

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**

**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**DAISY DAYANE FORMIGA DE SOUZA LIMA**

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO  
GERANIOL E DO CITRONELOL CONTRA *Candida*  
*albicans***

**CUITÉ,PB**

**2012**

**DAISY DAYANE FORMIGA DE SOUZA LIMA**

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO  
GERANIOL E DO CITRONELOL CONTRA *Candida*  
*albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Centro de Educação e  
Saúde da Universidade Federal de  
Campina Grande, como pré-requisito  
parcial para obtenção do título de  
Farmacêutico (a).

Orientador: Prof. Dr. WYLLY ARAÚJO DE OLIVEIRA

**Cuité, PB**

**2012**

**DAISY DAYANE FORMIGA DE SOUZA LIMA**

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO  
GERANIOL E DO CITRONELOL CONTRA *Candida*  
*albicans***

Aprovada em 10/10/2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

(UAS /CES/ UFCG)

(Orientador)

---

Prof. Dr. Egberto Santos Carmo

(UAS /CES/ UFCG)

(Examinador)

---

Prof. Dr. Carlos Márcio Ponce de Leon

(UAS /CES/ UFCG)

(Examinador)

L732i Lima, Daisy Dayane Formiga de Souza.

Investigação do mecanismo de ação do geraniol e do citronelol contra *Candida Albicans*. / Daisy Dayane Formiga de Souza Lima – Cuité: CES, 2012.

39 fl.

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

Orientador: Wylly Araujo de Oliveira.

1. *Candida Albicans*. 2. Geraniol. 3. Citronelol. 4. Antifúngico. Título.

CDU 616-083

*“ A excelência pode ser obtida se você se importa mais do que os outros julgam ser necessário; se arrisca mais do que os outros julgam ser seguro, sonha mais do que os outros julgam ser prático, e espera mais do que os outros julgam ser possível”.*

*Vince Lombardi*

*Dedico à minha família, a minha mãe Socorro, por tornar possível este momento acontecer, aos meus irmãos Cintya e Júnior, a minha avó Ozelita, pelo amor incondicional e dedicação de sempre e ao meu avô de coração José Secundo (in memoriam) pela representação paterna que sempre teve na minha vida. Em especial à Wellington e Ana Luiza, que estão sempre comigo e são minha base maior, o meu sentido de vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por todas as bênçãos da minha vida, pela força e inspiração durante o curso.

A minha família pelo amor e carinho de todas as horas.

Aos meus colegas de turma que me acompanharam nessa caminhada, em especial à Paula Nascimento, Magna Tavares, Glória Azevedo e Rosalina Jácome, compartilhamos ótimos momentos e construímos uma grande amizade.

Aos meus professores de todo o curso, que contribuíram cada um a sua maneira na minha formação.

Ao meu orientador Prof. Wylly Araújo de Oliveira pelo apoio e aprendizado neste trabalho. Aos colaboradores da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por contribuírem para os experimentos.

Ao meu companheiro de laboratório Fellipe Pedrosa Araújo, meu parceiro nesse trabalho. A Patrícia Duarte Silva, pelo auxílio e companhia nos experimentos.

A todos que fazem o Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), tenho orgulho de me formar neste campus e de ser integrante da primeira turma de farmácia da UFCG.

A todos que contribuíram não só com meu trabalho, mas principalmente na minha formação. Meu muito OBRIGADA!

LIMA, D. D. F. S. **Investigação do mecanismo de ação do geraniol e do citronelol contra *Candida albicans***. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité-Paraíba.

## RESUMO

Devido ao aumento da incidência de infecções fúngicas, em especial por *Candida albicans*, e aos relatos cada vez mais frequentes de resistência fúngica, é necessário a pesquisa por novas opções de tratamento. Os produtos naturais representam um vasto campo de pesquisa, sendo muitos os relatos na literatura de substâncias de origem natural com potencialidade antifúngica, dentre estas substâncias estão os óleos essenciais e seus componentes. Esse trabalho visa investigar a atividade do geraniol e citronelol contra *C. albicans*, tendo em vista que essas substâncias são componentes de alguns óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana. Através da técnica de microdiluição foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol e citronelol; sendo que quando uma alíquota de cada cavidade da microplaca onde não houve crescimento foi semeada em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) encontrou-se a Concentração Fungicida Mínima (CFM); ainda pela técnica de microdiluição, foi investigada a capacidade das substâncias interagirem com o ergosterol e interferirem com a parede celular. Os resultados demonstraram que essas substâncias possuem atividade antifúngica, a CIM do geraniol e do citronelol foi 250 µg/mL em todas as cepas testadas. A CFM do geraniol contra as cepas ICB-12 e ATCC 76615 foi 1000 µg/mL, contra as demais cepas foi 250 µg/mL. A CFM do citronelol contra a cepa ICB-12 foi 500 µg/mL, contra as demais cepas foi 250 µg/mL. Na investigação do mecanismo de ação verificou-se que tanto o geraniol quanto o citronelol ligaram-se ao ergosterol, o que pode ser observado pelo aumento da CIM. Não houve aumento da CIM de nenhum dos dois óleos na presença do sorbitol, o que sugere que a ação do geraniol e do citronelol não ocorrem por ação na parede celular. Os resultados demonstram que estas substâncias são potenciais agentes antifúngicos, com forte atividade antimicrobiana, sendo comprovados pelos seus valores consideráveis da CIM e CFM, quanto ao seu mecanismo de ação por sua ligação ao ergosterol, traça-se um perfil de um possível alvo que ofereça seletividade na ação dessas substâncias, podendo ser continuados os estudos para delineamento aprofundado do seu mecanismo, bem como realização de estudos pré-clínicos clínicos.

