



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
SINTÉTICOS E BIOATIVOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA**

JULIO ABRANTES PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL SOBRE LEVEDURAS
MULTIRRESISTENTES DO GÊNERO *Candida* E PERFIL
FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO EM ESTUDOS *IN SILICO***

JOÃO PESSOA
2017

JULIO ABRANTES PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL SOBRE LEVEDURAS
MULTIRRESISTENTES DO GÊNERO *Candida* E PERFIL
FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO EM ESTUDOS *IN SILICO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima

JOÃO PESSOA
2017

P436a Pereira, Julio Abrantes.
Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Candida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico* / Julio Abrantes Pereira.- João Pessoa, 2017.
97f. : il.
Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Geraniol - atividade antifúngica.
3. *Candida*. 4. *In silico*.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

JULIO ABRANTES PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL SOBRE LEVEDURAS
MULTIRRESISTENTES DO GÊNERO *Candida* E PERFIL
FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO EM ESTUDOS *IN SILICO***

Tese de doutorado aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora

Prof(a) Dr(a). Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinador interno

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Examinador interno

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Examinador externo

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Examinador externo

JOÃO PESSOA
2017

**Ao meu Deus, fonte de toda a minha
inspiração. Dedico-te mais esta vitória.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ser um bom pai para mim, sempre cuidando, inspirando e oferecendo todo o suporte necessário para a conquista deste sonho.

Aos meus pais pela minha formação profissional e pelo amor e carinho comigo.

A minha orientadora Edeltrudes de Oliveira Lima por todo apoio, orientação, paciência e amizade.

A minha amiga Janiere Pereira, “meu braço direito” na execução deste projeto, sempre disposta a ajudar e a orientar. Agradeço também pelo companheirismo, apoio e carinho nesta jornada, a qual serviu para afinarmos nossa amizade.

A minha amiga Daniele Figueredo, “meu braço esquerdo” na execução deste projeto, também sempre solicita a me ajudar e orientar. Sendo dúvida um dos melhores frutos desta pós foi a conquista da sua amizade.

As amigas Zelia Braz e Maria de Fátima Peixoto por todo apoio, carinho e paciência, (principalmente na escrita da tese). Muito obrigado!

Ao Abrahão Alves de Oliveira Filho pela parceria na correção dos artigos e na realização da estatística.

Ao professor Lauro Santos Filho em ter conseguido as cepas bacterianas e ter emprestado a pipeta multicanal.

Aos membros da banca sempre gentis e solícitos em colaborar com seu tempo e conhecimento.

Aos colegas de laboratório Camila Pinheiro, Felipe Sarmiento, Camila Gurgel e demais colegas mestrands e doutorandos por toda ajuda, força e momentos felizes vividos.

Ao Sandro Soares por toda ajuda, apoio e paciência.

A Ana Luiza pelo apoio, paciência e ajuda nas soluções em computador.

Anderson Nunes por toda amizade, com alguém quem estive e estressado durante este período do doutorado.

A secretária da pós graduação Caroline Mangureira pela presteza e atenção dada.

Muito obrigado a todos e que ajudaram direto ou indiretamente na concretização este sonho.

“A sabedoria é como ouro. É moeda que vale em qualquer lugar.”

“O homem busca incessantemente o saber, ano após ano ao longo de sua existência, porém o homem sábio não só é aquele que tem muito conhecimento acumulado, mas aquele que sabe usar a sua sabedoria para o bem da humanidade.”

(Julio Abrantes Pereira)

RESUMO

PEREIRA, J. A. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Candida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico***. 2017. 97f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Área de Concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

Atualmente, em todo globo terrestre tem ocorrido o aumento da frequência dos casos de candidíase, infecção oportunista comumente tratada com fluconazol. Com o uso indiscriminado deste e outros antifúngicos tem se emergido casos de candidíase por cepas multirresistentes tornando-se necessário a busca por novos fármacos. Vários produtos naturais a exemplo do monoterpene geraniol têm demonstrado atividade antimicrobiana frente a diversos micro-organismos. Buscando alternativas para o tratamento da candidíase o presente estudo objetivou-se avaliar a atividade antifúngica do geraniol frente a cepas de *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol por meio de técnicas de microdiluição, avaliando-se a concentração inibitória mínima – CIM, concentração fungicida mínima – CFM, efeito na parede celular (ensaio de sorbitol), ligação ao ergosterol da membrana, efeito de associação deste monoterpene com antifúngicos fluconazol e anfotericina B pelo técnica de checkboard e ensaio de modulação. Verificou-se também a os parâmetros farmacológicos, toxicológicos e possíveis espectros de atividade do geraniol por meio de ensaios *in silico* utilizando-se os softwares Osiris, Molinspiration e Pass online. As análises realizadas revelaram que o geraniol apresentou uma excelente atividade antifúngica frente a todas as cepas multirresistentes com uma CIM₉₀ 512µg/mL, além de um efeito fungicida concentração dependente após 8 horas de exposição com a CFM₉₀ de 512µg/mL, este não apresentou atividade na parede fúngica e nem interagiu com o ergosterol da membrana celular, também não se evidenciou efeito sinérgico, antagônico ou modulador deste fitoconstituente sobre o fluconazol e a anfotericina B. Os ensaios *in silico* mostraram que o geraniol tem uma boa biodisponibilidade oral teórica, além de inúmeras atividades farmacológicas e que embora apresente o risco de efeito irritante, não apresenta efeitos mutagênicos, tumorigênicos e nem danos ao aparelho reprodutor, o que permite sugerir que o geraniol é um bom candidato no combate a cepas de *Candida* multirresistentes.

Palavras-chave: Atividade antifúngica. *Candida*. Geraniol. *In silico*.

ABSTRACT

PEREIRA, J. A. **Antifungal activity of geraniol on multiresistant yeasts of *Candida* genus and pharmacological and toxicological profile in *in silico* studies.** 2017. 97f. Thesis (Doctorate in Natural and Synthetic Bioactive Products – Concentration Area: Pharmacology) – Federal University of Paraiba, João Pessoa, 2017.

Currently, throughout the globe, there has been an increase in the frequency of cases of candidiasis, an opportunistic infection commonly treated with fluconazole. With the indiscriminate use of this and other antifungals cases of candidiasis by multiresistant strains have emerged, making it necessary to search for new drugs. Several natural products such as monoterpene geraniol have demonstrated antimicrobial activity to various microorganisms. The present study aimed to evaluate the antifungal activity of geraniol against strains of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* resistant to fluconazole by means of microdilution techniques, evaluating the minimum inhibitory concentration - CIM, minimum fungicidal concentration - CFM, cell wall effect (sorbitol assay), binding to membrane ergosterol, effect of association of this monoterpene with fluconazole and amphotericin B antifungal agents by the checkerboard technique and modulation assay. Pharmacological, toxicological and possible spectra of geraniol activity were also verified by *in silico* assays using the Osiris, Molinspiration and Pass online software. The analysis showed that geraniol showed excellent antifungal activity against all multiresistant strains with a 512 μ g/mL CIM₉₀, and a fungicidal effect dependent concentration after 8 hours of exposure with the CFM₉₀ of 512 μ g/mL. Fungal wall and did not interact with the ergosterol of the cell membrane, nor did it show a synergistic, antagonistic or modulating effect of this phytoconstituent on fluconazole and amphotericin B. The *in silico* tests showed that geraniol has a good theoretical oral bioavailability, as well as numerous. Although it presents the risk of an irritant effect, it does not present mutagenic, tumorigenic or reproductive effects, which leads to the conclusion that geraniol is a good candidate in the fight against multidrug resistant strains of *Candida*.

Key-words: Antifungal activity. *Candida*. Geraniol. *In silico*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – A-B: Características macromorfológicas de <i>Candida</i> spp em ágar Sabouraud dextrose.....	24
FIGURA 02 – Mecanismos de virulência e atributos fitness de <i>C. albicans</i>	26
FIGURA 03 – Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.....	29
FIGURA 04 – Estrutura química da anfotericina B e da nistatina.....	30
FIGURA 05 – Poro transmembrana resultante da interação da anfotericina B com o ergosterol permitindo a saída de íons de dentro da célula.....	31
FIGURA 06 – Visualização do agente antifúngico polieno - anfotericina B, ergosterol e colesterol em três dimensões.....	32
FIGURA 07 – Fórmula estrutural dos imidazólicos: cetoconazol e miconazol.....	33
FIGURA 08 – Fórmula estrutura dos triazóis: itraconazol e fluconazol.....	34
FIGURA 09 – Fórmula estrutural das alilaminas: terbinafina e naftifina	35
FIGURA 10 – Mecanismo de biossíntese do ergosterol.....	35
FIGURA 11 – Estrutura química da flucitosina.....	36
FIGURA 12 – Esquema do mecanismo de ação da flucitosina.....	37
FIGURA 13 – Estrutura química da micafungina.....	38
FIGURA 14 – Estrutura química do geraniol.....	43
FIGURA 15 – Curva de morte microbiana ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) da cepa <i>C. albicans</i> 681, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.....	64
FIGURA 16 – Curva de morte microbiana ($\text{Lo}_{10}\text{UFC/mL}$) da cepa <i>C. glabrata</i> 173, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.....	64
FIGURA 17 – Curva de morte microbiana ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) da cepa <i>C. krusei</i> 885, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.....	65
FIGURA 18 – Grupamento químico responsável pelo efeito irritante do geraniol.....	77
FIGURA 19 – Previsão de atividade antimicrobiana do geraniol obtidas pela ferramenta PASS on-line ($\text{Pa}>30\%$).....	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Descrição dos fatores inerentes ao hospedeiro, que predisõem o surgimento de candidíases.....	27
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a <i>C. albicans</i>	58
TABELA 2 – CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a <i>C. glabrata</i>	60
TABELA 3 – CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a <i>C. krusei</i>	62
TABELA 4 - Efeito do geraniol sobre as cepas <i>C. albicans</i> 681, <i>C. glabrata</i> 173 e <i>C. krusei</i> 885 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.....	67
TABELA 5 - Efeito do geraniol sobre as cepas <i>C. albicans</i> 681, <i>C. glabrata</i> 173 e <i>C. krusei</i> 885 na ausência e presença de ergosterol 400µg/mL.....	70
TABELA 6 - ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre <i>C. albicans</i> 681.....	72
TABELA 7 - ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre <i>C. glabrata</i> 173.....	73
TABELA 8 - ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre <i>C. krusei</i> 885.....	73
TABELA 9 – Modulação da ação dos antifúngico na sua CIM pelo geraniol na CIM/8 frente a <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. krusei</i>	75
TABELA 10 – Análise teórica das propriedades físico-químicas do geraniol envolvidas na biodisponibilidade oral teórica comparada aos padrões da “Regra dos cinco” Lipinski – Osiris.....	76
TABELA 11 – Risco de toxicidade do geraniol comparada ao dos antifúngicos padrões – Osiris.....	77
TABELA 12 – Comparativo da probabilidade do geraniol com o antifúngicos padrões de interagirem com diferentes alvos farmacológicos – Molispiration.....	78
TABELA 13 – Atividade previstas para o geraniol com uma probabilidade maior que 70% (Pa > 70%) – Pass online.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BHI	Brain heart infusion
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF_A	Concentração inibitória fracionada de A
CIF_B	Concentração inibitória fracionada de B
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM_A	Concentração inibitória mínima de A
CIM_B	Concentração inibitória mínima de B
cLogP	Coefficiente de partição água:óleo
CSD	Caldo Sabouraud dextrose
Da	Peso molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
dTMP	Monofosfato de timidina – desoxirribose
dUMP	Monofosfato de uridina – desoxirribose
EI	Inibidor de enzima
ep	Erro padrão
5-FdUMP	Ácido 5-fluorodesoxiuridílico;
FLUC	Fluconazol
5-FU	5- fluorouracil
5-FUDP	Difosfato de 5-fluorouracil - ribose
5-FUMP	Monofosfato de 5-fluorouracil - ribose
5-FUTP	Trifosfato de 5-fluorouracil - ribose
GPCRL	Ligante da proteína GPCR
HOG	Glicerol de alta osmolaridade
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada

ICM	Modulador de canal iônico
ICZ	Itraconazol
IPP	Isopentilpirofosfato
IRRI	Irritante
KI	Inibidor de quinase
LM	Laboratório de micologia
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MUT	Mutagênico
nALH	Número de aceptores de hidrogênio
nDLH	Número de doadores de hidrogênio
NRL	Ligante de receptor nuclear
Pa	Probabilidade de ativação
Pi	Probabilidade de inatividade
PI	Inibidor de protease
PM	Peso molecular
RDC	Resolução da diretoria colegiada
REP	Dano ao aparelho reprodutor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TUMO	Tumorigênico
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UMP	Monofosfato de uridina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
α	Alfa
β	Beta
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
LogUFC/mL	Logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	23
3.1 GENERALIDADES SOBRE FUNGOS DO GÊNERO <i>Candida</i>	23
3.2 CANDIDÍASE	27
3.3 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA	29
3.3.1 Polienos	30
3.3.2 Inibidores da síntese de ergosterol	33
3.3.3 Flucitosina	36
3.3.4 Equinocandinas	38
3.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	38
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE PRODUTOS NATURAIS	40
3.5.1 Óleos essenciais e terpenos	42
3.5.2 O geraniol	43
3.6 ESTUDO <i>IN SILICO</i> DE TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DE COMPOSTOS NATURAIS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 LOCAL DO TRABALHO	47
4.2 FITOCONSTITUINTE, ANTIFÚNGICOS E SUBSTÂNCIAS	47
4.3 MEIOS DE CULTURA	47
4.4 MICRO-ORGANISMOS	47
4.5 INÓCULO	48
4.6 METODOLOGIA	48
4.6.1 Avaliação das atividades antimicrobianas <i>in vitro</i>	48

4.6.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	48
4.6.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	49
4.6.2 Cinética de morte fungica.....	50
4.6.3 Ação do produto na parede celular fúngica	51
4.6.4 Ação do produto na membrana celular - Interação com o ergosterol	52
4.6.5 Determinação do índice de concentração inibitória fracionada (pelo método de checkerboard) do geraniol associado com antifúngicos licenciados	52
4.6.6 Avaliação da interferência do geraniol sobre a resistência aos antifúngicos licenciados (ensaio de modulação)	54
4.7-ENSAIOS <i>IN SILICO</i>	54
4.7.1 Osiris	54
4.7.2 Molinspiration.....	55
4.7.3 Pass online	55
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA - CFM	58
5.2 CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA.....	63
5.3 ENSAIO COM SORBITOL	66
5.4 INTERAÇÃO COM O ERGOSTEROL	69
5.5 ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	71
5.6 MODULAÇÃO DO GERANIOL SOBRE A ANFOTERICINA B E AO FLUCONAZOL.	74
5.7 ENSAIOS <i>IN SILICO</i>	76
6 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Dados mostram um crescente aumento do número de infecções fúngicas invasivas, fato este preocupante uma vez que estas possuem uma considerável taxa de mortalidade (CASTELLI *et al.*, 2014).

Dentre as infecções fúngicas com elevada frequência destaca-se a candidíase, processo infeccioso micótico oportunista provocado por leveduras do gênero *Candida*, podendo esta se manifestar clinicamente de forma superficial ou sistêmica (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Um conjunto de fatores tem propiciado o aumento da frequência deste tipo de infecção, entre estes o avanço da medicina, que tem proporcionado o aumento da sobrevivência de pacientes imunocomprometidos, e o uso indiscriminado de antimicrobianos, que eliminam a microbiota do corpo humano além é claro de selecionar micro-organismos resistentes.

Diante deste cenário está ocorrendo à emergência de patógenos pouco frequentes como a *Candida glabrata*, *Candida krusei* e a *Candida albicans* resistente ao fluconazol, fato que preocupa a sociedade científica, pois estes micro-organismos são de difícil tratamento.

As opções de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções sistêmicas é relativamente pequeno, tornando-se menor ainda diante de leveduras multirresistentes, além disso, parte destes fármacos apresenta elevada toxicidade e/ou elevado custo (KHAN *et al.*, 2013).

A descoberta de novos agentes antifúngicos que sejam mais eficazes e menos tóxicos aos usuários ou que apresentem um novo mecanismo de ação tornou-se essencial nos dias atuais. Os produtos naturais pela sua diversidade química e propriedades bioativas podem ser considerados promissores na descoberta de novos fármacos antifúngicos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Estudos prévios mostraram a atividade antifúngica do geraniol (LEITE *et al.*, 2014, MIRON *et al.*, 2014); entretanto, é necessário verificar o potencial deste monoterpeno frente a cepas de *Candida* não-*albicans* e especialmente em cepas multirresistentes destes micro-organismos para que desta forma se possa confirmar o

futuro promissor deste fitoconstituente como fármaco para tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. albicans*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica do geraniol sobre cepas clínicas multirresistentes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, bem como os parâmetros farmacológicos, toxicológicos e possíveis espectros de atividade do geraniol por ensaios *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do geraniol frente às cepas clínicas multirresistentes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.
 - Determinar a CIM do fluconazol e da anfotericina B frente às cepas em análise.
 - Estudar os possíveis modos de ação do geraniol com ênfase nos seus efeitos sobre a parede celular e a membrana plasmática.
 - Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (método de associação – *checkerboard*) do fitoconstituente associado ao fluconazol e a anfotericina B;
 - Estudar a modulação do fitoconstituente sobre fluconazol e a anfotericina B;
 - Investigar os parâmetros farmacológicos, toxicológicos e possíveis espectros de atividade do geraniol *in silico*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 GENERALIDADES SOBRE FUNGOS DO GÊNERO *Candida*

Dentre os diversos seres vivos que habitam o globo terrestre estão os fungos, os quais por apresentarem membrana nuclear são classificados como eucariontes. A nível celular este seres se caracterizam por apresentar uma parede celular, cujo um dos componentes principais é o polissacarídeo quitina, uma membrana citoplasmática (que possui o lipídeo ergosterol na composição), um citoplasma onde estão diversas organelas e um núcleo, formado pela membrana nuclear e o material genético (SIDRIM; ROCHA, 2012).

Os fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os cogumelos e os fungos filamentosos (MURRAY, 2014; SIDRIM; ROCHA, 2012). Estes podem interagir com plantas, a animais ou seres humanos de várias maneiras, estabelecendo relacionamentos simbióticos, latentes, comensais ou patogênicos (ROMANI, 2011).

Entre os diversos fungos destacam-se clinicamente as leveduras do gênero *Candida*, as quais apesar de habitarem de forma comensal a cavidade bucal, o trato gastrointestinal e geniturinário, no momento de uma disfunção da microbiota e/ou enfraquecimento imunológico do hospedeiro, expõem um caráter oportunista, causando então micoses superficiais ou sistêmicas (BERMAN, 2012).

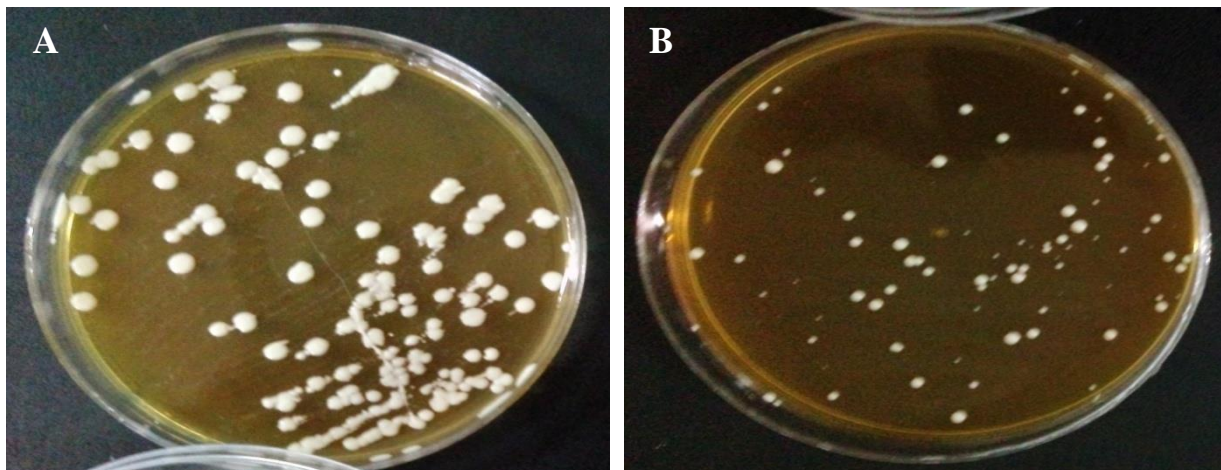
As leveduras do gênero *Candida* têm a versatilidade de se adaptar em diferentes ambientes, podendo ser encontradas em vários ecossistemas, como solo, alimentos, água, fazendo parte da microbiota de homens e animais. Esses micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para o seu desenvolvimento (GIOGLO; SVIDZINSKI, 2010).

