



Universidade Federal
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

FELLIPE PEDROSA ARAÚJO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL E DO
CITRONELOL ASSOCIADOS COM ANFOTERICINA B E COM O
CETOCONAZOL**

CUITÉ
2012

FELLIPE PEDROSA ARAÚJO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL E DO
CITRONELOL ASSOCIADOS COM ANFOTERICINA B E COM O
CETOCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção
do título de bacharel em Farmácia pela
Universidade Federal de Campina Grande.

ORIENTADOR: Prof. Dr. WYLLY ARAÚJO DE OLIVEIRA

CUITÉ
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

A663e Araújo, Fellipe Pedrosa.

Estudo da atividade antifúngica do geraniol e do citronelol associados com anfotericina B e com o cetoconazol. / Fellipe Pedrosa Araújo – Cuité: CES, 2012.

49 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2012.

Orientador: Wylly Araújo de Oliveira.

1. *Candida albicans*. 2. Geraniol. 3. Citronelol. I. Título.

CDU 615.1

FELLIPE PEDROSA ARAÚJO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO GERANIOL E DO
CITRONELOL ASSOCIADOS COM ANFOTERICINA B E COM O
CETOCONAZOL**

Trabalho de conclusão de curso aprovado em 19 de outubro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

Universidade Federal de Campina Grande – Orientador

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano

Universidade Federal de Campina Grande – Examinador

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

Universidade Federal de Campina Grande - Examinador

CUITÉ

2012

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Josué Alves Pedrosa e Maria Elza Pedrosa de Araújo.

Fellipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, em primeiro lugar, pelo amparo e suporte nesta luta.

Agradeço à meu pai e à minha mãe!

Por tornarem possível a minha existência e pelo amor incondicional devotado a mim.

Eu amo vocês. Sou muito grato por tudo.

Agradeço à minha irmã, a quem estou ligado pelo amor, pelo sangue e pelas raízes ancestrais.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira, por não medir esforços para conseguir material necessário ao desenvolvimento desta pesquisa, pelo carinho, pela compreensão e pela orientação dada no decorrer de todo o trabalho.

Agradeço aos responsáveis pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba, que gentilmente doaram as cepas fúngicas utilizadas no estudo.

Agradeço à Daisy Dayane Formiga de Souza Lima e à Patrícia Duarte Costa Silva pela parceria durante o trabalho.

Agradeço à Emanuelle Dias, minha namorada, pelo amor, apoio e companheirismo nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo constante incentivo.

Agradeço aos amigos de curso. Em especial, a Juciara, Fidel, Alaine, Monique, Cida, Hugo e Paula, que durante todo o trajeto do curso ofereceram muita atenção, dedicação e carinho.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida e deixaram exemplo de educação.

Agradeço à Universidade Federal de Campina Grande por proporcionar o conhecimento científico.

Foi com grande satisfação que realizei este Trabalho de Conclusão de Curso.

Muito obrigado a todos vocês!

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu
tamanho original”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas em humanos, com a candidemia sendo a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequentemente isolada. A resistência fúngica aos agentes terapêuticos disponíveis está aumentando, como reflexo do crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e tratamento empírico com antifúngicos. Na tentativa de se transpor esta realidade têm-se buscado estabelecer e avaliar novas terapias alternativas e o estudo da interação entre óleos essenciais de plantas ou seus constituintes isolados com drogas antimicrobianas surge como alternativa frente aos problemas de resistência fúngica e toxicidade. O presente trabalho teve como objetivo verificar a atividade da associação do geraniol + anfotericina B, geraniol + cetoconazol, citronelol + anfotericina B e citronelol + cetoconazol frente a *Candida albicans*, utilizando a técnica de checkerboard. Nesta técnica é verificado o crescimento fúngico quando o microrganismo é exposto a diversas concentrações das drogas em associação. De acordo com os valores dos Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), nenhuma das quatro associações apresentaram atividade sinérgica, sendo todas indiferentes (geraniol + anfotericina B, geraniol + cetoconazol, citronelol + anfotericina B e citronelol + cetoconazol). Embora, em nenhuma das combinações estudadas tenha sido apresentado sinergismo, o não antagonismo da associação de óleos essenciais ou seus constituintes isolados com drogas sintéticas é relatada como uma alternativa bastante promissora no combate ao avanço da resistência fúngica e diminuição dos efeitos tóxicos, este tipo de alternativa vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa.

Palavras-chaves: *Candida albicans*, geraniol, citronelol, anfotericina B, cetoconazol, checkerboard

ABSTRACT

Yeasts of the genus *Candida* are the most common cause of invasive fungal infections in humans, with the candidemia being the fourth most common cause of nosocomial infections in the United States and in other developed countries, being *Candida albicans* the most frequently isolated species. The fungal resistance to the therapeutic agents available is increasing, as a reflex of the growth of the immune-compromised population and the increasingly frequent use of prophylaxis and empiric treatment with antifungal. In the attempt of transposing this reality it has searched to establish and evaluate new alternative therapies and the study of the interaction between plants essential oils or its isolated constituents with antimicrobial drugs arises as alternative before the problems of fungal resistance and toxicity. The present work aimed to verify the activity of the association of geraniol + amphotericin B, geraniol + ketoconazole, citronellol + amphotericin B and citronellol + ketoconazole in the face of *Candida albicans*, utilizing the checkerboard technique. In this technique it is verified the fungal growth when the microorganism is exposed to diverse concentrations of the drugs in association. According to the values of the Fractional Inhibitory Concentration Indices (FICI) none of the four associations presented synergic activity, being all indifferent (geraniol + amphotericin B, geraniol + ketoconazole, citronellol + amphotericin B and citronellol + ketoconazole). Although in none of the combinations studied synergism has been presented, the non-antagonism of the association of essential oils or its isolated constituents with synthetic drugs is related as a rather promising alternative in the combat to the advance of the fungal resistance and decrease of the toxic effects, being studied for many research groups.

Keywords: *Candida albicans*, geraniol, citronellol, amphotericin B, ketoconazole, checkerboard.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC – 5-Fluorocitosina

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

CVV – Candidíase Vulvovaginal

CVVR – Candidíase Vulvovaginal Recorrente

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

MFS – Major Facilitator Superfamily

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

PDR – Pleiotropic Drug Resistance

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química do citronelol e do geraniol	24
FIGURA 2. Esquema representativo da metodologia de checkerboard.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol contra <i>Candida albicans</i>	31
TABELA 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do geraniol com anfotericina B sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12	31
TABELA 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do geraniol com cetoconazol sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12	32
TABELA 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelol com anfotericina B sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12.....	32
TABELA 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelol com cetoconazol sobre cepa de <i>C. albicans</i> ICB-12	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	15
3.1.1 Candidíases	16
3.1.2 Candidemia	18
3.2 Terapia antifúngica	19
3.2.1 Anfotericina B e Cetoconazol	20
3.2.2 Limitações dos antifúngicos sintéticos	22
3.3 Produtos Naturais	23
3.3.1 Geraniol e Citronelol	23
3.4 Associação de substâncias – técnica de checkerboard	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Local do estudo	27
4.2 Cepa fúngica	27
4.3 Antifúngicos e substâncias testadas	27
4.4 Inóculo	27
4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol	28
4.6 Ensaio de sinergismo – técnica de checkerboard	28
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* continuam sendo responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em ambientes hospitalares e ambientes comunitários. Sua presença na microbiota humana propicia a ocorrência de infecções, principalmente devido aos fatores de virulência do fungo e a interação com pacientes hospitalizados com debilidade do sistema imunológico (VASQUEZ *et al.*, 1993).