**Palavras chave:** *Candida albicans*, geraniol, citronelol, antifúngico.



LIMA, D. D. F. S. **Investigation of the mechanism of action of geraniol and citronellol against *Candida albicans***. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité-Paraíba.

## **ABSTRACT**

Due to the increased incidence of fungal infections, especially *Candida albicans*, and the increasingly frequent reports of fungal resistance, it is necessary to search for new treatment options. Natural products represent a vast field of research, with many reports in the literature of substances of natural origin with potential antifungal, among these substances are essential oils and their components. This study aims to investigate the activity of citronellol and geraniol against *C. albicans* in order that these substances are components of some essential oils that have antimicrobial activity. Through the microdilution technique was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of geraniol and citronellol; being that when an aliquot from each well of the microtiter plate where no growth was plated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) met the minimum fungicidal concentration (CFM); further by microdilution technique, we investigated the ability of substances interacting with the ergosterol and interfering with the cell wall. The results showed that these substances have antifungal activity, the MIC of geraniol and citronellol was 250 mg / mL for all strains tested. The CFM of geraniol against strains ICB-12 and ATCC 76615 was 1000 mg / mL, against all other strains was 250 mg / mL. The CFM of citronellol against ICB-12 strain was 500 mg / mL, against the other strains was 250 g / mL. Na investigation of the mechanism of action was found that both geraniol as citronellol ligated to ergosterol, which can be observed by increasing the MIC. There was no increase in MIC of either oils in the presence of sorbitol, which suggests that the action of geraniol and citronellol not occur per share in the cell wall. The results show that these substances are potential antifungal agents, with strong antimicrobial activity, being proven by their considerable values of MIC and MFC, as to its mechanism of action by its binding to ergosterol, draw a profile of a possible target that offers selectivity in the action of these substances may be continued studies to detailed design of your facility as well as conducting preclinical studies clinicians.

**Keywords:** *Candida albicans*, geraniol, citronellol, antifungal.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

CES: Centro de Educação e Saúde

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CFM: Concentração Fungicida Mínima

et al.: e colaboradores

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

MAP: Mitogen-activated protein

OE: Óleo Essencial

OMS: Organização Mundial de Saúde

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFMG: Universidade Federal de Campina Grande

µg: micrograma

mL: mililitro

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Valores da CIM e da CFM das substâncias geraniol e citronelol sobre as cepas ICB12 e ATCC.....27

**TABELA 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B contra cepas de *Candida albicans*.....28

**TABELA 3.** Valores da CIM do geraniol e do citronelol sobre *C.albicans* na presença e na ausência de sorbitol 0,8M.....29

## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura química do geraniol.....	24
<b>FIGURA 2.</b> Estrutura química do citronelol.....	25
<b>FIGURA 3:</b> Efeito de diferentes concentrações de ergosterol exógeno (100, 200 e 400µg/mL) sobre a CIM da anfotericina B, do geraniol e do citronelol frente a cepa de <i>Candida albicans</i> ICB-12.....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS.....	16
3.2 CANDIDÍASE.....	17
3.3 ANTIFÚNGICOS.....	18
3.4 RESISTÊNCIA FÚNGICA.....	21
3.5 PRODUTOS NATURAIS.....	22
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 LOCAL DE TRABALHO.....	25
4.2 SUSTÂNCIAS.....	25
4.3 ANTIFÚNGICOS.....	25
4.4 CEPAS FÚNGICAS.....	25
4.5 MEIOS DE CULTURA.....	25
4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	25
4.7 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO SOBRE A PAREDE CELULAR FÚNGICA.....	26
4.8 LIGAÇÃO AO ERGOSTEROL.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	27
5.2 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO SOBRE A PAREDE CELULAR.....	28
5.3 LIGAÇÃO AO ERGOSTEROL.....	29

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* spp é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções na corrente sanguínea (BANERJEE *et al.*, 1991). Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco (SIDRIM *et al.*, 2004).

As leveduras das espécies de *Candida* estão frequentemente relacionadas na etiologia de infecções micóticas. Sendo a candidíase a infecção fúngica mais comum, tendo a *C.albicans* como seu principal agente etiológico (LIMA *et al.*, 2006).

A *C. albicans* é um patógeno oportunista que habita o corpo de forma comensal e é a maior causa de infecções fúngicas em humanos. Estas infecções normalmente ocorrem como consequência de uma alteração na resposta imunológica e da virulência da cepa *C. albicans*, que apresenta considerável plasticidade morfológica (MONGE *et al.*, 2006).

As principais manifestações clínicas da candidíase são candidíase cutâneo-mucosa (que acomete a pele, unhas e mucosas), a candidíase sistêmica (que se dissemina por via hematogênica) e a candidíase alérgica (que atinge principalmente os espaços interdigitais das mãos) (SIDRIM *et al.*,2004).

Devido a essa alta incidência de infecções fúngicas e ao fato de existirem cepas resistentes aos antifúngicos que estão no mercado, observa-se a necessidade de surgirem novos antifúngicos (ODDS, 2003).

Para isso novas drogas estão sendo buscadas em produtos naturais. Os óleos essenciais são relatados na literatura como possíveis fontes de novas drogas com atividade antifúngica. A perspectiva de obtenção de novos fármacos favorece os produtos naturais em relação aos sintéticos sob o aspecto da diversidade molecular (MOORE *et al.*, 1997).

A literatura apresenta vários registros onde destaca a expressiva atividade das propriedades antifúngicas dos óleos essenciais que eles apresentam expressiva atividade antifúngica (DUARTE *et al.*, 2005; PEREIRA, 2009; CASTRO *et al.*, 2010; CARMO,2010; OLIVEIRA, 2011). A atividade anticandida dos óleos essenciais vem sendo investigada para que se possa disponibilizar novas opções de tratamento a

candidíase. Os mecanismos não estão elucidados sendo necessário amplo estudo do tema.



