

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE ENFERMAGEM
BACHARELADO EM ENFERMAGEM**

HELLEN APARECIDA SILVA PONTE

**LINALOL MODULA A RESISTÊNCIA DE DERMATÓFITOS A
FÁMACOS AZÓLICOS**

CUITÉ, 2018

HELLEN APARECIDA SILVA PONTE

**LINALOL MODULA A RESISTÊNCIA DE DERMATÓFITOS A
FÁMACOS AZÓLICOS**

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado para
obtenção do título de bacharel em Enfermagem
pela Universidade Federal de Campina Grande,
campus Cuité.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

CUITÉ, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

P813I Ponte, Hellen Aparecida Silva.

Linalol modula a resistência de dermatófitos à fármacos azólicos. / Hellen Aparecida Silva Ponte. – Cuité: CES, 2018.

38 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Enfermagem) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2018.

Orientadora: Fillipe de Oliveira Pereira.

1. Dermatófitos. 2. Resistência. 3. Antifúngicos. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 547.9

HELLEN APARECIDA SILVA PONTE

**LINALOL MODULA A RESISTÊNCIA DE DERMATÓFITOS A FÁMACOS
AZÓLICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do título de bacharel em Enfermagem pela Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité.

Aprovado em: __/__/2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Orientador – UFCG

Prof. Dra. Alana Tamar Oliveira de Sousa
Membro-UFCG

Prof. Dra. Igara Oliveira Lima
Membro-UFCG

AGRADECIMENTOS

Louvo a Deus de todo o meu coração. Ao criador, que me deu vida, que me permitiu chegar até aqui, e que se for de sua vontade, me permitirá ir mais longe. A Ti, toda honra, todo louvor e toda minha adoração.

Aos meus pais, Hélio e Simone, aos melhores pais, dedico toda e qualquer conquista. Sei que não há pessoas no mundo que se alegrem tanto e que torçam tanto por mim. Sei também que devo tudo o que sou a vocês. Não existe ninguém que já tenha me dado tanto amor e tanta dedicação. Deus me mostra todo o seu cuidado através da vida de vocês, e nada que eu faça ou diga será capaz de expressar o que vocês representam. Obrigada pai, obrigada mãe, mesmo sabendo que isso é tão pouco.

À minha família, todo o meu coração. Sabe que sou louca por vocês, né? Agradeço a minhas avós, Cecília e Luzia, aos meus tios e primos. Em especial agradeço as minhas tias Maria e Girlene que sempre foram mais que isso, sempre foram mães. Agradeço também aos meus primos Dária, Danusa e Wallace, que além de família, são meus melhores amigos. Vocês são meu alicerce, para onde sempre quero voltar.

Ao meu marido Anderson e meus sogros, Osmar e Marizélia, obrigada! Vocês completam minha vida e hoje tudo faz sentido. Sou grata por pertencer a essa família. E cada conquista minha, é de vocês também. Amo vocês.

E Deus não satisfeito com as pessoas maravilhosas que me deu como família, ainda colocou em minha vida amigos mais chegados que irmãos. Aos melhores amigos do mundo, toda a minha gratidão. Lizandra, Heleninha, Thiago, Thallys, Belmiro, Jaysa, Vanessa, Anny, Micarlla e Rennan, obrigada por serem os melhores, amo vocês.

Toda minha gratidão a todos que fazem a instituição UFCG. Cada funcionário que tem um papel importantíssimo na manutenção e qualidade dessa instituição. A cada professor que nos ensinou com excelência, a cada profissional que sempre manteve o espaço limpo e organizado, que sempre nos deu bom dia, boa tarde e um café. Vocês tornaram esses quase 5 anos mais leves. Gratidão! Em especial expresso minha alegria em tê-las em minha banca, Alana e Igara.

Ao meu orientador Fillipe, toda minha admiração e respeito. Obrigada pelas oportunidades, pela paciência em me orientar, obrigada por me ajudar a trilhar meu caminho profissional. Sem dúvida levarei um pouco de você para onde for, um pouco da sua organização, profissionalismo e responsabilidade. Te admiro muito. Também agradeço pela oportunidade de trabalhar em nosso grupo de pesquisa “GPFungos”, assim como agradeço a

todos que participam ou participaram do grupo. Em especial a Islaine, que me auxiliou em todas as etapas da minha pesquisa. Desejo todo sucesso do mundo!

Agradeço as professoras Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (Brasil) e Nilce Maria Martinez-Rossi, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Brasil), que nos cederam as cepas, possibilitando assim nosso estudo.

Por fim sou grata aos meus colegas de turma, que me inspiram pela dedicação. Sei que serão profissionais brilhantes.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, deixa um pouco de si. E vocês têm me moldado como pessoa, como futura profissional, como ser humano.”

*“Oh, my beautiful mother
She told me: Son, in life you're gonna go
far
If you do it right, you'll love where you
are
Just know, wherever you go
You can always come home”*
*(“Oh, minha bela mãe
Ela me disse: Filho, você irá longe na
vida
Se fizer isso certo, amarás o lugar onde
está
Apenas saiba, onde quer que vá
Você pode sempre voltar para casa”)*

93 Million Miles (Jason Mraz)

RESUMO

Dermatofitoses são infecções que normalmente acometem tecidos queratinizados como pele, unhas e couro cabeludo tendo como principais agentes etiológicos fungos do gênero *Microsporum* e *Trichophyton*. O surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos azólicos vem justificando estudos que visem aumentar o arsenal drogas que atuem sobre mecanismos que conferem resistência a múltiplas drogas. Neste sentido, os terpenos merecem destaque. Este estudo investigou a atividade moduladora da resistência de cepas *Microsporum* e *Trichophyton spp.* a agentes antifúngicos inibidores da biossíntese de ergosterol (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) pelo monoterpeneo linalol. Foi inicialmente determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do linalol e dos antifúngicos por microdiluição, em meio RPMI 1640. Em seguida, foi avaliado o efeito modulador de linalol determinando a CIM dos antifúngicos na presença de concentrações subinibitórias de linalol e clorpromazina. Por fim, investigou-se o efeito da associação (*checkerboard*) de linalol com o cetoconazol e itraconazol. Uma cepa Δ mdr2 foi utilizada como controle, pois não expressa genes que conferem resistência por transportadores ABC (*ATP-BINDING CASSETTE*). Os resultados apontam que o linalol apresenta atividade antifúngica modulando a resistência de *Trichophyton spp.* e *Microsporum spp.* a cetoconazol e itraconazol, pois os fungos se tornaram mais sensíveis às drogas na presença de linalol. Esta modulação não ocorreu com a cepa Δ mdr2. A associação entre linalol e os fármacos azólicos aconteceu de forma sinérgica. Pode-se concluir que linalol é um promissor agente antifúngico inibidor da atividade de transportadores ABC em dermatófitos.