O gênero *Candida* é composto por leveduras hialinas, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. *In vitro* em ágar Sabouraud dextrose (ASD) estes micro-organismos se desenvolvem formando colônias de coloração de branca a bege com textura lisa ou enrugada, brilhante ou seca, (Figura 1) (LACAZ; DUPONT, 2002; SILVA *et al.*, 2012).

Esses seres eucarióticos apresentam duas formas de reprodução: a fase assexuada ou anamorfa (predominante), a qual abrange a formação de blastoconídios (leveduras) pelo processo de brotamento parental, a fase sexuada ou teleomorfa por esporos sexuais, os

ascósporos, sendo este último processo não tão frequente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1 – A-B: Características macromorfológicas de *Candida* spp em ágar Sabouraud dextrose.



Fonte: Leite (2015).

As leveduras do gênero *Candida* são classificadas taxonomicamente em: Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae*, Gênero *Candida* (HOOG *et al.*, 2011). Este gênero possui cerca de 200 espécies, entretanto aproximadamente apenas de 35% destas são capazes de se desenvolver sob temperatura a 37° C do corpo humano (SILVA *et al.*, 2012).

As principais espécies de leveduras do gênero *Candida* de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. catenulata*, *C. zeylanoides*, *C. chiropterorum*, *C. ciferrii*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. novergensis*, *C. lusitaniae*, *C. haenulonii*, *C. utilis*, *C. haemulonii*, *C. viswanathii*, *C. pulcherrima* e *C. intermédia*, (HOOG *et al.*, 2011).

Dentre as espécies acima citadas destaca-se a *C. albicans* devido à elevada frequência nos casos de candidíase, cuja constante exposição desta espécie a antifúngicos tem feito emergir cepas multirresistentes, por sua vez infecções causadas por espécies de *Candida* não – *albicans* tem aumentado cada vez mais (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

Estudos mostram que a maioria dos casos de fungemia estão significativamente associados a espécies de *Candida* não – *albicans* (DOTIS *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2010). Entre as espécies de *Candida* não – *albicans* merece destaque a *C. krusei* e a *C.*

glabrata uma vez que estas são resistentes ao fluconazol (antifúngico mais usado no tratamento de candidíase), a primeira devido a uma resistência intrínseca e a segunda a um mecanismo de resistência adquirido (SIDRIM; ROCHA, 2012).

Segundo Liguori *et al.* (2009) o aumento de infecções por espécies de *Candida* não – *albicans* pode estar relacionado a melhorias nos métodos de diagnóstico como o uso de meios cromogênicos com a capacidade de diferenciar espécies de *Candida*, bem como a introdução de técnicas moleculares para o diagnóstico de rotina da fungemia.

Apesar de causarem infecções oportunistas, as leveduras do gênero *Candida* possuem uma ampla gama de fatores de virulência (Figura 2), os quais são determinados geneticamente (TAMURA *et al.*, 2007).

A morfologia fúngica é um fator de grande importância tanto a invasão quanto a evasão das células hospedeiras. A forma leveduriforme (blastocóndio) parece iniciar a infecção, embora menor capacidade infectante quando comparada as formas pseudo-hifas e /ou hifas verdadeiras (presentes em fases específicas do processo infeccioso), que demonstram ser mais invasivas e resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo estas difíceis de serem fagocitadas devido a sua morfologia e ao tamanho. Estas formas alongadas estão relacionadas ao agravamento de estados patológicos (ROMÁN *et al.*, 2007).

Um dos fatores de virulência proposto, embora não tão comum e com poucas evidências é o fenômeno de “switching” que corresponde à transição celular do crescimento de leveduras a células alongadas e opacas. Esta variação fenotípica pode influenciar a formação de biofilme e a antigenicidade da levedura (BARDEBO; SGARBI, 2010; MAYER; HUBE; WILSON, 2013).

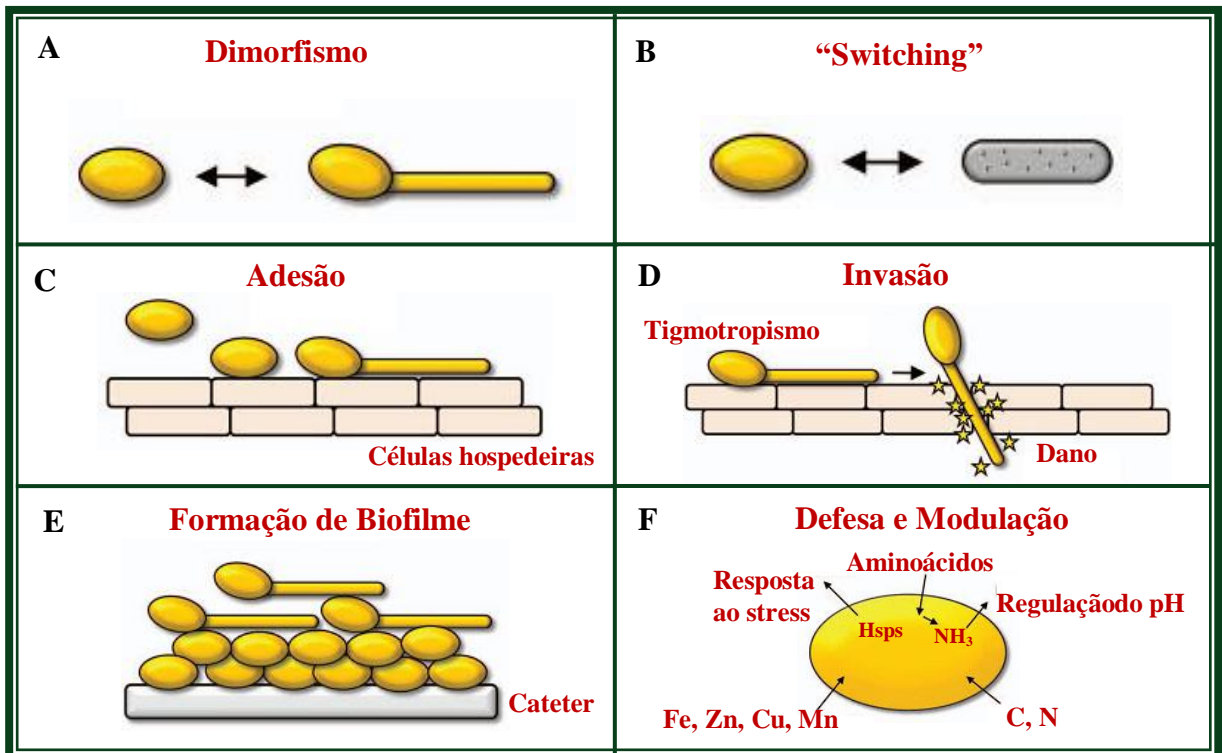
No desenvolvimento do processo infeccioso as proteínas adesinas como a família ALS (*Agglutimin-Like Sequence*) desempenha um importante papel de promover à adesão das leveduras as células do hospedeiro, enquanto que as invasinas como AL3 facilitam a invasão das leveduras (MAYER; HUBE; WILSON, 2013).

Leveduras do gênero *Candida* também utilizam mecanismos que permitem identificar e penetrar locais infectáveis no hospedeiro, facilitando assim o processo de patogênese, esse mecanismo é denominado tigmotropismo de hifas (BRAND *et al.*, 2008).

Enzimas extracelulares como fosfolipases e proteases tem sido indicadas em aumentar a eficiência na aquisição de nutrientes extracelulares, mas, sobretudo em facilitar a disseminação da doença ao promover danos celulares (SILVA, 2016).

Outros fatores de virulência também relatados são a produção de biofilme (complexa estrutura tridimensional multicelular de leveduras, pseudo-hifas e hifas envolvidas por uma matriz extracelular) que possui elevada resistência antifúngica e a capacidade da levedura de modular o meio em que está por meio de alteração de pH, captação de aminoácidos e traços de metais, e ainda o seqüestro de componentes de carbono e nitrogênio, favorecendo a sobrevivência fúngica (MAYER; HUBE; WILSON, 2013; SILVA *et al.*, 2010).

Figura 2 - Mecanismos de virulência e atributos fitness de *C. albicans*. A: Formas virulentas envolvidas no processo infeccioso; B: Processo “Switching” com o desenvolvimento de forma opaca; C: Adesão das formas dimórficas de *C.albicans*. ao tecido; D: Invasão tecidual via tigmotropismo; E: Formação de Biofilme numa estrutura abiológica; F: Atividade defensiva e moduladora de *C. albicans*



Fonte: Adaptado de Mayer, Rube e Wilson (2013).

3.2 CANDIDÍASE

Espécies de *Candida* podem viver como micro-organismos comensais em indivíduos saudáveis. A colonização começa nos primeiros dias após o nascimento e persiste durante toda a vida. Vivem na pele e em várias membranas mucosas, incluindo boca, vagina, uretra, tubo digestivo e área respiratória superior do corpo humano sem causar danos (LÓPEZ-MARTINEZ, 2010).

Em determinadas circunstâncias, na presença de fatores predisponentes, o equilíbrio-parasita hospedeiro é rompido e o micro-organismo inicia a candidíase, processo infeccioso oportunista provocado por leveduras do gênero *Candida* (BARBEDO; SGARBI, 2010).

O primeiro registro de leveduras do gênero *Candida* spp. como patógeno foi atribuído a Langenbeck, em 1839, no qual se observou e isolou em aftas bucais de um paciente com tifo um micro-organismo, que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, *C. albicans*. Na época, esta levedura foi considerada erroneamente o agente etiológico da referida doença (SIDRIM; ROCHA, 2012).

Entre os fatores predisponentes ao desenvolvimento desta micose oportunista estão os fatores de virulência do fungo e os fatores extrínsecos e intrínsecos ao hospedeiro (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013), os quais estão expostos no Quadro 1.

FATORES INTRÍNSECOS	
FISIOLÓGICOS	Velhice, gravidez e prematuridade
PATOLÓGICOS	Neoplasias, hemopatias diversas, lúpus eritematoso disseminado, diabetes e outras endocrinopatias, tuberculose, AIDS.
FATORES EXTRÍNSECOS	
INTERVENÇÕES	Transplantes, usos de sondas, cateteres, aparelhos de respiração artificial, nutrição parenteral, hemodiálise.
AGENTES FÍSICOS	Traumatismo, irradiação, queimaduras e radioterapia.
MEDICAMENTOS	Terapêutica antimicrobiana prolongada, imunossupressores, quimioterapia e uso de drogas citotóxicas.

Quadro 1- Descrição dos fatores inerentes ao hospedeiro, que predisõem o surgimento de candidíases.

Fonte: Lacaz e Dupont (2002); Sidrim e Rocha 2012, com adaptações.

Clinicamente a candidíase pode ser classificada em superficial ou de mucosa, profunda ou sistêmica, apresentando manifestações clínicas variáveis segundo o sítio anatômico de instalação (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010).

Entre as micoses superficiais merece destaque a onicomiose (micose no aparelho ungueal que afeta tanto a população imunocompetente quanto os imunossuprimidos (MARTINS *et al.*, 2007), a candidíase oral (manifestando-se normalmente como aftas ou quelite angular, as quais afetam 90% dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida HIV/AIDS (OWOTADE; PATEL, 2014) e a vulvovaginite, considerado o segundo mais freqüente quadro infeccioso que afeta o órgão sexual feminino (SILVA *et al.*, 2014).

A incidência das infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado de forma significativa nas últimas décadas (NEGRI *et al.*, 2012). A candidemia é a manifestação mais comum de infecção disseminada por *Candida* (PEIXOTO *et al.*, 2014).

O termo candidemia é a denominação para infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. Podendo ser definida como a ocorrência de duas culturas positivas (ou mais) para a mesma espécie de *Candida*, proveniente de amostras diferentes, coletadas após 3 dias da admissão (BRASIL, 2004).

Esta manifestação clínica tem sido a infecção fúngica invasiva mais extensamente estudada, pois a mesma tornou-se um problema persistente em inúmeros hospitais em todo mundo tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Esta patologia tem grande significado devido a sua elevada taxa de mortalidade (31,5% - 50%) e aumento dos custos hospitalares para o seu controle (PATEL *et al.*, 2005).

Mais de 70% das infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalares foram devido a *Candida* spp. a maioria como candidemia (HORN *et al.*, 2007). Segundo Colombo *et al.* (2006) a candidemia representa a quarta causa mais freqüente de infecção da corrente sanguínea e conforme Nakamura, Caldeira e Avila (2013) esta patologia tem uma alta incidência no Brasil, 2,49 casos por 1000 internações, o que corresponde a uma taxa de 2 a 5 vezes maior do que vários países do hemisfério norte, como França, Estados Unidos, Noruega e Suíça.

O principal mecanismo de transmissão de candidemia dá-se por meio endógeno, em que a *Candida* spp. constituinte da microbiota de vários sítios anatômicos, altera seu caráter de comensal para patógeno oportunista em consequência a condições de debilidade do

hospedeiro, no entanto outra via pode ser descrita. A via exógena ocorre em meio médico, principalmente por meio das mãos de profissionais da saúde e manuseio de materiais médico-hospitalares contaminados por fungos (PEIXOTO *et al.*, 2014).

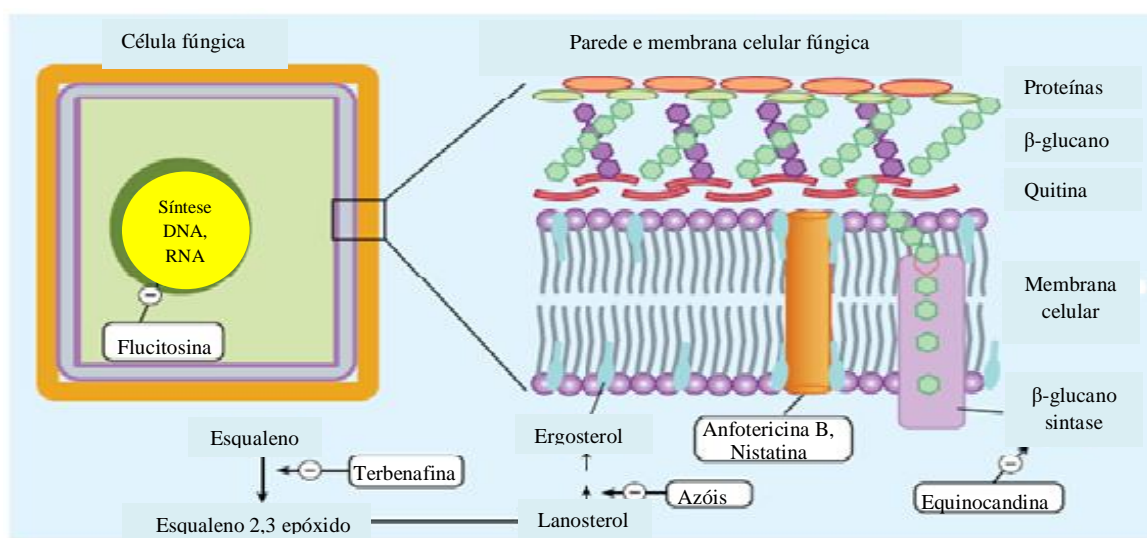
3.3 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA

Sendo a candidíase uma micose oportunista a primeira medida a ser tomada para o seu tratamento é a eliminação dos fatores predisponentes, por sua vez isso nem sempre é possível quando estamos diante de um paciente com câncer, leucemia, linfoma, AIDS e/ou diabetes (LÓPEZ-MARTINEZ, 2010).

Atualmente, várias drogas antimicrobianas podem ser utilizadas no tratamento das infecções causadas por fungos, porém, essa “diversidade” torna-se relativamente pequena, quando comparado ao arsenal de drogas disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas (SILVA, 2016). Isso é atribuível à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade de encontrar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos (GÓES, 2009).

Segundo Murray *et al.* (2014) os agentes antifúngicos disponíveis a comercialização podem ser classificados com base no seu alvo de atuação na célula fúngica. Entre as classes estão: polienos, inibidores da biossíntese do ergosterol (azólicos e alilaminas); antimetabólicos e equinocandinas (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.



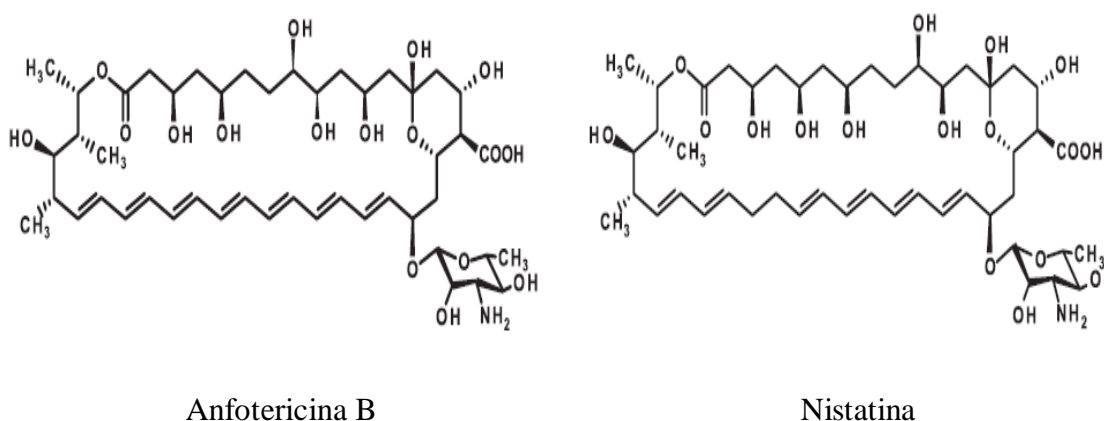
Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2012).

3.3.1 Polienos

Esta representa a mais antiga classe de fármacos antifúngicos, cujo início de uso ocorreu na década de 1950. Desta classe os dois fármacos mais usados clinicamente são a anfotericina B e a nistatina, os quais apresentam o mesmo mecanismo de ação e estrutura química macrocíclica caracterizada por átomos de carbono divalente dispostos em série (SIDRIM; ROCHA, 2012).

Estruturalmente a anfotericina B é muito semelhante à nistatina, exceto por ter sete ligações duplas conjugadas, enquanto a nistatina tem quatro. Esta diferença confere uma atividade antifúngica consideravelmente mais elevada a anfotericina B, presumivelmente devido a uma interação hidrofóbica mais eficiente com ésteres de membrana (Figura 4) (BRAUTASET *et al.*, 2011).

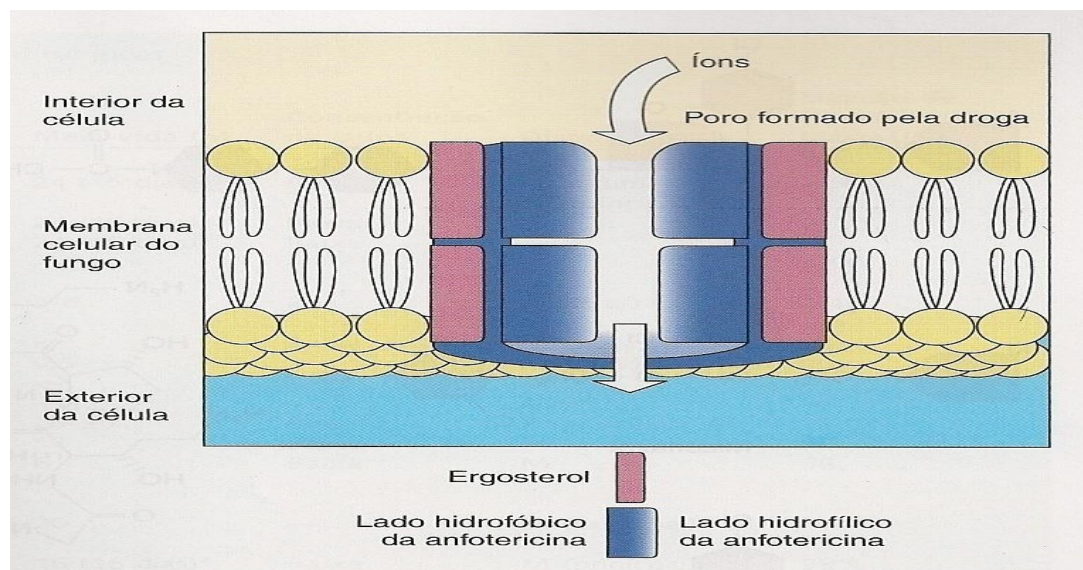
Figura 4 - Estrutura química da anfotericina B e da nistatina.