## 2. OBJETIVOS

Determinar a atividade antifúngica e investigar o mecanismo de ação do geraniol e do citronelol contra *Candida albicans*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Infecções fúngicas

Os fungos formam uma classe de microorganismos que possuem reservatório ambiental e infectam indivíduos que são expostos a grandes quantidades do microorganismo ou estão imunologicamente comprometidas. Quanto a patogenicidades eles podem ser divididos em patógenos primários e secundários. Patógenos primários são aqueles fungos que causam doenças em indivíduos imunocompetentes. Patógenos oportunistas causam infecções em pacientes que possuem o sistema imunológico deficiente, seja local ou sistemicamente (OLIVEIRA, 2011).

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo, vários fatores estão relacionados ao crescimento dessas infecções fúngicas, entre eles: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o uso de medicamentos imunossupressores, utilizados às vezes de forma abusiva, permitindo a instalação de microorganismos convencionalmente saprófitos (SIDRIM *et al.*, 2004).

As micoses apresentam grande interesse na prática médica pela frequência com que acometem a população, assim como por simularem outras patologias, principalmente aquelas que afetam áreas expostas do corpo como a pele, dependendo, por isso, do laboratório para o seu diagnóstico definitivo (SIDRIM *et al.*, 2004). As lesões decorrentes das infecções fúngicas manifestam-se, do ponto de vista clínico, nas mais diferentes formas, podendo ser classificadas de acordo com sua localização no organismo, em micoses superficiais e cutâneas, representadas principalmente pelas dermatofitoses e a *Pitiríase versicolor*; as subcutâneas como, por exemplo, a esporotricose e cromomicose, e profundas e sistêmicas como a paracoccidiodomicose e histoplasmose (WANKE *et al.*, 2002). Além disso, também são observadas micoses cujos agentes etiológicos são essencialmente oportunistas como é o caso da candidíase e a criptococose e de outras consideradas emergentes, devido a pouca frequência com que seus agentes etiológicos são encontrados na rotina micológica (FLEMING *et al.*, 2002).

Os pacientes imunocomprometidos possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por infecções fúngicas, como os indivíduos portadores de leucemia, linfoma, diabetes mellitus e síndrome da imunodeficiência adquirida. (LIMA *et al.*, 2006)

### 3.2 Candidíase

A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais freqüente. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LACAZ *et al.*, 1991; SIDRIM *et al.*, 2004).

A *C. albicans* é um patógeno oportunista que habita o corpo de forma comensal e é a maior causa de infecções fúngicas em humanos. Estas infecções normalmente ocorrem como consequência de uma alteração na resposta imunológica e virulência da *C. albicans*, que apresenta considerável plasticidade morfológica (MONGE *et al.*, 2006).

O gênero *Candida* apresenta espécies que podem se apresentar sob forma de leveduras (inócuas) ou hifas (patogênicas). Dependendo das condições como pH, temperatura e reservas nutricionais, alteram seu fenótipo, formando pseudohifas, passando de blastoconídeos para crescimento micelial. Também podem se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídeos. São caracterizadas primariamente pela morfologia colonial em meio de cultura Agar Sabouraud e formação de tubo germinativo. As células leveduriformes possuem formato esférico, medindo 3 a 5µm de diâmetro (LACAZ *et al.*, 2002).

A *Candida albicans* pode se apresentar sob várias formas, chamadas de variações adaptativas, sendo a forma de hifa a mais virulenta e a mais aderente, quando comparada à célula leveduriforme. Dessa forma, a capacidade dessa espécie de formar tubos germinativos parece contribuir para sua virulência (ALMEIDA *et al.*, 2002).

Infecções por *Candida* 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*, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, sendo estas complicações infecciosas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (COLOMBO *et al.*, 2003).

Assim como outras leveduras, as do gênero *Candida* secretam enzimas proteolíticas que podem degradar ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro, induzindo uma disfunção ou uma destruição física, sendo que a invasão das células do hospedeiro por tais microorganismos implica na penetração e danos ao envelope externo celular, sendo esse processo mediado por meios físicos e enzimáticos, ou pela combinação de ambos (SALYERS; WITT, 1994).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a virulência da *Candida spp.* estão relacionados à ativação da via de transdução de sinal MAP (mitogen-activated protein) cinase, onde respostas celulares envolvidas com crescimento invasivo, formação de parede celular, adaptação ao estresse osmótico e reprodução ocorrem mediante vias de sinalização intracelular como MKc1, Cek1/2 e HOG1 MAP Kinase. Outras vias de sinalização intracelular, como p38 MAPK, também estão envolvidas com a patogenicidade da *C. albicans*. Uma vez instalada a infecção, mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-2 $\alpha$ , são sintetizados e, conseqüentemente, induzem a resposta inflamatória (OROZCO *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2010).

### 3.3 Antifúngicos

Os antifúngicos existentes no mercado atualmente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se leva em consideração os efeitos colaterais como nefro e hepatotoxicidade. Entre alguns exemplos de antifúngicos que apresentam efeitos tóxicos cita-se anfotericina B e o cetoconazol. O fato de alguns antifúngicos apresentarem ação fungistática e não fungicida, pode contribuir para o surgimento de cepas resistentes (RANG *et al.*, 2007).

Os fungos possuem parede celular, sendo uma estrutura essencial para eles, diferentemente das células dos mamíferos, e este fato faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvos úteis para o descobrimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade (ZACCHINO *et al.*, 2001; SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001).