Palavras-chaves: Dermatófitos. Resistência. Antifúngico. Terpenos. Bomba de efluxo.

ABSTRACT

Dermatophytoses are infections that affect keratinized tissues such as the skin, nails and scalp. Their main etiologic agents are fungi of the genera *Microsporum* and *Trichophyton*. The emergence of azole antifungal resistant strains has encouraged studies that aim to increase the arsenal of drugs that act on the defense mechanisms which confer multiple drug resistance. In this context, the terpenes drugs deserve attention. This study investigated the monoterpene linalool and its resistance modulating activity involving ergosterol biosynthesis inhibitors (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) in strains of *Microsporum* spp. and *Trichophyton* spp. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of linalool and the tested antifungals were initially determined using microdilution in RPMI 1640 medium. The modulating effect of linalool was evaluated by determining the MICs of the antifungals in the presence of sub-inhibitory concentrations of linalool. We also investigated the association effect (checkerboard) of linalool together with ketoconazole and itraconazole. One strain, $\Delta mdr2$ was used as the control, because it do not express genes that confer ABC transporter resistance. The fungi *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. presented evidence of modulated resistance, becoming more sensitive to ketoconazole and itraconazole in the presence of linalool. The modulation did not occur with the $\Delta mdr2$ strain. The linalool and azole drug associations presented synergism. We conclude that linalool is a promising antifungal agent; inhibiting ABC transporter activity in dermatophytes.

Key words: Dermatophytes. Resistance. Antifungal. Terpenes. Efflux pump.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de fármacos azólicos na ausência e presença de concentrações subinibitórias de linalol ou clorpromazina em <i>Microsporum</i> spp e <i>Trichophyton</i> spp.....	16
Tabela 2- Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de fármacos azólicos e o efeito da associação com linalol contra <i>Microsporum</i> spp. e <i>Trichophyton</i> spp.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	MICROLITRO
Nm	NANÔMETRO
ABC	<i>ATP-BINDING CASSETTE</i> (FAMÍLIA DE TRANSPORTADORES)
CIF	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA
CIM	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
ICIF	ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA
LM	LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA
MDR	RESISTENCIA A MULTIPLAS DROGAS
RPMI	MEIO ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE
UFC	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
Cepas e inóculo fúngico.....	12
Antifúngicos.....	13
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	13
Estudo do efeito modulador da atividade antifúngica	14
Estudo de associação entre drogas	14
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES	20
REFERENCIAS	21
ANEXO: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA MYCOPATHOLOGIA	26

INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos realizados ao longo do último século revelam que os dermatófitos infectam seres humanos de todas as idades, etnias, gênero e níveis socioeconômicos com taxas surpreendentemente elevadas. São infecções que normalmente acometem tecidos queratinizados como pele, unhas e couro cabeludo, podendo ser leve a grave, dependendo da resposta imune do hospedeiro [1, 2].

Embora a diversidade encontrada na frequência de espécies de dermatófitos no Brasil seja evidenciada em diversos trabalhos, há relatos que apontam o predomínio das espécies *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* entre os principais agentes etiológicos de *tinea capitis* e *tinea corporis*, assim como *Trichophyton rubrum* é o mais frequente em casos clínicos de *tinea pedis* e *tinea unguium* [1, 3-5]. Segundo estudo epidemiológico realizado no nordeste brasileiro por Silva-Rocha [6], o predomínio de infecções acometendo pele e unhas por espécies supracitadas são as mais comuns. Em uma perspectiva mundial, estima-se que 10 a 20% da população é afetada por dermatofitoses [2].

Indivíduos com doença vascular periférica e imunossuprimidos, podem apresentar complicações do quadro clínico e, muitas vezes, dermatofitoses mais profundas. Infecções por dermatófitos que normalmente são restritas a área da epiderme, podem ser invasivas e causar infecções generalizadas graves, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas [7, 8].

Estudos indicaram que a maioria dos pacientes HIV positivos contraem infecções fúngicas secundárias. Observações semelhantes foram feitas com relação ao aumento da frequência de transplantes de medula óssea e órgão, uso de agentes antineoplásicos, uso excessivo de antibióticos e uso prolongado de corticosteróides [9].

Diante disso, o tratamento de dermatofitoses vem se tornando uma preocupação mundial e apesar disso, apenas um pequeno número de antifúngicos está disponível para o tratamento dessas infecções [10, 4]. Este fato é justificado pelo aumento da prevalência dessas doenças, concomitantemente ao aparecimento de cepas resistentes aos principais antifúngicos utilizados na terapêutica a exemplo dos antifúngicos azólicos. Os compostos azólicos são drogas inibidoras da biossíntese de ergosterol, um importante esteroide presente na membrana plasmática fúngica [9]. Esse aumento da resistência implica no aumento das taxas de morbidades e custos no tratamento farmacológico [11, 12].

Entre os principais mecanismos de resistência descritos em dermatófitos, destaca-se a redução do acúmulo das drogas no ambiente intracelular por expressão de bombas de efluxo [8]. Bombas de efluxo são ATPases de membrana altamente conservadas que reconhecem

uma grande diversidade de drogas, diminuindo suas concentrações intracelulares e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos [11]. Transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) estão entre as principais famílias de proteínas que funcionam como bombas de efluxo envolvidas em mecanismos de resistência a múltiplas drogas (*MDR-multidrug resistance*) [13, 4]. Por exemplo, o gene *pdr1* de *Trichophyton interdigitale*, anteriormente chamado *mdr1*, codifica um transportador ABC que é superexpresso na presença de vários fármacos antifúngicos [14]. Além disso, células fúngicas quando expostas a drogas citotóxicas, como fluconazol, tioconazol, griseofulvina e itraconazol, mostraram aumento dos níveis de transcrição de mRNA para o gene *mdr2* que codifica também um transportador ABC, além de estar envolvido com desenvolvimento e virulência fúngica [13, 15].

Neste contexto, drogas que atuam sobre transportadores ABC podem maximizar a ação dos agentes antifúngicos e, portanto, são ferramentas de grande potencial para reverter situações de MDR. Os produtos naturais como óleos essenciais e seus componentes têm se apresentado como potencial fonte de novos agentes antifúngicos e moduladores de bombas de efluxo [16]. Os óleos essenciais são complexos de compostos voláteis encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes de plantas aromáticas. Entre seus componentes, os monoterpenos são os mais representativos e dotados de uma grande diversidade estrutural e potencial antimicrobiano [17].