A frequência de infecções por espécies de *Candida spp.* tem aumentado nas últimas décadas, tornando a candidemia uma infecção presente nos hospitais. Nos EUA, a taxa de fungemia entre 1980 e 1990 aumentou em torno de quatro vezes. Em 1990, cerca de 10% de todas as infecções sangüíneas foram por *Candida sp.* Atualmente, essas infecções representam o quarto lugar entre as adquiridas no ambiente hospitalar (ZARDO, 2004; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

Candida albicans é, sem dúvida a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Trata-se de levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência, a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento (LIMA *et al.*, 2006). Após a introdução dos azóis, que possuem uma bioviabilidade oral e uma baixa incidência de efeitos colaterais, uma nova era no tratamento de infecções de fungos começou. Depois de muito tempo observou-se que o tratamento com azóis estava fracassando. Estudos relataram que um dos motivos para este fracasso ocorreu devido à resistência de *Candida spp.* aos agentes antifúngicos (CASTRO *et al.*, 2006).

Devido aos problemas de resistência, toxicidade e de custos elevados, a busca por novas terapias desperta o interesse dos pesquisadores. A associação de óleos essenciais ou seus constituintes isolados com drogas antimicrobianas sintéticas surge como uma alternativa promissora. Muitos trabalhos, cujo foco principal é a combinação destas substâncias pela técnica de checkerboard, já foram desenvolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antifúngica da associação entre geraniol e citronelol com a anfotericina B e cetoconazol frente à cepa *Candida albicans* ICB-12, através do método de checkerboard.

2.2 Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol e do citronelol frente à cepa *Candida albicans* ICB-12;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B e do cetoconazol frente à cepa *Candida albicans* ICB-12;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (técnica de checkerboard) das seguintes associações: geraniol + anfotericina B, geraniol + cetoconazol, citronelol + anfotericina B, citronelol + cetoconazol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, caracteristicamente esféricas ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente encontradas na natureza: são frequentemente encontradas como um pó branco cobrindo folhas e frutas. As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo. Podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor de elétrons. Esse é um atributo valioso porque permite que esses fungos sobrevivam em vários ambientes. Se houver acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Essa fermentação é usada na fabricação de cerveja, do vinho e nos processos de panificação. Um exemplo de leveduras de importância clínica são as que pertencem ao gênero *Candida* (TORTORA, 2005).

O gênero *Candida* pertence ao reino *Fungi*, grupo *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e faz parte da família *Criptococcacea*. As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, entretanto outras espécies emergentes deste gênero têm sido isoladas em diversos casos de candidíase e candidemias (DALAZEN *et al.*, 2011).

Espécies de *Candida* são os principais agentes de infecção fúngica, levando a um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde a doença mucocutânea até infecções invasivas, associadas com elevada letalidade. Os mecanismos de defesa do hospedeiro têm papel crucial na epidemiologia destas infecções; embora candidíase ocorra com maior frequência no indivíduo imunocomprometido, como exemplificado por infecções mucocutâneas recorrentes em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a candidíase invasiva tem sido claramente associada nas últimas décadas ao uso de múltiplos procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana de largo espectro em pacientes imunocompetentes criticamente enfermos, muitos deles admitidos em unidades de terapia intensiva (PASQUALOTTO, 2004).

Candida albicans, a espécie de *Candida* mais importante é uma levedura oval com brotamento único. Compõe a microbiota normal das membranas mucosas do trato

respiratório superior, gastrintestinal e genital feminino. Nos tecidos pode apresentar-se na forma de levedura ou como pseudo-hifa que são leveduras alongadas, visualmente semelhantes a hifas, mas que não são hifas verdadeiras (SERRACARBASSA, 2003; LEVINSON, 2010).

Segundo Murray (2006), os principais fatores de virulência de *C. albicans* são: 1) a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios: é considerada importante nos estágios iniciais da infecção; a adesão é adquirida por uma combinação de mecanismos específicos (interação ligante-receptor) e inespecíficos (forças eletrostáticas e de van der Waals), 2) o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular: a transformação de levedura em hifa é uma resposta a alterações no microambiente sendo regulada tanto por pH quanto por temperatura, 3) a produção de enzimas como proteinases que hidrolisam as proteínas do hospedeiro envolvidas em defesas contra a infecção, permitindo que as leveduras rompam barreiras do tecido conjuntivo e fosfolipases que lesam as células do hospedeiro, sendo consideradas importantes na invasão tecidual, 4) a termotolerância significativa.

3.1.1 Candidíases

A candidíase é uma infecção primária ou secundária, aguda ou crônica, envolvendo membros do gênero *Candida*. Candidíases emergiram como um problema médico significativo ao término do século XX, pela prevalência das infecções oportunistas em pacientes infectados com vírus HIV e em outros casos clínicos de imunossupressão e infecções superficiais ainda continuam infestando o hospedeiro normal, especialmente em climas quentes (ANDRADE, 2004).

As leveduras do gênero *Candida spp.* constituem um fungo presente na microbiota da pele e mucosa do homem desde o nascimento (RIBEIRO *et al.*, 2004; ÁLVARES, 2007). Espécies de *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Elas são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida spp.* na vagina. Estes microorganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o

comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida spp. podem colonizar as mucosas ou estar associadas a quadros de vulvovaginites, candidíase laríngea, candidíase oral, entre outros, sendo que dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é, sem dúvida, a principal causadora de tais infecções (BOATTO *et al.*, 2007).

Infecções por *Candida spp.* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção por *Candida spp.*, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida spp.* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A maioria dos indivíduos desenvolve defesas imunológicas que impedem sua proliferação e progressão para o desenvolvimento de candidíase localizada ou disseminada. Em algumas situações específicas onde ocorrem deficiências imunológicas, como por exemplo, o uso crônico de corticosteróides ou pacientes com AIDS, podem proliferar causando doenças de alta gravidade (CARVALHO *et al.*, 2003).

Segundo Dalazen *et al.* (2011), as candidíases vulvovaginal e oral são consideradas as duas formas mais comuns de infecção fúngica oportunista, e a transformação da condição assintomática para a sintomática indica uma transição da forma saprófita para a forma patógena.

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um processo infeccioso e/ou inflamatório do trato geniturinário inferior feminino, que compromete principalmente vulva e a vagina, desenvolvem-se em decorrência de infecção por leveduras, as quais podem ser habitantes normais dessa mucosa, sendo infecção bastante relevante na medicina devido ao acentuado número de atendimentos em consultórios de ginecologia (BOATTO *et al.*, 2007; FERRAZZA *et al.*, 2005).