As células fúngicas e humanas apresentam semelhanças, compartilham a maioria das vias de metabolismo intermediário, utilizando enzimas muito similares não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro. Os alvos que apresentam maior possibilidade de levar a antifúngicos seletivos

são os inibidores da síntese de ergosterol, a inibição das topoisomerases fúngicas e a inibição da parede celular fúngica (URBINA *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

A parede celular fúngica como alvo para detectar antifúngicos seletivos surgiu recentemente. Visto que a parede celular fúngica é uma barreira protetora, evita a sua ruptura osmótica e lhe confere forma, é essencial para seu crescimento e viabilidade (SARTORI *et al.*, 2005). Ela é constituída por muitos componentes macromoleculares, entre eles  $\beta$ -glicanos, quitina, manoproteínas, entre outras. Uma vez sintetizados, eles interagem entre si, via uma série de enzimas associadas à parede, realizando-se ligações cruzadas, ramificações e outras funções. Três atividades enzimáticas têm demonstrado serem essenciais para a formação da parede celular fúngica: 1,3  $\beta$ -glicano sintetase, 1,6  $\beta$ -glicano sintetase e quitina sintetase que catalisam a formação de 1,3 e 1,6  $\beta$ -glicanos e quitina respectivamente, sendo portanto, alvos atrativos para o descobrimento de novos fármacos antifúngicos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

As topoisomerases I fúngicas são suficientemente diferentes das humanas, logo também podem ser alvos promissores para novos antifúngicos. O DNA celular, tanto cromossomal como plasmídico, encontra-se como um círculo fechado covalentemente que pode estar em estruturas topológicas diferentes, relaxado ou superenovelado. As DNA-topoisomerases são um grande grupo de enzimas capazes de catalisar a interconvenção entre ambas as formas topológicas, permitindo que o mesmo cumpra suas funções de transcrição, transdução ou recombinação dentro das células (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Até o momento o número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos (WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Os polienos ligam-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. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro e potente, mas seu uso é associado a efeitos adversos significantes, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa, já que

a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral (GOODMAN *et al.*, 1996). Novas formulações da anfotericina B, na forma de lipossomas e de dispersão coloidal, produzem menos efeitos colaterais, como resultado da redistribuição do fármaco nos tecidos e da seletividade de liberação, mas o preço destas formulações é muitas vezes maior que o das antigas (GRAYBILL *et al.*, 1996; HARSTE *et al.*, 1996; HOPPE-TICHY *et al.*, 1997).

Os azóis são compostos totalmente sintéticos. O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da esterol-14- $\alpha$ -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (GOODMAN *et al.*, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Outro agente antifúngico sistêmico utilizado é o pró-fármaco flucitosina. Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a flucitosina em 5-fluorouracila, um potente antimetabólito; como resultado final, a síntese de ácido desoxirribonucléico (ADN) dos mesmos fica prejudicada. Embora as células dos mamíferos não convertam a flucitosina em fluorouracila, o que é crucial para ação seletiva do composto, alguns microrganismos da flora intestinal o fazem, causando certa toxicidade aos humanos. A flucitosina tem espectro de ação restrito, tem atividade clinicamente útil somente contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp. e os agentes da cromomicose, a resistência medicamentosa que surge durante a terapia é causa importante de fracasso terapêutico (GOODMAN *et al.*, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002).

No tratamento das micoses superficiais a diversidade de fármacos disponíveis para a terapia é maior. Além dos polienos anfotericina B e nistatina, da flucitosina e de uma maior variedade de azóis (bifonazol, clotrimazol, econazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, miconazol, terconazol e tioconazol), existem ainda outros antifúngicos: o derivado da morfolina, amorolfina; os tiocarbamatos tolnaftato e tolclato; as alilaminas naftifina, terbinafina e butenafina e o composto ciclopirox, além do antibiótico griseofulvina (GOODMAN *et al.* 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002; KOROLKOVAS *et al.*, 2003).

### 3.4 Resistência fúngica

O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes (ZACCHINO *et al.*, 2001).

Os mecanismos envolvidos no processo de resistência a antifúngicos são ainda pouco compreendidos. No entanto, alguns mecanismos de resistência foram descritos em várias espécies patogênicas, nomeadamente a alteração na captura da droga, na enzima alvo, nas enzimas da síntese de ergosterol e finalmente a presença de bombas de efluxo na célula fúngica (RODERO *et al.*, 2002).

Por detrás de todos estes fenômenos, podem estar alterações na composição de esterol na membrana plasmática do fungo (WHITE *et al.*, 1998; BARBOSA, 2008). Vários estudos demonstraram que durante a eliminação ou redução de ergosterol, aparecem novos compostos como o 14 $\alpha$ -metil esterol que altera a permeabilidade e o fluxo da parede fúngica. Estas alterações baixam a capacidade de entrada dos azóis no interior da célula (WHITE *et al.*, 1998; BARBOSA, 2008). Também a alteração na composição dos fosfolípidos da membrana pode influenciar a entrada de drogas, a modificação dos fosfolípidos e ácidos gordos de *C. albicans* afeta a permeabilidade da célula tornando-a mais resistente ao miconazol (MAGO N, KHULLER GK, 1989; BARBOSA, 2008). A modificação quantitativa ou qualitativa da lanosterol C14 $\alpha$  desmetilase está implicada nos processos de resistência aos azóis (WHITE *et al.*, 1998; BARBOSA, 2008).

### 3.5 Produtos naturais

Produtos naturais são substâncias produzidas por microrganismos, plantas, organismos marinhos e animais para várias finalidades, como: barreiras protetoras, coenzimas e cofatores, defesa do hospedeiro contra infecção bacteriana e predadores (animais), proteção de seu nicho ecológico, comunicação intra e inter espécies, pigmentos, sinalização celular, expressão gênica e homeostase dos organismos (JONH, 2010).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas pelo homem ao longo de toda a história da humanidade no tratamento e cura de enfermidades. É uma prática que nasceu provavelmente na pré-história, quando, a partir da observação do comportamento dos animais na cura de suas feridas e doenças, os homens descobriram as propriedades curativas das plantas e começaram a utilizá-las, levando ao acúmulo de conhecimentos empíricos que foram passados de geração para geração (FERRO, 2006).