Fonte: Brautaset *et al.* (2011).

A atividade antifúngica dos polienos é mediada através da sua ligação ao ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática fúngica. A ligação resulta na formação de canais aquosos e não aquosos que aumenta a permeabilidade da membrana (Figura 5). Componentes celulares, incluindo proteínas e cátions monovalentes e divalentes, atravessam esses poros, o que leva à perda de potencial de membrana e, finalmente, a morte da célula (CHANDRASEKAR, 2011; MOHR *et al.*, 2008; MATHEW; NATH, 2009).

Figura 5 - Poro transmembrana resultante da interação da anfotericina B com o ergosterol permitindo a saída de íons de dentro da célula.



Fonte: Wispelwey e Parsons (2006).

Os macrolídeos poliênicos apresentam uma longa história de uso com baixa incidência de resistência, sendo estes eficientes agentes fungicidas, contudo sua utilização na prática médica é problemática, devido a sua baixa solubilidade e considerável toxicidade em humanos (BORGOS *et al.*, 2006).

A anfotericina B tem sido o medicamento padrão para o tratamento das infecções disseminadas causadas por vários fungos, uma vez que esta é ativa contra a maioria destes, incluindo *Aspergillus* e *Candida* (RANG *et al.*, 2011).

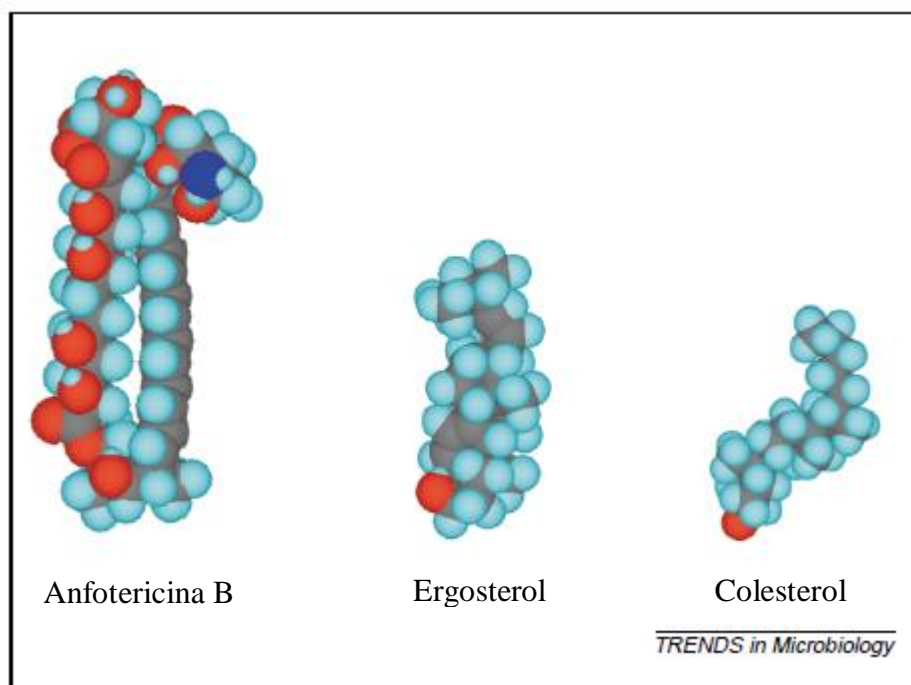
O efeito adverso mais grave e comum da anfotericina B é a nefrotoxicidade, a qual tem sido reduzida graças às novas formulações de medicamentos a base deste fármaco. Estas formulações (lipossomo-encapsulada) diminuem a velocidade com que a anfotericina B é entregue aos rins, entretanto estas formulações apresentam um custo consideravelmente elevado (principal fator limitante ao uso dessas formulações tornado-as de difícil acesso no Brasil). Vale ressaltar que a essa fórmula lipossomal não possui maior eficácia que o fármaco nativo, e sim capacidade de causar poucas reações adversas (BENNETT, 2011; RANG *et al.*, 2011).

A anfotericina B possui ação seletiva, ligando-se avidamente as membranas dos fungos e de alguns protozoários, menos avidamente às células dos mamíferos e não se ligando

de forma alguma às bactérias. A base dessa especificidade relativa é a grande avidez do fármaco pelo ergosterol, principal esterol da membrana fúngica, que não é encontrado nas células de animais (onde o colesterol é o principal esterol) (RANG *et al.*, 2011).

A maior afinidade da anfotericina B pelo ergosterol do que pelo colesterol, provavelmente se deve a estrutura tridimensional cilíndrica do ergosterol, enquanto que a do colesterol apresenta uma forma sigmóide (Figura 6) (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Figura 6 - Visualização do agente antifúngico polieno - anfotericina B, ergosterol e colesterol em três dimensões. O ergosterol mantém uma forma cilíndrica em todas as rotações e liga-se melhor ao lado hidrofóbico (da direita) da molécula de anfotericina B do que o colesterol, com a sua estrutura sigmoide. A afinidade de ligação diferencial da anfotericina B para os dois esteróis é a base de sua ação antifúngica seletiva.



Fonte: Odds, Brown e Gow (2003).

Outro fármaco poliênico bastante usado na clínica é a nistatina, contudo seu uso é limitado principalmente ao tratamento de infecções de pele, das membranas mucosas e do trato gastrointestinal causada por *Candida*. Encontra-se disponível principalmente sob a forma de suspensão, pomadas e cremes vaginais, sendo este fármaco não absorvido pelo trato gastrointestinal (RANG *et al.*, 2011; SIDRIM; ROCHA, 2012).

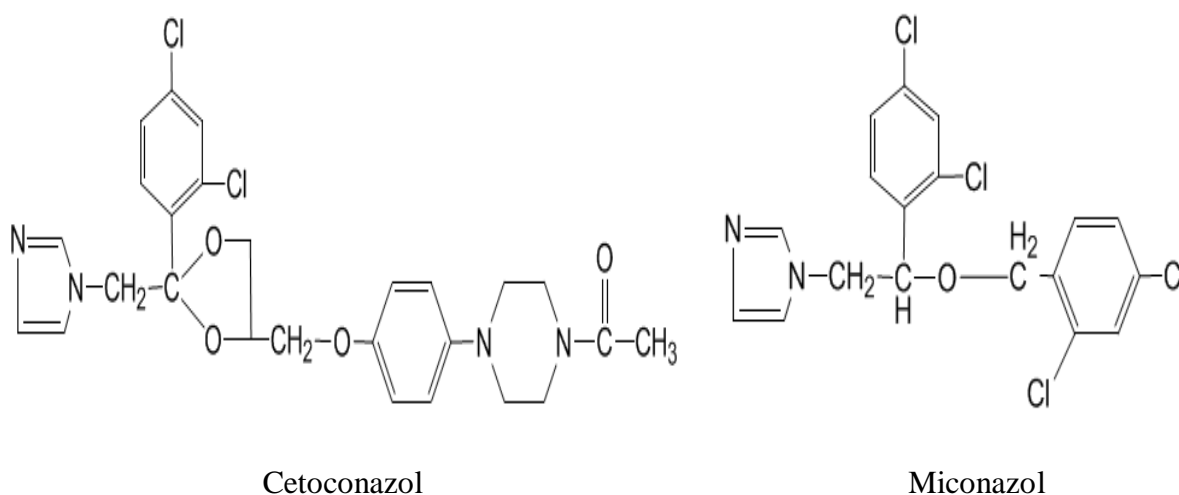
3.3.2 Inibidores da síntese de ergosterol

3.3.2.1 Derivados azólicos

Os azóis constituem a maior classe de agentes antifúngicos, sendo esta caracterizada por compostos sintéticos heterocíclicos com anel pentagonal (MURRAY *et al.*, 2014).

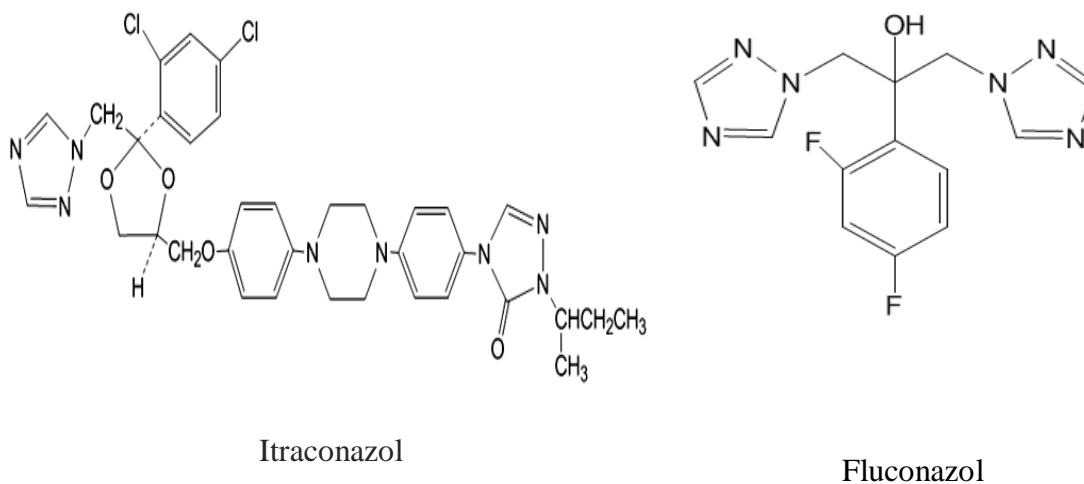
As drogas azólicas são constituídas por duas famílias que diferem no número de nitrogênio no seu anel azol: os imidazólicos (dois átomos de nitrogênio, Figura 7) como o miconazol, cetoconazol, clotrimazol, e econazol; e os triazólicos (três átomos de nitrogênio, Figura 8) como o fluconazol, itraconazol (triazólicos de 1º geração); voriconazol, posaconazol e ravuconazol (triazólicos de 2º geração) (MATHEW; NATH, 2009).

Figura 7 - Fórmula estrutural dos imidazólicos: cetoconazol e miconazol.



Fonte: Wispelwey e Parsons (2006).

Figura 8 – Fórmula estrutural dos triazóis: itraconazol e fluconazol.



Fonte: Pasqualotto e Denning (2008).

Outra importante diferença entre os imidazólicos dos triazólicos é o fato dos triazólicos sistêmicos serem metabolizados lentamente e exercerem menos efeitos sobre a síntese do esteroide humano. (BENNETT, 2011).

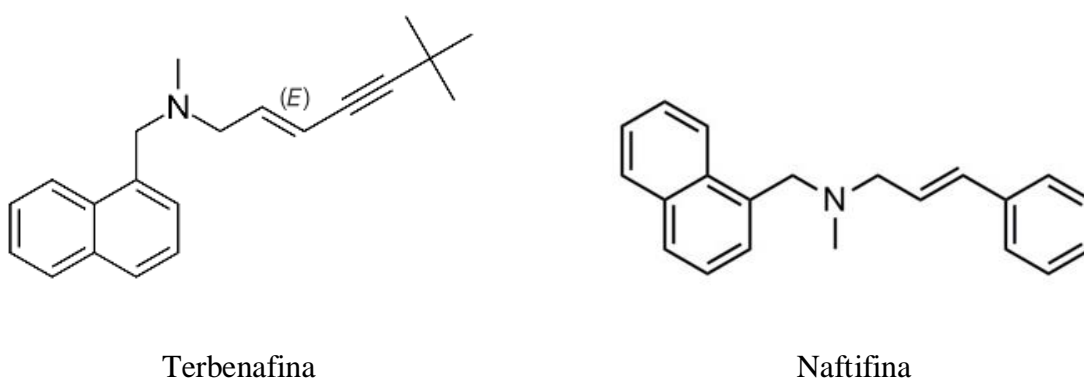
Os azóis geralmente exercem ação fungistática contra leveduras, tais como espécies de *Candida*, mas fungicida contra fungos filamentosos, como *Aspergillus* (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

Os azóis agem sobre os fungos impedindo a biossíntese do ergosterol, principal esteroide presente na membrana celular fúngica. Esta interferência se processa por meio da inibição da 14 α -desmetilase, enzima microsômica do citocromo P450, que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol, impedindo assim a conversão do lanosterol em ergosterol. O comprometimento da biossíntese do ergosterol e o acúmulo de lanosterol (14 α -metil esteroide, tóxico as células fúngicas) resultam na desagregação do arranjo lipídico da membrana, acarretando então o aumento da permeabilidade e interferência na ação de enzimas associadas à membrana, inibindo assim o crescimento e replicação dos fungos (BENNETT, 2011; MOHR *et al.*, 2008).

3.3.2.2 Alilaminas

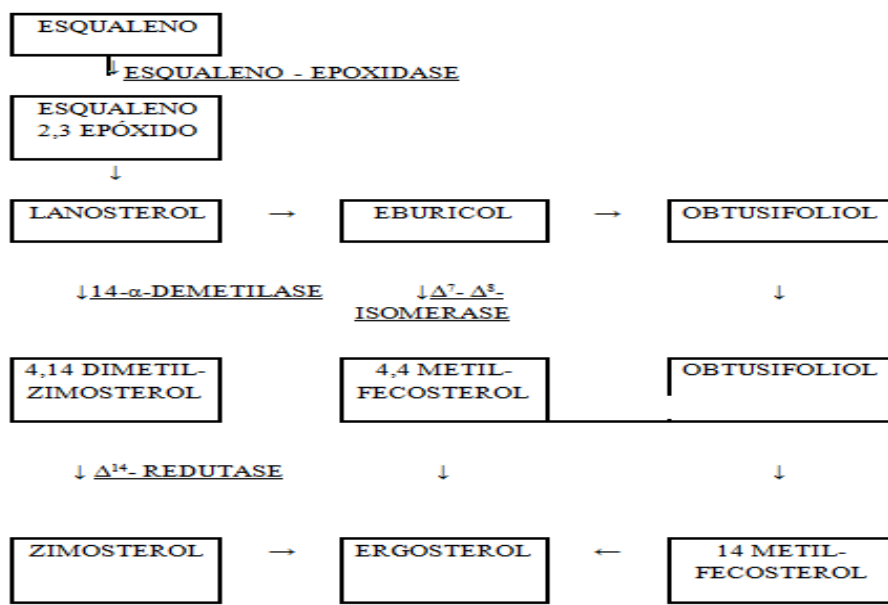
Outra classe de antifúngicos que também agem inibindo a síntese de ergosterol é a das alilaminas, representada pela terbenafina e a naftifina (Figura 9). Os fármacos desta classe bloqueiam a biossíntese do ergosterol via esqualeno ao inibir a esqualeno epoxidase, causando acúmulo de esqualeno e redução na formação de ergosterol (figura 10) (MURRAY *et al.*, 2014).

Figura 9 – Fórmula estrutural das alilaminas: terbenafina e naftifina.



Fonte: Leite (2015).

Figura 10 - Mecanismo de biossíntese do ergosterol.

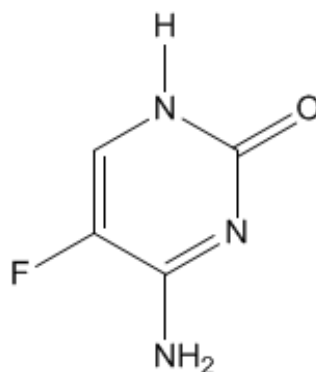


Fonte: Adaptado de Rocha e Sidrim (2012).

3.3.3 Flucitosina

Pertencente a classe das pirimidinas, a flucitosina (5-fluorocitosina, 5-FC) é uma pirimidina fluorada relacionada com a fluoracila (Figura 11) (BENNETT, 2011).

Figura 11 - Estrutura química da flucitosina

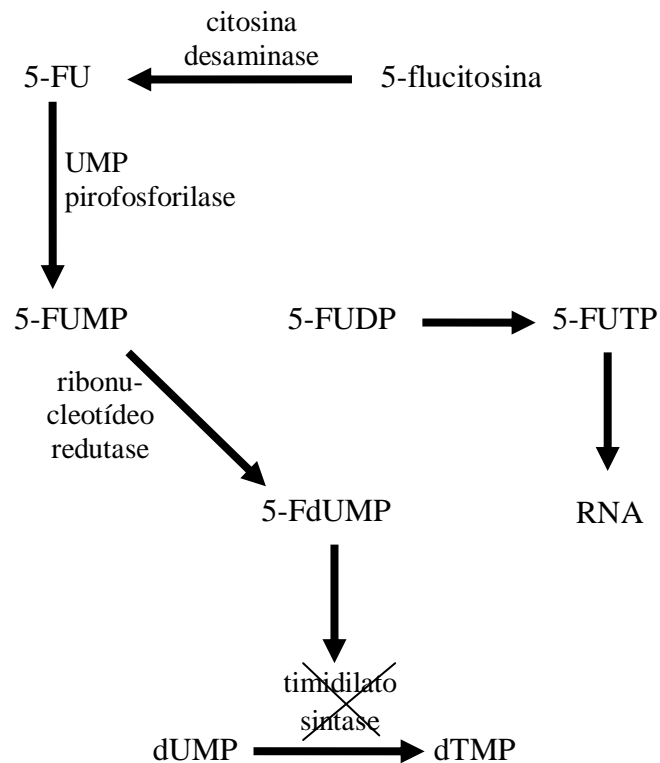


Fonte: Bennett (2011).

Embora tenha seu uso iniciado em 1971, este antifúngico oral é pouco utilizado pela população, o que se deve ao seu limitado espectro de antifúngico, sua toxicidade (efeitos gastrointestinal e hematológico) e ao rápido desenvolvimento de resistência (quando usado em monoterapia), de modo que usualmente é combinado com a anfotericina B, formando uma combinação sinérgica útil para tratar infecções sistêmicas graves (RANG *et al.*, 2011).

A flucitosina é o único antifúngico antimetabólito, sua ação ocorre inicialmente com a internalização celular do fármaco, etapa durante a qual ocorre a conversão enzimática da 5-fluorocitosina a 5-fluorouracil (5FU), em seguida, no citoplasma, a 5FU é convertida em monofosfato de 5-fluorouracil-ribose (5-FUMP), também denominado de ácido 5-fluorouridílico, o qual pode ser incorporado ao RNA (através da síntese do trifosfato de 5-fluorouridina) ou ser metabolizado em ácido 5-fluorodesoxiuridílico, um potente inibidor da timidilato sintetase, comprometendo assim a síntese de DNA, (figura 12) (BENNETT, 2011).

Figura 12: Esquema do mecanismo de ação da flucitosina



5-FU: 5-fluoracil; UMP pirofosforilase: monofosfato de uridina pirofosforilase; 5-FUMP: monofosfato de 5-fluorouracil-ribose; 5-FUDP: difosfato de 5-fluorouracil-ribose; 5-FUTP: trifosfato de 5-fluorouridina; 5-FdUMP: ácido 5-fluorodesoxiuridílico; dUMP: monofosfato de uridina – desoxirribose; dTMP: monofosfato de timidina – desoxirribose.

Fonte: Bennett (2011).

O fato das células dos mamíferos não converterem a flucitosina em fluorouracil, torna a ação deste medicamento seletiva para seres que a possuem (BENNETT, 2011). Muitos fungos filamentosos não possuem as enzimas necessárias para a internalização e conversão da flucitosina, logo a atividade fungicida da 5-fluorocitosina é limitada a leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* (MATHEW; NATH, 2009).

A intrínseca pode ocorrer em organismos nunca expostos à droga de interesse num hospedeiro. É definida como resistência a todos ou a maioria dos isolados de uma espécie a certa droga. Podendo ser encontrada naturalmente em certos fungos, como por exemplo: a *C. krusei* ao fluconazol e o *C. neoformans* as equinocandinas. Por outro lado, a resistência adquirida surge somente após a exposição do organismo a droga e é caracterizada por uma alteração na expressão gênica, quando em presença do agente antifúngico (KANAFANI; PERFECT, 2008; REX *et al.*, 1997).