Estima-se que cerca de 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% apresentarão candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), que se caracteriza pela apresentação de pelo menos quatro episódios em um ano. O uso de anticoncepcionais orais,

antibióticos e as várias formas de imunodeficiência podem estar envolvidos no desencadeamento destes episódios de infecção de repetição. Por outro lado, estudos indicam que 20 a 25% das mulheres saudáveis e completamente assintomáticas apresentam culturas de secreção vaginal positivas para leveduras (CARVALHO *et al.*, 2003; FERRAZZA *et al.*, 2005).

Nos Estados Unidos, a incidência de candidíase vulvovaginal dobrou na década de 1990 em relação à de 1980, ocorrendo cerca de 13 milhões de casos por ano. Infecções por outras espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. tropicalis* e *C. glabrata*, entre outras, têm sido descritas. A erradicação dessas leveduras é problemática, com recorrências frequentes, e a espécie *C. albicans* é prevalente tanto na colonização quanto nas doenças (SILVA *et al.*, 2008). A razão desse aumento é atribuída ao uso inadequado de antimicóticos (ROSA; RUMEL, 2004).

A candidíase oral acomete principalmente pacientes portadores do HIV, devido à supressão do sistema imunológico instalada nesses pacientes. Quanto à frequência da candidíase oral nos pacientes HIV positivos, há variação entre diferentes relatos, mas pode atingir até 94% dos indivíduos infectados, dependendo do estágio da infecção e da população analisada. Ressaltam a importância da candidíase oral como marcador da progressão da doença e preditivo para o aumento da imunossupressão. É caracterizada por quatro subtipos clínicos como: eritematosa; pseudomembranosa; hiperplásica e queilite angular (CAVASSANI *et al.*, 2002).

Em casuísticas de infecções urinárias por leveduras, *Candida albicans* tem sido considerada a espécie mais comumente isolada do trato urinário, sendo responsável por cerca de 50 % a 70% dos episódios, seguida por *Candida glabrata* em 5 a 33 % e outras espécies de leveduras não-*albicans* que têm sido relatadas em 8 a 28 % dos casos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

3.1.2 Candidemia

A frequência de infecções hematogênicas por *Candida spp.* (candidemia) tem aumentado consideravelmente, sendo importantes causas de morbidade e mortalidade, especialmente em unidades de terapia intensiva e/ou de assistência a pacientes críticos. O aumento na frequência de candidemia tem sido observado particularmente entre pacientes em uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral, e em pacientes expostos a

múltiplos procedimentos invasivos. Candidemia é a quarta causa mais comum de infecção na corrente sanguínea em hospitais terciários, e sua ocorrência tem sido associada à longa permanência hospitalar e alta mortalidade, sendo *C. albicans* responsável por cerca de 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais (HINRICHSEN *et al.*, 2008). No entanto, a frequência de espécies não-*albicans* (*C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) vem aumentando principalmente pelo uso prévio de fluconazol (FRANÇA *et al.*, 2008).

O fluconazol é o agente antifúngico mais utilizado mundialmente no tratamento de candidemia, tanto pela eficácia quanto pelo baixo custo de aquisição, embora tenha atividade limitada sobre *C. krusei* e *C. glabrata* que são espécies isoladas com menos frequência. A terapia inapropriada com este antifúngico, por exemplo, pode aumentar a mortalidade entre os pacientes e os custos do hospital. Assim, é de extrema importância a realização rotineira de testes de susceptibilidade para determinar a espécie fúngica envolvida na infecção e, conseqüentemente, para determinar a terapia mais eficaz (SILVA, 2008).

3.2 Terapia antifúngica

Os fungos são seres eucarióticos, ou seja, apresentam estrutura celular semelhante às células dos seres humanos, ao contrário das bactérias que são procarióticas. Isso explica o fato de que a terapia antifúngica sistêmica disponível é bastante limitada se comparada com a quantidade de drogas antibacterianas comercialmente disponíveis, pois devido a essa semelhança estrutural alguns compostos antifúngicos são consideravelmente mais tóxicos que os agentes bacterianos (FUCHS, 2004). Desta forma, inicialmente os agentes antifúngicos disponíveis tinham ação pouco efetiva e não-específica, sendo o iodeto de potássio um dos primeiros compostos utilizados a partir de 1903, mas que ainda hoje mantêm importância em alguns tratamentos, como nos casos de esporotricose (BOFF, 2007).

Os principais grupos de agente antifúngicos, em uso no presente momento no Brasil, com ação sobre espécies de *Candida*, compreendem os antifúngicos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os derivados azólicos, que possuem dois ou três átomos de nitrogênio no anel azólico e são denominados como imidazólicos (cetoconazol e miconazol) ou triazólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol). Dentre os antifúngicos empregados na terapia deste fungo leveduriforme, a anfotericina B tem sido considerada o mais efetivo. Possui atividade fungicida *in vivo* e *in vitro* contra leveduras (*Candida spp* e *C. neoformans*) e

fungos filamentosos (*Aspergillus spp*, zigomicetos e fungos demáceos), além dos fungos dimórficos, no entanto, sua formulação endovenosa tem limitado seu uso devido à alta toxicidade hepática, frequentemente associada com disfunção renal (RIBEIRO *et al.*, 2004).

3.2.1 Anfotericina B e Cetoconazol

A anfotericina B é uma mistura de substâncias antifúngicas derivadas de culturas de *Streptomyces*. Estruturalmente, estas são moléculas muito grandes (“macrolídeos”), que pertencem ao grupo poliênico dos agentes antifúngicos (RANG; DALE, 2007). O nome anfotericina provém de anfótero, que significa que uma molécula pode reagir como ácido frente a bases fortes e como base frente a ácidos fortes (SILVA, 2006).

A maioria dos agentes causadores de micoses profundas é sensível à anfotericina B, principal antifúngico para controle de infecções graves. Seu espectro de ação inclui fungos patogênicos e oportunistas, mas anfotericina B não é efetiva nas dermatofitoses superficiais (FUCHS, 2004).

Mesmo sendo a anfotericina B, atualmente, o antifúngico mais eficaz disponível, seu uso é restrito pela sua toxicidade sistêmica e local. A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes. Efeitos colaterais, como: distúrbios gastrintestinais, febre, calafrios, tromboflebite, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações alérgicas e parada cardíaca, podem ocorrer durante a infusão rápida da droga (CASTRO *et al.*, 2006).

A anfotericina B, atua ligando-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas levando à morte celular (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Segundo Fuchs (2004), a atividade da anfotericina B pode ser alterada, *in vitro*, pela combinação com outros fármacos. Rifampicina reduz as concentrações necessárias para inibir o crescimento de *Aspergillus*, *Histoplasma* e *Candida*, mas esse efeito não se mostrou consistente em infecções experimentais. Relato de caso acompanhado de estudos de sinergismo *in vitro*, sugere benefício com essa associação em infecções por *Rhizopus sp*. Minociclina aumenta a atividade *in vitro* da anfotericina B contra *Candida* e *Cryptococcus*, mas não há qualquer dado clínico embasando o uso da combinação. Associação de

anfotericina B e flucitosina, por outro lado, foi superior ao uso isolado dos fármacos contra *Candida* e *Cryptococcus in vitro*, em animais e meningite criptocócica humana. Essa combinação é recomendada no tratamento de infecções graves por esses fungos. Associação de antifúngicos azólicos e anfotericina B pode ser antagônica, já que os primeiros inibem a síntese do ergosterol, sítio de ligação de anfotericina B. As interações podem variar com o fungo, teste de sensibilidade e fármaco, assim como o modelo experimental empregado.