Neste estudo, foi utilizado linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol), um monoterpeneo muito comum em perfumaria, mas que também possui atividade antimicrobiana e inseticida reconhecidas [18,19]. No entanto, não há relatos de sua atividade moduladora da resistência em dermatófitos. Por isso, procurou-se investigar a atividade moduladora de linalol sobre a resistência de dermatófitos a compostos azólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas e inóculo fúngico

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas as cepas *M. canis* LM 216, *M. gypseum* LM 666 e *T. rubrum* LM 148, cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. Além destas, foram utilizadas *T. interdigitale* H6 (ATCC MYA-3108) e seu derivado $\Delta mdr2$ foi obtido por um método de inativação [15], cedidas pelo Departamento de Genética, Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Todas as cepas foram mantidas em tubos de

ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sob refrigeração (8°C). Os fungos foram cultivados em ágar batata dextrose (Difco[®]), a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 520 nm para um valor de 70-72% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $0,5 - 5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) [20,22].

Antifúngicos

Cetoconazol, fluconazol, itraconazol, linalol e clorpromazina foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Brasil). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizado água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar concentrações inferiores utilizando o próprio meio RPMI 1640.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato [20,21]. Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL das drogas-teste duplamente concentradas diluídas em RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich[®] -Brasil). Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. A CIM é definida como a menor concentração das drogas (produto natural ou droga-padrão) capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CIM foram expressos como média geométrica [21].

Estudo do efeito modulador da atividade antifúngica

Para avaliar se as drogas-teste modulam a ação dos antifúngicos frente às cepas testadas, foi empregado o método proposto por Coutinho et al. [23]. Os valores de CIM de cetoconazol, fluconazol e itraconazol foram determinados na ausência e na presença de concentrações subinibitórias de linalol (1/8CIM) ou clorpromazina (1/4CIM), pela técnica de microdiluição. A clorpromazina foi usada como um controle positivo, por se um inibidor de bomba de efluxo [24]. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CIM expressos como média geométrica.

Estudo de associação entre drogas

O estudo de associação de linalol com os fármacos azólicos foi realizado pela técnica de *checkerboard*. Diluições das soluções das drogas-teste (1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) foram feitas em RPMI 1640. Após isto, uma alíquota de 50 µL dos azóis (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) foi adicionada nos poços da placa no sentido vertical e, em seguida, 50 µL de uma determinada diluição de linalol foram adicionados no sentido horizontal da placa. Por fim, adicionados 100 µL do inóculo [20]. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 7 dias para a realização da leitura da CIM. Na perspectiva de avaliar a atividade das associações de drogas, o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculada através da soma: $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o linalol e B o cetoconazol, fluconazol ou itraconazol. O $CIF^A = CIM^A$ combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo (< 0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferença (> 1,0 e < 4,0) ou antagonismo (> 4,0) [25,26].

RESULTADOS

Inicialmente, os valores de CIM de linalol e clorpromazina foram determinadas por microdiluição (tabela 1). Linalol conseguiu inibir o crescimento de todas as cepas testadas a partir de 256 µg/mL, com exceção de *T. interdigitale* $\Delta mdr2$ que foi mais sensível (CIM: 128 µg/mL). Clorpromazina apresentou os seguintes valores de CIM: *T. rubrum* LM 148 (2 µg/mL), *T. interdigitale* H6 (0,5 µg/mL), *T. interdigitale* $\Delta mdr2$ (1 µg/mL), *M. canis* LM 216 (8 µg/mL) e *M. gypseum* LM 666 (4 µg/mL). Os fármacos azólicos foram ativos contra todas

as cepas. Contudo, as cepas de *Microscopium* spp foram mais resistentes aos fármacos azólicos, pois apresentaram maiores valores de CIM. Os controles realizados mostraram ausência de inibição do crescimento fúngico por DMSO, confirmando que o impedimento do crescimento foi devido à presença dos produtos antifúngicos. O crescimento foi detectado quando todas as cepas foram cultivadas na ausência de drogas, o que confirmou a viabilidade do inóculo fúngico.

No ensaio de modulação, as drogas-testes (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) foram testadas na presença de concentrações subinibitórias de linalol (1/8CIM) ou clorpromazina (1/4CIM). Na presença de linalol, os valores de CIM de cetoconazol diminuíram em *T. rubrum* LM 148, *T. interdigitale* H6 e *M. gypseum* LM 666, confirmando seu efeito modulador da resistência destas cepas fúngicas. Na presença de linalol, itraconazol inibiu o crescimento de *M. canis* LM 216 a uma concentração inferior quando comparado com sua CIM isolado. Porém, linalol não conseguiu modular a resistência dos fungos frente a fluconazol em *M. canis* LM 216. Clorpromazina modulou a resistência de todos os fungos frente a todos os compostos azólicos, pois apresentaram valores de CIM menores de quando foram testados isoladamente. A única cepa que não apresentou interferência em sua sensibilidade na presença de linalol foi *T. interdigitale* $\Delta mdr2$.

Após análise dos resultados da modulação, foi realizado ensaio de associação entre o linalol e as drogas cuja atividade antifúngica foi modulada. Houve modulação da resistência das cepas *T. rubrum* LM 148, *M. gypseum* LM 666 e *T. interdigitale* H6 frente a cetoconazol; houve modulação de *M. canis* LM 216 frente a itraconazol. A técnica consistiu na obtenção de misturas contendo diversas concentrações das drogas em estudo, na perspectiva de avaliar se a associação entre as drogas pode ser interpretada como sinérgica, aditiva, indiferente ou antagonista (tabela 2). Com base no seu ICIF, o tipo de associação entre as drogas foi sinérgica para as cepas *T. rubrum* LM 148, *T. interdigitale* H6 e *M. gypseum* LM 666, sugerindo que de alguma forma, o linalol está potencializando a ação da do cetoconazol. Com *M. canis* LM 216, o valor da CIM de itraconazol foi reduzido para 1/8CIM, sendo interpretado também como sinérgico (tabela 2).

Tabela 1 - Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de fármacos azólicos na ausência e presença de concentrações subinibitórias de linalol ou clorpromazina em *Microsporum* spp e *Trichophyton* spp.

Drogas	CIM isolada	CIM combinada (linalol)	CIM combinada (clorpromazina)
Cetoconazol			
<i>T. rubrum</i> LM 148	2	0.125	0.25
<i>T. interdigitale</i> H6	1	0.25	0.25
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	1	1	1
<i>M. canis</i> LM 216	8	8	4
<i>M. gypseum</i> LM 666	8	2	2
Fluconazol			
<i>T. rubrum</i> LM 148	0.5	0.5	0.065
<i>T. interdigitale</i> H6	0.5	0.5	0.065
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	0.5	0.5	0.5
<i>M. canis</i> LM 216	32	32	8
<i>M. gypseum</i> LM 666	32	32	16
Itraconazol			
<i>T. rubrum</i> LM 148	0.5	0.50	0.065
<i>T. interdigitale</i> H6	0.5	0.50	0.065
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	0.5	0.50	0.50
<i>M. canis</i> LM 216	8	4	4
<i>M. gypseum</i> LM 666	4	4	2

CIM: concentração inibitória mínima como média geométrica de três experimentos.

