64 the values for R - (+) citronellal respectively, and 256 and 512, respectively, for citronellal S - (-), on fungi of the genus *Cryptococcus*; The antifungigram of the strains of *Cryptococcus* sp. was carried out with the antifungal agents amphotericin B, fluconazole and fluorocytosine where a resistance of fluconazole and flucytosine was observed; This study investigated the possible interference of monoterpenes in the study associated with the activity of these antifungal agents, noting that citronellal R did not present an apparent synergic effect, whereas S showed a much more synergistic effect, even capable of inhibiting the resistance caused by fluconazole; The microbial death curve of the R - (+) and S - (-) isomers of the citronellal phytoconstituent was determined on a previously chosen strain (FGF-3) and the fungicidal effects of the citronellal S isomer and concentration dependent fungicidal effect Of R citronelal; Its *in silico* variables were of good prospecting. In conclusion, the substances exhibited a good biological activity and correlation with other antifungal agents, showing synergistic effects in the association study and their *in silico* variables were well prospective, thus characterizing these fully viable substances to be continued their studies.

KEYWORDS: *Cryptococcus*; Citronelal; *In silico*; Association; Time-kill curve.

LISTA DE SIGLAS

Abreviaturas/Siglas Descrição

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Anf. B.	Anfotericina B
ASD	Agar Sabourad dextrose
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSD	Caldo Sabourad dextrose
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g/cm ³	Grama por centímetro cúbico (densidade)
g/mol	Gramas por mol (Peso molecular)
GAIXM	Galactoxilomana
GXM	Glicuroxilomana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
Pa	Probabilidade de ser ativo
PASS	Previsão do espectro de atividade para substâncias
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Probabilidade de ser inativo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
USA	United States of America

LISTA DE FIGURAS

Figura-1: Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.....	15
Figura-2: Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.....	16
Figura 3- Citronelal, estrutura molecular.....	19
Figura 4- Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa <i>C. neoformans</i> FGF 3, sob ação do fitoconstituente R-(+)-Citronelal, de acordo com o tempo.....	35
Figura 5- Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa <i>C. neoformans</i> FGF 3, sob ação do fitoconstituente S-(+)-Citronelal, de acordo com o tempo.....	36
Figura 6- Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa <i>C. neoformans</i> FGF 3, sob ação do antifúngico controle Anfotericina B, de acordo com o tempo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente R-(+) Citronelal, sobre cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	26
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do S-(-) Citronelal, sobre cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	28
Tabela 3 - Resultados do antifungígrafo de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina sobre cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> . Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.....	30
Tabela 4 - Resultados da associação de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina, com R-(+) Citronelal, na concentração de 64 µg/mL, sobre cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> . Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.....	32
Tabela 5 - Resultados da associação de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina, com S-(-) Citronelal, na concentração de 256 µg/mL, sobre cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> . Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.....	33
Tabela 6 - Predição da atividade de (R)-(+) e (S)-(-)-citronelal com possibilidade de ser ativo (Pa > 70%) determinada através da ferramenta Pass online.....	39
Tabela 7 - Calculo dos riscos de toxicidade e de drug-score dos compostos (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em comparação com os medicamentos anti-fúngicos convencionais.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 ASPECTOS DO GÊNERO <i>Cryptococcus</i>	12
3.2 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA.....	13
3.3 RESISTENCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	15
3.4 TERAPIA COMBINADA.....	16
3.5 ESTUDO DA TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DE COMPOSTOS NATURAIS, SUJEITO AO DIRECIONAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	17
3.6 R-(+) E S-(-) CITRONELAL.....	18
4 METODOLOGIA.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 ENSAIOS ANTIFUNGICOS.....	26
5.2 ANALISE <i>in silico</i>	38
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A Criptocose também conhecida como Torulose, Blastomicose Européia, Doença de Busse-Buschke é uma micose sistêmica, que agride o homem e os animais, e utiliza como principal forma de contaminação a via inalatória. É causada por um complexo de fungos patogênicos do gênero *Cryptococcus*, que ganhou relevância pelo seu caráter de infecção oportunista, acometendo pacientes imunocomprometidos ou não, podendo levar ao desenvolvimento de dermatites, problemas respiratórios e nervosos (BRASIL, 2012).

Atualmente cerca de 70 espécies de *Cryptococcus* são descritas, porém, para fins práticos, devem ser considerados patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os quais destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptocose humana e animal, sendo mais raros os casos diagnosticados por outras espécies, como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* (TAKAHARA, 2011; CARDOSO, 2012).

A espécie *neoformans* é cosmopolita, do ponto de vista epidemiológico e está relacionada a várias fontes ambientais como solo contaminados por excretas de aves, principalmente, pombos domésticos (REOLON et al., 2004).

Cryptococcus neoformans é comum acometer indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); de 1980 a 2012, 6% dos casos notificados foram nesses pacientes. A segunda espécie mais encontrada, *gattii*, é endêmico nas regiões Norte e Nordeste e apresenta alta letalidade, cerca de 35% a 40% dos casos detectados. A doença não é de notificação compulsória, por isto os dados são dispersos e pouco confiáveis, o que dificulta gerar um concreto mapa de infecção e áreas mais afetadas e inviabiliza estabelecer a magnitude real da doença no Brasil, aliado com um desenvolvimento de resistência por algumas espécies aos antifúngicos mais utilizados na terapêutica, este fungo apresenta uma possibilidade de gerar uma maior patogenicidade e dificuldade de tratamento. (BRASIL, 2012; MAY et al., 2016).

Então para combater esses micro organismos são lançados mão de diversas estratégias o que inclui a busca de novas drogas naturais ou sintéticas com amplo espectro, capazes de abranger cepas resistentes, mas que ao mesmo tempo não revelem tantos efeitos colaterais e adversos, ou efeitos tóxicos aos usuários e que o tratamento tenha menor tempo de duração, ou seja, o alcance de uma droga ideal. Os produtos naturais são fortes aliados ao desenvolvimento de novos fármacos, já que contribuíram para o desenvolvimento de

inúmeras drogas de interesse clínico, muitas das quais, ainda são aplicados na terapêutica moderna (CALIXTO et al., 2005).

Estudos realizados com ervas aromáticas, extratos, óleos essenciais e constituintes químicos isolados, têm demonstrado resultados satisfatórios em relação à inibição de patógenos oportunistas, patógenos primários e de toxinas microbianas. E as principais classes de compostos antimicrobianos de origem vegetal, encontram-se atribuídas a metabólitos secundários, relacionadas a alcaloides, lecitinas, polipeptídeos, fenóis e terpenos (SOUZA et al., 2005; CATÃO et al., 2010).

Nesse contexto, os terpenóides são reconhecidos, por apresentar um enorme potencial biológico, uma vez que vários de seus compostos monoterpênicos, já revelou diversos resultados positivos, o que inclui admirável ação antimicrobiana. Dentre esta classe de compostos foi escolhido o citronelal por já apresentar atividade contra algumas leveduras e não apresentar resistência aparente, bem como bons resultados em testes realizados anteriormente no próprio laboratorio (FRIEDMAN et al., 2004; ALI et al., 2005; QUI et al., 2010; ZORE et al., 2011; OLIVEIRA et al, 2016).

Dessa forma, a atual pesquisa, teve por finalidade avaliar o efeito biológico dos isômeros R e S do fitoconstituente citronelal, sobre fungos do gênero *Cryptococcus*, o que poderá conduzir à descoberta de uma molécula ao desenvolvimento de um novo antifúngico, além disso, contribuir para a obtenção de maiores informações sobre o potencial farmacológico desse fitoconstituente e assim colaborar numa maior caracterização das propriedades farmacológicas que envolvem a classe de terpenóides.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito biológico dos isômeros R-(+) e S-(-) do fitoconstituente citronelal, sobre fungos do gênero *Cryptococcus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de R-(+) e S-(-) citronelal, sobre fungos do gênero *Cryptococcus*;
- Realizar o antifungígrafo das cepas de *Cryptococcus neoformans* com os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e fluorcitosina;
- Investigar a possível interferência dos monoterpeno em estudo em associação à atividade desses antifúngicos;
- Determinar a curva de morte microbiana dos isômeros R-(+) e S-(-) do fitoconstituente citronelal, sobre os micro organismos estudados;
- Avaliar o potencial de atuação de R-(+) e S-(-) citronelal sobre as leveduras testadas através da análise *in silico* dos parâmetros absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* caracteriza-se por leveduras encapsuladas que podem estar dispersas no ambiente, tendo como habitat natural lugares úmidos, alimentando-se de resíduos orgânicos, como excretas de pombos (RIBAS et al., 2013). A criptococose foi reconhecida como doença fúngica do homem por Otto Busse em 1894, por meio de um corpúsculo redondo-ovalado, causador de uma lesão na tíbia de uma paciente e denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, Francesco Sanfelice isolou a mesma levedura encapsulada a partir de suco fermentado de pêssego. Em 1895, Sanfelice foi o primeiro responsável pelo isolamento de *Cryptococcus* sp. em animais, a partir de linfonodos de um boi, e o chamou de *Torulopsis neoformans* (CORREA; CORREA, 1992).

Em 1901, Vuillerman e Klein isolaram o agente de uma lesão pulmonar em suínos e denominou os isolados de Busse de *Cryptococcus hominis*, e o isolado de Sanfelice de *Cryptococcus neoformans*, já que os isolados não eram fermentativos e não formavam ascóporos, diferentes dos membros do gênero *Saccharomyces*. Em 1934, foi comprovado que os dois eram um único agente, que, em 1950, recebeu o nome de *Cryptococcus neoformans*. Constituindo-se como uma levedura não-contagiosa, subaguda a crônica, comumente apresentando tropismo de sintomas nervosos ou respiratórios (CORREA; CORREA, 1992). A etimologia da palavra *Cryptococcus*, oriundo da palavra grega "Kryptos", significa "escondido", "secreto", "misterioso". Tal terminologia foi criada em 1833 por Kutting (HEITMAN et al., 2011).

São fungos leveduriformes que se apresentam de forma globosa ou ovalada, medem entre 2 a 4 µm de diâmetro e ao seu redor possui cápsula polissacarídica, a qual possibilita resistência à dessecção. A cápsula expressa pelo fungo *C. neoformans* é composta por galactoxilomana (GAIXM), glicuroxilomana (GXM) e pequenas quantidades de manoproteínas. GalXM e GXM induzem grupos de citocinas, e a GalXM induz a apoptose de macrófagos por alterações morfológicas, ou seja além de ser um dos fatores de virulência do fungo, capaz de possibilitar a sua vida intracelular, apresenta um forte mecanismo de evasão à resposta imune celular (TAKAHARA, 2011; VILLENA et al., 2008). A diferença das estruturas das glicuronoxilomananas, de sua parede celular, permitiu a identificação dos cinco sorotipos atualmente conhecidos A, B, C, D e AD (STEEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Desde a sua identificação, a criptococose foi atribuída a uma única espécie fúngica, *Cryptococcus neoformans*. No entanto, métodos moleculares aperfeiçoados levaram a um patógeno, *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii*, sendo classificado como uma espécie distinta, *Cryptococcus gattii*, em 2002. Mais recentemente, as análises baseadas em sequenciação genética têm destacado a complexa história evolutiva deste grupo e houve uma proposta de divisão adicional de *C. neoformans* em duas espécies (*C. neoformans* e *Cryptococcus deneoformans*) e *C. gattii* em um total de cinco espécies (*C. gattii*, *Cryptococcus bacillisporus*, *Cryptococcus deuterogattii*, *Cryptococcus tetragattii* e *Cryptococcus decagattii*). (MAY et al., 2016)

Muitas pesquisas foram realizadas a partir do primeiro isolamento de *Cryptococcus neoformans*, no entanto ainda há muitos aspectos clínicos, epidemiológicos e ecológicos desconhecidos, em especial no Brasil. No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram entre os anos de 1941 e 1944, descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida. Quanto à epidemiologia do agente, ocorre grande heterogeneidade de distribuição dos sorotipos e variedade em diferentes países e regiões de um mesmo país. (NISHIKAWA et al., 2003; PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

A infecção ocorre, geralmente, pela via aerógena, através da inalação de esporos viáveis no ambiente, representados por leveduras desidratadas de locais com excretas contaminadas, que se aloja primariamente nos pulmões. Após a infecção, o *Cryptococcus spp.* pode espalhar-se através da corrente sanguínea ou linfática, tendo tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), manifestando normalmente meningite (CICHON et al., 2011; TAKAHARA et al.; 2011).