A grande maioria dos estudos mostrou antagonismo entre anfotericina B e fluconazol contra *Candida albicans*. Em relação ao itraconazol, dois estudos mostraram claro antagonismo com anfotericina B, inclusive com maior mortalidade em animais de experimentação com candidíase tratados com a associação. Por outro lado a associação anfotericina-fluconazol foi aditiva ou sinérgica contra *Cryptococcus neoformans*, *in vitro* e *in vivo*. As implicações clínicas desses achados devem ser questionadas, pois modelos experimentais diferem das infecções humanas com relação a patogênese e tratamento, e analisaram-se poucas cepas de fungos. Assim não se recomenda a associação rotineira de imidazólicos e anfotericina B. Há evidências de sinergismo com terbinafrina e caspofungina (FUCHS, 2004).

O cetoconazol é um dos representantes dos antifúngicos imidazólicos, juntamente com o clotrimazol e o miconazol. O clotrimazol foi o primeiro imidazol estudado, porém sua capacidade de induzir enzimas microsossomais do fígado limitou seu uso sistêmico. O miconazol é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal e deve ser administrado por via intravenosa (CASTRO *et al.*, 2006).

O cetoconazol é um imidazol aprovado como antifúngico sistêmico em 1981 (MARTINS *et al.*, 1997). Este fármaco atua inibindo uma enzima pertencente à rota biossintética do ergosterol conhecida como lanosterol 14- α -demetilase, que é codificada pelo gene ERG11 em *Candida*. A exposição das células fúngicas cetoconazol causa depleção do ergosterol e acumulação de esteróis 14- α -metilados, tais como lanosterol e 14- α -metil-3,6-diol, que afetam a estrutura da membrana, alterando sua fluidez e a atividade das enzimas a ela ligadas (SCHEID, 2007).

A dose de 200 a 800mg/kg ao dia é variável de acordo com o tipo de infecção que se pretende tratar. Apresenta uma baixa porcentagem de efeitos tóxicos graves. São relatadas náuseas, vômitos e diarreia. Foram reportados casos de disfunção hepática variando de elevação assintomática das enzimas até necrose hepática fatal. O cetoconazol possui uma excelente ação *in vitro* e *in vivo* contra a maioria das espécies de *Candida*. Acredita-se que, para o tratamento ser eficaz, o antifúngico deva ser administrado por longos períodos. O

cetoconazol está indicado nos casos de corioretinite presumida por *Candida* sem associação com candidemia ou nos pacientes severamente debilitados que não podem receber a anfotericina B intravenosa (CASTRO *et al.*, 2006).

3.2.2 Limitações dos antifúngicos sintéticos

A resistência dos fungos aos agentes terapêuticos disponíveis está aumentando, como reflexo do crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e tratamento empírico com antifúngicos. A resistência predomina com imidazólicos, especialmente com fluconazol, mas também têm aumentado para a anfotericina B. (FUCHS, 2004).

São conhecidos três mecanismos de resistência aos azólicos. 1- Redução do acúmulo intracelular do fármaco resultante da utilização reduzida deste agente antifúngico ou do aumento da excreção do fármaco devido à ação de produtos de genes de resistência aos antifúngicos; 2- Alteração estrutural da enzima 14- α -demetilase, resultando em uma diminuição na sua ligação aos azólicos; 3- Síntese aumentada de 14- α -demetilase, devido a amplificação do gene (transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico) (COSTA, 2009).

O mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo, sendo que o ergosterol dá lugar à formação de outros lipídios. Apesar de poucos relatos de resistência a este fármaco, seu uso tem sido limitado devido aos efeitos nefrotóxicos e à dificuldade na sua administração que deve ser feita por via endovenosa (COSTA, 2009).

Diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos sintéticos, as espécies de *Candida* têm se mostrado resistentes. Com o objetivo de identificar substâncias alternativas ao uso de medicamentos tradicionais, estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e de seus componentes isolados em associação com drogas antifúngicas sintéticas vêm sendo desenvolvidos. Dessa forma, a busca de produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente, frente a microrganismos resistentes se mostra como uma alternativa no controle de infecções fúngicas (CAVALCANTI, 2011).

3.3 Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade, desde tempos imemoriais, como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais, objetivando a busca por alívio e cura de doenças através do uso de ervas e consistindo, possivelmente, uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. É crescente a utilização e a demanda de produtos naturais, em todo o mundo, especialmente devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (MACHADO; FERNANDES-JÚNIOR, 2011).

Dentre as terapias naturais, a fitoterapia é a que mais se destaca. Desta maneira, as plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde, tradicionalmente constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais (OE), utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (MACHADO; FERNANDES-JÚNIOR, 2011).

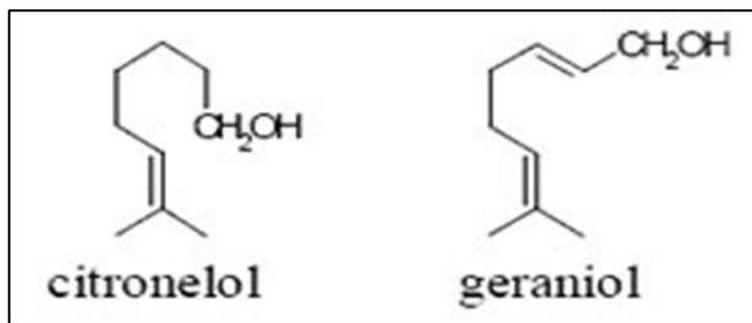
Os óleos essenciais são responsáveis por conferir aroma e sabor característico às plantas e são relacionados à atração de polinizadores, proteção contra insetos e diversas funções necessárias à sobrevivência da planta. Os OE apresentam composição complexa, sendo os terpenos considerados a classe de substâncias mais encontrada nas plantas. A composição química do óleo pode apresentar variação devido à fatores ambientais e de manejo das plantas bem como da forma de extração e armazenamento, interferindo na atividade antimicrobiana (ZAGO *et al.*, 2009).

Desta forma, os óleos essenciais representam uma fonte valiosa pela busca de novas drogas, sendo um assunto de grande importância no cenário mundial, pois a adequada vigilância na competição entre fungos e humanos, nos remete à informação de que novos alvos susceptíveis e novos agentes continuarão sendo requeridos para uma terapia mais efetiva (PEREIRA, 2009).