Tabela 2- Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de fármacos azólicos e o efeito da associação com linalol contra *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp.

Drogas	CIM isolada	CIM combinada	ICIF (tipo de interação)
<i>T. rubrum</i> LM 148			
Linalol	256	64	0.38 (sinergismo)
Cetoconazol	2	0.25	
<i>T. interdigitale</i> H6			
Linalol	256	64	0.38 (sinergismo)
Cetoconazol	1	0.125	
<i>M. gypseum</i> LM 666			
Linalol	256	32	0.25 (sinergismo)
Cetoconazol	8	1	
<i>M. canis</i> LM 216			
Linalol	256	32	0.25 (sinergismo)
Itraconazol	8	1	

CIM: concentração inibitória mínima; ICIF: índice de concentração inibitória fracionária.

DISCUSSÃO

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem-sucedidas na descoberta de novos fármacos. São importantes instrumentos no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, e, neste caso, as plantas medicinais e os produtos derivados delas são reconhecidamente importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas [27]. Uma abordagem terapêutica alternativa com produtos naturais traz a perspectiva de descobrir substâncias com eficácia significativa e menor índice de efeitos indesejáveis.

Além disso, representam uma alternativa econômica, fáceis de obter e são aplicáveis a várias patologias [2].

Neste estudo, o monoterpene linalol foi o produto de origem natural analisado quanto ao seu potencial modulador da resistência fúngica. A atividade antifúngica de linalol é relatada na literatura em estudos anteriores. Linalol foi testado frente a cepas de *Candida albicans*, comprovando sua sensibilidade ao fitoconstituente [28]. Mostra-se igualmente eficaz frente a cepas de *C. krusei*, apresentando atividade fungicida, alterando a parede celular [29]. Em relação a atividade do monoterpene contra dermatófitos, foi verificada a eficácia do linalol associado ao cetoconazol para induzir alterações micromorfológicas, apresentando-se como um agente antifúngico com potencial anti-*Trichophyton rubrum* [30]. Silva et al. [31] também verificaram a atividade antifúngica de linalol frente a cepas de *Microsporum* spp.

A membrana celular fúngica é predominantemente constituída por esteróis, glicerofosfolípidios e esfingolípídeos. O papel dos lípidios na função da membrana celular e na patogênese fúngica tem sido alvo de diversos estudos na perspectiva de identificar potenciais alvos terapêuticos [32]. Os terpenos são compostos hidrofóbicos que preferencialmente interagem com a membrana celular aumentando a fluidez e permeabilidade da membrana, afetando assim o funcionamento adequado das proteínas presentes em sua estrutura [30,31].

Considerando isto, a atividade antifúngica do linalol contra dermatófitos foi avaliada na perspectiva de verificar se a alteração da homeostase da membrana fúngica em decorrência de seu mecanismo de atividade antifúngica poderia diminuir o efluxo dos fármacos azólicos por proteínas transportadoras ABC presentes na membrana plasmática, e assim, modular a resistência dos dermatófitos. Transportadores do tipo ABC estão entre as principais envolvidas em mecanismos de resistência a múltiplas drogas, onde são expressas através de genes específicos [33, 13, 11].

Segundo Martins et al. [4], genes de transportadores ABC possuem alta homologia entre os dermatófitos, e é provável que eles tenham funções específicas, sugerindo que a ação de cada droga é dependente de outros fatores inerentes a cada espécie. Dados sugerem que esses genes transportadores ABC atuam sinergicamente em dermatófitos, e eles podem se compensar quando expostos a drogas antifúngicas. Esta pode ser uma causa importante de falha terapêutica no tratamento de infecções fúngicas. Especificamente, o gene *mdr2* codifica um transportador ABC e é expresso diferencialmente na presença de antifúngicos como

cetoconazol, fluconazol e itraconazol [14], desempenhado um papel na modulação da suscetibilidade a fármacos azólicos [15, 13].

De acordo com este estudo, cetoconazol teve sua atividade modulada pelo linalol frente às cepas de *T. rubrum* LM 148, *T. interdigitale* H6 e *M. gypseum* LM 666, e itraconazol frente à cepa de *M. Canis* LM 216. É possível que esta atividade moduladora tenha ocorrido pela interferência de linalol na atividade dos transportadores ABC, uma vez que a cepa *T. interdigitale* $\Delta mdr2$ (não expressa o gene *mdr2*) não teve sua sensibilidade alterada pela clorpromazina, diferentemente das demais cepas.

Embora seja um fármaco antipsicótico, a clorpromazina foi utilizada neste estudo por sua ação descrita na literatura como inibidora de bombas de efluxo, assim como uma série de bloqueadores de canais iônicos terapêuticos como a exemplo do tioridazina e haloperidol [34]. O uso de inibidores de bombas de efluxo, como clorpromazina, para identificar indiretamente o envolvimento de bombas de efluxo na resistência fúngica é relatado na literatura. São drogas que se comportam de forma eficiente reduzindo níveis significativos de resistência fúngica [35].

Desta forma, a atividade moduladora de produtos naturais sobre a resistência de bactérias e fungos aos antimicrobianos é evidenciada na literatura como uma importante forma de impedir o aparecimento de MDR. Além disso, é possível que se observe a potencialização dos efeitos tóxicos das drogas comumente utilizadas na terapêutica sobre os micro-organismos [36].

Atualmente, a associação de drogas na clínica surge como algo promissor, na perspectiva de diminuir efeitos adversos, reduzir o custo do tratamento ou aumentar o potencial antimicrobiano das drogas. Outra vantagem relevante é que a combinação de terapia com concentrações subletais de antifúngicos pode levar à rara possibilidade de desenvolvimento de resistência nos agentes patogênicos [32].

Neste estudo, o ensaio de associação demonstrou que a interação entre os azóis e o linalol foi sinérgica. Estudos de associação *in vitro* entre antifúngicos e produtos naturais já são relatados. Cardoso et al. [37] demonstraram que os monoterpenos linalol e geraniol, quando associados com fluconazol, apresentaram efeito sinérgico sobre *Candida albicans*. O estudo de Pinto [38] demonstrou que associações de fluconazol com compostos presentes no óleo essencial de *Thapsia villosa* (*Apiaceae*) como limoneno e metileugenol contra leveduras e fungos dermatófitos clinicamente relevantes, mostraram efeito sinérgico. Com isso, os

resultados deste estudo sugerem que o uso de combinações de linalol com fármacos azólicos pode ser bastante promissor.