Embora não tão frequente existem cepas de *Candida* spp. resistentes aos polienos, sendo a maioria destes casos resistência do tipo secundária (MURRAY *et al.*, 2014). O principal mecanismo de resistência a esta classe de antifúngicos deve-se a mutações no gene *ERG3*, que resulta na diminuição do ergosterol ou substituição deste por outros esteróis (fecosterol) com pouca afinidade pelos polienos (PEMAN; CATON; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Alterações em outros genes reguladores de enzimas formadoras do ergosterol (*ERG1* e *ERG25*) também resultam na resistência a polienos (KHOT *et al.*, 2006), assim como o aumento da atividade da catalase e a diminuição ao dano oxidativo (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Com relação aos azóis, o uso indiscriminado destes medicamentos, principalmente o fluconazol, tem feito emergir cepas de *Candida* resistentes. Entre os mecanismos que promovem a resistência a este grupo de fármacos estão à indução de bombas de efluxo pelos genes *CDR* e *MDR*, resultando na redução da concentração de azólicos intracelularmente necessária para produzir efeito satisfatório; mutações nos genes *ERG11*, que resulta numa enzima C-14- α -desmetilase com alteração no sítio alvo de ligação dos azóis (SAGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015); aumento da concentração da enzima-alvo, decorrente de alterações no gene *ERG11p* (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A substituição do ergosterol pelo fecosterol, resultado de mutações no gene *ERG3*, também promove resistência aos azóis, uma vez que ocorre a anulação dos efeitos perturbadores na membrana causado pelos azóis (SAGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015). Ressaltando-se que cepas de *Candida* com mutações *ERG3* também são resistentes aos polienos, pois suas membranas celulares são desprovidas de ergosterol (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Quanto à flucitosina, os mecanismos de resistência a esta droga envolvem mudanças na enzima citosina permease (codificada pelo gene *FCY2*), que é responsável pela absorção da droga dentro da célula; ou mudanças na enzima citosina desaminase (codificada pelo gene *FCY1*), que é responsável pela conversão de flucitosina a 5-fluorouracilo; ou mudanças na enzima uracila fosforibosil transferase, que é responsável pela transformação de 5-fluorouracilo para monofosfato de 5-fluorouridina (codificada pelo gene *FUR1*), a qual impede o comprometimento do RNA, DNA e síntese protéica (ESPINEL-INGROFF, 2008).

Tem-se observado que a maioria destes mecanismos de resistência a flucitosina é direcionada a *Candida albicans*, porém resistência a *C. glabrata*, também vem sendo evidenciada, por mutações em outros genes (WHITE, 2007; PFALLER, 2012).

Embora raro, tem sido relatado casos de resistência de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* a equinocandinas (PFALLER, 2012). A resistência a uma das equinocandinas pode ser estendida as demais. Raramente, fármacos desta classe são afetados por bombas de efluxo (ARENDRUP *et al.*, 2010). O principal mecanismo de resistência as equinocandinas decorre de mutações no gene *FKS1*, responsável pela codificação da enzima alvo β -1,3-D-glucano sintase (ARENDRUP *et al.*, 2010; PFALLER, 2012).

3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE PRODUTOS NATURAIS

Por volta do século XX, com a ascensão da síntese química e a industrialização de medicamentos, as indústrias farmacêuticas acharam que preveniriam e curariam todas as moléstias que acometiam os seres vivos por meio de drogas sintéticas. Hoje, percebe-se que esse anseio não foi totalmente alcançado com sucesso, uma vez que não se obteve todas as substâncias sintéticas necessárias para a cura e prevenção de todas as enfermidades (SILVA, 2016).

Entre as enfermidades que aterrorizam o homem estão os processos infecciosos, cada vez mais difíceis de serem tratados com o arsenal antimicrobiano desenvolvido ao longo dos anos, devido à emergência de patógenos multirresistentes, resultados do uso indiscriminado e excessivo dos fármacos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Dentre os primórdios da origem da origem humana, as plantas eram usadas com fins terapêuticos. Sendo a diversidade molecular dos produtos de origem natural muito superior àquela derivada de processos de síntese (BARBOSA – FILHO *et al.*, 2007).

Os produtos naturais têm mostrado resultados positivos na eliminação de micro-organismos multirresistentes a exemplo de Souza *et al.* (2011) em que cujos ensaios com extratos de *L. camara* e *L. montevidensis* verificou um efeitos modulador destes sobre o aminoglicosídeo frente a micro-organismos resistentes, além disso esses extratos mostraram atividade inibitória sobre cepas sensíveis e multirresistentes de bactérias gram positivas e gram negativas.

Estudos com decoctos de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), *Punica granatum* (romã) e *Cinnancomum zeylanicum* Breyer (canela) mostra a atividade antifúngica destes frente a diversas cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (ABILIO *et al.*, 2014).

Os produtos naturais e seus derivados têm sido reconhecidos por muitos anos como fontes de agentes terapêuticos e de diversidade estrutural (LAHLOU, 2013). Durante a última década, as plantas medicinais com as características de vários constituintes, ações e alvos tem se expandido a nível mundial e ganhou popularidade considerável. Assim sendo, os produtos naturais à base de plantas fornecem uma fonte inigualável de diversidade química para a descoberta de moléculas biologicamente ativas importantes e interessantes (LI, 2002).

Inúmeros compostos derivados de plantas medicinais têm sido utilizados como protótipos para a síntese de novos agentes terapêuticos. Isso proporciona a elaboração de diversos novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; NEWMAN; GRAGG, 2012).

Produtos naturais bioativos e seus derivados têm sido utilizados como uma promissora fonte de novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas. Isso se deve as características únicas das moléculas antimicrobianas naturais, ou seja, a sua imensa diversidade química, permeabilidade celular intrínseca e especificidade bioativa (JIANG *et al.*, 2008).

Todos esses fatores têm ajudado a pressionar uma crescente procura dentre os produtos naturais por agentes antifúngicos novos, que sejam mais eficazes e menos tóxicos do que estão em uso (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013; RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013). Dentre os compostos antifúngicos de origem natural têm-se dado muita atenção nos últimos tempos aos terpenos, moléculas consideradas promissoras ferramentas terapêuticas no tratamento de infecções fúngicas e pelo seu reconhecido poder antimicrobiano (LEITE, 2016).

3.5.1 Óleos essenciais e terpenos

Entre as diversas substâncias produzidas nos vegetais estão os óleos essenciais, metabólito secundário caracterizado por ser uma mistura complexa de substâncias voláteis, naturais, de odor forte, originado de plantas aromáticas (BAKKALI *et al.*, 2008). Podem ser sintetizados em qualquer órgão da planta, desde a raiz às sementes, estes líquidos voláteis e límpidos, raramente coloridos e lipossolúveis são produzidos pelos vegetais com intuito de garantir a sua sobrevivência, uma vez que servem para a defesa da planta contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (SANTOS, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008).

No organismo humano estas substâncias produzem diversas propriedades biológicas. Por ser uma mistura, os óleos essenciais podem conter de 20 a 60 componentes, destes, os dois ou três componentes em maior concentração são considerados majoritários, os quais geralmente determinam as propriedades biológicas do óleo essencial (BAKKALI *et al.*, 2008).

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes últimos os predominentes (SIMÕES; SPITZER, 2010).

Usualmente empregados na produção de perfumes e cosméticos (EDRIS, 2007), os terpenos são formados pela condensação de varias unidades de carbono (C₅) chamados de isopreno (C₅H₈), que por sua vez origina-se do ácido mevalônico. O isopreno é um composto orgânico da classe dos alcadienos, que são hidrocarbonetos insaturados com duas duplas ligações (LEITE, 2016).

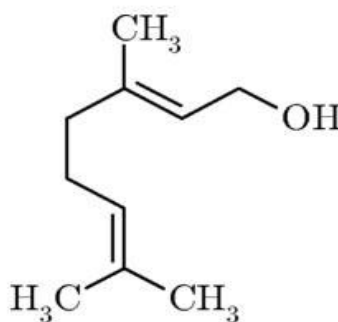
Os compostos terpênicos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno: hemiterpenos ou isoprenos (C₅), monoterpeno (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀), polisoprenóides (nC) e seus derivados oxigenados (terpenoides) (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os terpenos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (α -terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (α -pineno, tujona e cânfora) (SIMÕES; SPITZER, 2010).

3.5.2 O geraniol

O geraniol, molécula acíclica, também caracterizada estruturalmente por possuir um grupo hidroxila e duas duplas ligações (Figura 14) é um exemplo de monoterpene bastante estudado devido as suas diversas atividades biológicas.

Figura 14 - Estrutura química do geraniol.



Fonte: Leite (2016).

Presente em um grande número de tecidos vegetais, o geraniol normalmente é encontrado juntamente com os produtos de sua oxidação: geranial e neral (isômeros do citral) (IIJIMA *et al.*, 2004). O produto referido como “geraniol” é uma mistura de dois isômeros cis - trans, onde o isômero trans é chamado de geraniol e o cis de nerol (CHEN; VILJOEN, 2010).

De odor agradável, o geraniol é utilizado como agente natural no controle de pragas, uma vez que este monoterpene possui propriedades inseticidas e repelentes de baixa toxicidade para mamíferos. Tem sido sugerido que o geraniol representa uma nova classe de agentes quimiopreventivos contra o câncer. Também foi se investigado outras atividades biológicas como: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e alguns efeitos vasculares (CHEN; VILJOEN, 2010).

O geraniol é dos principais componentes do óleo do gerânio (*Pelargonium hortorum*), o qual é utilizado na medicina popular em lavagem vaginal para o tratamento da candidíase vaginal (MARUYAMA *et al.*, 2008).

Vários estudos têm comprovado a ação antimicrobiana do geraniol. Pereira *et al.* (2012) constatou uma excelente atividade antifúngica deste fitoconstituente frente a cepas de *Trichophyton rubrum*, verificando também a possível ação desta molécula no ergosterol da membrana, além da inibição da síntese deste esterol.

Leite *et al.* (2014) em seus estudos observaram atividade antifúngica do geraniol frente a cepas de *Candida albicans* com uma CIM de 16µg/mL, sendo este fitoconstituente capaz de interferir na morfologia do crescimento fúngico, impedindo a produção de pseudo-hifa e clamidoconídios.

Mesa-Arango *et al.* (2009) e Marcos-Arias *et al.* (2011) também demonstraram a atividade antifúngica do geraniol frente a diversas espécies de *Candida*, reforçando que este fitoconstituente tem *in vitro* uma importante atividade antifúngica.

3.6 ESTUDO *IN SILICO* DE TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DE COMPOSTOS NATURAIS

Conforme discutido em secções anteriores a emergência de patógenos fúngicos resistentes aos antimicrobianos disponíveis para tratamento tem impulsionado a busca de novos fármacos, mais eficazes e menos tóxicos; no entanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos requerem um gasto oneroso para as indústrias farmacêuticas, problema que pode ser minimizado com a aplicação de tecnologia computacional nesta fase, pois esta possibilita a redução do número de ensaios em laboratórios para seleção e desenvolvimento de um novo fármaco, otimizando assim custos e tempo (RAJASEKHA *et al.*, 2011).

As ferramentas computacionais, *in silico*, possibilitam avaliar a farmacocinética, propriedades biológicas e tóxicas de um composto nas fases iniciais da sua descoberta e desenvolvimento, o que possibilita aos cientistas farmacêuticos selecionar os melhores candidatos ao seu desenvolvimento, bem como rejeitar aqueles com uma baixa probabilidade de sucesso (RAJASEKHA *et al.*, 2011).

Estima-se que para obter uma nova droga segura e eficaz ao consumo humano, seja necessário entre 15 a 25 anos, com um gasto de 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares (GELDENHUYS, *et al.*, 2006). Uma das razões participativas na delonga a esse processo trata-se do insucesso apresentado em 50% do desenvolvimento de um novo fármaco em decorrência do perfil farmacocinético e toxicológico inapropriado (SILVA, 2016).

O uso destas ferramentas computacionais tem sido estimulado pela legislação recente, uma vez que é possível obter parâmetros toxicológicos prévios sem ter que usar animais para este fim (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2015).

O estudo de fitoconstituintes como o geraniol por meio de ensaios *in silico* é primordial, uma vez que possibilita predizer o potencial desta molécula como futuro fármaco de medicamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO TRABALHO

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 FITOCONSTITUINTE, ANTIFÚNGICOS E SUBSTÂNCIAS

O fitoconstituente incluído no estudo, geraniol, e demais substâncias usadas nas análises: sorbitol, ergosterol, anfotericina B e fluconazol foram adquiridas na Sigma-Aldrich®. As soluções dos agentes antifúngicos foram preparadas no momento de execução dos ensaios, dissolvendo-os primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e Tween 80 (Sigma-Aldrich®) a 2%, e utilizando água destilada estéril (ou o meio RPMI-1640, ensaio de checkboard e modulação) para alcançar a concentração desejada.

4.3 MEIOS DE CULTURA

Para a execução dos testes os meios de cultura utilizados foram: o ágar e o caldo Sabouraud dextrose (DIFCO - Laboratories Co./USA/France), meio líquido RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com 20mm de Hepes Sigma-Aldrich®. O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em balões e/ou tubos de ensaios adequados para os ensaios microbiológicos.

4.4 MICRO-ORGANISMOS

Para os ensaios de atividade antifúngica foram utilizadas cepas clínicas obtidas de hemoculturas, que hoje fazem parte da coleção da micoteca do Laboratório de Micologia Clínica – UFPB. Foram usadas cinco cepas de *Candida albicans* (49, 271, 369, 607, 681), cinco de *Candida glabrata* (46, 173, 221, 512, 561) e cinco de *Candida krusei* (656, 885, 978, LM 08, LM 13). Todas apresentavam diferentes padrões de sensibilidade e resistência aos

antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Antes do início dos experimentos todas as cepas foram repicadas três vezes em Caldo Sabouraud Dextrose - CSD a fim de revitalizá-las.

Do último repique de revitalização se fez novos repiques de cada cepa que foram mantidos em tubos de ensaio contendo ASD inclinado, sob-refrigeração (4°C) e a temperatura de 35-37°C como estoque. Nos ensaios foram usados repiques recém obtidos de 24-48 horas de incubação a 35-37°C.

4.5 INÓCULO

Na preparação da suspensão dos micro-organismos, as cepas selecionadas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 horas à temperatura de 35-37 °C. Logo, estas foram transferidas para uma solução fisiológica (0.85 %) esterilizada até atingir a turbidez padrão do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland (uma suspensão de sulfato de bário e ácido sulfúrico), obtendo-se assim, aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL de leveduras, (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2008).

4.6 METODOLOGIA

4.6.1 Avaliação das atividades antimicrobianas *in vitro*

4.6.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica da microdiluição em placa de 96 orifícios com tampa (INLAB/Indústria Brasileira). Na referida placa estéril foi distribuído inicialmente 100 µL do meio de cultura (RPMI-1640 líquido) duplamente concentrado, a partir da primeira linha (1) até a última (12). Em seguida foi distribuído na linha 1 (nas cavidades A até H) 100 µL do geraniol, duplamente concentrado. Por meio de diluições seriadas à razão de 2 até a antepenúltima linha, obteve-se as concentrações de 1024 a 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo, previamente preparado a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica. A penúltima e a última linha (11 e 12) foram reservadas, respectivamente, para os controles

do crescimento microbiano no meio de cultura na ausência produto teste e para o controle de esterilidade do meio (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998).

Para o controle de crescimento microbiano (realizado para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos agentes emulsificantes utilizados na solubilização dos monoterpenos) foi adicionado aos 100 µL do RPMI-1640, 100 µL solução com DMSO (5%), Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão de levedura. Quanto ao controle de esterilidade do meio realizou-se colocando apenas 100 µL do RPMI-1640 nas cavidades da última linha.

O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 35-37°C durante 24-48 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com os micro-organismos, realizou-se a primeira leitura dos resultados.

Definiu-se a CIM como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. E também pela observação da mudança da coloração do meio de cultura, de rosa para amarelo, indicando crescimento microbiano.

Os resultados foram expressos pela média aritmética das CIM's obtidas nos ensaios. Os resultados foram expressos em CIM₉₀ e CIM₅₀ para aquelas concentrações que cada produto conseguiu inibir 90% e 50% das cepas ensaiadas, respectivamente. (ALLEGRI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; MANN; MARKHAM, 1998).

Produtos naturais com CIM até 500µg/mL foram considerados com forte atividade antimicrobiana, com CIM entre 600 e 1600µg/mL possuem atividade moderada e CIM acima de 1600µg/mL considerados com atividade fraca (SARTORATTO *et al.*, 2004).

4.6.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico nas placas de microdiluição foram semeadas em placas de ASD. As placas foram incubadas a 35-37°C por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que o crescimento foi inferior a 3 colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Os ensaios foram realizados em triplicata e a média geométrica foi calculada (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2002).

Quando a razão CFM/CIM de um agente está compreendida entre 1:1 a 2:1, a substância química é considerada como fungicida contra o patógeno, caso a razão seja >2:1, o

modo de ação provavelmente é fungistático (CLSI, 2009; HAFIDH *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

4.6.2 Cinética de morte fungica

A cinética de morte do micro-organismo frente ao produto teste foi realizada de acordo com trabalho de Klepser *et al.* (1998), com algumas modificações. As cepas escolhidas: *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885 (por serem resistentes ao fluconazol, porém sensíveis a anfotericina B) foram cultivadas em ASD em tubo, 24 horas antes do teste. As suspensões fúngicas foram preparadas suspendendo-se 3-5 colônias, recém-obtidas, em NaCl 0,85%, a suspensão resultante foi ajustada com um padrão 0,5 de McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL). Desta suspensão 0,5 mL foram adicionadas a tubos com 4,5 mL de caldo Sabouraud dextrose - CSD com ou sem o produto teste nas várias concentrações apropriadas (CIM÷2, CIM, CIM×2 e CIM×4). Isto resultou em uma diluição de 1:10 da suspensão fúngica e forneceu um inóculo inicial de cerca de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. Quanto ao controle positivo, anfotericina B, este foi testado na concentração da CIM (CORREA-ROYERO *et al.*, 2010; ERNST *et al.*, 2002; KEELE *et al.*, 2001).

Os tubos de cultura inoculados foram agitados em aparelho Vortex e incubados a 35-37°C. Em pontos de tempo predeterminados (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h após a adição do geraniol ou antifúngico), 0,01 mL da amostra foi removida de cada tubo de cultura e semeada por esgotamento em estrias sucessivas em placa de ASD. Para os tubos com grande turbidez realizava-se uma diluição prévia de 1:10, a partir da qual retirava-se a alíquota para inoculação em ASD. As placas foram incubadas a 35-37°C por 24-48 h. Após esse período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada placa foi contado e multiplicado pelo fator da diluição utilizada, a fim de se obter o número de UFC/mL. O limite mínimo de detecção foi de 100 UFC/mL. O experimento foi realizado em duplicata. As curvas foram construídas plotando a contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas) com o GraphPad Prism version 5.0 for Windows, Programa GraphPad, San Diego California USA, (www.graphpad.com.) Foi considerada atividade fungicida da droga quando houve redução no crescimento igual ou maior a $3 \log_{10}$ ($\geq 99,9\%$) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houve redução no crescimento menor que $3 \log_{10}$ ($<$

99,9%) UFC/mL (CORREA-ROYERO *et al.*, 2010; ERNST *et al.*, 2002; KEELE *et al.*, 2001).

4.6.3 Ação do produto na parede celular fúngica

Para investigar a ação do produto na parede celular fúngica foi realizado ensaio com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Caso o produto atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará a morte celular quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M (FROST, 1995).

A determinação da CIM do geraniol, na presença do sorbitol (0,8M), foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, semelhante ao item 4.6.1.1, sendo este ensaio realizado com as cepas *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885. Em uma coluna da placa, foi adicionado em todos os 12 poços 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose - CSD previamente adicionado de sorbitol 0,8 M. Na coluna seguinte adicionou-se em todos os 12 poços 100 µL de CSD sem sorbitol. Posteriormente, 100 µL da solução do geraniol, na concentração de CIM×256 (131.072 µg/mL), foi dispensados nas cavidades da primeira linha das colunas da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois obteve - se concentrações de CIM×128 (65.536 µg/mL) até CIM÷4 (128 µg/mL) do geraniol. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica (FROST *et al.*, 1995).

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do meio CSD com sorbitol (0,8 M), 100 µL de solução de DMSO (5%) mais Tween 80 (2%) dissolvidos em CSD; e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado, sendo colocados 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35-37°C por 48 horas para ser realizada a leitura (FROST *et al.*, 1995).

Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de sorbitol. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (FROST *et al.*, 1995).