3.3.1 Geraniol e Citronelol

O citronelol e o geraniol (figura 1) são constituintes dos óleos essenciais de espécies do gênero *Cymbopogon*. O gênero *Cymbopogon* possui mais de 100 espécies nos países tropicais, inclusive no Brasil, dentre as quais, aproximadamente 56 são aromáticas. A algumas delas deve-se dar atenção especial pelo grande uso na medicina popular e teor de óleo essencial com as mais diferentes finalidades, como uso terapêutico, cosmético ou em perfumaria. Dentro deste gênero encontram-se *C. winterianus*, *C. martinii*, *C. nardus* e *C. flexuosus*. A destilação destas plantas produz óleo essencial com uma grande variação de componentes como: citronelal, citral, citronelol, geraniol, dentre outros. Assim como a composição, o rendimento do óleo essencial é variável entre estas espécies. As folhas são usadas como chás após secagem, enquanto o óleo essencial extraído é utilizado em alimentos, cosméticos e medicamentos. Os constituintes dos óleos essenciais encontrados nas diferentes espécies são influenciados pelo material genético, condições de cultivo e ambientais, e pela colheita e processamento pós-colheita (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

FIGURA 1: Estrutura química do citronelol e do geraniol



Fonte: <http://www.sofi.com.br/node/15737>

De acordo com estudo realizado por Scherer *et al.* (2009), os compostos majoritários encontrados no óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) foram o β-citronelal (45%), geraniol (20,71%) e β-citronelol (14,49%), além de outros compostos com área superior a 1%. No óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*), o geraniol constituiu mais de 80%, sendo o acetato de geranila o segundo composto em maior percentagem (12%).

Em estudo realizado por Nunes *et al.* (2011) foi comprovada a atividade antimicrobiana de sete terpenóides, entre eles, o geraniol e o citronelol. Os resultados mostraram que as leveduras de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* quando tratadas com CIM de citral, citronelal, citronelol e geraniol, tiveram a respiração inibida. Geraniol foi o terpenóide com maior atividade microbicida sobre *C. albicans*. Citral, citronelol, citronelal e geraniol induziram a perda de componentes celulares tanto em *C. albicans* quanto em *S. cerevisiae*.

3.4 Associação de substâncias – técnica de checkerboard

A associação de substâncias e o estudo do efeito interativo entre elas tem uma longa história. O estudo do uso de duas ou mais substâncias em associação tem início com a realização de ensaios *in vitro* que indicam interações positivas capazes de promover a inibição do crescimento de microrganismos. Atualmente estão disponíveis vários protocolos experimentais que mensuram os efeitos de combinações de substâncias. Um dos modelos mais simples e utilizados é o teste de checkerboard, que proporciona uma disposição bidimensional de concentrações diferentes das substâncias avaliadas, permitindo o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) (CASTRO, 2010).

O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) é a forma mais comum para relatar resultados de estudos com o método checkerboard, e é a concentração mais baixa de cada droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CUENCA-ESTRELA, 2004).

Sinergismo é uma interação positiva entre dois compostos, possuindo como principais mecanismos: 1- inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica; 2- melhor penetração de um antifúngico como resultado da ação de outro antifúngico na parede celular ou membrana citoplasmática; 3- interação de transporte; 4- inibição simultânea de diferentes alvos na célula fúngica; 5- atividade fungicida rápida. E o antagonismo, por outro lado, é uma interação negativa, onde os mecanismos de antagonismo são: 1- ações de dois antifúngicos no mesmo sítio de ação podem resultar em baixa da habilidade do outro agente exercer sua atividade no mesmo local, ou em um sítio alterado; 2- a adsorção de um agente na superfície do fungo inibe a ligação de outro agente antifúngico no sítio de ação; 3- modificação de um alvo após a prévia exposição a outro agente (JOHNSON *et al.*, 2004; ARGENTA, 2008).

Segundo Barbosa (2011), o uso combinado de agentes antimicrobianos buscará sempre um incremento no papel terapêutico das drogas.

A associação entre antimicrobianos convencionais ou a combinação destes com produtos naturais tem sido reportada por alguns autores (KUIPERS *et al.*, 1999; GÓMEZ-LÓPEZ *et al.*, 2003; MELETIADIS *et al.*, 2006; ROSATO *et al.*, 2007; CÓRDOBA *et al.*, 2008; SAAD *et al.* 2010; AMBER *et al.*, 2010). Rosato *et al.*, (2008) verificaram que o óleo essencial de *Pelargonium graveolens* quando associado com anfotericina B endovenosa apresentou atividade sinérgica frente a espécies de *Candida*.

A atividade da associação de drogas antifúngicas sintéticas foi avaliada por Córdoba *et al.*, (2008). Esses autores observaram que a associação de terbinafrina com

voriconazol apresentou atividade sinérgica contra 21 de 29 isolados clínicos de *Fusarium spp.* enquanto que a associação de anfotericina B com voriconazol foi sinérgica contra apenas 5 cepas. Meletiadis *et al.*, (2006) verificaram a presença de sinergismo na associação entre anfotericina B e itraconazol contra cepas de *Aspergillus fumigatus* obtidas de isolados clínicos. Gómez-López *et al.*, (2003) observaram que a associação do itraconazol com terbinafina apresentou um potente efeito sinérgico contra isolados clínicos de *Zygomycota*.

Desta forma, o estudo e a descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada com antibióticos/antifúngicos de uso comum podem representar uma nova forma de fazer frente aos microrganismos multirresistentes (CASTRO, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Os estudos foram realizados nos laboratórios de Bioquímica e Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande.

4.2 Cepa fúngica

A cepa testada, *Candida albicans* ICB-12, é proveniente da coleção do laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

4.3 Antifúngicos e substâncias testadas

Como antifúngicos, foram utilizados a anfotericina B e o cetoconazol. O geraniol e o citrionelol, substâncias utilizadas no ensaio de sinergismo, foram obtidas comercialmente na Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

4.4 Inóculo

Culturas de *Candida albicans* ICB-12 foram semeadas em tubos de ensaio contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado e incubadas durante 24-48 horas a 37°C. A partir do tubo com ASD, foram retiradas colônias do microrganismo para preparar as suspensões. As suspensões do microrganismo foram preparadas no momento da realização dos testes em tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, tais suspensões foram agitadas durante 1-2 minutos com auxílio do

aparelho Vortex®. A padronização do inóculo foi realizada obedecendo a escala 0,5 de McFarland, que equivale a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, o que foi confirmado por realização de leitura através de espectrofotômetro a 625nm (transmitância 85%). (HADACEK; GREGER, 2000; SOUZA et al., 2007; MAHBOUBI; BIDGOLI, 2010).

4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada uma das drogas testadas foi determinada pelo método da microdiluição de acordo com as normas do NCCLS, com algumas modificações. Inicialmente, em uma placa com 96 cavidades, foi adicionado 100µL do Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) duplamente concentrado aos pocinhos. Posteriormente foi adicionado 100µL da emulsão do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol aos pocinhos da 1ª linha da placa, de modo que a concentração inicial nesses pocinhos foi ajustada mediante cálculos adquirindo valores iguais a 2000µg/mL, 2000µg/mL, 1µg/mL e 256µg/mL, respectivamente. Em seguida, a partir dos pocinhos da 1ª linha da placa, foram realizadas diluições seriadas 1:2 até as cavidades da 11ª linha. As cavidades da 12ª linha foram utilizadas para a realização dos controles positivo e negativo da placa. Por fim, foi adicionado 10µL do inóculo da suspensão fúngica nas cavidades. O experimento foi realizado com aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC do microrganismo em cada cavidade. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Em 24-48 horas houve a observação do crescimento fúngico. A CIM foi considerada como a menor concentração da substância que inibiu o crescimento do microrganismo através da leitura visual das placas de 96 cavidades. Os experimentos foram realizados em triplicata. Desta forma foi determinada a CIM do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol.