Neste sentido, o estudo e a descoberta de produtos naturais com constituintes ativos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada com antifúngicos de uso comum podem representar uma nova forma de fazer frente aos micro-organismos, diminuindo o risco de se selecionar novos ou melhores mecanismos de resistência. Dessa forma, pode-se impulsionar a produção e o uso de produtos naturais como adjuvantes farmacológicos nos tratamentos contra agentes infecciosos [39, 23, 40]. No entanto, apesar do reconhecido potencial anti-dermatofítico dos produtos naturais, muitas vezes vantajoso frente às drogas comerciais, ainda há um longo caminho a ser percorrido até a sua utilização na terapêutica [41].

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que linalol apresentou atividade antifúngica e moduladora da resistência de *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp. a cetoconazol e itraconazol. A forma pela qual a associação entre cetoconazol e linalol ou itraconazol e linalol acontece em dermatófitos é sinérgica. Possivelmente, linalol atua sobre a membrana plasmática fúngica, modificando a atividade dos transportadores ABC que conferem resistência destes fungos a drogas antifúngicas. Diante disso, o estudo revela um composto promissor para o tratamento de dermatofitoses causadas por diversas cepas dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. No entanto, é sugestivo que novos estudos complementares visando a aplicação clínica de linalol e suas associações com drogas azólicas possam ser realizados.

REFERENCIAS

1. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008; 166:335-52.
2. Soares LA, Sardi JCO, Gullo FP, et al. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products, *Braz J Microbiol*. 2013; 44:1035-41.
3. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51:2-15.
4. Martins M, Franceschini A, Jacob T, Rossi A, Rossi N. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *J Med Microbiol*. 2016; 65:605–10.
5. Rahman S. Genetic Predictors of Susceptibility to Dermatophytoses, *Mycopathologia*, 2017; 182:67-76.
6. Silva-Rocha WP, Azevedo MF, Chavez GM. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med*. 2016; 27:57-64.
7. Há SJ, Sun PL, Sung WW. Deep dermatophytosis caused by zoophilic strain of *Trichophyton interdigitale* with successful treatment of itraconazole. *Mycopathologia*. 2017; 7:715-20.
8. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol*. 2010; 85:657-67.
9. Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16:555-78.
10. Kaspers S, Syer S, Magin P. Oral antifungal medication for toenail onychomycosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012; 4.
11. Ughachukwu PO, Unekwe PC. Efflux pump- mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res*. 2012; 2:191-98.

12. Ghannoum M. Azole Resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2016; 106:79-86.
13. Maranhão CA, Paiao FG, Fachin AL, Martinez-Rossi NM. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. *J Med Microbiol.* 2009; 58:163-98.
14. Cervelatti EP, Paiva E, Meirelles WF. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. *Rev Bras Milho e Sorgo.* 2002; 1: 30-7.
15. Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni WJR., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1093-99.
16. Limaverde PW, Campina FF, Cunha FAB. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food Chem Toxicol.* 2017; 109:957-61.
17. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46:446-75.
18. Sokovic M, Glamoclija J, Kataranovski D, Marin PD, Vukojevic J, Brkic, D. Antifungal activity of the essential oils and components *in vitro* and *in vivo* on experimentally induced dermatomycoses at rats. *Dig J Nanomater Bios.* 2012; 7:959-66.
19. Beier RC. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. *Poultry Science.* 2014; 93:267-72.
20. Clinical and laboratory standards institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America.2002; 22(16).

21. Santos DA, Barros MES, Hamdan JS. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 98-101.
22. Barros MES, Santos DA, Hamdan, JS. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. Mycolol Res. 2006; 110:1355-60.
23. Coutinho HD, Costa JGM, Lima EO, Silva VSF, Siqueira- Junior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy. 2008;54:328-30.
24. Galgóczy L, Bácsi A, Homa M, Virágh M, Papp T, Vágvölgyi C. *In vitro* antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. Mycoses. 2011; 54:737-43.
25. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2002; 49:345–51.
26. Correa-Royero J, Tangarife V, Durán C, Stashenko E.A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. Rev Bras Farmacogn. 2010; 20:734-41.
27. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. Molecules. 2016; <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.
28. Dias IJ, Trajano, ERIS, Castro RD. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. Braz J Biol, 2017; 78: 368-374.
29. Tabassum N, Vidyasagar GM. Antifungal investigations on plant essential oils: a review. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5: 19-28.

30. Lima M, Medeiros A, Silva K, Pereira FO, et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. J Mycol Med. 2017; 27:195-202.
31. Silva KVS, Lima MIO, Cardoso GN, Santos AS, Silva GS, Pereira FO. Inhibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. Mycosis. 2017; 60: 387–93.
32. Sant DG, Tupe SG, Ramana CV, Deshpande MV. Fungal cell membrane-promising drug target for antifungal therapy. J Appl Microbiol. 2016; 121:1498-1510.
33. Deising HB, Reimann S, Pascholati SF. Mechanisms and significance of fungicide resistance. Braz J Microbiol. 2008; 39: 286-95.
34. Kapp E, Malan SF, Jacques J, et al. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in Mycobacterium tuberculosis: A Rational Drug Design Perspective Mini Rev Med Chem. 2018; 18:72-86.
35. Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, et al. Inhibitors of my mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10:983-98.
36. Costa LM, Macedo EV, Oliveira FA, Ferreira JH, Gutierrez SJ, Peláez WJ, Lima FC, Siqueira Junior JP, Coutinho HD, Kaatz, GW, Freitas RM, Barreto HM. Inhibition of the NorA efflux pump of Staphylococcus aureus by synthetic riparins. J Appl Microbiol. 2016; 121:1312 22.
37. Cardoso NNR, Alviano CS, Blank AF, Romanos MTV, Rozental SR. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. Evid Based Complement Alternat Med. 2016.

38. Pinto, E, Gonçalves, MJ, Cavaleiro C, Salgueiro, L. Antifungal Activity of Thapsia villosa Essential Oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. *Molecules*. 2017; 22:1595.
39. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70: 461-77.
40. Leite FS, Giannini MJS, Almeida AMF. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products. *Braz J Microbiol*. 2013; 44:1035-41.
41. Lopes G, Pinto E, Salgueiro L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis? *Mycopathologia*. 2017; 182: 143-67.