3.2 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA

Atualmente existe uma variedade de agentes antifúngicos disponíveis, de administração tópica e sistêmica que são distribuídos em classes conforme o seu alvo de atuação (MURRAY et al., 2014). São eles os polienos, inibidores da biossíntese do ergosterol (azólicos e alilaminas); antimetabólicos (fluocitosina) e equinocadinas (que inibem a formação da parede celular) (**Figura 1**).

Os polienos como nistatina, anfotericina B e suas formulações lipofílicas, são reconhecidos principalmente por atuarem de forma intensa na membrana celular fúngica, afetando diretamente o ergosterol, desestruturando-a, causando formação de canais, com

perda de íons e moléculas, provocando ruptura e morte celular. Além disso, por não terem especificidade somente ao ergosterol fúngico (o que leva aos efeitos colaterais e adversos ao ser humano com intensidade variável conforme o polieno em questão e sensibilidade do paciente), atuam também intracelularmente provocando outros danos celulares, como o envolvimento do bloqueio da cadeia respiratória desses micro-organismos (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

De amplo espectro, a anfotericina B tem uso complexo na clínica, já que expõem muitos efeitos colaterais e adversos tóxicos ao ser humano, pensando nisso, novas formulações lipofílicas, contendo este antifúngico como base, foram criadas, no intuito de minimizar os efeitos danosos aos pacientes, ao mesmo tempo buscando potencializar sua atividade, no entanto, este poliênico e suas formulações, são direcionadas como segunda escolha para o tratamento candidíase invasiva (MARTINEZ, 2006; PEREIRA; PAIVA, 2010).

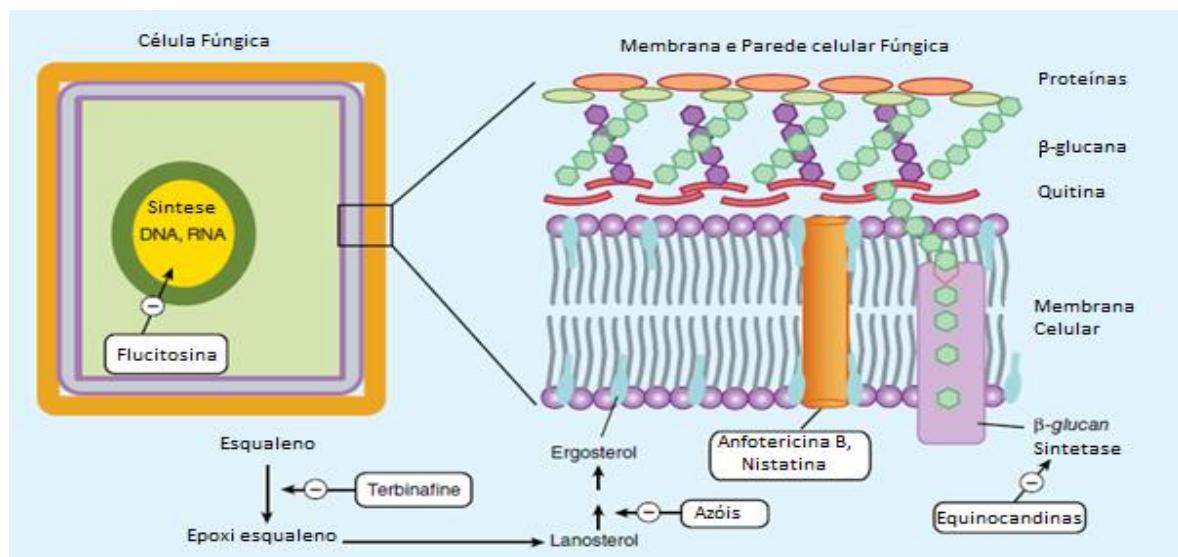
Contemplando a maior classe de antifúngicos sintéticos as drogas azólicas são constituídas por duas famílias que diferem no número de nitrogênio no seu anel azol:os imidazólicos (dois átomos de nitrogênio)como omiconazol, cetoconazol e econazol, por exemplo; e os triazólicos (três átomos de nitrogênio),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

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

Pertencente à classe das pirimidinas, a flucitosina, é o único antifúngico, antimetabólico. Sua forma ativa 5-fluorouracil, convertido enzimaticamente no citoplasma do fungo, atua intracelularmente comprometendo a formação do DNA e RNA e síntese protéica (PFALLER, 2012; MURRAY et al., 2014).

As equinocandinas, atualmente são representados por micafungina, caspofungina e anidulafungina e agem na parede celular inibindo a enzima β -(1,3)-D-glucanosintase, comprometendo a estabilidade dessa estrutura, com extravasamento de componentes levando à morte do fungo (PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; CORTÉS; RUSSI, 2011).

Figura-1: Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.



Fonte: KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012.

O tratamento da criptococose vem convencionado à utilização de medicamentos padronizados pelo NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), através do Mycoses Study Groups, Infections Diseases Society of America. Dentre estes agentes antifúngicos, é mais comum o uso da anfotericina B, 5-fluorocitosina e fluconazol ou itraconazol, administrados em associação ou de forma individualizada. No início do tratamento pode ser usado a Anfotericina B associado a 5-fluorocitosina, onde para tratamentos mais prolongados é recomendado o uso do fluconazol (PERFECT et al., 2010).

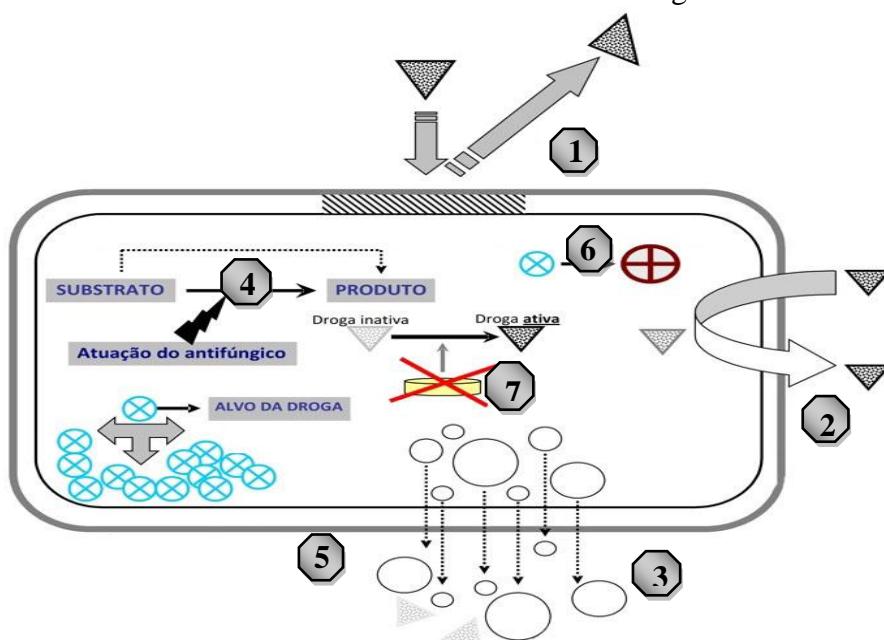
3.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

A falha na terapêutica aos agentes antifúngicos pode ser de causa aplicada ao fenômeno “resistência”, observada *in vitro* e *in vivo*. A primeira é classificada em intrínseca, quando o próprio micro-organismo naturalmente é resistente anterior à exposição ao antifúngico; e adquirida quando esse é vinculado a alterações gênicas no próprio fungo ocorrendo após entrar em contato com antifúngico, podendo esta ser reversível, ou persistente; a *in vivo* é direcionada a resistência clínica que corresponde à soma de vários fatores, relacionados ao estado imunológico do hospedeiro, ao agente antifúngico no que diz respeito, ao comportamento farmacocinético e farmacodinâmico e a espécie responsável pelo processo infeccioso (SANGLARD; ODSS, 2002; PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004; PFALLER; DIEKEMA, 2007; ESPINEL-INGROFF, 2008). De um modo geral independente

de qual seja a resistência em questão, os fatores mais importantes para o desenvolvimento deste fenômeno estão atribuídos ao paciente (SILVA; DÍAZ; FEBRÉ, 2002).

Vários mecanismos moleculares estão relacionados à resistência antifúngica (**Figura-2**). Podem-se incluir as alterações no alvo molecular do fármaco, super expressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, “superexpressão” da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas degradantes ao fármaco (GHANNOUM; RICE, 1999; SANGLARD; ODDS, 2002).

Figura-2: Mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos.



1-Bloqueio da entrada do antifúngico; 2-Bombeamento da droga para o meio extracelular; 3-Produção e ação de enzimas que degradam o fármaco inativando-o; 4-Via metabólica alternativa que “burla” a via do qual o antifúngico apresentaria atividade; 5-Superprodução do alvo do antifúngico; 6-Alteração do alvo;7- Inativação de enzimas necessárias para obtenção da forma ativa da droga.

Fonte: Adaptado de LOURENÇO, 2015.

Embora a resistência ambiental seja rara, a resistência adquirida é observada com as três classes de antifúngicos em uso contra *Cryptococcus* spp., no caso dos polienos, o alto índice de exposição à anfotericina B foi capaz de gerar resistência ocorrida por uma mutação na síntese de ergosterol e consequentemente mudança da ligação deste fungicida. Como a fluorcitosina e o fluconazol apresentam um efeito majoritariamente fungistático, sua capacidade de gerar resistência nas cepas estudadas é mais elevada, com mudanças no sítio de ligação da fluorcitosina ou superexpressão de genes que o fluconazol inutiliza ou a produção de bombas que colocam o fluconazol para fora da célula fúngica (ERG 11 e AFR1 respectivamente). (SIONOV et al., 2010; MAY et al., 2016)

3.4 TERAPIA COMBINADA

A necessidade de se buscar a interatividade entre antifúngicos é que esta resulte em um efeito sinérgico de forma que se obtenha uma ou mais interações que permitam: a melhoria na penetração de uma molécula na célula fúngica, graças à ação da outra droga que possa atuar na membrana; um aumento no espectro antifúngico; o desempenho em conjunto e sequencial pelos antifúngicos na mesma cadeia biossintética essencial para a sobrevivência da célula fúngica; alterações na atividade na bomba de efluxo, pela atuação do outro presente; bloqueio múltiplo de alvos; redução da dose e toxicidade de um fármaco; aceleração da resposta terapêutica, encurtando-o a duração do tratamento e redução a taxa de desenvolvimento de resistências (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2004; FOHRER et al., 2006).