4.6 Ensaio de sinergismo – técnica de checkerboard

Os efeitos combinados das associações testadas, geraniol + anfotericina B, geraniol + cetoconazol, citronelol + anfotericina B e citronelol + cetoconazol, foram

Após o preenchimento, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 – 48 horas. Após este período foi observado visualmente o crescimento fúngico para a determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

Para avaliar o efeito das combinações, a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi calculada para cada substância em combinação. As seguintes fórmulas foram utilizadas para calcular o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF): CIF de A = CIM da droga A em combinação/ CIM A sozinho, CIF de B = CIM da droga B em combinação/ CIM B sozinho, e o ICIF = CIF da droga A + CIF da droga B. A seguinte fórmula geral também pode ser utilizada para calcular o índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF): $ICIF = (CIM \text{ da droga A em combinação} / CIM \text{ da droga A sozinha}) + (CIM \text{ da droga B em combinação} / CIM \text{ da droga B sozinha})$. As associações foram consideradas como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$), indiferentes ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônicas ($ICIF > 4$) de acordo com o valor do ICIF (WHITE *et al.*, 1996).

5. RESULTADOS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada uma das substâncias testadas contra *Candida albicans* está apresentada na tabela 1.

Os valores da CIM do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol contra a cepa de *Candida albicans* ICB-12 foram respectivamente, 250 µg/mL, 250 µg/mL, 0,03 µg/mL e 64 µg/mL.

TABELA 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol, do citronelol, da anfotericina B e do cetoconazol contra *Candida albicans*.

CEPA	Geraniol (µg/mL)	Citronelol (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)	Cetoconazol (µg/mL)
ICB-12	250	250	0,03	64

Foram realizados testes de associação, via checkerboard, entre o citronelol e os antifúngicos cetoconazol e anfotericina B, assim como, entre o geraniol e os mesmos antifúngicos. Os resultados estão expressos nas tabelas 2 a 5.

O geraniol quando associado com a anfotericina B teve a sua CIM diminuída pela metade, a CIM da anfotericina B passou de 0,03 µg/mL para 0,00375 µg/mL. A associação das substâncias foi classificada como indiferente já que o resultado do índice de concentração inibitória fracionada foi igual a 0,625.

TABELA 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do geraniol com anfotericina B sobre cepa de *C. albicans* ICB-12

Cepa	CIM das drogas associadas (µg/mL)		CIF ^a		ICIF ^b
	Geraniol	Anfotericina B	Geraniol	Anfotericina B	
ICB-12	125	0,00375	0,5	0,125	0,625

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF

Quando o geraniol foi associado com o cetoconazol a sua CIM caiu pela metade, a mesma coisa aconteceu com a CIM do cetoconazol, que passou de 64 $\mu\text{g/mL}$ para 32 $\mu\text{g/mL}$. A associação mostrou-se indiferente, pois o índice de concentração inibitória fracionada foi igual a 1.

TABELA 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g/mL}$) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada depois da combinação do geraniol com cetoconazol sobre cepa de *C. albicans* ICB-12

Cepa	CIM das drogas associadas ($\mu\text{g/mL}$)		CIF ^a		ICIF ^b
	Geraniol	Cetoconazol	Geraniol	Cetoconazol	
ICB-12	125	32	0,5	0,5	1

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF

Quando o citronelol foi associado com a anfotericina B a CIM do citronelol permaneceu inalterada, enquanto a CIM da anfotericina B variou de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ para 0,00375 $\mu\text{g/mL}$, o que representa uma CIM 8 vezes menor; isto representa um índice de concentração inibitória fracionada correspondente a 1,125, que indica indiferença entre as duas substâncias.

TABELA 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g/mL}$) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelol com anfotericina B sobre cepa de *C. albicans* ICB-12.

Cepa	CIM das drogas associadas ($\mu\text{g/mL}$)		CIF ^a		ICIF ^b
	Citronelol	Anfotericina B	Citronelol	Anfotericina B	
ICB-12	250	0,00375	1	0,125	1,125

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF

Já quando o citronelol foi associado com o cetoconazol sua CIM passou de 250 $\mu\text{g/mL}$ para 125 $\mu\text{g/mL}$. A CIM do cetoconazol variou de 64 $\mu\text{g/mL}$ para 8 $\mu\text{g/mL}$. O índice de concentração inibitória fracionada referente a esta associação foi igual a 0,625, o que representa indiferença na associação de ambas as substâncias.

TABELA 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g/mL}$) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelol com cetoconazol sobre cepa de *C. albicans* ICB-12.

Cepa	CIM das drogas associadas ($\mu\text{g/mL}$)		CIF ^a		ICIF ^b
	Citronelol	Cetoconazol	Citronelol	Cetoconazol	
ICB-12	125	8	0,5	0,125	0,625

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF

Percebe-se através dos resultados que todas as associações estudadas foram indiferentes, pois todas as ICIFs situaram-se entre 0,5 e 4,0.

6. DISCUSSÃO

As infecções por *Candida spp.* tornaram-se problema de saúde pública em diferentes centros em todo o mundo, principalmente devido ao fenômeno da resistência (NUCCI, 2003; SANGLARD et al., 1995). Segundo Cowen *et al.* (2002), resistência à droga antifúngica tem sido classificada como primária, quando um fungo é resistente a uma droga antes de qualquer exposição, ou secundária, quando um fungo inicialmente sensível torna-se resistente após exposição à droga. Espécies fúngicas exibem perfis de susceptibilidade intrinsecamente diferentes para diferentes medicamentos, com cada uma das espécies mostrando distribuição de CIMs distintas. Por exemplo, *Cryptococcus neoformans* e várias espécies de *Aspergillus* são resistentes a 5-FC (5-Fluorocitosina). *Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii*, bem como espécies de *Fusarium* e *Trichosporon*, são mais resistentes a anfotericina B do que *Candida albicans*. *C. neoformans* e várias espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei* e *C. glabrata*, são resistentes a muitos dos fármacos azólicos. Não surpreendentemente, espécies de *Candida*, que são intrinsecamente mais resistentes aos azólicos, surgiram como importantes patógenos oportunistas após a implantação generalizada destas drogas. Kriengkauykiat *et al.* (2011), relatam que os patógenos fúngicos podem apresentar vários mecanismos de resistência.

Segundo Sanglard *et al.* (1995) e White *et al.* (1998), os principais mecanismos de resistência fúngica aos derivados azólicos incluem:

- Redução da susceptibilidade da enzima 14- α -demetilase;
- Amplificação do gene 14 DM, codificando a superprodução da enzima 14- α -demetilase e, conseqüentemente, requerendo maiores doses do azólico para inibição do fungo;
- Alterações na relação fosfolipídios/esterol não esterificado. O aumento dos esteróis não esterificado reduz a permeabilidade da membrana fúngica, conduzindo menor captação do antifúngico.
- Aumento da escaleno-epoxidase que é acompanhada do aumento da 14- α -demetilase, com conseqüente aumento da biossíntese do ergosterol;
- Efluxo da droga, o que consiste na saída do antifúngico do interior das células fúngicas, através do transporte ativo. Proteínas transportadoras, como a MFS (Major Facilitador Superfamily) e a glicoproteína P, são especializadas no bombeamento de algumas drogas do interior celular para o meio externo. Os genes que codificam tais proteínas estão sob

investigação e são chamados PDR (Pleiotropic Drug Resistance), porque determinam a resistência a várias drogas.