ANEXO:

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA MYCOPATHOLOGIA

Mycopathologia

LINALOOL MODULATES DERMATOPHYTE SUSCEPTIBILITY TO AZOLE DRUGS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MYCO-D-18-00154	
Full Title:	LINALOOL MODULATES DERMATOPHYTE SUSCEPTIBILITY TO AZOLE DRUGS	
Article Type:	Short Communication	
Keywords:	Dermatophytes, resistance, antifungal, terpenes, efflux pump	
Corresponding Author:	fillipe de oliveira pereira Universidade Federal de Campina Grande BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Campina Grande	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Hellen Aparecida Silva Ponte	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Hellen Aparecida Silva Ponte	
	Maria Islaine de Oliveira Lima	
	Edeltrudes de Oliveira Lima	
	fillipe de oliveira pereira	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (443272/2014-0.)	dr fillipe de oliveira pereira
Abstract:	<p>Dermatophytoses are infections that affect keratinized tissues such as the skin, nails and scalp. Their main etiologic agents are fungi of the genera <i>Microsporum</i> and <i>Trichophyton</i>. The emergence of azole antifungal resistant strains has encouraged studies that aim to increase the arsenal of drugs that act on the defense mechanisms which confer multiple drug resistance. In this context, the terpenes drugs deserve attention. This study investigated the monoterpene linalool and its resistance modulating activity involving ergosterol biosynthesis inhibitors (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) in strains of <i>Microsporum</i> spp. and <i>Trichophyton</i> spp. The minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool and the tested antifungals were initially determined using microdilution in RPMI 1640 medium. The modulating effect of linalool was evaluated by determining the MIC of the antifungals in the presence of sub-inhibitory concentrations of linalool. We also investigated the association effect (checkerboard) of linalool together with ketoconazole and itraconazole. One strain, Δmdr2 was used as the control, because it does not express a gene that encodes a ABC transporter conferring drug resistance. The fungi <i>Trichophyton</i> spp. and <i>Microsporum</i> spp. presented evidence of modulated resistance, becoming more sensitive to ketoconazole and itraconazole in the presence of linalool. The modulation did not occur with the Δmdr2 strain. The linalool and azole drug associations presented synergism. We conclude that linalool is a promising antifungal agent; inhibiting ABC transporter activity in dermatophytes.</p>	
Suggested Reviewers:	<p>Juliana Moura Mendes Arrua jmmarrua@gmail.com Dr. Juliana is a specialist in molecular biology of filamentous fungi.</p> <p>Henrique Douglas Melo Coutinho hdouglas@zipmail.com.br Dr. Henrique is a specialist in studies with efflux pumps.</p>	

Egberto Santos Carmo
egbertosantos@ufcg.edu.br
He is professor of mycology for health courses.

Maragareth de Fátima Formiga Melo Diniz
margareth@ccs.ufpb.br
She is a medical pharmacologist of great importance in the scientific community.

LINALOOL MODULATES DERMATOPHYTE SUSCEPTIBILITY TO AZOLE DRUGS

1
2 Hellen Aparecida Silva Ponte¹; Maria Islaine de Oliveira Lima¹; Edeltrudes de Oliveira Lima², Fillipe de
3
4 Oliveira Pereira^{1*}
5

6
7 ¹Laboratory of Biochemistry, Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University
8
9 of Campina Grande, Cuité, Brazil.

10
11 ²Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal
12
13 University of Paraíba, João Pessoa, Brazil,
14

15
16 *corresponding author: e-mail address fillipeopereira@ufcg.edu.br and telephone number 55-83-
17
18 998168410.
19

20 21 22 23 24 **ABSTRACT**

25
26
27 Dermatophytoses are infections that affect keratinized tissues such as the skin, nails and scalp. Their main
28
29 etiologic agents are fungi of the genera *Microsporum* and *Trichophyton*. The emergence of azole
30
31 antifungal resistant strains has encouraged studies that aim to increase the arsenal of drugs that act on the
32
33 defense mechanisms which confer multiple drug resistance. In this context, the terpenes drugs deserve
34
35 attention. This study investigated the monoterpene linalool and its resistance modulating activity
36
37 involving ergosterol biosynthesis inhibitors (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) in strains of
38
39 *Microsporum* spp. and *Trichophyton* spp. The minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool and
40
41 the tested antifungals were initially determined using microdilution in RPMI 1640 medium. The
42
43 modulating effect of linalool was evaluated by determining the MIC of the antifungals in the presence of
44
45 sub-inhibitory concentrations of linalool. We also investigated the association effect (checkerboard) of
46
47 linalool together with ketoconazole and itraconazole. One strain, $\Delta mdr2$ was used as the control, because
48
49 it does not express a gene that encodes a ABC transporter conferring drug resistance. The fungi
50
51 *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. presented evidence of modulated resistance, becoming more
52
53 sensitive to ketoconazole and itraconazole in the presence of linalool. The modulation did not occur with
54
55 the $\Delta mdr2$ strain. The linalool and azole drug associations presented synergism. We conclude
56
57 that linalool is a promising antifungal agent; inhibiting ABC transporter activity in dermatophytes.
58

59
60 **Key words:** Dermatophytes, resistance, antifungal, terpenes, efflux pump.
61
62
63
64
65

1 Numerous studies conducted over the last century have shown that dermatophytes infect humans with
2 surprisingly high rates, for all ages, ethnicities, genders, and socioeconomic levels. The infections often
3 affect keratinized tissues such as the skin, nails and scalp, and depending on the host's immune response,
4 they may be mild to severe [1, 2].
5

6
7 The diversity of dermatophyte species found in Brazil is evidenced in many studies, as well as the
8 predominance of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* as principal etiological agents
9 of *tinea capitis* and *tinea corporis*; and *Trichophyton rubrum* in clinical cases of *tinea pedis* and *tinea*
10 *unguium* [1, 3-5]. According to an epidemiological study conducted by Silva-Rocha [6], infections
11 affecting the skin and nails in northeastern Brazil are most commonly caused by the species mentioned
12 above. From a global perspective, it is estimated that 10 to 20% of the population is
13 affected by dermatophytoses [2].
14
15
16
17
18
19
20
21

22 Individuals with peripheral vascular disease and immunosuppressed individuals often present clinical
23 complications; many times with a dermatophytosis involved. Dermatophyte infections, usually restricted
24 to the epidermis, can become invasive causing severe generalized infections with granulomatous
25 lesions [7, 8]. The majority of HIV-positive patients contract secondary fungal infections, and similar
26 patterns exist in relation to currently increasing frequencies for bone marrow and organ transplants, use
27 of anti-neoplastic agents, excessive use of antibiotics, and prolonged use of corticosteroids [9].
28
29
30
31
32
33
34

35 Dermatophytosis treatment is becoming a global concern, yet in spite of this, only a small number of
36 antifungal drugs are available for treatment [10, 4]. The increase in prevalence for these diseases and the
37 emergence of resistance to the few antifungal agents available for treatment (azole antifungals) are linked.
38 Azole compounds are drugs that inhibit ergosterol biosynthesis; an important steroid present in the fungal
39 plasma membrane [9]. Increased resistance implies an increase in morbidity rates and costs involved in
40 pharmacological treatment [11, 12].
41
42
43
44
45
46
47