A terapia combinada é recomendada em casos quando a monoterapia convencional vem apresentado resultados insatisfatórios frente ao micro-organismo infectante no paciente. O uso associado entre antifúngicos convencionais é observado em estudos tanto *in vitro* como na clínica, sendo este último geralmente empregado de forma empírica (MIÑÓN et al., 2007; LEDEZMA; MANISCALCHI; ESPINOZA, 2008; GADEA; MENSA, 2008).

Entretanto, limitações nas combinações entre antifúngicos convencionais são frequentes, nem sempre o resultado da combinação é alcançado por um efeito sinérgico, mas numa indução de maior toxicidade, competitividade entre os fármacos (GADEA, MENSA, 2008). O intuito pelo qual vários estudos combinatórios entre antifúngicos e produtos naturais vêm sendo desenvolvidos é de que haja uma interferência que reduza ou supere aquelas atribuídas aos agentes antifúngicos disponíveis na terapêutica.

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

O planejamento de novos fármacos é um processo árduo, que requer tempo e investimento aplicado a pesquisa e o desenvolvimento. Calcula-se que para obter uma nova droga segura e eficaz ao consumo humano, seja necessário entre 15- 25 anos, com um gasto de 800 a 1,4 bilhões de dólares (GELDENHUYSEN et al., 2006). Uma das razões participativas na delonga a esse processo trata-se do insucesso apresentado em 50% do desenvolvimento de um novo fármaco em decorrência do perfil farmacocinético e toxicológico inapropriado. Assim, promover a determinação dos parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade (ADMET)

para moléculas em estudo, são importantes, para definir a sua biodisponibilidade e os possíveis efeitos tóxicos, o que contribui na redução de tempo e custo no processo de investigação e desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al, 2004).

Desta forma, a utilização de ferramentas de previsão assistida por computador desempenha um papel essencial, quanto a se enquadrar em um dos vários métodos alternativos na avaliação de forma rápida e reproduzível, das propriedades toxicológicas e farmacológicas, de compostos existentes e hipotéticos, bem como de modelos *in vitro* (ANGELO et al, 2006; SRINIVAS et al, 2014).

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

3.6 R-(+) e S-(-) CITRONELAL

Os óleos essenciais, um complexo aromático que contém uma mistura de diversos fitoconstituintes químicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, já revelou e continua a revelar em todo o mundo inúmeras propriedades biológicas exercidas sobre animais, plantas e seres humanos (BASER; BUCHBAUER, 2010); sendo este perfil um reflexo da sua rica composição química, que varia entre dois grupos de estruturas de baixo peso molecular: os terpenóides e compostos aromáticos (BAKALLI et al., 2008).

Os terpenos se enquadram como o grupo mais importante na composição dos óleos essenciais. Formado pelas combinações entre as unidades de isoprenos (C_5), geram moléculas estruturalmente e funcionalmente distintas que são classificadas segundo a quantidade de unidades isoprénicas existentes no seu esqueleto de carbono. Os terpenos mais comuns são monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}), que podem passar a ser denominados de terpenoides quando apresentarem oxigênio na sua molécula (BAKALLI et al., 2008).

Várias propriedades farmacológicas sobre terpenoides encontram-se dispostas na literatura, com destaque para os monoterpenoides. Pesquisas com citral e uma derivação sua, o citral-epoxi, apresentaram uma boa atividade antimicrobiana, mostrando ser mais eficaz contra cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) do que os antibióticos ácido nalidíxico, ampicilina e nitrofurantoina (SADDIG; KHAYYAT, 2010). O timol oriundo

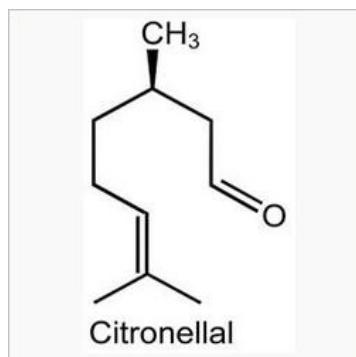
do óleo de *Lippia gracilis* Schauer, revelou atividade anti-inflamatória e cicatrizante em roedores (RIELLA et al., 2010). Em outro estudo, as concentrações subinibitórias de eugenol foram capazes de reduzir a produção de exotocinas SEA e SEB e α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA) e bem como de sua forma sensível, quando foram avaliadas as suas expressões transpcionais e níveis fenotípicos (QIU et al., 2010).

Os aldeídos estão entre os antimicrobianos mais efetivos e dois exemplos que podem ser citados são o formaldeído e o glutaraldeído. Eles inativam proteínas formando ligações cruzadas covalentes com vários grupos funcionais orgânicos nas proteínas (-NH₂, -OH, -COOH e -SH) (TORTORA et al., 2008).

O citronelal (3,7-dimetil 1-oct-6-enal) (Fig. 3), também conhecido como Rhodinal, é um monoterpeno biologicamente ativo, formado pelo metabolismo secundário de plantas. É tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica dos enantiômeros R e S por destilação com arraste de vapor ou extração por solventes dos óleos de *Corymbia citriodora* (Hill e Johnson) e *Java citronella*, no óleo essencial de *Cymbopogon nardus* existe apenas o isômero (+)-(R)-citronelal. Alternativamente é também encontrado em outros 50 óleos essenciais; juntamente com citral, geranal, linalol e citronelol, o citronelal é um dos mais importantes monoterpenos (PYBUS & SELL, 1999).

Ligeiramente solúvel em água, trata-se de um líquido incolor bastante instável que apresenta um agradável odor de limão, porém menos doce e frutado que o citral. Possui ponto de ebulição em 201-207°C, densidade de 0,855 g/cm³, massa molar de 154,25 g/mol e um centro estereogênico, que permite a existência das formas dextrogira (+) R e levogira (-) S. É largamente utilizado na fabricação de fragrâncias e perfumes, repelentes e de outros químicos aromáticos. Além disso o citronelal possui atividades antimicrobianas constatadas, sobre bactérias e fungos do gênero *Fusarium* e *Candida*. (SEIXAS et al, 2011).

Figura 3- Citronelal, estrutura molecular.



4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO TRABALHO

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

4.2 SUBSTÂNCIAS

As substâncias R-(+) e S-(-) Citronelal, que foram o objeto de estudo dessa pesquisa, foram obtidos da SIGMA-ALDRICH®/USA.

4.3 MEIOS DE CULTURA

Para a manutenção das cepas e ensaios da atividade antifúngica, foram utilizados o Ágar Sabouraud Dextrose – ASD, Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO LABORATORIES/ USA/FRANCE) e RPMI 1640-L-glutamina (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes. Anterior a sua utilização, os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.4 CEPAS FÚNGICAS

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas 10 cepas da espécie *Cryptococcus neoformans* que pertencem à MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose à temperatura de 4 °C. Sendo utilizados para os ensaios repiques de 36-72 horas em Ágar Sabouraud Dextrose, incubados a 35±2 °C.

4.5 INÓCULO

Para preparação do inóculo, culturas de *Cryptococcus* spp. foram semeadas em meio nutritivo e incubadas a 35±2 °C por 36-72 horas. Colônias dessas culturas, foram suspensas

em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, para primeiramente obter um inóculo de 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

4.6 ANTIFÚNGICOS

Para controle dos ensaios de atividade antifúngica foi utilizado como antifúngico padrão a anfotericina B, que foi adquirida da Sigma-Aldrich®. Além da anfotericina B, foram utilizados os antifúngicos fluconazol e fluocitosina, impregnados em discos obtidos do CECON (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda/ São Paulo-SP), nos testes de identificação do perfil de sensibilidade das cepas fúngicas (Antifungígrama) e no estudo de associação com os isômeros do citronelol.

4.7 ENSAIOS ANTIFÚNGICOS

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleland; Squires (1991), Hadacek; Greger (2000) e CLSI (2002). A determinação da CIM de R-(+) e S-(-) Citronelal, sobre cepas de *Cryptococcus*, foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas para cultura de células contendo 96 poços (KASVI/ ITÁLIA). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de Caldo RPMI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão do produto teste também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 32 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL dos inóculos de *Cryptococcus* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Todo o ensaio foi realizado em duplicata. As placas preparadas e assepticamente fechadas foram submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 °C por 36-72 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do produto, capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando em comparação com seu controle. O resultado será expresso pela média geométrica das CIM's obtidas nos dois ensaios.

A atividade antimicrobiana de R-(+) e S-(-) Citronelal foi interpretado e considerado como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade;

600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima-CFM

Após leitura da CIM, com ajuda de uma alça calibrada, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x4) nas placas de microdiluição, foram semeadas em placas (INLAB - 90x15mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas por 36-72 horas a 35±2 ° C. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento ou que o crescimento for inferior ou igual a 3 unidades formadoras de colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Após a coleta de resultados será realizado o cálculo da razão CFM:CIM e caso menor ou igual a dois, caracteriza assim um efeito majoritariamente fungicida segundo o Clinical and Laboratory Standard Institute (ESPINEL-INGROFF et al., 2002; CLSI, 2009).

4.7.3 Antifungograma: Teste de Sensibilidade das cepas fúngicas

O teste de suscetibilidade das cepas de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos foi realizado por difusão em disco, que segue o método adaptado de Kirby Bauer (1966). Com o uso de Swab estéril, um volume de aproximadamente 1mL da suspensão fúngica será semeado sobre a superfície sólida de ASD contidos em placas lisas estéreis (INLAB - 90x15mm). Discos de papel com diâmetro de 6,35 mm impregnados com o antifúngico, em concentrações específicas, foram aplicados sobre ASD. Em seguida, as placas foram incubadas a 35±2 °C por 36-72 horas. A leitura ocorreu por avaliação do halo de inibição de crescimento do mico-organismo frente aos antifúngicos. Estes serão classificados como sensível e resistente, segundo as especificações recomendadas pelo fabricante, o Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP.(Anexo I)

4.7.4 Estudo da associação de R-(+) e S-(-) Citronelal com anfotericina B fluconazol e Fluocitosina.

Para o estudo de associação de R-(+) e S-(-) Citronelal, sobre os antifúngicos, foi utilizada a técnica de difusão em disco em meio sólido utilizando discos de papel filtro (OLIVEIRA et al., 2006). Uma alíquota de 10µL da CIM do produto testes foi transferida

para os discos contendo os antibióticos nas suas respectivas concentrações, sendo em seguida alocados em placas de Petri estéreis (INLAB - 90x15mm) contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose – ASD que previamente foi inoculado com swab estéril das suspensões fúngicas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 36-72h, seguido da realização de sua leitura (KONEMAN et al., 2008; OSTROSKY et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2006).

O efeito interferente da combinação R-(+) e S(-) Citronelal mais antifúngicos foi avaliado conforme a metodologia descrita por Cleeland; Squires (1991):

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

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

4.7.5 Efeito dos produtos teste isolados e associados a antifúngicos convencionais sobre a cinética do crescimento fúngico

O estudo da interferência do produto teste isolado ou associado ao antifúngico sobre curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia de Klepser et al. (1998) com algumas modificações. Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas do produto, bem como, de sua associação com o antifúngico padrão, foi observado o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24 h. Inicialmente, 1 mL da suspensão de leveduras foi inoculado em 9 mL de caldo Sabouraud contendo fitoconstituente e o antifúngico padrão (em concentrações correspondentes a CIM do produto isolado). Também foi realizado o experimento controle, com crescimento livre de antifúngico. Nos intervalos 0 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h após a incubação, uma alíquota de 10 μ L desse inóculo foi uniformemente semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose. As placas inoculadas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48 horas.