Leveduras do gênero *Candida spp.* são a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas em humanos, com a candidemia sendo a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos. O aumento da resistência do fungo às drogas clássicas, a toxicidade das substâncias disponíveis para o tratamento, e os custos envolvidos justificam a busca por novas abordagens. Dessas novas abordagens, os óleos essenciais derivados de plantas e os seus constituintes são um dos grupos mais promissores de compostos naturais para o uso na prevenção e tratamento da infecção fúngica (SILVA *et al.*, 2011).

Hemaiswarya *et al.* (2008) relatam que, desde as últimas três décadas, a taxa de morte a cada ano, devido a infecções fúngicas, tem aumentado significativamente. Com o aumento da utilização de agentes antifúngicos, há um aumento no número e na variedade de cepas fúngicas resistentes a estes fármacos. Além disso, a terapia antifúngica utilizada é muitas vezes tóxica, sendo uma das causas da baixa adesão à terapia medicamentosa. Uma terapia alternativa pode ser desenvolvida para suprimir o aparecimento de resistência antifúngica e minimizar os efeitos colaterais relacionados ao medicamento.

A utilização de óleos essenciais derivados de plantas ou de seus constituintes isolados, associados com substâncias sintéticas com atividade antifúngica surge como terapia alternativa ao uso de medicamentos tradicionais, frente ao problema do elevado crescimento de resistência aos compostos antifúngicos disponíveis comercialmente.

Para Odds (2003), há muitos modelos para delineamentos experimentais que avaliam os efeitos da combinação de substâncias e uma das formas mais conhecidas e muito simples de tais testes é o método de checkerboard, uma metodologia que permite o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), o qual demonstra se a combinação possui atividade sinérgica, indiferente ou antagônica. De acordo com Mackay *et al.* (2000), a vantagem de utilizar a técnica de checkerboard para o estudo das interações de substâncias se trata de que ela é uma técnica normalmente escolhida, porque os dados produzidos podem ser facilmente comparados com os estudos já publicados, além de simples e de fácil entendimento, embora seja de execução demorada. White *et al.* (1996), ressaltam que, apesar do método de checkerboard ser um teste relativamente de fácil execução, ele mede apenas a atividade fungistática.

Devido aos problemas de resistência, toxicidade e de custos elevados a busca por novas terapias desperta o interesse dos pesquisadores e a associação de óleos essenciais ou seus constituintes isolados com drogas antimicrobianas sintéticas surge como uma alternativa promissora. Muitos trabalhos, cujo foco principal é a combinação destas substâncias pela técnica de checkerboard, já foram desenvolvidos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as associações entre geraniol e anfotericina B, geraniol e cetoconazol, citronelol e anfotericina B e citronelol e o cetoconazol foram indiferentes contra a cepa *Candida albicans* ICB-12.

O estudo da interação de óleos essenciais e seus constituintes isolados com drogas antimicrobianas vem sendo estudando por vários pesquisadores, apresentando muitos resultados satisfatórios. Em estudo realizado por Silva *et al.* (2011) foi demonstrado que a associação do óleo essencial de *Coriandrum sativum*, cujo geraniol é um dos componentes, com anfotericina B apresentou forte sinergismo contra duas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028 e ATCC 24433), com Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) iguais a 0,375 e 0,185, respectivamente. Tendo em vista que a anfotericina B é bastante nefrotóxica e que algumas espécies de *Candida* já demonstram resistência a este antifúngico, estes resultados mostram a importância do uso da associação, já que através da combinação foi possível diminuir a concentração de anfotericina B capaz de inibir o crescimento das duas cepas de *C. albicans*.

Foi demonstrado que o citronelol e o geraniol, componentes majoritários do óleo essencial de *Pelargonium graveolens*, quando associados com norfloxacina, possuiu efeito sinérgico contra três cepas bacterianas: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213 (ROSATO *et al.*, 2007).

Pyun & Shin (2006) associaram o óleo essencial de *Allium sativum* com cetoconazol contra espécies do gênero *Trichophyton* e verificaram a ocorrência de forte atividade sinérgica para as espécies *T. rubrum*, *T. erinacei*, *T. soudanense* com ICIFs iguais a 0,12, 0,09, 0,09, respectivamente. O óleo essencial de *Pelargonium graveolens* quando associado com anfotericina B endovenosa apresentou atividade sinérgica frente a espécies de *Candida* (ROSATO *et al.*, 2008).

Saad *et al.* (2010), relataram a ocorrência de atividade sinérgica quando os óleos essenciais de *Thymus maroccanus* e *Thymus broussonetii* foram associados com anfotericina B e fluconazol frente a uma cepa de *Candida albicans*. Em mais um estudo para verificar a presença de atividade sinérgica entre substâncias combinadas, Amber *et al.* (2010) constataram a presença de sinergismo, quando o óleo essencial de *Ocimum sanctum* foi

associado com fluconazol e cetoconazol contra cepas de diferentes espécies do gênero *Candida*.

Oliveira *et al.* (2006) demonstraram que as características da interferência de óleos essenciais sobre a ação de antibióticos varia de acordo com o tipo de antibiótico, com o tipo de óleo essencial testado em associação e com o tipo de microrganismo ensaiado. Por exemplo, o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) possui efeito sinérgico com a ampicilina e cloranfenicol, mas efeito antagônico com a gentamicina frente a *Staphylococcus epidermidis*.

Embora o nosso estudo não tenha encontrado efeito sinérgico entre as drogas testadas, é importante ressaltar a falta de antagonismo entre as associações aqui estudadas. A utilização de terapia combinada é significativa por aumentar o espectro de atividade que não seria alcançado com um único agente, melhorar a eficácia, permitir a diminuição da dose de um ou dos dois agentes sem comprometer a eficácia e que pode reduzir a toxicidade, retardar o surgimento e a disseminação da resistência antifúngica entre fungos patogênicos, e ainda pode melhorar a atividade antifúngica em um determinado sítio anatômico.

A ausência de efeitos antagônicos pode justificar avaliações clínicas da interação entre as drogas. Foi demonstrado que a associação *in vitro* entre anfotericina B e a flucitosina possui efeito indiferente contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, mas apesar disto, esta combinação tem-se mostrado clinicamente eficaz devido a complementariedade de seus perfis farmacocinéticos e da não sobreposição de toxicidade (KEELE *et al.*, 2001; ROLING *et al.*, 2002).

A anfotericina B pode causar toxicidade renal severa em aproximadamente 50% dos pacientes (DUPONT, 2002), enquanto o cetoconazol pode ser tóxico para o fígado (LAKE-BAKAAR, 1987). A diminuição das CIMs da anfotericina B e do cetoconazol quando associados com o geraniol ou com o citrônio é importante pela possibilidade de diminuir os efeitos tóxicos daqueles antifúngicos. A CIM da anfotericina B diminuiu 8 vezes quando esta droga foi associada com o geraniol ou com o citrônio. Já a CIM do cetoconazol diminuiu pela metade quando este foi associado com o geraniol e diminuiu 8 vezes quando foi associado com o citrônio.