48 Among the main mechanisms of resistance described in dermatophytes, the expression of efflux pumps
49 most effectively reduces drug accumulation in the intracellular environment [8]. Efflux pumps are highly
50 conserved membrane ATPases that recognize a wide variety of drugs; decreasing their intracellular
51 concentrations and consequently their toxic effects [11]. ABC transporters (*ATP-binding cassette*) are
52 among the leading families of proteins that act as efflux pumps. They are involved in mechanisms of
53 multiple drug resistance (MDR) [4, 13]. As an example, the *pdr1* gene of *Trichophyton interdigitale*,
54 previously called *mdr1*, encodes an ABC transporter that in the presence of many antifungal drugs
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 is highly expressive [14]. Fungal cells, when exposed to cytotoxic drugs such as fluconazole, tioconazole,
2 griseofulvin, and itraconazole present increased levels of mRNA transcription for the *mdr2* gene, which
3 in addition to being involved with fungal development and virulence, encodes an ABC transporter [13,
4 15].
5
6

7
8 Drugs that act on ABC transporters can maximize the action of antifungal agents and become potential
9 tools to reverse MDR situations. Natural products such as essential oils and their components have been
10 noted as a potent source of new antifungal agents and efflux pump modulators [16-17]. In this
11 study, linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol), was used; a very common monoterpene in perfumery.
12 Yet it possesses recognized antimicrobial and insecticide activities [18-19]. Since, there are no reports of
13 resistance modulation in dermatophytes; we sought to evaluate azolic resistance modulation in
14 dermatophytes through the activity of linalool. For this, the following strains *M. canis* LM 216, *M.*
15 *gypseum* LM 666 and *T. rubrum* LM 148 were provided by the Laboratory of Mycology of the
16 Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (Brazil). *T. interdigitale* strain H6
17 (ATCC MYA-3108) was isolated from clinical specimens at the University Hospital of Ribeirão Preto
18 Medical School, São Paulo University, Brazil, and its $\Delta mdr2$ strain derivative was obtained by an
19 inactivation method, as previously described [15]. The H6 and $\Delta mdr2$ strains were provided by Nilce
20 Maria Martinez-Rossi from Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São
21 Paulo (Brazil). The fungi were grown in potato dextrose agar (Difco®) at 28° C for 7 days to obtain the
22 fungi inocula in sterile saline (0.85 % NaCl) with 10⁶ conidia/mL [20-22].
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 Initially, MIC values of the Ketoconazole, fluconazole, itraconazole, linalool and chlorpromazine (Sigma-
40 Aldrich®, Brazil) were determined against dermatophyte fungi by microdilution technique [20-21]. To
41 assess whether the drugs tested modulate the activity of the antifungal agents when used against the test
42 strains, we applied the method proposed by Coutinho et al. [23]. Using microdilution technique, the MIC
43 values of ketoconazole, fluconazole and itraconazole in the absence or presence of sub inhibitory
44 concentrations of linalool (1/8MIC) or chlorpromazine (1/4MIC) were obtained. Chlorpromazine was
45 used as a positive control as an efflux pump inhibitor [24]. After analysis of the modulation results,
46 linalool - azole association study was performed using the *checkerboard* technique [20]. The fractional
47 inhibitory concentration index (FICI) was calculated as the sum of: $FIC^A + FIC^B$, where A represents
48 linalool; and B represents ketoconazole, fluconazole or itraconazole. The $FIC^A = (MIC^A$
49 $combined)/(MIC^A$ alone), while the $FIC^B = (MIC^B$ combined)/(MIC^B alone). The FICI was interpreted in
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the following way: synergism (< 0.5), additivity (0.5-1.0), indifference (> 1.0 and < 4.0), or antagonism (> 4.0) [25-26].

Linalool inhibited the growth of all strains tested at 256 µg/mL. The azole drugs were active against all strains. However, the *Microscopum* spp. strains were more resistant to azoles and presented higher MIC values (Table 1). In the presence of linalool (1/8MIC), the ketoconazole MIC values decreased for *T. rubrum* LM 148, *T. interdigitale* H6 and *M. gypseum* LM 666, confirming modulatory effects on fungal strain susceptibility. In the presence of linalool (1/8MIC), itraconazole inhibited *M. canis* LM 216 growth at a lower concentration than its isolated MIC. However, linalool failed to modulate the resistance of fungi against fluconazole in *M. canis* LM 216. Chlorpromazine modulated the resistance of all fungi against all azole compounds, presenting lower MIC values than when each was tested separately. The single strain that showed no interference in its sensitivity in the presence of linalool was *T. interdigitale* Δ *mdr2* (Table 1). Association tests between linalool and the drugs whose antifungal activity was modulated was performed. On the basis of the FICI results (0.38), synergistic association between the drugs was determined for *T. rubrum* LM 148, *T. interdigitale* H6, and *M. gypseum* LM 666, suggesting that somehow linalool is potentiating the action of ketoconazole. With *M. canis* LM 216, the MIC value of itraconazole was reduced to 1/8MIC; interpreted as synergistic effect (FICI = 0.38).

In previous studies, the antifungal activity of linalool has been reported. Linalool has been tested against strains of *Candida albicans* whose sensitivity to linalool was demonstrated [27]. Linalool's activity against dermatophytes was confirmed when associated with ketoconazole to induce morphological changes, and presenting as an antifungal agent with anti-*T. rubrum* potential [28]. Silva et al. [29] also observed linalool's antifungal activity against strains of *Microscopum* spp.

Terpenes are hydrophobic and preferentially interact with the cell membrane; increasing membrane fluidity and permeability, while also affecting membrane protein functions [28-29]. Antifungal activity of linalool against dermatophytes was evaluated from the perspective of fungal membrane homeostasis; whether membrane alterations due to antifungal activity might decrease azole drug efflux performed by the ABC protein transporters present in the plasma membrane; modulating dermatophytic virulence. ABC transporters are among the chief mechanisms used by MDR species and are expressed through specific genes [11, 13, 30].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In this study, ketoconazole and itraconazole had their activities modulated by linalool. It is possible that these modulation effects occurred through linalool's interference in the activity of ABC transporters, and since the *T. interdigitale* Δ *mdr2* strain does not express the *mdr2* gene, its sensitivity was not amended by chlorpromazine, unlike the other strains. Although chlorpromazine is an antipsychotic drug, it was used in this study because of its efflux pump inhibitor action [31]. The use of efflux pumps inhibitors, like chlorpromazine, to indirectly identify the involvement of efflux pumps in fungal resistance is well reported in the literature, being efficient drugs which can reduce levels of fungal resistance significantly [32].

Natural product modulation activity against bacterial and fungal resistance is highlighted in the literature as an important way to prevent MDR emergence [33]. The association tests in this study demonstrated that the interactions between the azoles tested and linalool are synergistic. *In vitro* association studies between antifungals and natural products have also been reported. Cardoso et al. [34] showed that the monoterpenes linalool and geraniol, when associated with fluconazole, present synergistic effect against *Candida albicans*. Study and discovery of natural drugs with intrinsic antimicrobial activity and active constituents that may be combined with current antifungals represents a new way of tackling micro-organisms; it reduces the risks involved in selecting and improving new mechanisms of resistance and may also boost both production and use of natural products as pharmacological adjuvants to treat infectious diseases [23, 35-36]. However, in spite of the recognized anti-dermatophyte potential of natural drugs, being often more advantageous as compared to commercial drugs, there is still a long way to go before their use [37].