4.6.4 Ação do produto na membrana celular - Interação com o ergosterol

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando a ruptura da membrana celular fúngica e perda de conteúdo intracelular. Para determinar se o geraniol se liga ao ergosterol da membrana fúngica, a CIM deste produto para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* foi determinada por microdiluição em meio com e sem a adição de ergosterol. Se a atividade do produto for causada pela ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impedirá a ligação com o ergosterol da membrana fúngica e como consequência, a CIM desse produto tende a aumentar na presença do ergosterol exógeno em relação ao ensaio controle. Caso a CIM do produto permaneça inalterada na presença de ergosterol exógeno, sugere-se que este composto não age ligando-se ao ergosterol da membrana. Da mesma forma, pode-se observar se este comportamento é específico para o ergosterol ou se ele acontece semelhantemente com colesterol (ESCALANTE *et al.*, 2008).

A determinação da CIM dos produtos (geraniol e anfotericina B) contra cepas de *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885 foi realizada por microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades, semelhante ao protocolo exposto no item 4.6.1.1. O meio de cultura (CSD) foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nos poços da penúltima linha da placa 100 µL de solução de DMSO (5%) mais Tween 80 (2%) dissolvidos em CSD com ergosterol e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade também foi realizado colocando-se apenas 100 µL do meio de cultura em orifícios sem a suspensão dos fungos. Por último, foi realizado todo o procedimento acima com a anfotericina B, cuja interação com ergosterol já é conhecida, para servir de controle positivo dos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 35-37°C por 24 - 48 horas para ser realizada a leitura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (ESCALANTE *et al.*, 2008).

4.6.5 Determinação do índice de concentração inibitória fracionada (pelo método de checkerboard) do geraniol associado com antifúngicos licenciados

As combinações de geraniol com os antifúngicos licenciados (anfotericina B ou fluconazol) foram testadas em triplicata frente às cepas de *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885, utilizando a técnica de microdiluição checkerboard com modificações (ELIOPOULOS, MOELLERING, 1991). Inicialmente, 50 μ L do meio RPMI-1640 foram adicionados nos poços da placa de microdiluição. Em seguida, foi adicionado na primeira linha no sentido horizontal da placa (1-16) 50 μ L do monoterpene a uma concentração 4 vezes superior a concentração inicial desejada (como a concentração inicial era $CIM \times 4$, então colocou-se inicialmente o geraniol na concentração $CIM \times 16$) e realizou-se a diluição seriada em razão de dois. Posteriormente, no sentido vertical da placa (A-H) foi adicionado em cada linha 100 μ L do antifúngico (anfotericina B ou fluconazol) em diferentes concentrações ($CIM \times 8$, $CIM \times 4$, $CIM \times 2$, CIM , $CIM \div 2$, $CIM \div 4$, $CIM \div 8$, $CIM \div 16$). Devido às diluições que o monoterpene e os antifúngicos sofreram ao longo da técnica foi possível se obter cada um destes nas seguintes concentrações: $CIM \times 4$, $CIM \times 2$, CIM , $CIM \div 2$, $CIM \div 4$, $CIM \div 8$, $CIM \div 16$ e $CIM \div 32$). Removeu-se 100 μ L da mistura em cada poço. Por fim, foram adicionados 10 μ L da suspensão fúngica em cada poço. As placas foram incubadas a 35-37 °C por 24-48h. Decorrido este tempo realizou-se a leitura visual dos poços em que não houve crescimento microbiano.

Tanto os antifúngicos quanto o monoterpene usados nesta técnica foram dissolvidos em DMSO (5%) mais Tween 80 (2%) e em caldo RPMI-1640 concentração simples (ao invés de água destilada estéril).

Para avaliar a interação de cada combinação, o ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) foi calculado através da soma do $CIF_A + CIF_B$, onde a concentração inibitória fracionada de A - CIF_A representa o geraniol e a concentração inibitória fracionada de B - CIF_B pode representar a anfotericina B ou fluconazol.

O CIF_A , por sua vez, é calculado através da relação CIM_A combinado/ CIM_A sozinho, onde CIM_A combinado é a concentração inibitória mínima do geraniol em associação e CIM_A sozinho é a concentração inibitória mínima do geraniol sozinho; enquanto que o $CIF_B = CIM_B$ combinado/ CIM_B sozinho, onde CIM_B combinado é a concentração inibitória mínima da anfotericina B ou fluconazol em associação e CIM_B sozinho é a concentração inibitória mínima da anfotericina B ou fluconazol sozinho. Este índice é interpretado da seguinte forma:

sinergismo ($\leq 0,5$), aditividade ($>0,5$ e <1), indiferença (≥ 1 e <4) ou antagonismo ($\geq 4,0$) (LEWIS *et al.*, 2002).

Além de suas propriedades antimicrobianas intrínsecas, o geraniol ensaiado pode alterar o efeito de antimicrobianos convencionais (utilizados na prática clínica), seja aumentando a atividade antifúngica ou revertendo à resistência aos antifúngicos convencionais. Além disso, uma das razões para a utilização da associação de dois ou mais compostos antimicrobianos se faz interessante, pois podem levar a uma diminuição das doses necessárias das drogas, e assim, diminuir o perfil de eventos adversos, aumentando a eficácia (VAZQUEZ, 2008; CASTRO, 2010).

4.6.6 Avaliação da interferência do geraniol sobre a resistência aos antifúngicos licenciados (ensaio de modulação)

Para avaliar se o geraniol modularia a ação da anfotericina B e fluconazol frente às cepas de *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885, a CIM destes antifúngicos foram determinadas, pela técnica de microdiluição, na ausência e na presença do geraniol em concentrações sub-inibitórias (CIM/8). Os valores de CIM dos antifúngicos foram então comparados na ausência e presença do geraniol CIM/8. As placas foram incubadas durante 24 horas a 35-37 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados (COUTINHO *et al.*, 2008; ELIOPOULOS, MOELLERING, 1991).

4.7-ENSAIOS *IN SILICO*

No presente estudo para os ensaios *in silico* sobre o geraniol foram utilizados os seguintes softwares: Osiris, Molinspiration e o Pass online.

4.7.1 Osiris

A ferramenta Osiris é um software online (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) capaz de prever a toxicidade do geraniol comparando sua estrutura química com fragmentos moleculares, cuja toxicidade definida encontra-se num banco de

dados. Os resultados da toxicidade são expressos em efeito mutagênico, tumorigênicos, irritabilidade e efeitos sobre o sistema reprodutor (URSU; OPREA, 2010; URSU *et al.*, 2011).

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

Além de informar sobre a possível toxicidade de uma molécula o Osiris é capaz de informar parâmetros físico-químicos importantes na predição da biodisponibilidade oral teórica da droga em estudo. Estes parâmetros são: coeficiente de partição (água/óleo) - cLogP, peso molecular, número de aceptores de hidrogênio - nALH, número de doadores de hidrogênio-nDLH (URSU; OPREA, 2010; URSU *et al.*, 2011).

Baseando-se na “Regra dos cinco” Lipinski (2004), caso a molécula apresente scores de pelo menos 3 parâmetros atendendo o exigido ($cLogP \leq 5$; peso molecular < 500 daltons; $nALH \leq 10$; $nDLH \leq 5$), a molécula possivelmente apresentará boa biodisponibilidade oral.

4.7.2 Molinspiration

O Molinspiration é um software da web muito utilizado nos ensaios *in silico* (<http://www.molinspiration.com>), este é capaz de avaliar a molécula fornecendo diversos parâmetros, entre estes a capacidade de predizer em probabilidade se o geraniol atuaria sobre determinados alvos farmacológicos: modulador de canal iônico – ICM, inibidor de quinase – K, ligante de receptor nuclear – NRL, inibidor de protease – PI, inibidor de enzima – EI (ERTL, ROHDE, SELZER, 2000).

4.7.3 Pass online

O Passo online (<http://www.way2drug.com/passonline>) é um software capaz de informar possíveis atividades biológicas de uma molécula, baseando-se no arranjo molecular (NIGSCH *et al.*, 2011). Por meio de consulta a um banco de dados este programa compara a molécula orgânica em estudo com outras moléculas com atividade biológica definida e assim fornece previsões simultâneas de muitas atividades biológicas baseando-se apenas na estrutura química do composto orgânico (CHAND, 2011; KHURANA *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos nesse software é expresso em probabilidade da molécula ser ativa para determinada atividade biológica (Pa – probabilidade de ativação) e probabilidade

da molécula ser inativa para determinada atividade biológica (P_i – probabilidade de inatividade) (CHAND, 2011; KHURANA *et al*, 2011).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados do ensaio de cinética de morte foram expressos como média \pm erro padrão (e.p.) empregando-se o teste t não pareado para determinar diferenças significantes, quando valor de $p < 0,05$. Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, San Diego, CA, EUA.

RESULTADO E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA - CFM

O conhecimento do perfil de sensibilidade dos micro-organismos isolados em infecções antes de se iniciar uma terapia antimicrobiana é um dado de extrema relevância para que desta forma se possa ter sucesso no tratamento (SOUSA, 2015).

Diversas são as técnicas para se avaliar a sensibilidade de um micro-organismo, seja em meio sólido ou em meio líquido (macrodiluição e microdiluição). Ambas as técnicas também podem ser usadas para avaliar a atividade de novas drogas frente a micro-organismos teste (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A microdiluição, aceita por órgãos de padronização deste tipo de técnica, CLSI (2008), tem se tornado a técnica preferida para avaliar o potencial de novas drogas antimicrobianas, a exemplo das de origem natural, uma vez que esta técnica é simples, econômica (por requerer pouca quantidade de meio de cultura e amostras) e com grande reprodutibilidade (HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Utilizando-se da microdiluição foi possível obter a Concentração Inibitória Mínima – CIM ou MIC e a Concentração Fungicida Mínima – CFM do geraniol, além da CIM do fluconazol e anfotericina B frentes as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Tabela 1, 2 e 3).

Tabela 1 - CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a *C. albicans*.

Cepas de	Geraniol		Fluconazol	Anfotericina B	Controle*
	CIM	CFM	CIM	CIM	
<i>Candida albicans</i>	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	
<i>C. albicans</i> 49	256	512	2048	0,0625	+
<i>C. albicans</i> 271	512	512	2048	0,0625	+
<i>C. albicans</i> 607	512	512	2048	0,0625	+
<i>C. albicans</i> 681	512	512	2048	0,0625	+
<i>C. albicans</i> 369	256	256	2048	0,125	+

*Controle de crescimento do micro-organismo em RPMI – 1640, DMSO (5%) e tween 80 (2%), sem monoterpeno ou antifúngicos.

Segundo o CLSI (2008) cepas com CIM ≥ 64 mg/mL para o fluconazol são consideradas resistentes a este antifúngico, assim como, cepas com CIM ≥ 2 mg/mL são consideradas resistentes a anfotericina B. Com base nesta padronização todas as cepas de *C. albicans* analisadas foram resistentes ao fluconazol, porém sensíveis a anfotericina B, que provavelmente se deve a presença de mecanismos que confere resistência apenas aos azóis, como alteração na estrutura do sítio alvo da enzima 14 α -desmetilase.

A baixa toxicidade e boa eficácia tornaram o fluconazol uma droga amplamente usada na prática clínica (PFALLER *et al.*, 2007), fato que por sua vez resultou numa maior frequência de infecções por cepas resistentes ao fluconazol (ARENDRUP *et al.*, 2013; MULU *et al.*, 2013). Embora as cepas analisadas sejam sensíveis a anfotericina B a elevada toxicidade deste medicamento o torna inadequado para muitos pacientes, além é claro do seu custo, que faz com que este não esteja disponível em muitos hospitais, principalmente no Brasil; logo, se faz necessário a descoberta de novos fármacos.

Dados deste estudo mostram que o geraniol foi capaz de eliminar a *C. albicans* resistente ao fluconazol, demonstrando uma CIM variando de 256 a 512 μ g/mL e uma Concentração Inibitória Mínima para 90% das cepas – CIM₉₀ e CIM₅₀ de 512 μ g/mL.

De acordo com a classificação de Aligianis *et al.* (2001) o geraniol frente a *C. albicans* resistente ao fluconazol demonstrou um forte poder antimicrobiano. O geraniol também demonstrou uma atividade fungicida, pois a razão CFM/CIM não foi maior que 2:1 com uma CFM variando de 256 a 512 μ g/mL.

A natureza do efeito antifúngico no que diz respeito à inibição ou morte dos fungos testados é importante. A razão da CBM/CIM para bactérias ou CFM/CIM para fungos é usado para especificar a natureza do efeito antimicrobiano contra um determinado agente patogênico. Segundo alguns autores quando a razão CBM/CIM ou CFM/CIM de um agente está compreendida entre 1:1 a 2:1, a substância química é considerada como bactericida ou fungicida contra o agente patogênico. Por outro lado, se a razão for $> 2:1$, o modo de ação antimicrobiano é mais provável que seja bacteriostático ou fungistático (CLSI, 2009; HAFIDH *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PADLA, SOLIS, RAGASA, 2012). De acordo com outros autores, um agente é considerado fungicida quando a razão CIM/CFM for ≤ 4 e fungistática quando razão CIM/CFM for > 4 (FARSHORIA *et al.*, 2010; HAZEN, 1998).

Corroborando com os resultados demonstrados na tabela 1 Zore *et al.* (2010) em suas análises com cepas de *C. albicans* sensíveis, com sensibilidade dose dependente (SDD) ao

fluconazol ou resistentes ao fluconazol, encontraram uma CIM₉₀ de 561µg/mL para o geraniol, o qual também demonstrando um efeito fungicida. Contrapondo - se aos resultados encontrados em nosso trabalho, Leite *et al.* (2014) em seus estudos verificaram uma sensibilidade da *C. albicans* ao geraniol com uma CIM₉₀ de 16µg/mL, sendo este efeito fungistático. Miron *et al.* (2014) obtiveram uma CIM deste fitoconstituente de 128µg/mL frente a cepas de desta espécie, Singh, Fátima e Hameed (2016) uma CIM 250µg/mL.

A atividade fungicida deste fitoconstituente torna-se bastante interessante, uma vez que portadores de infecções por *Candida* multirresistente normalmente são pacientes hospitalizados e que tem um comprometimento nas defesas imunológicas; logo, precisam de drogas com potencial fungicida ao invés de fungistático.

As leveduras de *C. glabrata* normalmente não são sensíveis ao fluconazol, devido a um padrão de resistência tipo secundária, fato verificado nas cepas de *C. glabrata* deste estudo (Tabela 2). Observou-se também, que duas cepas (46 e 561), demonstraram ser resistentes tanto ao fluconazol quanto a anfotericina B.

Tabela 2 - CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a *C. glabrata*.

Cepas de <i>Candida glabrata</i>	Geraniol		Fluconazol	Anfotericina B	Controle*
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	
<i>C. glabrata</i> 512	512	512	1024	0,125	+
<i>C. glabrata</i> 221	512	512	1024	0,06	+
<i>C. glabrata</i> 173	256	512	1024	0,25	+
<i>C. glabrata</i> 561	> 4098	> 4098	> 4098	> 4098	+
<i>C. glabrata</i> 46	512	512	> 4098	> 4098	+

*Controle de crescimento do micro-organismo em RPMI – 1640, DMSO (5%) e tween 80 (2%), sem monoterpeno ou antifúngicos.

Segundo a literatura a resistência de espécies de *Candida* aos azóis pode decorrer da ativação de bombas de efluxo, redução da penetração da droga, alteração na estrutura do sítio alvo da enzima (gene *ERG11*), aumento da concentração da enzima - alvo e/ou desenvolvimento de vias alternativas (gene *ERG3*) (PEMAN; CANTON; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Quanto aos polienos o principal mecanismo de resistência decorre de alterações no gene *ERG3*, que resulta em conteúdo relativamente baixo de ergosterol ou substituição deste lipídeo por outros esteróis (fecosterol) que se ligam menos aos polienos (PEMAN; CANNTON; ESPINEL-INGROFF, 2009; KANAFANI; PERFECT, 2008).

Sabendo-se que uma mutação do gene *ERG3* leva alteração do conteúdo de ergosterol e conseqüentemente ocasiona resistência tanto aos azóis quanto aos polienos podemos então inferir a possível presença deste mecanismo de resistência nas cepas *C. glabrata* 46 e 561, entretanto a cepa de *C. glabrata* 561 parece ter a mais outros mecanismos de resistência, uma vez que esta apresentou uma CIM > 4098 µg/mL ao geraniol, diferentemente da *C. glabrata* 561.

Quanto à resistência apresentada pelas cepas de *C. glabrata* 173, 221 e 512 apenas ao fluconazol, pode se inferir que estas cepas apresentam mecanismo de resistência que interfere somente na via de ação dos azóis como alteração na estrutura do sítio alvo da enzima (gene *ERG11*) ou aumento da concentração da enzima-alvo.

Analisando a atividade do geraniol frente às cepas de *C. glabrata* o seu desempenho foi satisfatório, com uma CIM de 256 - 512 µg/mL e uma CIM₅₀ de 512 µg/mL.

Quanto a CFM do geraniol frente a cepas de *C. glabrata*, este foi considerado fungicida, uma vez que a razão CFM/CIM não foi superior a 2:1, tendo uma CFM praticamente igual à CIM, variando de 256-512 µg/mL.

Marcos-Arias *et al.* (2011) em seus estudos com cepas de *C. glabrata* ATCC e cepas clínica isoladas de prótese bucal de pacientes também evidenciou atividade fungicida do geraniol frente a estes espécimes. Miron *et al.* (2014) em seus estudos com esta mesma substância frente a *C. glabrata* observou uma CIM variando de 32-128 µg/mL, valores bem abaixo dos detectados neste estudo, o que se deve o inóculo utilizado por estes autores que era 50 vezes mais diluído.

Entre as espécies de *Candida* abordada neste trabalho merece destaque a *C. krusei*, pois diferentemente das outras que desenvolveram um mecanismo de resistência secundário ao fluconazol esta espécie apresenta uma resistência primária a este antifúngico, fato observado nos isolados, onde a CIM de todas as cepas foram superiores a 64 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3 - CIM do geraniol, fluconazol e anfotericina B, e CFM do geraniol contra a *C. krusei*.

Cepas de <i>Candida</i> <i>krusei</i>	Geraniol		Fluconazol	Anfotericina B	Controle*
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>C. krusei</i> 656	256	256	512	0,03125	+
<i>C. krusei</i> 978	256	256	128	0,03125	+
<i>C. krusei</i> 885	512	512	128	0,0625	+
<i>C. krusei</i> 13	512	512	> 4098	> 4098	+
<i>C. krusei</i> 08	256	256	> 4098	0,03125	+

*Controle de crescimento do micro-organismo em RPMI – 1640, DMSO (5%) e tween 80 (2%), sem monoterpreno ou antifúngicos.

Das cepas de *C. krusei* analisadas neste estudo apenas uma, n° 13, demonstrou-se ser resistente a anfotericina B, possivelmente devido a alterações no gene *ERG3*.

Frente às leveduras de *C. krusei* o geraniol teve uma excelente atividade antifúngica, sendo capaz de inibir todas as cepas analisadas, demonstrando desta forma ser mais eficiente que o fluconazol. A CIM variou de 256 a 512 $\mu\text{g/mL}$, com uma CIM₅₀ de 256 $\mu\text{g/mL}$ e uma CIM₉₀ de 512 $\mu\text{g/mL}$.

Este importante achado encontra-se em consoância com o descrito por Pfaller *et al.* (2008), no qual já apontava a *C. krusei* como potencial agente patogênico multidroga-resistentes, devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol e a relatos recentes que mostravam uma susceptibilidade diminuída deste agente patogênico tanto a flucitosina quanto anfotericina B.

Baseando-se na CIM₅₀ de 256 $\mu\text{g/mL}$ e na CIM₉₀ de 512 $\mu\text{g/mL}$ o geraniol é tido como forte agente antifúngico. Com base na CIM₅₀ de 256 $\mu\text{g/mL}$ é possível afirmar que o geraniol foi mais efetivo contra a espécie *C. krusei* do que com as demais, uma vez que a CIM₅₀ foi menor para esta espécie de *Candida*.

Observa-se na tabela 3 que a CFM de 256 - 512 $\mu\text{g/mL}$ do geraniol foi fungicida frente a *C. krusei*, pois a razão CFM/CIM não foi maior que 2:1.

Estes resultados são corroborados por outros estudos de atividade de geraniol frente a cepas de *C. krusei*, nos quais também evidenciaram uma atividade fungicida deste

fitoconstituente frente a esta espécie de *Candida* (MESA-ARANGO *et al.*, 2009; MARCOS – ARIAS *et al.*, 2011).

Avaliando-se de uma forma geral a CIM₉₀ deste monoterpreno para leveduras multirresistente do gênero *Candida* foi de 512µg/mL, assim como a CFM₉₀, valor corroborado por Zore *et al.* (2010) de 561 µg/mL.