O Brasil é o país com maior diversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de 20% do número total de espécies do planeta. Essa rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (BRASIL, 2006; CARVALHO *et al.* 2007).

A Fitoterapia é uma palavra que une dois radicais gregos: “phyton”, que significa planta, e “therapia”, tratamento. É a terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo toda e qualquer parte vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser usadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semisintéticos (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Em 2006, foi criado no Brasil o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006).

Embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, o estudo de produtos naturais voltou a receber grande atenção (YUNES, FILHO, 2001).

Óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação a vapor. De forma geral são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, sendo, por isso, também chamados de essências. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e



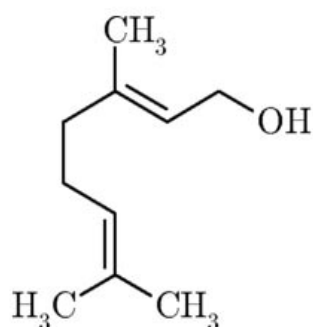
terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Quimicamente, a grande maioria dos óleos é formada de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos preponderam (SIMÕES *et al.*, 2007).

Sabe-se que alguns óleos essenciais são amplamente usados pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosméticas por suas ações bactericida, fungicida, parasicida e virucida, além de outras propriedades medicinais (BAKKALI *et al.*, 2008).

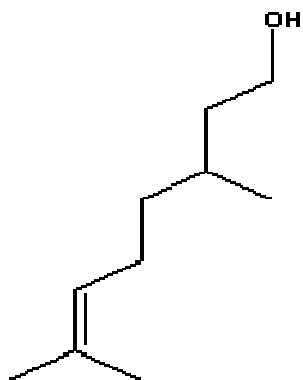
A busca por novas drogas a partir de produtos naturais continua sendo um assunto de grande importância no cenário mundial, pois a adequada vigilância na competição entre fungos e humanos, nos remete que novos alvos susceptíveis continuarão sendo requeridos para uma terapia mais efetiva (ODDS, 2003).

É nessa perspectiva que muitos estudos de atividade biológica, incluindo atividade micótica, têm sido realizados com óleos essenciais de plantas medicinais (NUNES *et al.*, 2006).

As substâncias geraniol e citronelol obtidas de óleos essenciais pertencem a um grupo de compostos definidos como terpenóides (SIMÕES *et al.*, 2007). Há relatos na literatura que esses óleos apresentaram atividade antifúngica frente aos organismos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium digitatum* (MOLEYAR *et al.*, 2004). Esses óleos são amplamente utilizados nas indústrias de detergentes, perfumarias, sanitária, cosméticos e farmacêutica (ROCHA *et al.*, 2000).



**FIGURA 1.** Estrutura química do geraniol (FONTE: SIMAS, 2004)



**FIGURA.2** Estrutura química do citronelol (FONTE: MARÓSTICA JÚNIOR, 2006)

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DE TRABALHO**

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Bioquímica e de Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande.

### **4.2 SUBSTÂNCIAS**

As substâncias utilizadas foram o geraniol e citronelol adquiridos comercialmente da Sigma- Aldrich.

### **4.3 ANTIFÚNGICOS**

O antifúngico utilizado como controle foi a anfotericina B.

### **4.4 CEPAS FÚNGICAS**

As cepas de *Candida albicans* testadas nos experimentos foram: ATCC 76615, ICB-12, LM- 410, LM-393 e LM-178 pertencentes à coleção do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

### **4.5 MEIOS DE CULTURA**

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram o meio sólido Agar Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), ambos preparados de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)**

Culturas de *Candida albicans* foram semeadas em placas com ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas durante 24-72 horas, a temperatura de 37°C. Colônias desta cultura foram suspensas em de NaCl 0,85% estéril e o inóculo foi padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). A CIM foi determinada através do método da microdiluição (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998). Em uma placa com 96 cavidades, foi adicionado caldo Sabouraud e as substâncias geraniol e citronelol nas concentrações de 2.000 a 1,95 µg/mL, em diluições seriadas 1:2. A determinação da CIM foi conduzida com aproximadamente  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL 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 do óleo que inibiu o crescimento do microrganismo através da leitura visual das placas de 96 cavidades. Os experimentos foram realizados em triplicata. A anfotericina B foi utilizada como controle.

Para determinar a CFM, 10µL de cada uma das cavidades onde não houve crescimento fúngico foi semeado em uma placa contendo ASD, estas placas foram incubadas à 37°C por 24-48 horas. A CFM foi considerada a menor concentração semeada em placa com ASD em que houve crescimento menor que 3 UFCs (Unidades Formadoras de Colônia)( KLEPSEK *et al.*, 1998; ERNST *et al.*, 1999).

#### **4.7 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO SOBRE A PAREDE CELULAR FÚNGICA**

Foi utilizado o método da microdiluição seriada em placas de 96 cavidades. A CIM do geraniol e do citrionelol foram determinadas como descrito anteriormente na presença e na ausência do sorbitol (0,8M). As placas foram incubadas a 37°C e a CIM determinada em 2 e em 7 dias (FROST *et al.*, 1995). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.8 LIGAÇÃO AO ERGOSTEROL**

A CIM foi determinada como mencionado acima na ausência e na presença do ergosterol que foi incorporado ao meio em três concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C e a CIM determinada em 24-48 horas (ZACCHINO, *et al.*, 2012). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A determinação da CIM das substâncias geraniol e citronelol foi realizada pelo método da microdiluição. Os valores da CIM e da CFM destas duas substâncias são apresentados na tabela 1. Como pode ser observado, a CIM do geraniol e do citronelol foi 250 µg/mL em todas as cepas testadas. Contudo a CFM variou entre 250 e 1000 µg/mL.