O experimento foi realizado em duplicata. As curvas expressando o resultado foram construídas plotando a contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo

(horas) com o auxilio do programa GraphPadPrism. Foi considerada atividade fungicida da droga as concentrações que apresentaram uma redução no crescimento maior ou igual a $3 \log_{10}$ ($\geq 99,9\%$) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houver redução no crescimento menor que $3 \log_{10}$ ($< 99,9\%$) UFC/mL (Endo et al., 2010).

4.4-ENSAIOS *in silico*

4.4.1 Passonline

O espectro de atividade biológica de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de atividade biológica, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. Previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online é um software destinado para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos. *Pass online* dá várias facetas da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente. Este teste foi realizado com os isomeros R e S citronelal e seus resultados expressos em uma tabela quando seu Pa fosse $> 70\%$. (SRINIVAS et al., 2014).

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

Para a análise dos parâmetros farmacocinéticos e toxicidade teórica do R-(+) e S-(-) Citronelal, foi realizada a avaliação *in silico* dos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), pelo o programa Osiris Property Explorer (Disponível em: <HTTP://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Nesta análise foram determinados os valores de logP, correspondente a lipofilicidade do composto; "druglikeness", que avalia a frequência de ocorrência de fragmentos comuns a fármacos comerciais e "drug score", que combina "druglikeness", cLogP e outras propriedades como a massa molecular (TECKTO, 2005). Na avaliação *in silico* dos riscos toxicológico relacionados ao fitoconstituente estudado, foi efetuado a análise teórica de efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução (ABREU, 2008).

Para avaliar a biodisponibilidade oral teórica de do R-(+) e S-(-) Citronelal, foi utilizado a “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devem ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade oral teórica. Assim, para que compostos sejam absorvidos devem possuir peso molecular 500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) 5, número de aceptores de ligação hidrogênio (nALH) 10 e número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) 5 (LIPINSKI et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS ANTIFÚGICOS

5.1.1 Determinação da CIM e CFM

Neste estudo o método de escolha para determinar a CIM e CFM foi o de microdiluição, apesar de atualmente existirem vários métodos que podem ser utilizados para avaliar a atividade antifúngica de produtos naturais, como difusão em ágar e macrodiluição. A escolha do método de microdiluição foi dada por apresentar-se como uma técnica simples, de baixo custo, alta reprodutibilidade e possibilitando a utilização de pequenas quantidades de meio de cultura e muitas cepas fúngicas. (CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998).

Nesta técnica podemos avaliar de forma quantitativa a concentração que é capaz de inibir o crescimento livre do fungo. Os resultados da determinação da CIM do fitoconstituente de R-(+) Citronelal, sobre cepas de *C. neoformans*, estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente R-(+) Citronelal, sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*.

<i>C. neoformans</i>	R (+) Citronelal ($\mu\text{g/mL}$)		Controle da cepa
	CIM	CFM	
FGF-3	64	64	+
FCF-10	64	64	+
ICB-59	64	64	+
LM 119	64	64	+
LM 230	256	512	+
LM 615	256	256	+
LM 1401	64	64	+
LM 1909	64	64	+
LM 2601	64	128	+
LM 6109	64	128	+

(+): Crescimento da levedura

Fonte: Pesquisa direta, 2016.

O composto R(+)-Citronelal, apresentou uma CIM de 64 µg/mL em 80 % das cepas estudadas, sendo mais resistentes as cepas: LM-230 e LM-615; que apresentaram uma CIM de 256 µg/mL. Segundo Sartoratto e colaboradores (2004), produtos com CIM entre 50 e 500 µg/mL apresentam forte atividade antimicrobiana, entre 600 e 1500 µg/mL moderada atividade antimicrobiana, e acima de 1500 µg/mL fraca atividade antimicrobiana. Segundo esta classificação, os produtos testados no presente estudo apresentaram forte atividade antimicrobiana frente às cepas de *C. neoformans*.

As concentrações fungicidas mínimas (CFM) variaram de 64 µg/mL (60% das cepas); 128 µg/mL nas cepas LM-2601 e LM-6109; 256 µg/mL na cepa LM-615; e 512 µg/mL na cepa LM-230. Sendo assim, todas as cepas apresentaram uma razão CFM:CIM menor ou igual a dois, caracterizando assim um efeito majoritariamente fungicida segundo o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2009). Porem a cepa LM-230 apresentou valores mais elevados que a media da substancia, e as cepas LM-2601 e LM-6109 caracterizando a formação de algum mecanismo de resistência.

O R(+)-Citronelal é o composto principal do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) e sua atividade biológica já foi definida sobre bactérias de importância alimentar do gênero *Listeria sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Salmonella sp.*, apresentando atividade tanto na sua forma natural como substituída, com radicais fenilselênicos, para que fossem melhorados seus parâmetros farmacocinéticos (VICTORIA et al., 2012).

O fitoconstituente S-(-) Citronelal apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 256 µg/mL em 80 % das cepas testadas, sendo as mais resistentes a LM-2601 e LM-6109 que apresentaram uma CIM de 512 µg/mL. Segundo os parâmetros estabelecidos por Sartoratto e colaboradores (2004), o S-(-) Citronelal ainda se encaixa como forte atividade antimicrobiana. Resultados expressos na **Tabela 2**.

A concentração fungicida mínima (CFM) apresentada foi majoritariamente 512 µg/mL (70 % das cepas), onde as cepas FGF-3; FCF-10; e ICB-59 apresentaram uma CFM de 256 µg/mL. Apresentando-se mais homogêneo em suas concentrações inibitórias, a substancia S-(-) Citronelal também apresenta características fungicidas, visto que sua razão CFM:CIM é menor ou igual a dois, caracterizando assim um efeito majoritariamente fungicida segundo o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2009).

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do S-(-) Citronelal, sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*.

<i>C. neoformans</i>	S-(-) Citronelal ($\mu\text{g/mL}$)		Controle da cepa
	CIM	CFM	
FGF-3	256	256	+
FCF-10	256	256	+
ICB-59	256	256	+
LM 119	256	512	+
LM 230	256	512	+
LM 615	256	512	+
LM 1401	256	512	+
LM 1909	256	512	+
LM 2601	512	512	+
LM 6109	512	512	+

(+): Crescimento da levedura

Fonte: Pesquisa direta, 2016.

Alguns pesquisadores afirmam que a atividade de óleos essencial é atribuída principalmente ao seu componente majoritário. No caso de Prashar et al. (2003), ele descreve a atividade antifúngica do óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) frente a *Saccharomyces cerevisiae* e considera que é atribuída ao conteúdo de geraniol – componente majoritário deste óleo. Entretanto, Lee et al. (2008) verificaram que o componente majoritário do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, o aldeido citronelal, não exerceu atividade antifúngica frente a fungos fitopatógenos como *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* e *Fusarium circinatum*.

Mais recentemente Seixas et al.(2011), observaram um maior efeito de inibição do óleo essencial do capim-citronela no crescimento micelial do fungo *Fusarium subglutinans* em relação ao composto citronelal, podendo este efeito ser devido ao sinergismo existente entre os compostos do óleo essencial do capim-citronela, que atuam de forma conjunta, o que propiciou um maior efeito fungistático do que o composto citronelal.

Em contrapartida a estes estudos, os presentes resultados demonstram uma forte atividade dos dois isômeros do fitoconstituente citronelal. Corroborando com outros ensaios

realizados por microdiluição. Neste caso, espécies fúngicas como *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *Rhizoctonia solani* foram sensíveis a citronelal, pois obtiveram-se valores de CIM entre 314,9 e 500 µg/mL (MESA-ARANGO et al., 2009).

Também em conformidade com o presente estudo, Oliveira (2016) determinou a atividade antifúngica de um derivado da molécula do citronelal, o composto 7-hidroxicitronelal, contra cepas do gênero *Candida*, encontrando uma CIM e CFM de 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente. Estes valores determinam uma caracterização da atividade antifúngica do terpeno citronelal contra espécies fungicas, mesmo de diferentes gêneros, qualificando assim esta molécula como potente arma no uso da terapêutica antifúngica atual.

As cepas de *Cryptococcus neoformans*, utilizadas no estudo, apresentaram-se totalmente viáveis de acordo com o controle de crescimento livre de substâncias antifúngicas.

5.1.2 Análise do perfil de sensibilidade das cepas frente a antifúngicos

Os resultados da análise do perfil de sensibilidade de cepas de *C. neoformans* a anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina estão expressos na tabela 3.

Os dados apresentados, em relação à anfotericina B demonstram que todas as cepas de *C. neoformans* foram sensíveis, de acordo com as especificações do fabricante (CECON/SP), que caracteriza um halo de inibição maior que 10 mm relacionado a uma CIM < 1µg/mL.

Estudos de susceptibilidade realizados na década de 80 utilizando a Anfotericina B como objeto de estudo frente a 24 cepas de 3 espécies do gênero *Cryptococcus* sp., apresentaram valores de CIM semelhantes aos atuais, assim figurando que estes micro-organismos não tem a mesma capacidade de resistência adquirida apresentada com os antifúngicos azólicos (BAVA; NEGRONI ,1989).

Em contrapartida nos estudos de Arechavala et al, (2009), a Anfotericina B apresentou um valor de CIM \leq 1µg/mL em todas as 265 cepas isoladas de *C.neoformans* em pacientes acometidos com HIV, entrando em conformidade com os resultados obtidos no presente estudo. Ainda segundo esse autor, ele cita que o uso prolongado de antifúngicos derivados azólicos, como o Fluconazol, pode gerar uma resistência fúngica e assim aumentar a concentração necessária para que ocorra a sua inibição de crescimento.

Tabela 3- Resultados do antifungígrafo de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*. Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.

Leveduras	Antifúngicos			
	Anfotericina B (100µg)	Fluconazol (25µg)	5-Fluorocitosina (10µg)	Controle da levedura
FGF- 3	26 ^(S)	23 ^(S)	8 ^(R)	+
FCF- 10	24 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	+
ICB- 59	22 ^(S)	18 ^(I)	0 ^(R)	+
LM- 119	20 ^(S)	8 ^(R)	10 ^(I)	+
LM- 230	20 ^(S)	0 ^(R)	0 ^(R)	+
LM- 615	21 ^(S)	10 ^(R)	0 ^(R)	+
LM- 1401	20 ^(S)	25 ^(S)	0 ^(R)	+
LM- 1909	25 ^(S)	20 ^(S)	0 ^(R)	+
LM- 2601	21 ^(S)	10 ^(R)	8 ^(R)	+
LM- 6109	18 ^(S)	17 ^(I)	0 ^(R)	+

(S): Sensível; (I): Intermediário; (R): Resistente; (+): Crescimento da levedura. Fonte: Pesquisa direta, 2016.

Frente ao fluconazol, 3 cepas foram sensíveis (30%), caracterizado por um halo de inibição maior ou igual a 19mm, sendo considerado sua CIM em torno de 8µg/mL segundo as especificações do fabricante (CECON/SP). Duas apresentaram um valor intermediário de atividade, e 5 das 10 cepas (50%) foram consideradas resistentes à exposição ao fluconazol, sendo que as cepas LM-230 e FCF-10 não apresentaram atividade alguma de inibição aparente.