O controle de esterilidade confirmou a ausência de contaminantes nos meios e materiais usados nos testes. O controle do inóculo composto de 100µL de solução de DMSO 5% e tween 80 a 2%, mais 100µL do caldo e 10µL do inóculo, demonstrou que estes agentes emulsificantes usados para solubilizar os compostos químicos a serem dissolvidos no meio não desempenharam qualquer atividade antifúngica sobre as cepas analisadas; logo, a atividade antifúngica evidenciada foi exclusivamente do geraniol ou antifúngico testado.

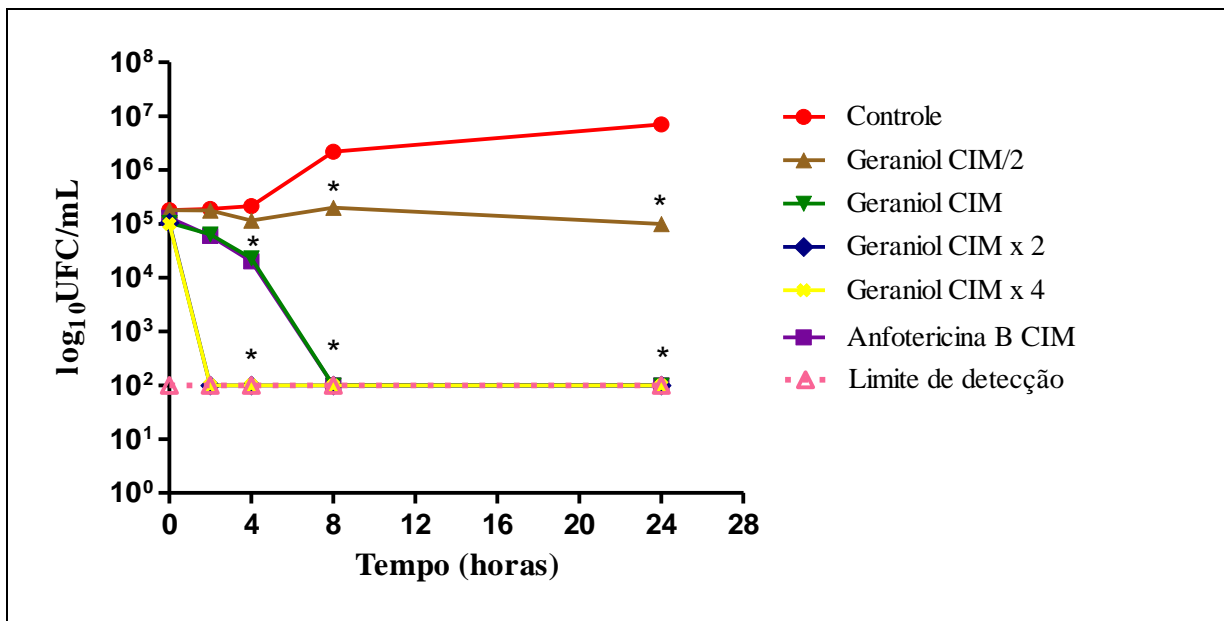
Baseado nos resultados da CIM e da CFM uma cepa clínica representativa de cada espécie foi selecionada para realizar os ensaios subsequentes. As cepas selecionadas teriam de ser resistentes ao fluconazol, apresentar uma CIM e CFM visível a olho nu e ter boa reprodutibilidade nos resultados destes ensaios. As cepas selecionadas foram *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885.

5.2 CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA

O interesse clínico em novas terapias antifúngicas tem impulsionado a necessidade cada vez maior de melhorar a compreensão acerca das propriedades farmacodinâmicas e características fungicidas destes agentes (KLEPSEK *et al.*, 1998). A cinética de morte microbiana avalia a ação de um produto sobre um micro-organismo mostrando se o mesmo tem ação fungicida ou fungistática (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

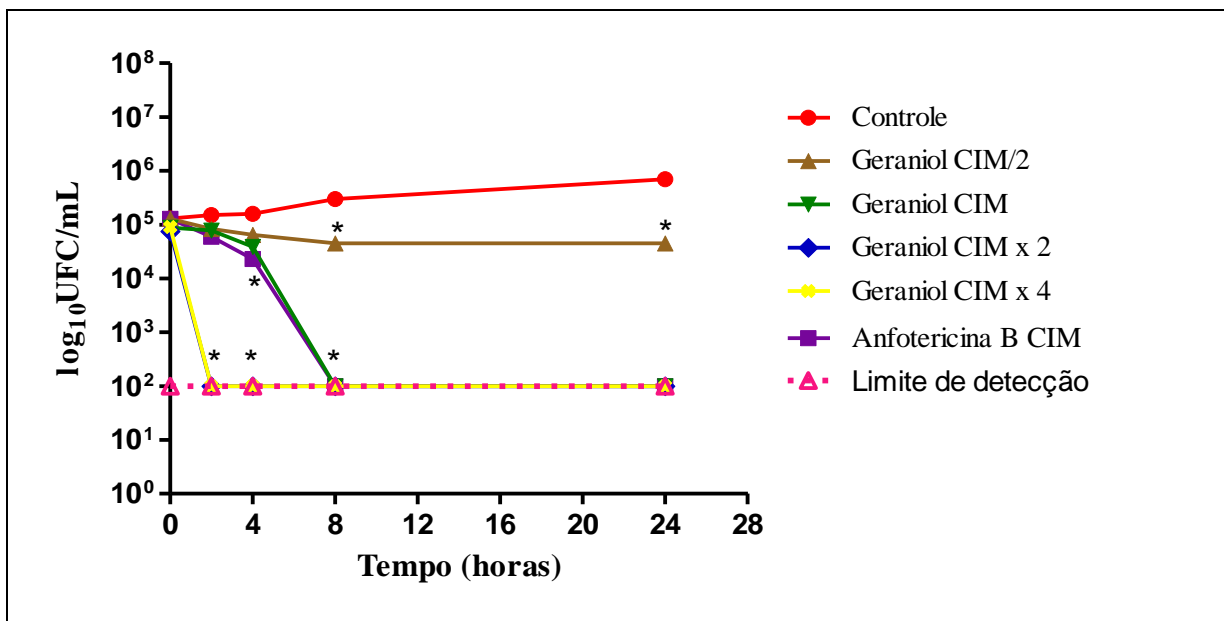
No presente trabalho, os ensaios de cinética de morte microbiana tiveram seus resultados expressos em gráficos que mostram curvas do log₁₀ UFC/mL de *C. albicans* 681 (Figura 15), *C. glabrata* 173 (Figura 16) e *C. krusei* 885 (Figura 17) em função do tempo, na ausência do geraniol (controle de crescimento do inóculo), na presença da CIM÷2, CIM, CIM×2 e CIM×4 do geraniol e na presença da anfotericina B (antifúngico padrão).

Figura 15 - Curva de morte microbiana ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) da cepa *C. albicans* 681, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.



* $p < 0,05$ versus controle

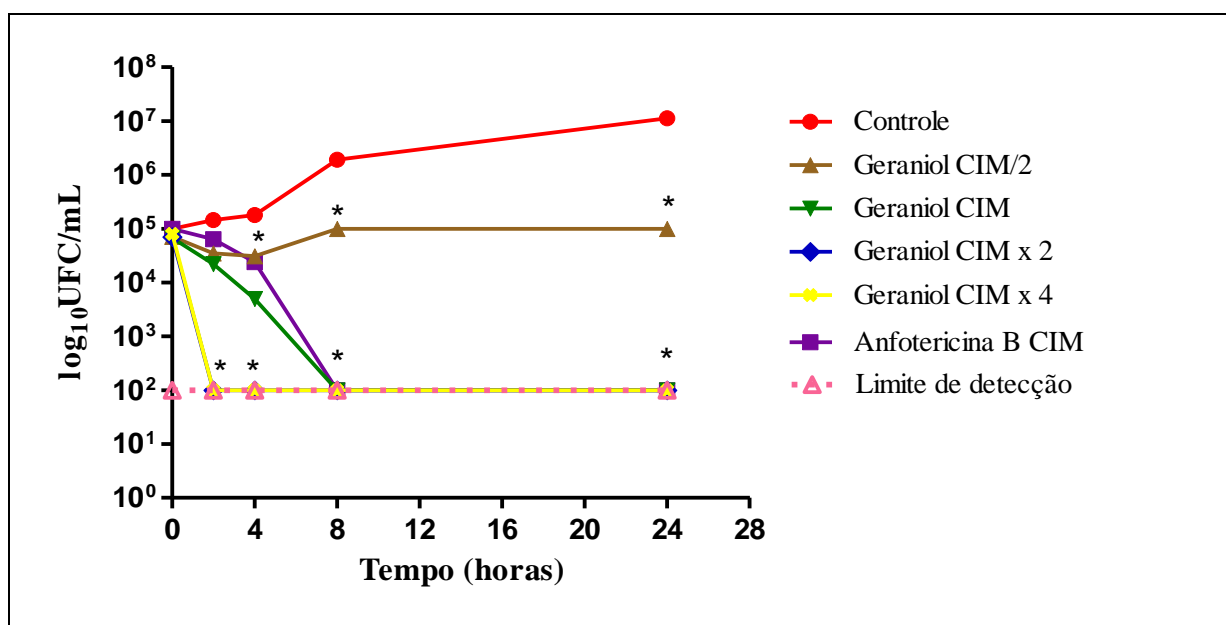
Figura 16 - Curva de morte microbiana ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) da cepa *C. glabrata* 173, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.



* $p < 0,05$ versus controle

Os ensaios de cinética de morte microbiana revelaram que independentemente da espécie de *Candida* o padrão de resposta antifúngica do geraniol sobre estas espécies foi o mesmo. Observa-se que tanto na CIMx2 quanto na CIMx4 após duas horas o inóculo microbiano tinha sido reduzido em mais de 3 escalas logarítmicas. A CIM por sua vez reduziu estes inóculo em 3 Log₁₀UFC/mL a partir de aproximadamente 8 horas de contato. Uma redução maior ou igual a 3 Log₁₀UFC/mL a partir do inóculo inicial indica uma ação fungicida do agente, caso a redução seja menor o agente antifúngico tem uma ação fungistática.

Figura 17 - Curva de morte microbiana (Log₁₀UFC/mL) da cepa *C. krusei* 885, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do geraniol.



*p<0,05 versus controle

Com base nesta classificação pode-se verificar que o geraniol foi fungistático na CIM/2 e fungicida a partir da CIM, o que indica um padrão de ação concentração dependente. Os resultados obtidos na cinética de morte microbiana são corroborados pelos da concentração fungicida mínima - CFM, que indicava uma ação fungicida do geraniol na concentração inibitória mínima – CIM na maioria das cepas.

Observa-se também que à medida que se aumenta a concentração do geraniol o efeito fungicida ocorre mais rapidamente, na CIM em 8 horas e na CIMx2 em 2 horas. Caso no experimento tivesse sido usado intervalos de tempos mais curtos talvez fosse possível verificar o efeito fungicida do geraniol na CIMx4 em um tempo menor que a CIMx2. O

geraniol apresentou um comportamento semelhante à anfotericina B, uma CIM fungicida capaz de eliminar 99,9% dos micro-organismos em aproximadamente 8 horas.

Estes resultados são corroborados por Leite *et al.* (2014) que também evidenciou que a medida que se aumenta a concentração do geraniol o efeito antifúngico passa de fungistático para fungicida; entretanto, estes autores só observaram o efeito fungicida a partir da CIMx2 (32 µg/mL) que ocorreu após 2 horas. Zore *et al.* (2011) em seus estudos evidenciaram uma ação fungicida do geraniol na CFM 640 µg/mL e CIM 561 µg/mL frente a cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol após 15 minutos. Esses dados de outros autores mostram que a depender da cepa analisada os valores da CFM variam.

Um entendimento claro das propriedades farmacodinâmicas de agentes antifúngicos é importante para o tratamento adequado de infecções fúngicas como a candidíase. Para certos agentes antifúngicos, a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e a curva de tempo morte podem ser clinicamente mais relevantes do que a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (LEMOS *et al.*, 2009).

Cantón *et al.* (2004) postularam que o uso de curvas de tempo de morte para fornecer avaliação da atividade fungicida é melhor do que a CFM. Estudos de tempo de morte fornecem uma avaliação mais dinâmica da interação entre um agente antimicrobiano e um dado organismo, e pode ter maior utilidade clínica do que determinações de CFM estática (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

5.3 ENSAIO COM SORBITOL

O ideal para um medicamento antifúngico é que este tenha entre os requisitos uma boa eficácia e segurança. O fármaco com uma boa segurança provoca o mínimo de efeitos colaterais e reações adversas ao usuário, para isto o ideal é que o fármaco tenha como alvo farmacológico estruturas presentes apenas nos micro-organismos.

Nos fungos a parede celular e a membrana celular (com enfoque no ergosterol, lipídeo não encontrado em células humanas) são importantes alvos farmacológicos dos fármacos antifúngicos. Composta por uma complexa rede de polissacarídeos, principalmente quitina e glicanos, a parede celular é uma estrutura importante para os fungos, uma vez que o protege de alterações da pressão osmótica, além de manter a forma e a integridade da célula fúngica, possibilitando desta forma o crescimento e divisão celular (BOWMAN; FREE, 2006).

Fármacos antifúngicos capazes de provocar perturbações ou alterações na organização da parede celular tendem a induzir a morte do fungo (SARTORATTO *et al.*, 2004). Sabendo-se que um dos principais componentes da parede celular são os glicanos se deduz que a supressão deste levará o fungo a morte. A supressão pode ser conseguida com a inibição da síntese de β -1,3-glicano. Dois importantes grupos de drogas que agem por este mecanismo são as papulacandinas e as equinocandinas (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Uma das formas de avaliar se uma nova droga atua na parede celular é por meio do ensaio com o sorbitol. Teste que compara a CIM da droga antifúngica na presença e na ausência do sorbitol (protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos).

Quando a substância em análise atua sobre a parede celular, esta causa uma morte fúngica na ausência de um estabilizador, no entanto na presença deste suporte osmótico ocorre a preservação dos micro-organismos permitindo o seu crescimento, o que é evidenciado pelo aumento do valor da CIM em meio com sorbitol em comparação com valor da CIM no meio sem o sorbitol (ESCALANTE *et al.*, 2008).

Os ensaios de sorbitol realizados nesta pesquisa demonstraram que o geraniol não exerce seu efeito antifúngico por meio da parede celular, pois os valores da CIM na presença e na ausência do sorbitol foram os mesmos (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito do geraniol sobre as cepas *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.

Micro-organismo	CIM geraniol ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
<i>C. albicans</i> 681	512	512
<i>C. glabrata</i> 173	256	256
<i>C. krusei</i> 885	512	512

Os resultados observados são corroborados pelos descritos por Leite *et al.* (2014) em suas pesquisas, nas quais também não verificou atividade antifúngica do geraniol sobre a parede celular de *Candida albicans*.

Miron *et al.* (2014) em seus ensaios com *Trichosporon asahii* também verificaram que o geraniol não agia inibindo o controle de mecanismos de síntese ou montagem da parede celular deste fungo.

Contraoendo-se as estas evidências Singh, Fátima e Hameed (2016) observaram em seus estudos com metodologia diferente das apresentadas aqui e pelos outros autores que o geraniol causa a ruptura da integridade da parede celular de *Candida albicans*. Nesse mesmo estudo estes autores comprovam que o geraniol bloqueia a via de sinalização da calcineurina (regulador multifuncional envolvido na regulação do crescimento celular e sustentação funcional da parede celular em situações de stress celular), logo é possível que esta ruptura da integridade da parede celular observada por estes pesquisadores ocorreu devido à supressão da calcineurina que deixou às células fúngicas mais susceptíveis a ação da caspofungina e a de outros agentes que desregulam a parede celular (vermelho congo, calcoflúor-branco) usados na metodologia.

Segundo Walker e White (2005) embora a estrutura básica da parede celular fúngica seja a mesma em todas as espécies (quitina e β -glicanos), cada fungo apresenta uma composição química diferente. Os genes que codificam a síntese de quitina e os sinais pelos quais são ativados dependem de específicas condições ambientais, estágio do ciclo celular e variam bastante entre as diversas espécies (LATGÉ; CALDERONE, 2007).

A variabilidade na composição da parede celular fúngica pode ser facilmente exemplificada quando comparamos a parede das hifas com as das formas leveduriformes, as hifas geralmente tem menos unidades de mananos (polímeros de unidades de manose unidas) do que das formas leveduriformes (WALKER; WHITE 2005).

Sabendo-se desta variabilidade na composição da parede celular fúngica se faz necessário confirmar que o geraniol não atua sobre a parede celular em outras espécies de *Candida* além da *C. albicans*, como já estudado por Leite *et al.* (2014) e Singh, Fátima e Hameed (2016). Este foi o primeiro trabalho a avaliar a possível ação do geraniol em parede celular de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Frost *et al.* (1995) afirmam que o ensaio de sorbitol é de amplo espectro, pois pode identificar não só agente que agem diretamente a síntese da parede celular, mas também mecanismos regulatórios envolvidos neste processo, incluindo vias de transdução de sinal, como a Proteína Quinase C (PKC), Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPK) e Quinases de Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPKK).

5.4 INTERAÇÃO COM O ERGOSTEROL

O próximo alvo farmacológico a ser estudado quanto ao mecanismo de ação do geraniol foi à membrana plasmática, componente imprescindível para a manutenção da viabilidade fúngica.

A membrana plasmática deste micro-organismo se assemelham com a dos humanos em sua característica básica, dupla camada de fosfolipídios com proteínas intercalares. Aqui as proteínas também exercem a função de transporte seletivo de substâncias do meio externo para o interno e vice-versa; no entanto, o principal esteróide presente é o ergosterol (SIDRIM; ROCHA, 2012).

Com as características de estar presente nos fungos e ausente nas células humanas, além de ser importante na manutenção da membrana plasmática, ou seja, da viabilidade fúngica, o ergosterol torna-se um importante alvo farmacológico, especialmente para fármacos que interagem diretamente com este formando poros, a exemplo dos polienos (MINNEBRUGGEN *et al.*, 2010).

Para avaliar se o geraniol atuou sobre o ergosterol, formando complexos com este, se fez a determinação da CIM na presença e na ausência deste esterol. Caso a atividade antifúngica se de pela ligação do monoterpene ao esterol, o ergosterol exógeno presente no meio impedirá a ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, uma vez que este está mais prontamente disponível, permitindo assim o crescimento do fungo no meio e sendo necessária uma maior quantidade de geraniol para eliminar a levedura, ocasionando então o aumento da CIM (ESCALANTE *et al.*, 2008).

Nos ensaios de interação do geraniol com o ergosterol realizados observou-se tanto para *C. albicans* quanto para *C. glabrata* e *C. krusei* a ausência de qualquer atividade antifúngica deste fitoconstituente mediante a sua ligação com o ergosterol, uma vez que os valores da CIM deste monoterpene permaneceram os mesmos tanto na presença quanto na ausência do esterol exógeno (Tabela 5).

O controle positivo demonstrou que a prova foi realizada de forma satisfatória, pois na presença do ergosterol exógeno a CIM da anfotericina B foi bem maior, do que na ausência deste lipídeo.

Tabela 5 - Efeito do geraniol sobre as cepas *C. albicans* 681, *C. glabrata* 173 e *C. krusei* 885 na ausência e presença de ergosterol 400µg/mL.

Micro-organismo	Geraniol		Anfotericina B	
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)	
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
<i>C. albicans</i> 681	512	512	0,0625	16
<i>C. glabrata</i> 173	256	256	0,25	16
<i>C. krusei</i> 885	512	512	0,0625	64

Leite *et al.*, (2014) também observaram a ausência de atividade do geraniol sobre o ergosterol de membrana celular sobre *C. albicans*. Nesta análise, por sua vez, comprovamos que embora as espécies de *Candida* tenham variações bioquímicas estas respondem de forma igual à interação do geraniol sobre a membrana celular.

Bard *et al.* (1988) já anunciavam com base em seus experimentos que a atividade antifúngica do geraniol não tinha como principal modo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol e sim a sua capacidade de perturbar estruturas da bicamada da membrana, deixando-as mais fluidas permitindo então a perda de potássio.

Anos posteriores, Singh, Fátima e Hameed (2016) confirmaram em novos experimentos o anunciado por Bard *et al.* (1988), ou seja, que o geraniol atua sobre cepas de *C. albicans* causando o rompimento da homeostase da membrana, o que por sua vez resulta na alteração da atividade da ATPase da membrana plasmática, causando então a não remoção de prótons que aumenta o pH intracelular. Estes também observaram que o bloqueio da síntese de ergosterol resulta na diminuição deste esterol em mais de 50% nas células.