Apenas através de resultados de estudos *in vitro* juntamente com estudos *in vivo*, é que se pode fazer uma melhor análise da terapia combinada. Devido a algumas limitações dos ensaios *in vitro*, como concentrações estáticas das drogas durante o experimento (o que não acontece em organismos vivos) e a falta de interação com as proteínas e outros componentes

do soro, os resultados de estudos *in vitro* devem servir como indicador de um potencial efeito dentro de um sistema vivo (KEELE *et al.*, 2001).

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados descritos anteriormente pode-se concluir que:

- Geraniol, citronelol, anfotericina B e cetoconazol, testados isoladamente, exibiram ação sobre a cepa *Candida albicans* ICB-12;
- De acordo com o ICIF, a associação entre o geraniol e a anfotericina B pelo método de checkerboard possuiu efeito indiferente, assim como, a associação entre o geraniol e o cetoconazol;
- O ICIF mostrou que a associação entre o citronelol e a anfotericina B possuiu efeito indiferente. O mesmo ocorreu para a associação entre o citronelol e o cetoconazol.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921–925, 2010.

ANDRADE, C. S. Atividade de novos antifúngicos sobre *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans*. 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

ARGENTA, J. S. Atividade *in vitro*, ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e terbinafrina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

BARBOSA, D. B. M. Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus*. 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Odontologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. S.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BOFF, E. Relação entre a suscetibilidade de *Candida spp* a anfotericina B, com óbito ou sobrevivência dos pacientes em episódios de candidemia. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

CARVALHO, R. J. V.; CUNHA, C. M.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; URZEDO, J. E.; MOREIRA, T. A.; MORAES, P. S. A.; TAKETOMI, E. A. IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 434-438, 2003.

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. 168 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida sp* wwa antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9/10, 2006.

CAVALCANTI, Y. W.; AMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Odontologia Clínico-Científica.**, v. 10, n. 3, p. 243-246, 2011.

CAVASSANI, V. G. S.; SOBRINHO, J. A.; HOMEM, M. G. N.; RAPOPORT, A. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 5, p. 630-634, 2002.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

_____. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CÓRDOBA, S.; RODERO, L.; VIVOT, W.; ABRANTES, R.; DAVEL, G.; VITALE, R. G. In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium spp.* **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 171–174, 2008.

COSTA, C. R. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. 2009. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. A. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 139-165, 2002.

CUENCA-ESTRELA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854–869, 2004.

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

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 31-36, 2002.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3ª ed, p. 431. **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, 2004.

GÓMEZ-LÓPEZ, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 199–202, 2003.

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.

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

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KEELE, D. J.; DeLALLO, V. C.; LEWIS, R. E.; ERNST, E. J.; KLEPNER, 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, p. 121-126, 2001.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clinical Epidemiology**, v. 3, p. 175–191, 2011.

KUIPERS, M. E.; DE VRIES, H. G.; EIKELBOOM, M. C.; MEIJER, D. K. F.; SWART, P. J. Synergistic Fungistatic Effects of Lactoferrin in Combination with Antifungal Drugs against Clinical *Candida* Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2635–2641, 1999.

LAKE-BAKAAR, G.; SCHEUER, P. J.; SHERLOCK, S. Hepatic reactions associated with ketoconazole in the United Kingdom. **British Medical Journal**, v. 294, p. 419-422, 1987.

LEVINSON, W. Microbiologia médica e imunologia. Traduzido por Martha Maria Kyaw. Rev. Téc. por Cynthia Kyaw. 10^a ed. **Artmed**: Porto Alegre, 2010.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACKAY, M. L.; MILNE, K.; GOULD I.M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 125–129, 2000.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F. G. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 771-774, 2010.

MARTINS, R. L. M.; SANTOS, C. G. F.; FRANÇA, F. R. F. C.; MORAES, M. A. P. Adiaspiromicose humana: relato de um caso tratado com cetoconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 507-509, 1997.

MELETIADIS, J.; TE DORSTHORST, D. T. A.; VERWEIJ, P. E. The concentration-dependent nature of in vitro amphotericin B–itraconazole interaction against *Aspergillus fumigatus*: isobolographic and response surface analysis of complex pharmacodynamic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 439–449, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. Traduzido por Cláudia Adelino Espanha *et al.* 5ª ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras**; norma aprovada-Segunda Edição. NCCLS documento M27-A2, 2002).

NUCCI, M. Estudos comparativos para o tratamento da candidíase. **Avanços Recentes na Terapêutica Antiinfeciosa**, n. 65, p. 22-27. São Paulo: Merck Sharp & Dohme, 2003.

NUNES, C. M. O.; TOSCAN, C.; ECHEVERRIGARAY, S.; DELMARE, A. P. L. Avaliação da atividade antimicrobiana de terpenóides. **In: XIX Encontro de jovens pesquisadores: I mostra acadêmica de inovação e tecnologia**, 2011, Caxias do Sul. Anais eletrônicos...Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011. Disponível em: <http://www.ucs.br/site/midia/arquivos/Carolina_Maria_de_Oliveira_Nunes.pdf>. Acesso em: 08/02/2012.

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

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

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

PASQUALOTTO, A. C. Epidemiologia das infecções por *Candida spp.* na corrente sanguínea: coorte retrospectiva em hospital terciário brasileiro. 2004. 144 f. Tese (Doutorado em Pneumologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

PYUN, M.-S.; SHIN, S. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 13, p. 394–400, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M. Farmacologia. Traduzido por Raimundo Rodrigues Santos et al. 6ª ed. **Elsevier**: Rio de Janeiro, 2007.

RIBEIRO E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P, L, F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, ed. 64, p. 106-128, 2004.

ROLING, E. E.; KLEPSE, M. E.; WASSON, A.; LEWIS, R. E.; ERNST, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 43, p. 13-17, 2002.

ROSA, M. I.; RUMEL D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

ROSATO, A.; VITALI, C.; DE LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; MILILLO, M. A. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v. 14, p. 727–732, 2007.

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

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii*

and their synergism with amphotericin B and fluconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1057–1060, 2010.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J. L.; MONOD, M.; BILLE, J.. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2378-2386, 1995.

SCHEID, L. A. Aspectos fenotípicos e perfil de suscetibilidade de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente a antifúngicos e associações. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H, T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.**, v. 66, p. 701-707, 2003.

SILVA C. R. G.; MELO, K. E.; LEÃO, M. V. P.; RUIS, R.; JORGE, A. O. C. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 6, p. 300-315, 2008.

SILVA, F. M. Potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro. 2008. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; DUARTE, A.; MENDONÇA, D. I.; DOMINGUES, F. C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 19, p. 42– 47, 2011.

SILVA, P. Farmacologia. 7ª ed. **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 n. 5, p. 409–413, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Traduzido por Roberta Marchiori Martins. 8ª ed. **Artmed**: Porto Alegre, 2005.

VASQUEZ, J. A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; DEMBRY, L. M.; SOBEL, J. D.; ZERVOS, M. J. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **The Journal Infectious Diseases**. v. 168, p. 195-201, 1993.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

WHITE, T. C.; MARR, K, A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WISPLINNGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES-JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp.* **NewsLab**. ed. 63, 2004.