O presente estudo apresenta conformidade com os resultados obtidos por Agudelo et al. (2015), que avaliou a suscetibilidade ao fluconazol de 71 cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes com AIDS. Onde encontrou uma relação de 36 cepas sensíveis ao fluconazol, 20 foram sensíveis dose-dependente e 15 consideradas resistentes ao antifúngico, explicitando a resistência adquirida aos antifúngicos azólicos já relatada por estudos anteriores, mas concluindo que a resistência ao Fluconazol apresentada pelas cepas de *C. neoformans* nestes pacientes não apresentava um aumento ao risco e falha do tratamento ou recorrência da infecção (ARECHAVALA et al, 2009).

Um estudo realizado por Dragomirescu e colaboradores (2009) analisou o perfil de sensibilidade de várias cepas fúngicas, incluindo 28 de *C. neoformans*, sendo observado que apenas 3 cepas foram susceptíveis ao fluconazol (14%), porém 20 cepas expostas a

anfotericina B foram sensíveis (71%), confirmando a característica apresentada no presente estudo, onde os isolados apresentam maior tendência ao desenvolvimento de resistência aos antifúngicos azólicos.

O fluconazol apresenta-se como um dos derivados azólicos mais utilizados atualmente, isto gera um desencadeamento de resistências e mutações por parte dos microorganismos. Nota-se que em torno de 30 % dos casos vem sendo gerada algum tipo de resistência. Isto compromete a terapêutica clínica, inviabilizando outras formas de tratamento e aumentando o tempo de exposição do paciente à doença e ao tratamento com drogas sintéticas potencializando possíveis efeitos tóxicos. A resistência de algumas cepas de *C. neoformans* ao fluconazol tem sido demonstrado como efeito à pressão exercida pelo fármaco promovendo várias duplicações cromossômicas, como a encontrada no cromossomo 1, intimamente relacionada com dois genes, ERG11, que é o alvo do fluconazol, e o AFR1, que é o transportador dos azoles pelo *C. neoformans* (SIONOV et al., 2010; CHEONG & MCCORMACK, 2013).

Já em relação a 5-fluorocitosina, nenhuma cepa demonstrou sensibilidade ao antifúngico segundo os parâmetros do fabricante, e somente a cepa LM-119 apresentou um valor intermediário de inibição. Apesar de já ter sido largamente empregada no estudo e tratamento da criptococose, a flucitosina hoje em dia é utilizada basicamente como associação com outros antifúngicos para melhorar a progressão do tratamento e diminuir os efeitos colaterais causados pela terapia antifúngica, esta terapia utilizada principalmente em pacientes imunocomprometidos e aparentando de risco (BAVA & NEGRONI, 1989; DEBOURGOGNE et al. 2012).

5.1.3 Estudo da associação de R-(+) e S-(-) Citronelal com Anfotericina B, Fluconazol e Fluocitosina.

Com a ineficácia de alguns antifúngicos e a busca de inovações terapêuticas mais eficazes há a necessidade da utilização de meios mais propícios para aumentar o efeito antimicrobiano dos produtos testados e diminuir as quantidades utilizadas, resultando em uma diminuição da toxicidade e de efeitos adversos relacionados ao tratamento. Um parâmetro importante para aumentar a eficácia da terapia antifúngica pode estar relacionado ao uso combinado de produtos obtidos das plantas em associação com antifúngicos convencionais. Uma vez que, alguns estudos relatam a utilização de um fármaco convencional usado no tratamento de criptococose, por exemplo a anfotericina B, que quando adicionados em baixas

concentrações, com outro composto, pode resultar num sinergismo de efeito da droga. (GULLO et al., 2013; COELHO & CASADEVALL, 2016).

O óleo essencial de *E. citriodora* que é constituído principalmente por citronelal, o qual apresenta propriedade irritante da mucosa do trato respiratório e tem poder anti-séptico ambiental, já se apresentou eficaz em associação com outros antimicrobianos conhecidos e utilizados na terapêutica para melhorar a prospecção de tratamento e auxiliar à terapia antibiótica (SIMOES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006)

Os resultados da associação dos isômeros R-(+) e S-(-) citronelal, com os antifúngicos padrão utilizados no tratamento da criptococose, podem ser observados nas tabelas 4 e tabela 5 respectivamente.

A substância R-(+) Citronelal, na concentração de 64 µg/mL, em associação com os antifúngicos utilizados na terapêutica, apresentou em sua maioria efeito tendendo de antagônico (40% das associações) a indiferente (50% das associações). Sendo que em associação com a Anfotericina B, somente sobre a cepa LM-6109 foi observado um sinergismo de atividades.

Tabela 4- Resultados da associação de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina, com R-(+) Citronelal, na concentração de 64 µg/mL, sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*. Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.

Cepas	Antifúngicos			
	Anfotericina B (100µg)	Fluconazol (25µg)	5-Fluorocitosina (10µg)	Controle da levedura
FGF- 3	24 ^(A)	10 ^(A)	0 ^(A)	+
FCF- 10	20 ^(A)	0 ^(I)	0 ^(I)	+
ICB- 59	20 ^(A)	35 ^(S)	0 ^(I)	+
LM- 119	21 ^(I)	13 ^(S)	0 ^(A)	+
LM- 230	21 ^(I)	0 ^(I)	0 ^(I)	+
LM- 615	21 ^(I)	0 ^(A)	0 ^(I)	+
LM- 1401	17 ^(A)	16 ^(A)	0 ^(I)	+
LM- 1909	22 ^(A)	20 ^(I)	0 ^(I)	+
LM- 2601	21 ^(I)	0 ^(A)	0 ^(A)	+
LM- 6109	20 ^(S)	17 ^(I)	0 ^(I)	+

(S): Sinérgico; (I): Indiferente; (A): Antagônico; (+): Crescimento da levedura

Fonte: Pesquisa direta, 2016.

Enquanto que em associação com o fluconazol, o produto apresentou sinergismo de ações nas cepas LM- 119, onde não chegou a ser expressivo e determinar como sensível à

associação. Sobre a cepa ICB-59, esta associação apresentou-se bem mais expressiva e caracterizando uma potencial coalisão de atividades (JOHNSON et al., 2004; CLEELAND & SQUIRES, 1991).

Tabela 5- Resultados da associação de Anfotericina B, Fluconazol e 5-Fluorocitosina, com S-(-) Citronelal, na concentração de 256 µg/mL, sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*. Valor do halo de inibição expresso em milímetros de diâmetro.

Leveduras	Antifúngicos			
	Anfotericina B (100µg)	Fluconazol (25µg)	5-Fluorocitosina (10µg)	Controle da levedura
FGF- 3	24 ^(A)	15 ^(A)	0 ^(A)	+
FCF- 10	20 ^(A)	17 ^(S)	8 ^(S)	+
ICB- 59	22 ^(I)	23 ^(S)	0 ^(I)	+
LM- 119	21 ^(I)	12 ^(S)	10 ^(I)	+
LM- 230	20 ^(I)	10 ^(S)	0 ^(I)	+
LM- 615	22 ^(I)	22 ^(S)	0 ^(I)	+
LM- 1401	16 ^(A)	13 ^(A)	0 ^(I)	+
LM- 1909	23 ^(A)	20 ^(I)	0 ^(I)	+
LM- 2601	21 ^(I)	18 ^(S)	11 ^(S)	+
LM- 6109	18 ^(I)	12 ^(A)	0 ^(I)	+

(S): Sinérgico; (I): Indiferente; (A): Antagônico; (+): Crescimento da levedura

Fonte: Pesquisa direta, 2016.

A substancia S-(-) Citronelal, na concentração de 256 µg/mL, em associação com os antifúngicos utilizados na terapêutica (Tabela 5), apresentou uma atividade mais expressiva que a explicitada pelo seu isômero. Onde pouco mais de 70 % das associações apresentaram efeito passando de antagônico à indiferente, porém as associações que foram sinérgicas apresentam-se concentradas, principalmente, na interação do produto com o antifúngico fluconazol (CLEELAND & SQUIRES, 1991).

O efeito sinérgico, observado no estudo com a substancia S-(-) Citronelal, representa 60% das associações com o Fluconazol. Corroborando com estudos anteriores que foram capazes de observar que a associação dos antifúngicos azólicos, representados principalmente pelo fluconazol, com produtos naturais ativos biologicamente, sendo fitoconstituintes isolados ou óleos essenciais extraído de plantas, foram capazes de agir sinergicamente e melhorar a atividade destes compostos, caracterizando o que pode ser um sinergismo de atividades por atuarem no mesmo alvo, ou por atuarem em alvos diferentes, impedindo assim a resistência natural ou adquirida do fungo (FARIA et al., 2011; LIU et al., 2014)

De acordo com os estudos de Cardoso et al. (2016) o terpeno geraniol, semelhante estruturalmente ao citronelal, junto com o linalol e o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, apresentaram atividade biológica contra cepas de *C. neoformans* e sinergismo na atividade inibitória da síntese de ergosterol, vital para o fungo, mesmo utilizando cepas denominadas como resistentes ao uso de fluconazol por ensaios anteriores. Caracterizando um importante embasamento, que estas substâncias e seus derivados são capazes de auxiliar os antifúngicos azólicos.

A flucitosina foi o antifúngico que apresentou menor atividade isolada ou em associação com as duas substâncias, apresentando apenas efeito sinérgico em duas cepas FCF-10 e LM-2601, em associação com o isômero S(-) citronelal, expondo assim sua pouca atividade contra o gênero *Cryptococcus* sp., e necessidade de associação com outras substâncias antifúngicas, seja de origem natural ou sintética, para que seja eficaz sua utilização (BARCHIESI et al., 2001; BII et al., 2007).

5.1.4 Cinética de morte microbiana

A análise da viabilidade dos micro-organismos pode ser feita através do método experimental da cinética de morte, logo após a exposição dos mesmos ao fitoconstituente por tempo determinado. Dessa forma, a contagem das células viáveis determina se o produto testado apresenta ação fungicida ou fungistática, bem como, caracteriza a relação entre a concentração e atividade ao longo do tempo (KLEPSER et al., 1998; MAY et al., 2000; PFALLER et al., 2004).

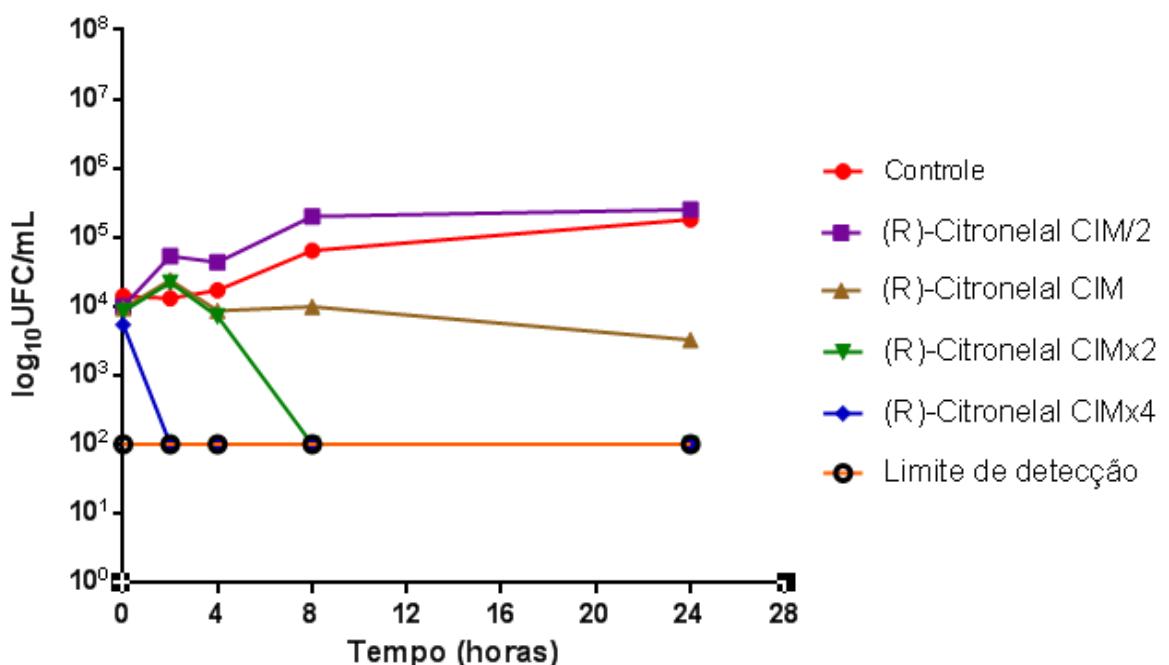
Uma cepa de *C. neoformans* (FGF 3) foi selecionada a partir dos ensaios anteriores e, com base nisso, foram construídas curvas de tempo de morte utilizando diferentes concentrações dos fitoconstituintes R-(+) e S-(-) citronelal, bem como anfotericina B, utilizada como antifúngico controle.