Zore *et al.* (2011) também atribui a atividade antifúngica dos terpenoides a capacidade destas substâncias de afetarem a integridade da membrana, além do bloqueio do ciclo celular em diferentes estágios (S, G1, G2).

Contrapondo-se aos resultados apresentados neste trabalho Miron *et al.*, 2014 atribui esta interferência na membrana celular fúngica a interação direta do geraniol com o ergosterol da membrana, resultado observado em seus experimentos com *Trichosporon asahii*.

Com base no aqui exposto e em nossos resultados corroborados por Leite *et al.* (2014) pode-se concluir que a interferência na bicamada da membrana celular causada pelo geraniol

é uma das principais causas da morte microbiana; entretanto, esta interferência na bicamada não tem como principal causa a interação direta deste terpeno com o ergosterol, o que levaria possivelmente a formação de poros na membrana.

Segundo Dalleau *et al.* (2008) os terpenos alteram a permeabilidade da célula ao penetrarem entre as cadeias de ácidos graxos que compõem as camadas duplas de lipídeos da membrana, interrompendo a embalagem lipídica e assim alterando a fluidez da membrana.

Singh, Fátima e Hameed (2016) ainda em seus estudos evidenciaram que a ação do geraniol está ligada ao impedimento da via da calcineurina. Regulador multifuncional, a calcineurina está envolvida na regulação do crescimento celular em várias respostas ao stress, incluindo o stress de membrana, pH alcalino, soro e ao stress iônico.

Dados revelam que o funcionamento normal da via de sinalização da calcineurina é indispensável para células sustentarem a integridade da membrana e da parede celular ao stress causado pelo geraniol. Entretanto ainda é preciso ser validado se o impedimento desta via é o responsável pela ruptura da integridade da membrana celular e da parede celular (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2016).

Outros estudos também indicam que os danos a integridade da membrana mediado por isoprenoides deve-se a modulação de via de sinalização como a via da MAP-quinase, entre estas a via do mevalonato (ZORE *et al.*, 2011).

O geraniol também exerce sua atividade antifúngica por meio da inibição da atividade mitocondrial, responsável pela respiração celular. Entretanto este processo não leva a produção de espécies reativas ao oxigênio – ROS. Além destas atividades o geraniol inibi a transformação da forma leveduriforme a hifa e interfere no processo de adesão das células leveduriformes a superfícies, impedindo então a formação de biofilme pela *Candida* (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2016).

Diante destas informações pode-se entender que o geraniol atua de diversas formas na sua atividade antifúngica; entretanto, falta se definir qual destes efeitos ocorre primeiro e como cada um pode influenciar no desencadeamento do outro.

5.5 ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

O aumento da prevalência de isolados multirresistente de *Candida* em infecções tem dificultado a tratamento da candidíase. Uma solução alternativa para este problema é o uso de terapia antifúngica combinada, no qual mais de um antifúngico é utilizado a fim de se obter um efeito sinérgico, que por sua vez reduz a dose destes antifúngicos e o aparecimento de reações adversas, além de uma maior eficácia na eliminação do patógeno (SOUSA, 2015).

Dalleau *et al.* (2008) ao verificar uma excelente atividade anti-*Candida* do geraniol frente ao biofilme produzido por este micro-organismo ressaltou a importância do uso deste monoterpeno sozinho ou combinado com azóis no combate destas leveduras, fazendo necessário desta forma, estudos da associação deste terpeno com antifúngicos licenciados.

Uma das formas de se avaliar *in vitro* a possibilidade de interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas entre antifúngicos frente a cepas microbianas é por meio do ensaio checkboard. Esta técnica apresenta várias vantagens como fácil padronização e execução, além de resultados fáceis de interpretar (LEWIS *et al.*, 2002; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Os resultados das interações antifúngicas obtidas no checkboard são submetidos ao cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada – ICIF, por meio deste índice as interações são classificadas como: sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), aditiva ($0,5 < ICIF < 1$), indiferente ($1 \leq ICIF < 4$) ou antagônica ($ICIF \geq 4$) (LEWIS *et al.*, 2002).

Os resultados da associação entre o geraniol com o fluconazol e a anfotericina B frente às diferentes espécies de *Candida* encontra-se disposto nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre *C. albicans* 681.

Antifungico / geraniol	CIM	Índice ICIF	Tipo de interação
Geraniol	1024	-	-
Fluconazol	4096	-	-
Anfotericina B	0,03125	-	-
Geraniol / Fluconazol	512 / 8192	2,5	Indiferente
Geraniol / Anfotericina B	1024 / 0,03125	2	Indiferente

Tabela 7 – ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre *C. glabrata* 173.

Antifúngico / geraniol	CIM	Índice ICIF	Tipo de interação
Geraniol	1024	-	-
Fluconazol	2048	-	-
Anfotericina B	0,03125	-	-
Geraniol / Fluconazol	256 / 2048	1,25	Indiferente
Geraniol / Anfotericina B	512 / 0,0625	2,5	Indiferente

Os dados das Tabelas 6, 7 e 8 mostram que independente da espécie de *Candida* a que seja submetida, a associação do geraniol com o fluconazol ou com a anfotericina B demonstra o mesmo padrão de resposta, tipo indiferente, ou seja, o geraniol nem potencializa e nem antagoniza o efeito do fluconazol e/ou da anfotericina B frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Tabela 8 – ICIF e CIM das drogas antifúngicas e geraniol sobre *C. krusei* 885.

Antifúngico / geraniol	CIM	Índice ICIF	Tipo de interação
Geraniol	512	-	-
Fluconazol	128	-	-
Anfotericina B	0,0625	-	-
Geraniol / Fluconazol	256 / 64	1	Indiferente
Geraniol / Anfotericina B	512 / 0,0625	2	Indiferente

O fato do geraniol não ter apresentado nenhum tipo de associação com a anfotericina B tende a reforçar a possibilidade de que este monoterpene certamente apresenta um mecanismo de ação distinto ao deste antifúngico frente às leveduras do gênero *Candida*.

Este foi o primeiro trabalho a analisar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos do geraniol quando associado com a anfotericina B ou o fluconazol, frente a espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*.

No presente estudo felizmente a associação de geraniol com fluconazol ou com a anfotericina B não teve uma resposta antagônica, o que levaria a falha terapêutica de um possível tratamento com as associações anteriormente descritas.

Associação do tipo indiferente também foi observada por Cardoso *et al.* (2016) em seus ensaios de associação entre o geraniol e o fluconazol frente a cepas de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, por sua vez estes pesquisadores ainda neste estudo observaram que esta mesma associação teve efeito sinérgico frente a cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, fato também evidenciado por Zore *et al.* (2010), logo isto nos leva a crer que não é possível definir um comportamento padrão de sinergismo do geraniol com antifúngicos sobre as leveduras do gênero *Candida*.

Um fato importante a se ressaltar quanto ao estudo de associação é que este apenas avalia a eficácia da combinação de drogas antifúngicas quanto à taxa de morte do patógeno fúngico, outras interações que não são avaliadas e que podem ocorrer como as interações farmacocinéticas podem ter impacto quando esses agentes são usados em conjunto (JOHNSON *et al.*, 2004).

5.6 MODULAÇÃO DO GERANIOL SOBRE A ANFOTERICINA B E AO FLUCONAZOL.

O uso irracional e abusivo de antimicrobianos tem exposto de forma desnecessária diversos micro-organismos aos principais fármacos usados na clínica, isto por sua vez seleciona na microbiota humana os micro-organismos dotados de diversos mecanismos de resistência a drogas.

Entre as alternativas usadas para tratar infecções causadas por patógenos multirresistentes esta a descoberta e uso de substâncias que modulam ou reverterem a resistência aos fármacos clássicos e disponíveis no mercado, tornando então novamente viável o uso destes fármacos. A exemplo de moduladores tem-se a fenotiazina, que altera a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo, o clavulanato de sódio que se liga de maneira irreversível as beta-lactamases (SOUSA, 2015).

Em seus estudos com *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA Coutinho *et al.* (2008) demonstraram o potencial modulador do extrato de *Momordica charantia L.* sobre aminoglicosídeos, revertendo a resistência destas bactérias para estes antibióticos. Lorenzi *et al.* (2009) também comprovaram a reversão da resistência de bactérias a antibióticos convencionais quando na presença de produtos naturais, eles também observaram que o geraniol inibia bombas de efluxo em bactérias gram negativas como *Escherichia coli* e

Enterobacter aerogenes permitindo a atuação de antibióticos como o cloranfenicol e fluoroquinolonas.

Dotado de atividade antifúngica, o geraniol foi estudado quanto ao potencial de atividade moduladora de antifúngicos clássicos usados no tratamento sistêmico da candidíase (Tabela 9).

Tabela 9 - Modulação da ação dos antifúngico na sua CIM pelo geraniol na CIM/8 frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Micro-organismo	Fluconazol CIM (µg/mL)		Anfotericina B CIM (µg/mL)	
	sozinho	associado ao geraniol (CIM/8)	sozinho	associado ao geraniol(CIM/8)
<i>C. albicans</i> 681	512	512	0,0625	0,0625
<i>C. glabrata</i> 173	256	256	0,25	0,25
<i>C. krusei</i> 885	512	512	0,0625	0,0625

Conforme pode se observar na tabela 9 os valores da CIM do fluconazol sozinho e em associação com o geraniol permaneceram os mesmos quando avaliado nas três diferentes espécies de *Candida*. Com relação a anfotericina B os valores das CIM deste antifúngico sozinho e em associação também permaneceram os mesmos; logo, o geraniol não apresentou nenhum efeito modulador sobre o fluconazol e a anfotericina B, uma vez que não houve um aumento da morte fúngica em menores concentrações dos antifúngicos licenciados (anfotericina B e fluconazol), fato representado caso ocorresse uma diminuição do valor da CIM, quando estes antifúngicos estivessem em associação com o geraniol.

Na literatura ainda são poucos os estudos quanto a modulação da ação de antifúngicos por fitoconstituintes. Entretanto, Sousa (2015) em seus trabalhos não evidenciou atividade moduladora dos terpenos citral e timol sobre a anfotericina B e fluconazol frente a cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Outros estudos, no entanto mostram atividade moduladora de produtos naturais sobre antimicrobianos licenciados, a exemplo de Sousa *et al.* (2012) que evidenciaram uma atividade moduladora do extrato de *Pityrogramma calomelanos* sobre o benzoilmetronidazol contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Tintino *et al.* (2013) também modulou a atividade benzoilmetronidazol com o extrato da planta *Costus cf. arabicus* frente a *C. krusei*.

5.7 ENSAIOS *IN SILICO*

Avaliar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos de uma substância orgânica por ensaios *in silico* é de extrema relevância, uma vez que possibilita otimizar tempo e custo com ensaios laboratórios (RAJASEKHA *et al.*, 2011).

O uso de modelos *in silico* para avaliar a toxicidade de composto em um ambiente metabólico de mamíferos vem sendo estimulado por legislação vigente, pois possibilita obter estes e outros parâmetros sem ter que sacrificar animais (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2015).

O presente trabalho é o primeiro estudo *in silico* pelos softwares Osiris, Molispiration e Pass online realizado com a molécula do geraniol.

Analisando os resultados obtidos no Osiris por meio da “Regra dos cinco” de Lipinski (2004) verificou-se que o geraniol apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica, uma vez que todos os parâmetros físico-químicos avaliados para esta molécula apresentaram dentro do ponto de corte estabelecido pela “Regra dos cinco” Lipinski (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise teórica das propriedades físico-químicas do geraniol envolvidas na biodisponibilidade oral teórica comparada aos padrões da “Regra dos cinco” Lipinski – Osiris.

Substância	nDLH	nALH	Da	cLogP
Geraniol	1	1	154.25	3.20
Padrão da “Regra dos cinco” Lipinski	= 5	= 10	< 500	< 5

nDLH: número de doadores de hidrogênio; nALH: número de aceptores de hidrogênio; Da: Peso molecular; cLogP: Coeficiente de partição água:óleo.

Comparado a fármacos disponíveis para uso como o itraconazol, o qual apresenta alto efeito mutagênico e tumorigênico, o geraniol demonstrou ser bastante promissor uma vez que não apresentou efeito mutagênico, tumorigênico e dano ao sistema reprodutor, embora tenha elevado risco irritabilidade (Tabela 11).

Estes resultados detectados por softwares demonstram ser bastante consistentes uma vez que são corroborados pelos ensaios *in vivo* de Farhath, Vijaya e Vimal (2012), cujos ensaios com administração oral de 5mg/kg de geraniol ratos durante 14 dias detectaram uma baixa toxicidade aguda do geraniol, com ausência lesões gástricas hemorrágicas.

Quanto ao alto risco de irritabilidade detectado pelo software Osiris, este possivelmente deve-se a um efeito colateral do geraniol em pessoas com hipersensibilidade a

esta substância. Hagvall, Karlberg e Christensson (2013) não observaram reações significativas de irritabilidade em seus estudos com geraniol puro e oxidado em formulações tópicas, nas concentrações de 4-11%, aplicadas na pele de pacientes. O geraniol encontra-se amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos e alimentos, entretanto é possível encontrar na literatura relatos de pessoas com hipersensibilidade a este monoterpene, a exemplo de paciente que desenvolveu queilite ao entrar em contato com o geraniol presente em alimentos (TAMAGAWA-MINEOKA; KATOH; KISHIMOTO, 2007), outros que apresentaram urticária, devido o geraniol em cosméticos (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

Tabela 11- Risco de toxicidade do geraniol comparada ao dos antifungicos padrões – Osiris.

Compostos	Risco de toxicidade			
	MUT	TUMO	IRRI	REP
Geraniol	■	■	■	■
Anfotericina B	■	■	■	■
Fluconazol	■	■	■	■
Itraconazol	■	■	■	■

■ : Não tóxico; ■ : baixo risco de toxicidade; ■ : alto risco de toxicidade; MUT: Mutagênico; TUMO: Tumorigênico; IRRI: Irritante; REP: Dano ao aparelho reprodutor.

Segundo o software o alto risco de irritabilidade apresentado pelo o geraniol deve a parte da molécula mostrada na figura 18.

Figura 18 – Grupamento químico responsável pelo efeito irritante do geraniol



Fonte: (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>)

Silva (2016) ao avaliar a molécula do β – citrionelol, monoterpene dotado de atividade anti - *Candida*, verificou que este também apresentava boa biodisponibilidade oral teórica, entretanto, diferentemente do geraniol o β – citrionelol demonstrou-se ser mais tóxico, pois além de uma alta probabilidade de efeito irritante, este apresentava alto risco de dano ao aparelho reprodutor.

Conhecer os alvos farmacológicos de uma molécula ajuda a compreender o seu mecanismo de ação e assim pressupor possíveis efeitos colaterais e reações adversas. O Molispiration informa scores que representam uma probabilidade de um fármaco em estudo de interagir com diversos alvos farmacológicos. Nestes softwares valores ≥ 1 indicam alta probabilidade da molécula interagir com determinado alvo farmacológico.

Conforme pode se observar o geraniol teve um comportamento parecido com os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol, em relação ao GPCRL, ICM, KI, NRL PI e EI, o que demonstra a possibilidade de quando em contato com micro-organismos, o geraniol atue em alvos farmacológicos específicos destes organismos (Tabela 12).

Table 12 - Comparativo da probabilidade do geraniol com o antifúngicos padrões de interagirem com diferentes alvos farmacológicos – Molispiration.

Compostos ^a	“Drug-likeness” ^b					
	GPCRL	ICM	KI	NRL	PI	EI
Geraniol	-0.60	0.07	-1.32	-1.32	-1.03	0.28
AMB	-3.06	-3.53	-3.59	-3.45	-2.45	-2.95
FLUC	0.04	0.01	-0.09	-0.23	-0.09	0.03
ICZ	-0.40	-1.50	-1.30	-1.31	-0.66	-0.97

^aAMB: anfotericina B; FLU:fluconazol; ICZ: itraconazol; ^b“Drug-likeness”: valor da probabilidade de interação da droga com o alvo farmacológico; GPCRL: ligante da proteína GPCR; ICM: modulador de canal iônico; KI: inibidor de quinase; NRL: ligante de receptor nuclear; PI: inibidor de protease; EI: inibidor de enzima.

Conhecido por possuir propriedades inseticidas e repelentes, o geraniol tem sido utilizado no controle de pragas. Estudos têm sugerido que o geraniol representa uma nova classe de agentes quimiopreventivos contra o câncer. Outras atividades biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória e alguns efeitos vasculares também foram investigados em ensaios não clínicos (CHEN; VILJOEN, 2010).

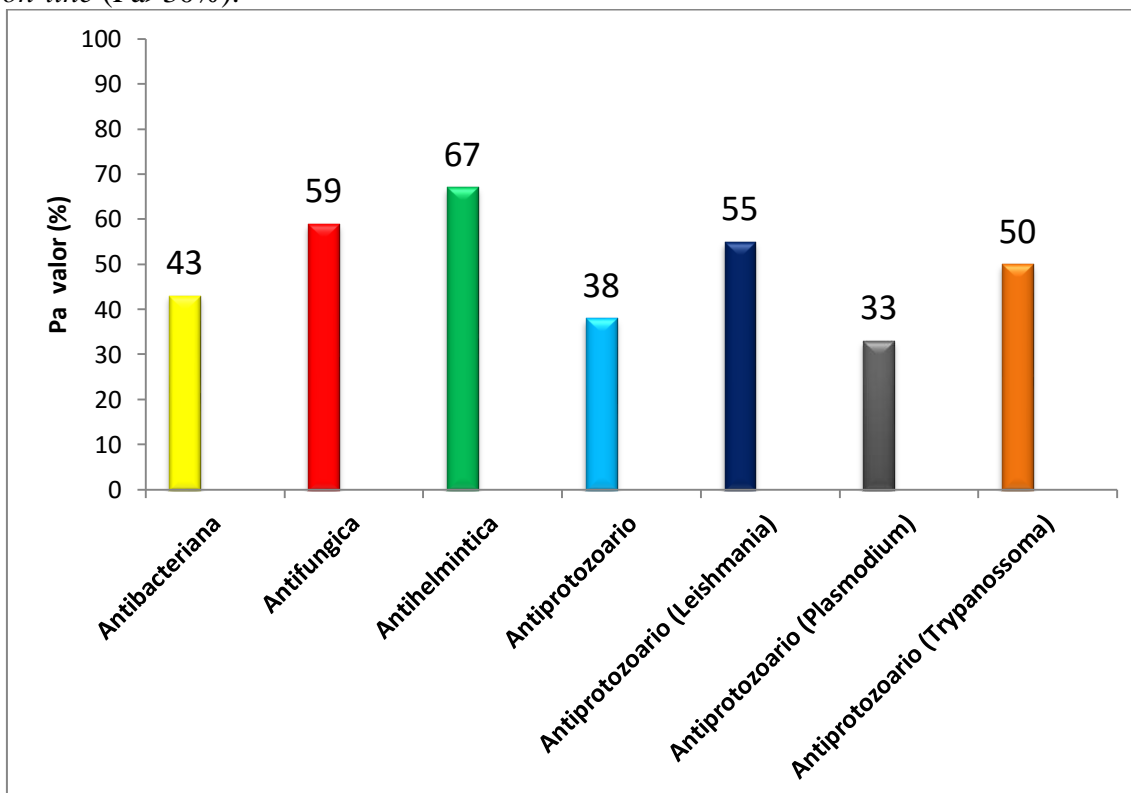
No presente estudo, por meio da ferramenta computacional *Pass online* foi possível verificar que o geraniol possui 74 possíveis atividades para um $Pa > 70\%$ (Tabela 13) e numerosas propriedades para um $Pa > 30\%$ (Figura 19), destacando-se entre elas a antifúngica (Pa : 59,6 e Pi : 0,019) e anti-helmíntica (Pa : 66,9 e Pi : 0,004). Estudos *in vitro* corroboram com a precisão deste software quanto a estas atividades detectadas (KUMARAN *et al.*, 2003; SINGH; GUPTA; PURI, 2003; LEITE *et al.*, 2014).

Tabela 13 - Atividade previstas para o geraniol com uma probabilidade maior que 70% ($P_a > 70\%$) – *Pass online*.