Com relação a anfotericina B , sua CIM contra a cepa ICB-12 e ATCC 76615 foram 0,03125 µg/mL e 0,125 µg/mL respectivamente, enquanto a CIM contra as demais cepas foi 0,250 µg/mL (tabela 2).

Sabe-se que na natureza muitas substâncias mostram papel relevante na proteção das plantas, com propriedades antimicrobianas e essas características possivelmente se relacionam a suas funções nas próprias plantas (BURT *et al.*, 2004).

**TABELA 1.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do geraniol e do citronelol sobre as cepas de *Candida albicans*.

CEPAS	GERANIOL (µg/mL)		CITRONELOL (µg/mL)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
ICB-12	250	1000	250	500
ATCC 76615	250	1000	250	250
LM-393	250	250	250	250
LM-410	250	250	250	250
LM-178	250	250	250	250

**TABELA 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B contra cepas de *Candida albicans*.

CEPAS	ANFOTERICINA B( $\mu\text{g/mL}$ )
ICB-12	0,03125
ATCC 76615	0,125
LM-393	0,25
LM-410	0,25
LM-178	0,25

A técnica da microdiluição usada na CIM é uma forma rápida e econômica para avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais. Possui grande reprodutibilidade e através dela podem-se testar várias amostras. Pode ser usada tanto para substâncias solúveis em água como para substâncias lipossolúveis (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A determinação da CIM, primeira etapa do trabalho, forneceu dados imprescindíveis para as fases posteriores. A CIM e a CFM fornecem importantes informações sobre a potência das substâncias avaliadas e servem para guiar os demais experimentos que visam mostrar a aplicabilidade clínica das substâncias. Segundo CLELAND; SQUIRES, (1991), para que um produto natural candidato a ser empregado como antifúngico justifique a continuação dos seus estudos ele deve obter resultados relevantes nesses experimentos *in vitro*.

Uma substância possui forte atividade antimicrobiana quando possui CIM entre 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ , atividade moderada com CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$  e fraca atividade com valores acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$  (ALIGIANNIS *et al.*, 2001). De acordo com esta classificação, tanto o geraniol quanto o citrionelol mostraram forte atividade antifúngica.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO SOBRE A PAREDE CELULAR

A determinação da ação de uma substância sobre a parede celular pode ser investigada pelo ensaio com sorbitol, essa determinação se dá na medida dos danos que os produtos com atividade antifúngica produzem aos componentes da parede celular fúngica. Se o produto atuar de alguma forma sobre a parede celular do fungo, ele provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas

permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Desta maneira, este ensaio compara os valores da CIM das substâncias antifúngicas na ausência e presença de sorbitol 0,8M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos dos fungos (GUNJI *et al.*, 1983; PEREIRA, 2009).

Os resultados dos valores da CIM do geraniol e do citrônio na presença e na ausência do sorbitol 0,8M podem ser observados na tabela 3. Podemos observar que os valores da CIM não variaram, mostrando que o sorbitol não interfere na ação das substâncias testadas.

Com base nesses resultados, sugere-se que a atividade antifúngica do geraniol e do citrônio não ocorre por interação com a parede celular da *C. albicans*.

**TABELA 3.** Valores da CIM do geraniol e do citrônio sobre *C. albicans* na presença e na ausência de sorbitol 0,8M.

CEPA	GERANIOL (µg/mL)		CITRÔNIO (µg/mL)	
	Presença de sorbitol (0,8M)	Ausência de sorbitol (0,8M)	Presença de sorbitol (0,8M)	Ausência de sorbitol (0,8M)
ICB-12	250	250	250	250

Esse ensaio possui amplo espectro de possibilidades, pois detecta não somente as substâncias que afetam a síntese dos polímeros da parede celular e a sua adjacência, como também os mecanismos regulatórios envolvidos nesse processo que podem permitir a observação microscópica das alterações produzidas nas cepas fúngicas (ZACCHINO, 2001).

Nesse caso com as substâncias não apresentaram ação na parede celular, os estudos seguiram no sentido de se investigar outros possíveis alvos que justifiquem ação fungicida do geraniol e citrônio.

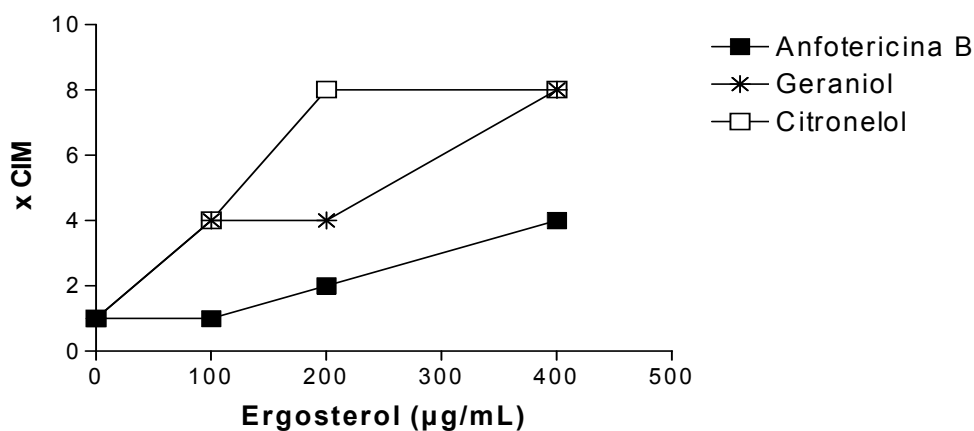
### 5.3 LIGAÇÃO AO ERGOSTEROL

O geraniol e o citrônio pertencem a um dos grupos dos constituintes comumente presentes como substâncias majoritárias em óleos essenciais, os terpenos, de acordo com a literatura agem principalmente contra a membrana citoplasmática dos microorganismos (DI PASQUA, 2007; PEREIRA, 2009). Esta hipótese justifica-se pelo

caráter lipofílico destes compostos, sugerindo sua interação com membranas dos microorganismos. Essa hidrofobicidade permite que estas substâncias se particionem nas membranas celulares dos fungos, alterando suas funções e deixando-as mais permeáveis (BURT, 2004; PEREIRA, 2009).