Os resultados dos ensaios da cinética de morte microbiana foram apresentados em gráficos que expressam valores de \log_{10} UFC/mL em função do tempo, para cada concentração testada. O efeito fungicida está relacionado à capacidade de um produto inibir o crescimento de um fungo em caldo, tornando-o incapaz de ser cultivado a partir da transferência da mesma amostra para um meio de cultura adequado ao seu crescimento (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 2001).

O tempo de morte para os micro-organismos é um parâmetro que possui implicações terapêuticas valiosas, pois a partir desses resultados pode-se realizar ajuste de dose na terapia

clínica para tornar o tratamento mais eficaz. Como o interesse clínico em terapias antifúngicas continua a crescer, existe uma necessidade cada vez maior acerca das propriedades farmacodinâmicas e características fungicidas destes agentes (KLEPSEN et al., 1998).

Figura 4- Curva de morte microbiana (\log_{10} UFC/mL) da cepa *C. neoformans* FGF 3, sob ação do fitoconstituente R-(+)-Citronelal, de acordo com o tempo.

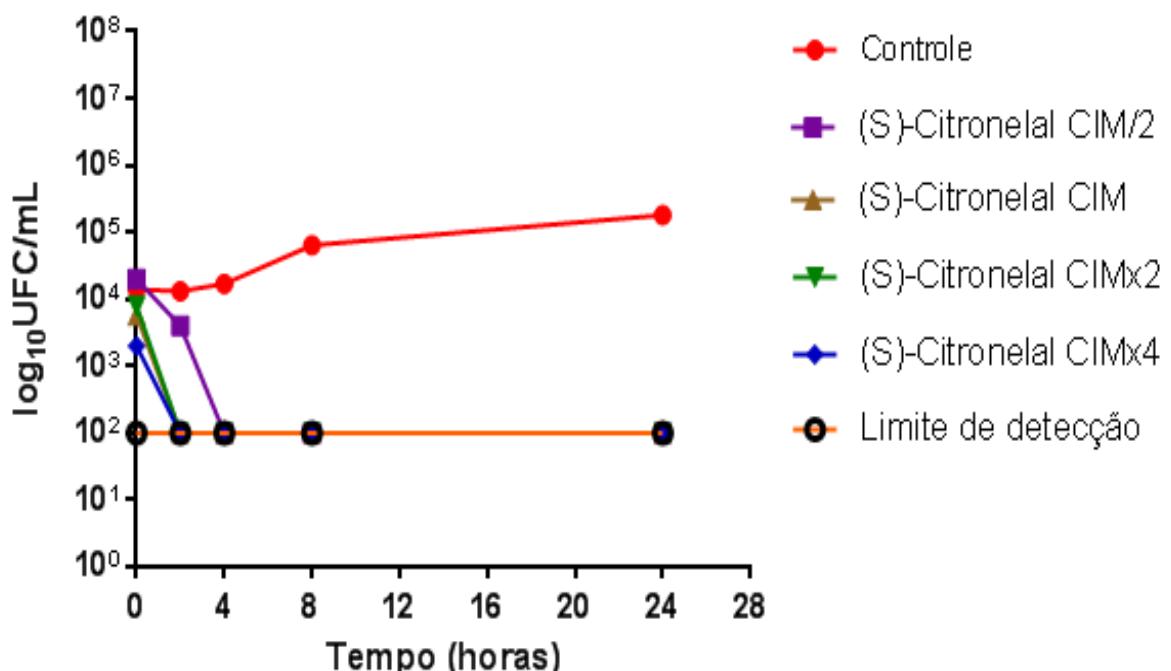


CIM/2: 32 μ g/mL; CIM: 64 μ g/mL; CIMx2: 128 μ g/mL; CIMx4: 256 μ g/mL. Fonte: Pesquisa direta, 2016.
Dados plotados com auxilio do programa GraphPad Prism® 6.0

A partir da análise do gráfico expresso na figura 4, que é resultado do estudo da cinética de ação da substância R-(+)-citronelal de acordo com o tempo, é possível determinar um efeito fungicida (Diminuição de 99,9% das cepas viáveis em relação à contagem de levedura inicial, o que corresponde a uma redução $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial) nas concentrações de CIMx2 e CIMx4 nas primeiras 8 horas de exposição ao fitoconstituente, determinando assim uma boa atividade de impedimento total do crescimento e viabilidade das células fúngicas frente ao fitoconstituente utilizado. Na sua concentração inibitória mínima em si (64 μ g/mL) foi possível observar uma diminuição na viabilidade fúngica visível em relação ao controle, porém não houve uma redução expressiva da contagem de células viáveis, caracterizando um efeito fungistático. Já a concentração sub-inibitória CIM/2 (32 μ g/mL) não foi capaz de inibir em nenhum dos tempos a viabilidade da cepa em estudo apresentando um comportamento semelhante ao controle, onde não há substâncias que interfiram no seu crescimento e multiplicação.

Caracterizou-se então um efeito fungicida dependente de concentração, corroborando com os resultados apresentados no seu estudo inibitório inicial, onde algumas concentrações da substancia R-(+)-citronelal apresentou características fungicidas, mas o efeito da sua CIM, neste estudo foi determinantemente fungistático. Dessa forma, a utilização de doses maiores podem otimizar o tratamento com agentes cuja atividade aumenta com o aumento da concentração. Os fármacos mais usados para o tratamento de infecções fúngicas, incluindo a anfotericina B e nistatina, têm seus efeitos fungicidas dependentes da concentração utilizada (KLEPSEN et al., 1998; NAKAMURA et al., 2004).

Figura 5- Curva de morte microbiana (\log_{10} UFC/mL) da cepa *C. neoformans* FGF 3, sob ação do fitoconstituinte S-(+)-Citronelal, de acordo com o tempo.



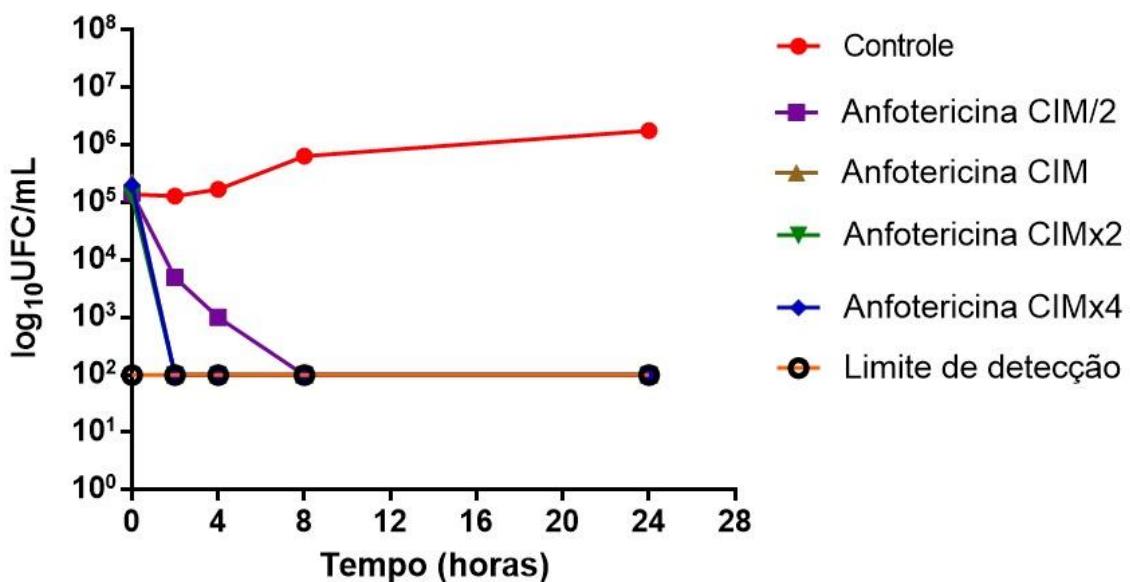
CIM/2: 128 μ g/mL; CIM: 256 μ g/mL; CIMx2: 512 μ g/mL; CIMx4: 1024 μ g/mL. Fonte: Pesquisa direta, 2016.
Dados plotados com auxilio do programa GraphPad Prism® 6.0

A substancia S-(-)-Citronelal, ao contrario o seu isômero, apresentou uma atividade fungicida bem mais expressiva e visível em relação ao controle. De acordo com o que é possível observar no gráfico plotado na figura 5, é possível determinar a atividade fungicida (diminuição >3 \log_{10} UFC/mL a partir do inóculo inicial) em todas as concentrações estudadas, mesmo a subinibitoria CIM\2 (128 μ g/mL) foi capaz de inibir, aparentemente, a totalidade de cepas viáveis, ate quatro horas de inicio da exposição à cepa. Semelhante a estes resultados, foram os expressos pela anfotericina B na Figura 6, onde sua menor concentração

foi capaz de inibir a totalidade de cepas, até o seu limite de detecção, em menos de 8 horas de continuidade do estudo, caracterizando um potencial efeito contra leveduras deste gênero.

De acordo com estudos realizados por Pinheiro (2013), foi avaliado que as leveduras do gênero *Cryptococcus* tendem a ter um efeito fungicida claro quando expostos a anfotericina B e geralmente um efeito dependente de concentração de produtos naturais, onde neste estudo a concentração CIM x4 de *Laurus nobilis L.* foi capaz de apresentar um efeito fungicida em menos de 4 horas de exposição, enquanto que suas concentrações até CIMx2 apresentaram um efeito inibitório mas não classificado como fungicida, assemelhando-se com o resultado encontrado pela substância R-(+) citronelal no presente estudo. Outros estudos caracterizaram o citronelal como substância fungicida frente a cepas do gênero *Candida*, ocorrendo uma ruptura da membrana fungica e possível parada do ciclo reprodutivo fungico como mecanismo de ação. (ZORE et al., 2011)

Figura 6- Curva de morte microbiana (Log UFC/mL) da cepa *C. neoformans* FGF 3, sob ação do antifúngico controle Anfotericina B, de acordo com o tempo.