N ^o activities	P_a	P_i	Activity
1	0,712	0,001	2,3-Oxidosqualene-lanosterol cyclase inhibitor
2	0,787	0,009	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinatate 3'-monooxygenase inhibitor
3	0,744	0,033	Acrocylindropepsin inhibitor
4	0,792	0,001	Alcohol dehydrogenase substrate
5	0,840	0,012	Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
6	0,770	0,012	Alkylacetyl glycerophosphatase inhibitor
7	0,843	0,004	All-trans-retinyl-palmitate hydrolase inhibitor
8	0,717	0,005	Allyl-alcohol dehydrogenase inhibitor
9	0,742	0,033	Antieczematic
10	0,750	0,018	Antineoplastic
11	0,710	0,009	Antisecretoric
12	0,770	0,004	Antiulcerative
13	0,766	0,001	Antiviral (Rhinovirus)
14	0,723	0,013	Apoptosis agonist
15	0,736	0,015	Arginine 2-monooxygenase inhibitor
16	0,886	0,011	Aspulvinone dimethylallyltransferase inhibitor
17	0,867	0,001	BRAF expression inhibitor
18	0,808	0,012	Beta-adrenergic receptor kinase inhibitor
19	0,866	0,002	Beta-carotene 15,15'-monooxygenase inhibitor
20	0,765	0,038	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
21	0,924	0,003	CYP2E1 inhibitor
22	0,847	0,011	CYP2J substrate
23	0,781	0,016	CYP2J2 substrate
24	0,807	0,007	Carboxypeptidase Taq inhibitor
25	0,724	0,035	Chlordecone reductase inhibitor
26	0,744	0,033	Chymosin inhibitor
27	0,885	0,001	Dolichyl-phosphatase inhibitor
28	0,816	0,003	Ecdysone 20-monooxygenase inhibitor
29	0,719	0,015	Exoribonuclease II inhibitor
30	0,804	0,001	Farnesyltranstransferase inhibitor
31	0,793	0,005	Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor
32	0,800	0,012	Feruloyl esterase inhibitor
33	0,720	0,013	Fucosterol-epoxide lyase inhibitor
34	0,808	0,012	G-protein-coupled receptor kinase inhibitor
35	0,712	0,021	GST A substrate
36	0,717	0,004	Gastrin inhibitor
37	0,741	0,006	Glucan 1,4-alpha-maltotriohydrolase inhibitor
38	0,775	0,005	Gluconate 5-dehydrogenase inhibitor
39	0,744	0,019	Glucose oxidase inhibitor
40	0,721	0,023	Glutamyl endopeptidase II inhibitor
41	0,735	0,027	Glycosylphosphatidylinositol phospholipase D inhibitor
42	0,760	0,004	Lactase inhibitor
43	0,710	0,011	Linoleate diol synthase inhibitor

44	0,885	0,004	Lipid metabolism regulator
45	0,737	0,004	Long-chain-aldehyde dehydrogenase inhibitor
46	0,816	0,004	Macrophage colony stimulating factor agonist
47	0,704	0,027	Mannotetraose 2-alpha-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor
48	0,881	0,016	Membrane integrity agonist
49	0,710	0,001	Mevalonate kinase inhibitor
50	0,953	0,003	Mucomembranous protector
51	0,754	0,009	N-acetylneuraminate 7-O(or 9-O)-acetyltransferase inhibitor
52	0,716	0,024	NADPH peroxidase inhibitor
53	0,701	0,004	Nitrite reductase (NO-forming) inhibitor
54	0,713	0,007	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase inhibitor
55	0,807	0,031	Phobic disorders treatment
56	0,864	0,004	Phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferase inhibitor
57	0,724	0,005	Phosphatidylglycerophosphatase inhibitor
58	0,802	0,002	Plastoquinol-plastocyanin reductase inhibitor
59	0,966	0,001	Prenyl-diphosphatase inhibitor
60	0,823	0,007	Protein-disulfide reductase (glutathione) inhibitor
61	0,707	0,015	Pullulanase inhibitor
62	0,774	0,004	Reductant
63	0,951	0,000	Retinol dehydrogenase inhibitor
64	0,735	0,015	Ribulose-phosphate 3-epimerase inhibitor
65	0,744	0,033	Saccharopepsin inhibitor
66	0,783	0,015	Sphinganine kinase inhibitor
67	0,857	0,008	Sugar-phosphatase inhibitor
68	0,840	0,003	TNF expression inhibitor
69	0,801	0,025	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
70	0,714	0,014	UDP-glucuronosyltransferase substrate
71	0,813	0,004	UGT1A9 substrate
72	0,881	0,009	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor
73	0,952	0,001	Undecaprenyl-phosphate mannosyltransferase inhibitor
74	0,875	0,002	Vitamin-K-epoxide reductase (warfarin-insensitive) inhibitor

Figura 19 - Previsão de atividade antimicrobiana do geraniol obtidas pela ferramenta *Pass on-line* (Pa>30%).



Sabendo-se que o terpenoide em estudo não possui 100% de Pa como antifúngico, se faz necessário então confirma esta atividade *in vitro* com diferentes espécies de fungos.

A veracidade dos excelentes resultados do ensaio *in silico* é corroborado pelos testes *in vitro* aqui realizados e por outros estudos quanto a atividade antifúngica do geraniol (MESA – ARANGO *et al.*, 2009; MARCOS – ARIAS *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2014), quanto a atividade anti - helmíntica (KUMARAN *et al.*, 2003) e anti malária (SINGH; GUPTA; PURI, 2003), comprovando assim a eficiência e validade dos resultados fornecidos por estes softwares.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O geraniol apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, cepas estas resistentes ao fluconazol e com poucas destas (*C. glabrata* 46 e 561; *C. krusei* 13) também resistentes a anfotericina B, com uma CIM₉₀ de 512µg/mL. O geraniol por sua vez, com sua atividade fungicida eliminou praticamente todas, inclusive cepas multiresistentes.

O geraniol tem uma atividade fungicida (CFM₉₀ de 512µg/mL) concentração dependente, ou seja, à medida que se aumenta a sua concentração o efeito passa de fungistático para fungicida, ocorrendo este efeito fungicida dentro de 8 horas.

Quanto ao possível mecanismo de ação do geraniol observou-se por meio do ensaio do sorbitol (0,8 M) e do ergosterol (400 µg/mL) que este monoterpene não atua na parede celular e nem interfere na membrana plasmática via interação direta com o ergosterol da membrana levando a formação de poros transmembrana.

Embora seja dotado de atividade antifúngica o geraniol não exerce efeito sinérgico, aditivo, antagônico ou modulador quando usado em associação com o fluconazol ou a anfotericina B.

Quanto ao estudo *in silico*, levando em consideração as ferramentas utilizadas, o geraniol demonstrou que tem vários efeitos biológicos possíveis no ser humano, bem como boa biodisponibilidade oral teórica e baixo risco de efeitos mutagênicos, tumorigênicos e danos ao sistema reprodutor, entretanto, apresenta um alto risco de efeito irritante.

A atividade antifúngica do geraniol frente a cepas de *Candida* multiresistentes torna esta molécula orgânica um excelente candidato no combate ao aumento da resistência microbiana.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et applications in microbiologia. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n. 1, p. 73- 86, 1973.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ARENDRUP, M. C.; DZAJIC, E.; JENSEN, R. H.; JOHANSEN, H. K.; KJAELDGAARD, P.; KNUDSEN, J. D. *et al.* Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, p. 343–353, 2013.

ARENDRUP, M. C.; GARCIA-EFFRON, G.; LASS-FLORL, C.; LOPEZ, A. G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 426–39, 2010.

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.

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

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.

BARD, M.; ALBRECHT, M. R.; GUPTA, N.; GUYNN, C. J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BENNETT, J. E. Antifungal Agents. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill Companies do Brasil, 2011. cap. 57.

BERMAN, J. *Candida albicans*. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. 620-622, 2012.

BORGOS, S. E. F.; TSAN, P.; SLETTA, H.; ELLINGSEN, T. E.; LANCELIN, J. M.; ZOTCHEV, S. B. Probing the structure–function relationship of polyene macrolides: engineered biosynthesis of soluble nystatin analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 2431–2439, 2006.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRAND, A.; VACHARAKSA, A.; BENDEL, C.; NORTON, J.; HAYNES, P.; HENRY-STANLEY, M.; WELLS, C.; ROSS, K.; GOW, N. R.; GALE, C. An Internal Polarity Landmark Is Important for Externally Induced Hyphal Behaviors in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 12-20, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e identificação dos fungos de importancia médica**. Módulo VII. Brasília: ANVISA, 2004. 24p.

BRAUTASET, T.; SLETTA, H.; DEGNES, K. F.; SEKUROVA, O. N.; BAKKE, I.; VOLOKHAN, O.; ANDREASSEN, T.; ELLINGSEN, T. E.; ZOTCHEV, S. B.. New Nystatin-Related Antifungal Polyene Macrolides with Altered Polyol Region Generated via Biosynthetic Engineering of *Streptomyces noursei*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6636–6643, 2011.

CANTON, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Patterns of amphotericin B Killing Kinetics against seven *Candida* species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 48, n. 7, p. 2477-2482, 2004.

CARDOSO, N. N. R.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ROMANOS, M. T. V.; 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. 12, p. 1-12, 2016.

CASTELLI, M. V.; BUTASSI, E.; MONTEIRO, M. C.; *et al.* Novel antifungal agents: a patent review (2011-present). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 24, p. 323-338, 2014.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida***. 2010. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011.

CHAND, B. Structure – Bioactivity - Relationships and Crystallographic Analysis of Secondary Interactions in Pregnane-Based Steroids. **Journal Chemical Crystallography**, v. 41, n. 12, p. 1901-1926, 2011.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, p. 495–544, 2008.

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

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **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.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, approved standard M27-A3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, v. 28, p. 14, 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infection. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams & Wilkins, 1991. p. 739-787.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, A. S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

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

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA- JÚNIOR J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008.

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

DOTIS, J.; PRASAD, P. A.; ZAOUTIS, T.; ROILIDES, E. Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 31, p. 557-60, 2012.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308–323, 2007.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations, In: **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, p. 434–441.

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.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area (PSA) as a sum on fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.1, p.3714-3717, 2000.

ERNST, E. J.; ROLING, E. E.; PETZOLD, C. R.; KEELE, D. J.; KLEPSE, M. E. *In Vitro* Activity of Miconazole (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 12, p. 3846–3853, 2002.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

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.

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

FARSHORIA, N. N.; BANDAYA, M. R.; AHMADB, A.; KHANB, A. U.; RAUF, A. Synthesis, characterization, and *in vitro* antimicrobial activities of 5 alkenyl/hydroxyalkenyl-2 phenylamine-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 6, p. 1933–1938, 2010.

FARHATH, S; VIJAYA, P. P.; VIMAL, M. An evaluation of toxicity in essential oils of Geraniol, Geraniol acetate, Gingerol and Eugenol in rats. **International Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 519-524, 2012.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 4, p. 306-309, 1995.

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

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI T. I. E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicinal e Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GÓES, V. F. F. **Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp.** 2009. 141 f. Tese (doutorado em Biologia Buco-Dental), UNICAMP, Piracicaba, SP, 2009.

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

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

HAFIDH, R. R.; ABDULAMIR, A. S.; VERN, L. S.; BAKAR, F. A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96–106. 2011.

HAGVALL, L.; KARLBERG, A.; CHRISTENSSON, J. B. Finding the optimal patch test material and test concentration to detect contact allergy to geraniol. (Report). **Contact Dermatitis**, v. 68, p. 224-228, 2013.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. 37–41, 1998.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinic fungi**. Virgili: Central bureau voor Schimmel cultures. 2011.

HORN, D. L.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; ANAISSIE, E. J.; MARR, K. A.; OLYAEI, A. J. *et al.* Presentation of the PATH Alliance registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 407–414, 2007.

IJIMA, Y.; GANG, D. R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHESKY, E. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 370-379, 2004.

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

JIANG, B.; XU, D.; ALLOCCO, J.; PARISH, C.; DAVISON, J.; VEILLETTE, K. et al. PAP inhibitor with In vivo efficacy identified by *Candida albicans* genetic profiling of natural products. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 4, p. 363–374, 2008.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination Antifungal Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

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

KEELE, D. J.; DELALLO, V. C.; LEWIS, R. E.; ERNST, E. J.; KLEPSER, M. E. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 41, n. 3, p. 121–126, 2001.

KHAN, M. A. S; AHMAD, I; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.

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

KHURANA, N. I.; MOHAN, P. S.; GAJBHIYE, A.; GOEL, R. K. PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 662, n. 1-3, p. 22-30, 2011.

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

KLEPSER, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 397-401, 1998.

KUMARAN, A. M.; SOUZA, P. D.; AGARWAL, A.; BOKKOLLA, R. M.; BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the Putative Anthelmintic Principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 957, 2003.

LACAZ, C. S.; DUPONT, B. **Tratado de Micologia Médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, n. 3, p.17-31, 2013.

LATGÉ, J. P.; CALDERONE, R. The fungal cell wall. In: KÜES, U.; FISCHER, R. (Editores). **The Mycotal Growth, Differentiation and Sexuality**. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, p. 73–104, 2007.

LEITE, M. C. A. **Citral e geraniol: atividade antifúngica *in vitro* sobre leveduras do gênero *Candida* de importância hospitalar**. 2015. 81f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. B.; SOUSA, J. P.; LIMA, E. O. Investigation the antifungal activity and mechanism(s) geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 00, n. 0, p. 62 – 70, 2014.

LEMONS, J. A.; COSTA, C. R.; ARAÚJO, C. R.; SOUZA, L. K. H.; M. R. R. SILVA. Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of hiv+ patients to fluconazole, amphotericin B and caspofungin. killing kinetics of caspofungin and amphotericin b against fluconazole resistant and susceptible isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, n. 1, p. 163-169, 2009.

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

LI, D; BERNHARDT, J; CALDERONE, R. Temporal expression of the *Candida albicans* genes CHK1 and CSSK1, adherence, and morphogenesis in a model of reconstituted human esophageal epithelial candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1558-1565, 2002.

LIGUORI, G.; ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p.76–78, 2009.

LIPINSKI, C. A. Drug discovery today. **Technologies**, v. 1, n. 1, p. 337-341, 2004.

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

LORENZI, V.; MUSELLI, A.; BERNADINI, A. F.; BERTI, L.; PAGÈS, J. M.; AMARAL, L.; BOLLA, J. M. Geraniol restores antibiotic activities against multdrug-resistant isolates from gram-negatives species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2209-2211, 2009.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

MARCOS – ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDOS, G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 119, 2011.

MARTINS, E. A.; GUERRER, L. V.; CUNHA, K. C.; SOARES, M. M. C. N.; ALMEIDA, M. T. G. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 5, p. 596-598, 2007.

MARUYAMA, N; TAKIZAWA, T; ISHIBASHI, H; HISAJIMA, T; INOUYE, S; YAMAGUCHI, H; ABE, S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

MATHEW, B. P.; NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**, v. 4, n. 3, p. 310–23, 2009.

MAYER, F. L.; HUBE, B.; WILSON, D. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MESA-ARANGO, A.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURAN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MINNEBRUGGEN, G. V.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGERS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, p. 22-32, 2010.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660-667, 2014.

MOHR, J.; JOHNSON, M.; COOPER, T.; LEWIS, J. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 5, p. 614–645, 2008.

MULU, A.; KASSU, A.; ANAGAW, B.; MOGES, B.; GELAW, A.; ALEMAYEHU, M. *et al.* Frequent detection of ‘azole’ resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 82, 2013.

MURRAY, P. R. Agentes Antifúngicos. In: MURRAY. **Microbiologia Médica**. Editores: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2014. Cap. 69, p. 631-642.

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

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-35. 2012.

NIGSCH, F.; LOUNKINE, E.; MCCARREN, P.; CORNETT, B.; GLICK, M.; AZZAOU, K.; URBAN, L.; MARC, P.; MULLER, A.; HAHNE, F.; HEARD, D. J.; JENKINS, J. L. Computational methods for early predictive safety assessment from biological and chemical data. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 7, n. 12, p. 1497-1511, 2011.

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

OLIVEIRA, C. S.; LIRA, B. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. **Molecules**, v. 17, p. 5095-5107, 2012.

OLIVEIRA FILHO, A. A.; FERNANDES, H. M. B.; ASSIS, T. J. C. F.; MEIRELES, D. R. P.; LIMA, E. O.; PESSOA, H. L. F. Pharmacological and Toxicological Analysis of Flavonoid 5,7,4'-Trimethoxyflavone: An *In Silico* Approach. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 3, p. 431-434, 2015.

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

OSIRIS. ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. 2014 Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 14 de Junho de 2016.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

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

PADLA, E. P.; SOLIS, L.T.; RAGASA, C. Y. Antibacterial and antifungal properties of ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 5, p. 408–414, 2012.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, Suppl. 1, 2008.

PATEL, M.; KUNZ, D. F.; TRIVEDI, V. M.; JONES, M. G.; MOSER, S. A.; BADDLEY, J. W. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 29–34, 2005.

PEMAN, J.; CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–60, 2009.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PEREIRA, F. O. **Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum***. 2012. 179 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

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

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, A. S.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 278–283, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; MEIS, J.F.; GOULD, I.M. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1735–1745, 2007.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.

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.

RAJASEKHA, K.K.; RAJENDRAPRASAD, Y.; SHANKARANANTH, V.; SWETHA HARIKA, K.; RAJANI, K.; PADMAVATHAMMA, M. *In silico* prediction of selected pharmacokinetic, biological and toxic properties of some 1, 3, 5-trisubstituted-2-pyrazolines

derived from isonicotinic acid. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 489-512, 2011.

RAJPUT, S. B; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 26, 2013.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M; FLOWER, R. J; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 768.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; GALGANI, J. N.; BARTLETT, M. S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A. et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 235-247, 1997.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 275-288, 2011.

ROMÁN, E.; ARANA, D. M.; NOMBELA, C.; ALONSO-MONGE, R.; PLA, J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 181-190, 2007.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. Cap. 16, p. 403-434.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275 – 280, 2004.

SHAPIRO, R. S; ROBBINS, N; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

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

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de β - citronelol sobre *Candida albicans***. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SILVA, D. R.; FERRAZ, C. M. L.; NETO-PEREIRA, B. B.; PARREIRA, D. S.; LUIZ, W.S. A candidiase na bibliografia: um panorama sintético. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2014.

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

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

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

SINGH, C.; GUPTA, N.; PURI, S. K. Geraniol-derived 1,2,4-Trioxanes with potent *in-vivo* antimalarial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 3447-3450, 2003.

SINGH, S.; FÁTIMA, Z.; HAMEED, S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpene geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. **Archives Microbiology**, n. 198, p. 459-472, 2016.

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

SOUSA, J. P. **Atividade antifúngica do citral e timol sobre *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis***. 2015. 144f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos) – Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SOUZA, T. M; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COSTA, J. G. M.; SARAIVA, A. A. F.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of antimicrobial activity of antibiotics and antifungals by the use of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.). **Archives of Biological Science Belgrade**, v. 64, n. 1, p. 43-48, 2012.

TAMAGAWA-MINEOKA, R.; KATOH, N.; KISHIMOTO, S. Allergic contact cheilitis due to geraniol in food. **Contact Dermatitis**, v. 56, n. 4, p. 242-243, 2007.

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

TINTINO, S. R.; CUNHA, F. A. B.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M. *et al.* Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 157-162, 2013.

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

URSU, O.; OPREA, T. I. Model-Free Drug-Likeness from Fragments. **Journal Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 8, p. 1387-1394, 2010.

URSU, O.; RAYAN, A.; GOLDBLUM, A.; OPREA, T. I. Understanding drug-likeness. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, n. 5, p. 760-781, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VAZQUEZ, J. A. Combination Antifungal Therapy for Mold Infections: Much Ado about Nothing? **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1889-1901, 2008.

YAMAMOTO, A. I.; MORITA, A. ; TSUJI, T.; SUZUKI, K. ; MATSUNAGA, K. Contact urticária from geraniol. **Contact Dermatitis**, v. 46, n. 1, p. 52-52, 2002.

WALKER, G.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. (Editor). **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd., 2005, p. 1-10.

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

WISPELWEY, B.; PARSONS, C. H. Agentes antifúngicos. In: BRODY. **Farmacologia Humana**. Editores: MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. Editores consultores: LARNER, J.; BRODY, T. M. Tradução da 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 50, p. 593-602.

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, p. 1181-1190, 2011.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; RATHOD, V.; KARUPPAYIL, S. M. Evolution of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. **Mycoses**, v. 54, p. 99-109, 2010.