Para determinar se as substâncias testadas ligam-se ao esterol da membrana do microrganismo, a CIM dos compostos foram determinadas com e sem a adição de ergosterol ao meio. Se a atividade do composto testado for devido a sua ligação com o ergosterol da membrana do microrganismo, o ergosterol exógeno irá prevenir a ligação ao ergosterol da membrana do fungo. Como consequência, um aumento da CIM será observada (ESCALANTE *et al.*, 2008, SILVA JÚNIOR, 2010.).

Os resultados da figura 3 demonstram que a CIM da anfotericina B contra *C. albicans* aumentou para 2xCIM e 4xCIM com a adição de 200 e 400µg/mL respectivamente. O ensaio com a anfotericina B a 100 µg/mL não houve alteração da CIM. A CIM do geraniol aumentou na presença do ergosterol para 4xCIM, 4xCIM e 8xCIM com a adição de 100, 200 e 400µg/mL de ergosterol respectivamente. Também houve alteração da CIM do citronelol para 4xCIM, 8xCIM e 8xCIM com a incorporação de respectivamente 100, 200 e 400µg/mL de ergosterol ao meio. Estes resultados demonstram que a adição de ergosterol ao meio, faz com que aumente a CIM da droga utilizada como controle (anfotericina B) e das substâncias testadas (geraniol e citronelol). Estes resultados sugerem que o geraniol e o citronelol agem no microrganismo por se ligar no ergosterol presente na membrana.



**FIGURA 3:** Efeito de diferentes concentrações de ergosterol exógeno (100, 200 e 400µg/mL) sobre a CIM da anfotericina B, do geraniol e do citronelol frente a cepa de *Candida albicans* ICB-12.



No caso da anfotericina B sua ação através de sua ligação ao ergosterol é com ruptura da estabilidade da membrana dos fungos, produz canais ou poros que alteram a permeabilidade da membrana do fungo e que permitem o extravasamento de constituintes celulares essenciais, levando finalmente à morte da célula (GOLAN, 2009).

Alguns autores colocam que a interação das substâncias em teste com a membrana pode ser consequência da interferência na biossíntese de ergosterol ou uma interação direta com o ergosterol, na alteração do perfil dos ácidos graxos da membrana plasmática, na função da  $H^+$ /ATPase presentes na membrana plasmática, no efluxo de  $K^+$  pela membrana, entre outros fatores (HAWORTH *et al.*, 1983, COX *et al.*, 1998; LUNDE, KUBO, 2000; PEREIRA, 2009).

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O geraniol e o citrionelol possuem atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans* testadas;
- As substâncias apresentam ação fungicida considerável;
- A atividade das substâncias não está envolvida com ação na parede celular;
- As substâncias provavelmente ligam-se ao ergosterol, alterando as funções da membrana, deixando-as mais permeáveis, desta maneira levando a lise das cepas testadas;
- As substâncias apresentam-se como potenciais candidatas a antifúngicos, podendo vir a se tornar opções no tratamento das candidíases, mediante realização futura de testes pré- clínicos e clínicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA, O.P.; SCULLY, C. Fungal Infections of the mouth. **Brazilian Journal Oral Sciences**, v.1, n.1, p.19-26, 2002.

ARAÚJO, N.R.R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microorganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. Dissertação de mestrado-UFPA, 2010.

AZAMBUIA, W. 2009. Disponível em [http://oleosessenciais.org/category/padroes\\_tipos/tipos/exoticos\\_tipos/](http://oleosessenciais.org/category/padroes_tipos/tipos/exoticos_tipos/), acessado em 27 de abril de 2012.

BANERJEE, S.N.; EMOR, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS W.R.; HORAN, T.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine** 91:86S-89S, 1991.)

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. **Biological effects of essential oils- a review**. 2008.

BARBOSA, M.O. **Papel da oxidase alternativa na resistência ao stress oxidativo em *Candida kruzei***. Dissertação de mestrado- Universidade de Aveiro, 2008.

BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. **Decreto n. 5813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 23 de junho de 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.94, n.3, p.223-25, 2004.

CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**. 2002; 2:550-563.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES ,D.S.G.; BARATELLIT, T.G.; SHUQAIR, N.S; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V,n.11,p519-528,set,2005.

CARMO, E.S, **Ensaio pré-clínicos e clínicos com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. para tratamento de pitiríase versicolor.** Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba UFPB/LTF, João Pessoa,2011.

CASTRO, R.D., LIMA, E.O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista Odontológica UNESP**, Araraquara. maio/jun., 2010; 39(3): 179-184.

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

COLOMBO, A.L; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v.36,n.5,p.599-607,2003.

DI PASQUA, R.; BETTS,G. ; HOSKINS, N.; EDWARDS ,M.; ERCOLINI,D.; MAURIELLO,G. Membrane toxicity of microbial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.55,n.12,p.4863-4860,2007.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTTORATO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**.v.97,n.2,p.305-311,2005.

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

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, n. 10, p. 1720-1725. 2008.

FERRO , D.; **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

FLEMING, R.V.; WALSH, T.J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infections Disease Clinics North American** ,16:915-933,2002.