CIM/2: 0,5µg/mL; CIM: 1µg/mL; CIMx2: 2 µg/mL; CIMx4: 4 µg/mL. Fonte: Pesquisa direta, 2016. Dados plotados com auxílio do programa GraphPad Prism® 6.0

A figura 6 demonstrou que a anfotericina B possui efeito fungicida bem definido, sobre a cepa testada, semelhante ao efeito do fitoconstituente S-(-) citronelal. As concentrações a partir da CIM tiveram efeito fungicida já a partir de 2 horas, e a CIM/2 obteve esse efeito a partir de 8 horas de exposição.

Um estudo de Pappalardo e colaboradores (2009) avaliou a susceptibilidade de isolados de *C. neoformans* frente a anfotericina B, pelo método de cinética de morte. Nesse

estudou foi observado que a anfotericina B teve efeito fungicida no intervalo de 6 a 12 horas de exposição para mais de 70% dos isolados, confirmando a natureza fungicida desse antifúngico, também apresentada no presente estudo.

A avaliação do efeito de antifúngicos padrão e de teste por meio da curva de cinética de morte já é uma técnica muito difundida no mundo e trás diversas informações para o pesquisador que esteja a utilizar esta ferramenta, no caso da anfotericina B, já foram descritos diversos tempos de atividade e observadas algumas resistências apresentadas por leveduras do gênero *Cryptococcus*, onde foi descoberto estar diretamente relacionado ao tamanho da cápsula que envolve a célula fungica e a proteção que isto trás ao microorganismo. Neste modelo de avaliação os isômeros R e S citronelal apresentaram-se totalmente viáveis para o estudo mais prolongado de seu mecanismo de ação frente a estas espécies fungicas, bem como determinação da sua toxicidade e disponibilidade de se tornar uma nova droga na terapêutica antifúngica. (ZAGAROSA et al., 2008; CÓRDOBA et al., 2011)

5.2 Análise *In silico*

5.2.1 Pass online

A análise das possíveis atividades dos dois isômeros (R)-(+) e (S)-(-)-citronelal na ferramenta Pass online, revelou que as moléculas foram semelhantes em sua superfície de atividade com 29 possibilidades de ser ativo ($Pa > 70\%$) com os valores e suas respectivas possibilidade de atividade expostos na Tabela 6. A analise resultou tambem em inúmeras propriedades semelhantes a drogas conhecidas com possibilidade de serem ativo maior que 30 % ($Pa > 30\%$). Destacando: atividade antifúngica ($Pa : 0.580$ e $Pi : 0,020$) e atividade antibacteriana ($Pa : 0.408$ e $Pi : 0,028$); alem de outras atividades como: atividade antiparasitária (sob o gênero *Trypanosoma*) $(Pa: 0,376$ e $Pi: 0,048$), atividade antiviral ($Pa: 0,332$ e $Pi: 0,070$), atividade inseticida ($Pa: 0,487$ e $Pi: 0,004$), atividade hepatoprotetora ($Pa: 0,355$ e $Pi: 0,042$) e atividade antioxidante ($Pa: 0,409$ e $Pi: 0,011$).

Para a avaliação da toxicidade de compostos orgânicos, são buscados os modelos *In silico* no ambiente de computadores, onde é simulado um metabolismo de um mamífero, avaliando assim parametros de interação organismo-composto e vice-versa sem a necessidade de exposição *In vivo*. Seu uso em ambientes regulados também tem sido incentivada pela legislação recente. Porém estas ferramentas apresentam limitações de so serem eficientes frente a avaliações de moleculas organicas com baixo a médio peso molecular, caracterizando

assim uma limitação para estudos de produtos naturais de alto peso molecular como taninos e lignanas (ANGELO et al., 2006; SRINIVAS et al., 2014).

Tabela 6- Predição da atividade de (R)-(+) e (S)-(-)-citronelal com possibilidade de ser ativo (Pa > 70%) determinada através da ferramenta Pass online.

Nº atividade	Pa	Pi	Atividade
1	0,747	0,032	Acrocylindropepsininhibitor
2	0,797	0,001	Alcoholdehydrogenasesubstrate
3	0,904	0,001	Aldosereductasesubstrate
4	0,704	0,010	All-trans-retinyl-palmitatehydrolaseinhibitor
5	0,777	0,004	Allyl-alcoholdehydrogenaseinhibitor
6	0,772	0,005	Antisecretoric
7	0,758	0,046	Aspulvinonedimethylallyltransferaseinhibitor
8	0,823	0,002	BRAF expressioninhibitor
9	0,724	0,048	CDP-glycerolglycerophosphotransferaseinhibitor
10	0,883	0,006	CYP2J substrate
11	0,843	0,002	Carboxylatereductaseinhibitor
12	0,747	0,032	Chymosininhibitor
13	0,768	0,002	Dolichyl-phosphataseinhibitor
14	0,703	0,005	Glutarate-semialdehydedehydrogenaseinhibitor
15	0,781	0,005	Limulus clotting factor B inhibitor
16	0,729	0,008	Limulus clotting factor C inhibitor
17	0,781	0,024	Mucomembranousprotector
18	0,779	0,041	Phobicdisorderstreatment
19	0,713	0,014	Phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferaseinhibitor
20	0,756	0,002	Plastoquinol-plastocyaninreductaseinhibitor
21	0,814	0,017	Polyporopepsininhibitor
22	0,824	0,003	Prenyl-diphosphataseinhibitor
23	0,821	0,012	Pro-opiomelanocortin converting enzyme inhibitor
24	0,885	0,004	Protein-disulfide reductase (glutathione) inhibitor
25	0,747	0,032	Saccharopepsininhibitor
26	0,745	0,018	TP53 expressionenhancer
27	0,824	0,020	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
28	0,838	0,021	Ubiquinol-cytochrome-c reductaseinhibitor
29	0,769	0,004	Undecaprenyl-phosphatemannosyltransferaseinhibitor

Pa= Probabilidade " de ser ativo"e Pi= Probabilidade "de ser inativo"

Então, assim sendo, vários métodos eficientes de aprendizado correlacionando estatística computadorizada vem sendo utilizados para desenvolver ferramentas para prever perigos toxicológicos pela análise de suas estruturas moleculares *In silico*. Essas ferramentas são usadas para estudar compostos hipotéticos existentes, que são rápidos, reprodutíveis e são normalmente baseados em biorreguladores humanos, bem como essas ferramentas pouparam o uso desnecessário do ambiente *in vivo*. (MARCHANT , 2012 ; SRINIVAS et al , 2014).

5.2.2 Osiris

O Osiris Property Explorer permite desenhar estruturas químicas e também calcula várias propriedades medicamentosas relevante sempre que a estrutura é válido. Os resultados da previsão são codificados por cores onde a cor vermelha mostra altos riscos com efeitos indesejados, como mutagenicidade ou baixa absorção intestinal, e de cor verde indica o comportamento semelhante às drogas usuais utilizadas na terapeutica (SAHU et al. , 2016).

As substancias (R)-(+) e (S)-(-)- citronelal foram analisadas através da ferramenta Osiris para a determinação das propriedades medicamentosas relevantes, como mutagênicidade, capacidade de irritação, efeitos reprodutivos, valor cLogP, drug-score, druglikeness e e avaliação dos riscos de sua toxicidade e os resultados dessa avaliação *In silico* são expressos na Tabela 7.

O programa Osiris foi utilizado para a previsão da toxicidade e carcinogenicidade para o agente antifúngico. Uma classe muito importante de enzima , responsável por muitos problemas de ADMET , é o citocromo P450, a inibição destas ou a produção de metabolitos indesejados pode resultar em muitas reacções adversas aos medicamentos (TEKTO, 2005; HADDA et al., 2014).

Tabela 7- Calculo dos riscos de toxicidade e de drug-score dos compostos (R)-(+) e (S)-(-) citronelal em comparação com os medicamentos anti-fúngicos convencionais.

Compostos	Risco de toxicidade ^[a]						Drug score ^[b]				
	MU T	TUMO T	IRRI R	REP P	CLP	S	D-L	D-S	nALH	nDLH	Da
(R)-(+)-CT	■	■	■	■	3.13	-2.36	-6.97	0.26	1.00	0.00	154.25
(S)-(-)-CT	■	■	■	■	3.13	-2.36	-6.97	0.26	1.00	0.00	154.25
Anfotericina B	■	■	■	■	0.32	-5.07	-0.13	0.27	18.00	12.00	924.09
Fluconazol	■	■	■	■	-0.10	-2.17	3.03	0.90	7.00	1.00	306.28
Itraconazol	■	■	■	■	5.15	-7.30	7.61	0.07	12.00	0.00	705.64
Miconazol	■	■	■	■	4.85	-5.08	4.72	0.49	3.00	0.00	416.13
Cetoconazol	■	■	■	■	3.36	-2.99	8.14	0.60	8.00	0.00	531.44

: Não toxico; : Pouco toxico; : Altamente toxico; ^[a]MUT: Mutagenico; TUMO: Tumorigenico; IRRI: Irritante; REP: Efeitos reprodutivos. ^[b]CLP: cLogP; S: Solubilidade; DL: Drug-likeness; DS: Drug-Score; nALH: numero de aceptores de ligação de Hidrogenio; nDLH: Numero de doadores de ligacoes de hidrogenio; Da: peso molecular (Daltons).

Os resultados mostraram esta monoterpenos apresenta baixo risco teórico de toxicidade e tem considerável valores druglikeness (-6,97) e drug-score (0,26). O "Drug score" (combinação dos valores de "druglikeness", cLogP, solubilidade, massa molecular e risco de toxicidade) gera um valor que infere no potencial de um composto se tornar uma droga futuro. Além disso, os resultados dos isomeros mostram que seguindo a "Regra de

Cinco" de Lipinski, que requer que o composto tenha de possuir pelo menos três destes quatro requisitos: $nDLH \leq 5$, $nALH \leq 10$, $DA \leq 500$ e $CLOGP \leq 5$; sendo assim o citronelal tem a capacidade de ser uma droga ativa em humanos utilizando a via de administração oral (LIPINSKI et al, 2001; ABHAY et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Os fitoconstituintes estudados apresentaram uma forte atividade antifúngica com uma CIM do R-(+)- citronelal de 64 µg/mL e uma CFM₅₀ de mesmo valor, caracterizando um efeito fungicida. Este efeito foi comprovado na curva de morte microbiana de acordo com o tempo e determinado que é uma qualidade dependente de concentração. Já o isômero S-(-) citronelal, apresentou uma CIM de 256 µg/mL e uma CFM₅₀ de 512 µg/mL, ainda caracterizado como uma substancia fungicida, o que ficou claro na observação do seu gráfico de morte microbiana de acordo com o tempo, onde esta substancia apresenta um efeito fungicida bem evidente em todas as concentrações e em pouco espaço de tempo.

As substancias R e S citronelal apresentaram-se de boa correlação com outros antifúngicos, apresentando efeitos sinérgicos no estudo de associação e suas variáveis *In silico* foram de boa prospecção, caracterizando assim essas substancias totalmente viáveis para que sejam continuados seus estudos e descobertos pontos cruciais para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.