The results of the current study suggest that combinations of linalool with azole drugs may be quite promising. These results demonstrate that linalool presents antifungal activity; modulating *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. susceptibility to ketoconazole and itraconazole. Associations between linalool and (ketoconazole or itraconazole) are synergistic in dermatophytes. Linalool most likely acts on the plasma membrane by modifying ABC transporter activity and lessening fungal resistance to antifungal drugs. In addition, the study reveals a promising new compound for treatment of *Microsporum* and *Trichophyton* related dermatophytosis. However, complementary studies are still needed to develop clinical applications for the use of linalool in association with azole drugs.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

FUNDING

These study was partially funded by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) with grant number 443272/2014-0.

REFERENCES

1. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008; 166:335-52.
2. Soares LA, Sardi JCO, Gullo FP, et al. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products, *Braz J Microbiol*. 2013; 44:1035-41.
3. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51:2-15.
4. Martins MP, Franceschini A, Jacob T, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *J Med Microbiol*. 2016; 65:605–10.
5. Rahman S. Genetic Predictors of Susceptibility to Dermatophytoses, *Mycopathologia*, 2017; 182:67-76.
6. Silva-Rocha WP, Azevedo MF, Chavez GM. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med*. 2016; 27:57-64.
7. Há SJ, Sun PL, Sung WW. Deep dermatophytosis caused by zoophilic strain of *Trichophyton interdigitale* with successful treatment of itraconazole. *Mycopathologia*. 2017; 7:715-20.
8. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol*. 2010; 85:657-67.
9. Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16:555-78.

10. Kaspers S, Syer S, Magin P. Oral antifungal medication for toenail onychomycosis. Cochrane Database Syst Rev, 2012; 4.
11. Ughachukwu PO, Unekwe PC. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. Ann Med Health Sci Res. 2012; 2:191-98.
12. Ghannoum M. Azole Resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. J Am Podiatr Med Assoc. 2016; 106:79-86.
13. Maranhão CA, Paiao FG, Fachin AL, Martinez-Rossi NM. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. J Med Microbiol. 2009; 58:163-98.
14. Cervelatti EP, Paiva E, Meirelles WF. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. Rev Bras Milho e Sorgo. 2002; 1: 30-7.
15. Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni WJR., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. J Med Microbiol. 2006; 55:1093-99.
16. Limaverde PW, Campina FF, Cunha FAB. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. Food Chem Toxicol. 2017; 109:957-61.
17. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. Food Chem Toxicol. 2008; 46:446-75.
18. Sokovic M, Glamoclija J, Kataranovski D, Marin PD, Vukojevic J, Brkic, D. Antifungal activity of the essential oils and components *in vitro* and *in vivo* on experimentally induced dermatomycoses at rats. Dig J Nanomater Bios. 2012; 7:959-66.
19. Beier RC. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. Poultry Science. 2014; 93:267-72.
20. Clinical and laboratory standards institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America.2002; 22(16).
21. Santos DA, Barros MES, Hamdan JS. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. J Clin Microbiol.2006; 44: 98-101.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
22. Barros MES, Santos DA, Hamdan, JS. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. Mycolol Res. 2006; 110:1355-60.
 23. Coutinho HD, Costa JGM, Lima EO, Silva VSF, Siqueira- Junior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy. 2008;54:328-30.
 24. Galgóczy L, Bácsi A, Homa M, Virágh M, Papp T, Vágvölgyi C. *In vitro* antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. Mycoses. 2011; 54:737-43.
 25. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2002; 49:345–51.
 26. Correa-Royero J, Tangarife V, Durán C, Stashenko E.A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. Rev Bras Farmacogn. 2010; 20:734-41.
 27. Dias IJ, Trajano, ERIS, Castro RD. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. Braz J Biol, 2017; 78: 368-374.
 28. Lima M, Medeiros A, Silva K, Pereira FO, et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. J Mycol Med. 2017; 27:195-202.
 29. Silva KVS, Lima MIO, Cardoso GN, Santos AS, Silva GS, Pereira FO. Inibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. Mycosis. 2017; 60: 387–93.
 30. Deising HB, Reimann S, Pascholati SF. Mechanisms and significance of fungicide resistance. Braz J Microbiol. 2008; 39: 286-95.
 31. Kapp E, Malan SF, Jacques J, et al. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in Mycobacterium tuberculosis: A Rational Drug Design Perspective Mini Rev Med Chem.2018; 18:72-86.
 32. Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, et al. Inhibitors of my mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10:983-98.
 33. Costa LM, Macedo EV, Oliveira FA, Ferreira JH, Gutierrez SJ, Peláez WJ, Lima FC, Siqueira Junior JP, Coutinho HD, Kaatz, GW, Freitas RM, Barreto HM. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. J Appl Microbiol. 2016; 121:1312-22.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
34. Cardoso NNR, Alviano CS, Blank AF, Romanos MTV, Rozental SR. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016.
35. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007; 70: 461-77.
36. Leite FS, Giannini MJS, Almeida AMF. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products. *Braz J Microbiol.* 2013; 44:1035-41.
37. Lopes G, Pinto E, Salgueiro L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis? *Mycopathologia.* 2017; 182: 143-67.

Table 1 - MIC values ($\mu\text{g/mL}$) of azoles drugs in the absence and presence of subinibitory concentrations of linalool or chlorpromazine in *Microsporium* spp and *Trichophyton* spp.

Drugs	MIC alone	Combined MIC (linalool)	Combined MIC (chlorpromazine)
Ketoconazole			
<i>T. rubrum</i> LM 148	2	0.125	0.25
<i>T. interdigitale</i> H6	1	0.25	0.25
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	1	1	1
<i>M. canis</i> LM 216	8	8	4
<i>M. gypseum</i> LM 666	8	2	2
Fluconazole			
<i>T. rubrum</i> LM 148	0.5	0.5	0.065
<i>T. interdigitale</i> H6	0.5	0.5	0.065
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	0.5	0.5	0.5
<i>M. canis</i> LM 216	32	32	8
<i>M. gypseum</i> LM 666	32	32	16
Itraconazole			
<i>T. rubrum</i> LM 148	0.5	0.50	0.065
<i>T. interdigitale</i> H6	0.5	0.50	0.065
<i>T. interdigitale</i> $\Delta\text{mdr}2$	0.5	0.50	0.50
<i>M. canis</i> LM 216	8	4	4
<i>M. gypseum</i> LM 666	4	4	2

MIC: minimal inhibitory concentration as geometric mean of three experiments.