FROST ,D.J.; BRANDT ,K.D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitions towards fung cell well synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**.v.48,p 306-310,1995.

GOLAN , D, E., TASHJIAN , A. H., ARMSTRONG, E. J., ARMSTRONG, APRIL W. **PRINCÍPIOS DE FARMACOLOGIA: A BASE FISIOPATOLÓGICA DA FARMACOTERAPIA**, 2ª ed.Guanabara Koogan 2009.

GOODMAN & GILMAN, - **As bases farmacológicas da terapeutica**. 9º ed. Rio de Janeiro, Magran-Hill Interamericana editores p.1436. 1996

GRAYBILL JR, Nayvar L K. Montabo EM et al – treatment of histoplasmosis with MK 0991 (L – 743, 872). **Antimierab Agents chamoter** n – 42, p. 152 – 153, 1998.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU ,T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphologic abnormalities. **Agricultural and Biological Chemistry**,v.47,n.9,p.2061-2069,1983.

HARSTE & BOLARDJ. Amphoterim B: nem life for na old drug. **Trends pharmae Science**. n.17. p. 449 – 449, 1996.

HOOPE – TICHYT et al; **Structures of Aureobasidin A**. **J. Antibiot**. n. 44, p. 925-933. 1991.

JOHN, J. E. Natural products as lead structures: a role for biotechnology. **Drug Discovery Today**. v. 15, n 11/12, 2010.

LACAZ, C.S; PORTO,E; MARTINS ,J.E.C. **Tratamento de micologia médica** Lacaz.São Paulo: Sarvier,2002.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, A.G.; LIMA, E.O.; Atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre espécies de *Candida*.**Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.16,n.2,p.197-201,2006.

MAGO, N.; KHULLER ,G.K. Influence of lipidic composition on the sensitivity of *Candida albicans* to antifungal agents. **Indian Journal Biochemistry and Biophys.**1998;26:30-33.

MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais.** Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,2006.

MONGE,R.A; ROMAN, E. ;NOMBELA ,C.; PLA ,J. **The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*** **Microbiology**,v.152,n.1,p.905-912,2006.

ODDS, F.C. Synerggy, anragonis, and what the checkboard puts between then. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**,v.52n.1,p.1,2003.

OLIVEIRA, W.A; **Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon witerianus* Jowitt ex Bor contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergilus fumigatus*.** Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba UFPB/LTF, UFPB/LTF,João Pessoa,2011.

OROZCO, A.; ZHOU, X. ; FILLER ,S. G. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infect Immunologic.** 2000; 68: 1134-41.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO ,M.K.; LIMA ,M.E.L et al.Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**v.18,n.2,p.301-307,2008.

PEREIRA, F.O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*.** Dissertação de mestrado UFPB/LTF, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba UFPB/LTF, João Pessoa,2009.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M; OHARA, M.T 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p325.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWE ,R.J.; **Farmacologia.** Rio de janeiro: Elsevier, 6 ed,2007.

ROCHA, S.F.R.;MING ,L.C.;MARQUES ,M.O. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela, *Cymbopogon witerianus* Jowitt. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**,v.3, p.73-78,2000.

SALYERS, A.;WITT,D.Virulance factors that promote colonization. **American Society for Microbiology Journals**. p.30-46,1994.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiano de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da Acmela brasiliensis Spreng (Veledia paludosa) (Asteraceae)**, Dissertação de mestrado, UNI,2005.

SELITRENNIKOFF,C.P. Antifungal Proteins. **Appllied Enviromental Microbiology**, v.67,n.7,p.2883-2894,2001.

SIDRIM, J.J.C.; DIÓGENES, M.J.N.; PAIXÃO, G.C.Dermatofitose. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B.**Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.p. 108-131.

SILVA JUNIOR, I.F.; RAIMONDI,M.; ZACCHINO,S.A.; CECHINAL FILHO,N.; NOLDIN,V.F.; RAO,V.S.; LIMA, J.C.S; MARTINS,D.T.O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of Lafoensia pacari A. St: Hil.,Lytharaceae,stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.v.20,n.3,p.422-428,2010.

SIMAS, N.K.; Lima,L.C.; Conceição,S.R; Kuster,R.M. ; Oliveira Filho,M.A; LAGE,C.L.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue — atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova** vol.27 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2004.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D. Avaliação da atividade antisséptica do extrato seco *Stryphnodendron asdtringens* (Mart.)Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,2007.

SIMÕES, C.M.O; SHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; **Farmagnosia: da planta ao medicamento**.6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS.2007,1102p.

URBINA, J.M.; CORTES, J.C.G.; PALMA, A. ; ZACCHINO, S.A.; ENRIZ, R.D.; RIBAS, J.C. ; KOUZNETSOV, V.V. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-Ary-4N-arylamino-1-butenes and related compounds with inhibitory activities of (1-3)  $\beta$  glucan chitin synthases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**.v.8, p.591-598,2000.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants, safe cure? **Química Nova**,v.28,p.519-528,setembro 2005.

WANKE, B.; LAZERA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memories of Institute Oswald Cruz**,95:153-158,2000.

WHITE, T.C.; MARR, K.A, BOWDEN, R.A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinic Microbiologic**. Rev. 1998; 11: 382-402.

WILLIAMS, D.A & LEMKE, T.L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5ed. Philadelphia, p 1114. 2002.

YUNES, R.A. E FILHO, V.C. Breve análise histórica da química das Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

ZACCHINO, S.A Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. p. 435-479.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the fungal cell wall. In: RAI, M., MARES, D. Plant derived antimycotics: current trends and future prospects. **The Haworth Press**, 1-41, 2003.

ZACCHINO, et al; Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action, **Molecules** 2012, 17.