REFERENCIAS

- ABHAY, T. S.; UDAY, D. D.; SANJAY, S. P.; SUDHIR, M. V. Improving decision making for drug candidates: A computational approach for benzthiazoles as antifungal. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.389-396, 2007.
- ABREU, P.A. **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas.** Dissertação do curso de Pós graduação em Neuroimunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008
- AGUDELO, C.A.; MUÑOZ, C.; RAMÍREZ, A.; TOBÓN, A.M.; DE-BEDOUT-BACT, C.; CANO L.E.; RESTREPO A. Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p214–220. 2015.
- ALI, S. M.; KHAN, A. A.; AHMED, I.; MUSADDIQ, M.; AHMED, K. S.; POLASA, H.; RAO, L. V.; HABIBULLAH, C. M.; SECHI, L. A.; AHMED, N. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 20, p. 1-7, 2005.
- ANGELO, V.; MAX, D.; MARKUS, A. L. The Challenge of Predicting Drug Toxicity in silico. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, n.1, p.195-208, 2006.
- ANVISA. Resolução normativa Nº 18, DE 24 de setembro DE 2014. MINISTERIO DA SAUDE - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=9&data=25/09/2014>> Acesso em 22 de abril de 2015.
- ARECHAVALA A.I.; OCHIUZZI, M.E.; BORGNA, M.D.; SANTISO, G.M. Fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: Results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.26(3), p194–197. 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p.446–475, 2008.
- BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A.M.; NAJVAR, L.K.; BOCANEGRA, R.; CASELLI, F.; DI CESARE, S.; GIANNINI, D.; DI FRANCESCO, L.F.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; SCALISE, G.; GRAYBILL, J.R.. Interactions of Posaconazole and Flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n. 5, p. 1355–1359. 2001
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils : science, technology, and applications**. NovaYorque: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p. 235-280.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**., v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.. Susceptibilidade "in vitro" de cepas de Cryptococcus a 5 drogas antifungicas. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo , v. 31, n. 5, p. 346-350. 1989 .

BII, C.C.; MAKIMURA, K.; ABE, S.; TAGUCHI, H.; MUGASIA, O.M.; REVATHI, G.; WAMAE, N.C.; KAMIYA, S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v.50, p.25–30. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e epidemiológica da Criptococose**, Brasília, DF: MS, 2012.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology e Therapeutics**, v.106, n. 2, p. 109-178, 2005.

CARDOSO, N.N.; ALVIANO, C.S.; BLANK, A.F.; ROMANOS, M.T.; FONSECA, B.B.; ROZENTAL, S.; RODRIGUES, I.A.; ALVIANO, D.S. Synergism Effect of the Essential Oil from Ocimum basilicum var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2016, ID 5647182, 12 p., 2016.

CARDOSO, P. H. M. **Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcusneoformans* mantidas em bancos de microrganismos**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CATÃO, R. M. R.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; ANTUNES, R.M.P.; ARRUDA, T.A.; SILVA, M.A.R. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de ripárias sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CHEONG, J.W.S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic?. **Medical Mycology**. V. 51, p. 261–269. 2013

CICHON, M.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; BORDIGNON, G. P. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Isolamento de *Cryptococcusneoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p.176-179, 2011.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections**. In: Lorian VMD. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p.739-788.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, CLSI document M07-A8. 8th. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Microreview: Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, v. 18, p.792–799, 2016.

CORDOBA, S.; AFELTRA, J.; VITALE, R.G.. Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate C.

neoformans iso-lates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v.71, p.260-2. 2011.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** São Paulo: MEDSI, 1992. p. 843.

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

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

DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR C. Successful treatment of Cryptococcus gattii neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210–213. 2012.

DRAGOMIRESCU, L.; LICKER, M.; HOGEA, E.; ZUGRAVU, R. Sensibility of fungi isolated from high risk wards. **Fisiologia (Physiology)**, v 61, p8-13. 2009.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**. v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

Endo, E. H. et al., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, 161, p. 534-540. 2010.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Testing conditions for determination of, minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3204-3208, 2002.

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

FARIA, N.C.G.; KIM, J.H.; GONÇALVES, L.A.P.; MARTINS, M. D. L.; CHAN, K.L.; CAMPBELL, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 506–513. 2011.

FOHRER, C.; FORNECKER, L.; NIVOIX, Y.; CORNILA, C.; MARINESCU, C.; HERBRECHT, R. Antifungal combination treatment: a future perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 25-30, 2006.

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

GADEA, I.; MENSA, J. Potencial de anidulafungina en la terapiacombinada. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 14, p. 51-55, 2008.

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

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GULLO, F. P.; ROSSI, S.A.; SARDI, J.C.; TEODORO, V.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, p.1377–1391, 2013.

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

HADDA, T. B.; AHMAD, M.; SULTANA, S.; SHAHEEN, U.; BADER, A.; SRIVASTAVA, S. POM analyses for antimicrobial evaluation of thienopyrimidinones derivatives: a rapid method for drug design. **Medicinal Chemistry Research**, v.23, n.1, p.16-24, 2014.

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

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**. Washington, DC: American society for Microbiology Press, p. 646. 2011.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

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

JOHNSON, M.D.; MACDOUGAL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. MINIREVIEW: Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

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

KLEPSER, M. E.; ERNEST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, 42 (5), p. 1207–1212. 1998.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN, W. C. J. **Diagnostic microbiology**.5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997. p. 1395.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy. **British Journal of Hematology**, v. 126, n. 2, p. 165-175, 2004.

LEDEZMA, E.; MANISCALCHI, M. T.; ESPINOZA, D. L. Sinergismo entre ajoeno y ketoconazole na isolamientos de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 157-162, 2008

LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2008.

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

LIU, W.; LI, L.P.; ZHANG, J.D.; LI, Q.; SHEN, H.; CHEN, S.M.; HE, L.J.; YAN, L.; XU, G.T.; AN, M.M.; JIANG, Y.Y. Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. **PLoS ONE**. v.9, e103442. doi:10.1371/journal.pone.0103442. 2014.

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

MARCHANT, C. A. Computational toxicology: a tool for all industries. **WIREs Computational Molecular Science**. v.2, n.1, p.424-434, 2012.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MAY, J.; CHAN, C.H.; KING, A.; WILLIAMS, L.; FRENCH, G.L.. Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal Antimicrobial Chemistry**, v. 45, p. 639-643, 2000.

MAY, R.C.; STONE, N.R.H.; WIESNER, D.L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews in Microbiology**, v.14, n. 2, p. 106–117, 2016.

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

MIÑÓN, P. B.; AGUILAR, V. A.; SUÁRES-RODRÍGUEZ, M.; BARONA, A. E.; IZQUIERDO, M. M. Tratamiento combinado concaspofungina y anfotericina b liposomal en niño de 12 meses afectado de candidemia asociada a catéter. **Anales Pediatría (Barcelona)**, v. 67, n. 4, p. 409-430, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **MicrobiologíaMédica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014. p. 627- 642.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L.C.; FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T.. In vitro activity of essential oil

from Ocimum gratissimum L. against four Candida species. **Research Microbiology**, v. 155, p. 579-586, 2004.

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

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-77, 2003.

OLIVEIRA, H.M.B.F. **Avaliação das atividades antifúngica, antioxidante e citotóxica dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal, (S)-(-)-citronelal e 7-hidroxicitronelal**. 2016. 143f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa, 2016.

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

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

PAPPALARDO, M. C. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p.299-305, 2003.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; SZESZS, M.W.; MARTINS, M.A.; BACETI, L.B.; BONFIETTI, L.X.; PURISCO, S.U.; BAEZ, A.A.; MELHEM, M.S.. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 146–151, 2009.

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

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeast and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 268-280, 2004.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**. V. 125, n. 1A, S3-S13. 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology reviews**, v. 20(1) p.133-63. 2007.

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

PINHEIRO, L. S. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Laurus nobilis L. (LOURO) SOBRE CEPAS DE Cryptococcus neoformans**. 2013. 78f. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia). UFPB/CCS – João Pessoa – PB. 2013.

PRASHAR, A.; HILIB, P.; VENESSA, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, 569–575, 2003.

PERFECT, J. R.. Clinical practice guidelines for the management of Cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 292-322, 2010.

PYBUS, D.; SELL, C.; **The Chemistry of Fragrances**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.

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

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in urban pigeons of Porto Alegre (RS), Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 40, p. 293-298, 2004.

RIBAS, R. C.; BAEZA, L. C.; RIBEIRO, F. H. M.. Isolation of *Cryptococcus spp.* in excrements of pigeons (*Columba sp.*) in the Maringá city, PR, Brazil. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 15, p.45-50, 2 SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2013.

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

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

SAHU, P. K.; SAHU, P. K.; SAMADHIYA, P.; SAHU, P. L.; AGARWAL, D. D. POM analyses and evaluation of in vitro antimicrobial, antitumor activity of 4H-pyrimido[2,1-b]benzothiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v.1, n.1, p.1-13, 2016.

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

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential

oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SEIXAS, P.T.L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G.R.; CARDOSO, D.P.. Controle fitopatológico do Fusarium subglutinans pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu , v. 13, n. spe, p. 513-517, 2011.

SILVA, V. V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de leveduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, n. 1, p. 56-65, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRS/UFSC. 1999.

SIONOV, E. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathogens**, 6:e1000848, 2010.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 118-122, 2001.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA FILHO, J.M.. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**. v.19, n.132, p. 40-45, 2005.

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

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection Journal**, v. 5, p. 667-675, 2003.

TAKAHARA, D. T. **Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande - MT.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Faculdade De Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

TECKTO, I.V. Computing chemistry on the web. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1497-1500, 2005

TORTORA, G. J., CASE, C. L., & FUNKE, B. R. **Microbiology**. 12º edição. São Paulo: Ed. Artmed, 2008. 1280 pag..

VICTORIA, F.N.; RADATZ, C. S.; SACHINI, M.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SAVAGNO, L.; PERIN, G.; MOTTA, A.S.; SILVA, W.P.; LENARDÃO, E.J. Further analysis of the antimicrobial activity of a-phenylseleno citronellal and a-phenylseleno citronellol. **Food Control**, v.23, p95-99. 2012.

VILLENA, S. N.; PINHEIRO, R. O.; PINHEIRO, C. S.; NUNES, M. P.; TAKIYA, C. M.; REIS, G. A.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; FREIREDE-LIMA, C. G. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus*

neoformans induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v.10, p.1274-1285, 2008.

ZARAGOZA, O.; CHRISMAN, C.J.; CASTELLI, M.V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CASADEVALL, A.. Capsule enlargement in Cryptococcus neoformans confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, p.2043–2057. 2008.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida*. **NewsLab**, v. 63, p. 136-146, 2004.

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

ANEXOS

I - Tabela de avaliação de sensibilidade dos antifungicos licenciados, no teste de difusão em ágar, do Sensifungic disc-Cecon.

Antifungicos	Símbolo	Conc / Disco	Zona de Inibição (mm)	CIM mcg/ml	Interpretação
S-Fluorocitosina	5 FC 1	1 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 25 > 25	Sensível Intermediário Resistente
Anfotericina B	AB	100 mcg	> 10 ≤ 10	< 1 ≥ 1	Sensível Intermediário ou Resistente
Nistatina	NY	100 U.I.	> 20 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível -- Resistente
Econazol	EC	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Clotrimazol	CTR	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Miconazol	MCZ	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Ketoconazol	KET	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Fluconazol	FLU	25 mcg	≥ 19 18 - 15 ≤ 14	≤ 8 32-16 ≥ 64	Sensível Intermediário Resistente
Itraconazol	ICZ	10 mcg	≥ 20 19 - 12 ≤ 11	-- -- --	Sensível Intermediário Resistente

Para Aspergillus fumigatus

S-Fluorocitosina	5 FC 1	1 mcg	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível Intermediário ou Resistente
S-Fluorocitosina	5 FC 10	10 mcg	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível ou Intermediário Resistente