



# ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO DO CARVACROL COM A ANFOTERICINA B OU COM O CETOCONAZOL



## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE ASSOCIATION OF CARVACROL WITH AMPHOTERICIN B OR WITH KETOCONAZOLE

SOARES, Gustavo Lima<sup>\*1</sup>; SANTOS, Brenda Lavínia Calixto dos<sup>2</sup>; LUZ, Brenna Ravena Araújo<sup>3</sup>; OLIVEIRA, Wylly Araújo de<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup> Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Sítio Olho D'água da Bica, S/Nº, Cep 58175-000, Cuité - PB, Brasil  
(fone; +55 83 3372 1900)

\* Autor correspondente  
e-mail: gustavolmsr@gmail.com

Received 20 April 2018; received in revised form 23 April 2018; accepted 24 April 2018

### RESUMO

Espécies de *Aspergillus* são causa de um elevado número de infecções fúngicas de difícil tratamento, apresentando expressivo número de óbitos devido complicações nos quadros severos de infecção. O objetivo foi avaliar a ação antifúngica do carvacrol contra espécies de *Aspergillus*, assim como avaliar as interações quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol. A atividade antifúngica do carvacrol foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo. As combinações das substâncias foram realizadas pela metodologia do checkerboard, para determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada. O carvacrol apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas de *Aspergillus* utilizadas nos ensaios. Nas associações das substâncias apenas uma combinação do carvacrol com a anfotericina B apresentou resultado satisfatório. As combinações do carvacrol com o cetoconazol não demonstraram bons resultados. Conclui-se que o carvacrol é um bom candidato a fármaco antifúngico devido sua boa atividade contra *Aspergillus* demonstrada no presente estudo, assim como em outros trabalhos na literatura. Sua combinação *in vitro* com a anfotericina B ou com o cetoconazol não apresentaram vantagens frente à utilização isolada dos antifúngicos.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*; Antifúngicos; Óleo essencial; Combinação.

### ABSTRACT

*Aspergillus* species are a cause of a high number of fungal infections of difficult treatment, presenting an expressive number of deaths due to the complications in the severe cases of infection. The objective was to evaluate the antifungal action of carvacrol against *Aspergillus* species, as well as to evaluate the interactions when associated with amphotericin B or ketoconazole. The antifungal activity of carvacrol was evaluated by the broth microdilution method. The combinations of the substances were performed by the checkerboard methodology, to determine the Index of Fractional Inhibitory Concentration. Carvacrol showed antifungal activity against all *Aspergillus* strains used in the trials. In combinations of substances, only a combination of carvacrol and amphotericin B presented satisfactory results. Combinations of carvacrol and ketoconazole have not shown good. It is concluded that carvacrol is a good candidate for the antifungal drug because of its good activity against *Aspergillus* demonstrated in the present study, as well as in other studies in the literature. Their combination *in vitro* with amphotericin B or ketoconazole did not present any advantages over the use of antifungal drugs alone.

**Keywords:** *Aspergillus*; Antifungals; Essential oil; Combination.

## INTRODUÇÃO

Os microorganismos do gênero *Aspergillus* são fungos aéreos amplamente distribuídos. Tais microorganismos são documentados como causa de quadros simples de síndromes alérgicas, porém podem ser causa de casos mais graves como infecções oportunistas invasivas (Vermeulen *et al.*, 2014). As infecções invasivas por *Aspergillus* representam as maiores taxas de morbidade e mortalidade entre pacientes severamente imunocomprometidos (Steinbach *et al.*, 2012).

Espécies do gênero são relatadas como causa de infecções pulmonares (Borges *et al.*, 2016), aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose pulmonar crônica, sinusite (Fortún *et al.*, 2012) e osteomielite em pacientes imunodeprimidos (Gomes *et al.*, 2013). Embora escassos casos de pacientes imunocompetentes que adquiriram a aspergilose invasiva também são relatados (Asare *et al.*, 2013). *Aspergillus fumigatus* é documentada uma das espécies mais envolvidas em casos de acometimento de pacientes imunocomprometidos, considerada a principal espécie causadora de aspergilose invasiva, sendo responsável por 50 a 90 % dos casos (Gibbons e Rokas, 2013).

O gênero *Aspergillus* utiliza de diversos mecanismos de virulência. O entendimento de tais mecanismos é fundamental no desenvolvimento de estratégias de investigação para combater as infecções causadas por estes fungos, assim como tratamentos eficazes. Os principais fatores de virulência são relacionados à estrutura fúngica, à liberação de proteases e aos alérgenos. Entretanto, mecanismos utilizados pelo fungo para se evadir do reconhecimento imunológico também são considerados importantes no estabelecimento da infecção (Chotirmall, *et al.*, 2014). As micotoxinas são importantes metabólitos produzidos por *Aspergillus* no processo de contaminação em alimentos. Quando ingeridas frequentemente podem induzir problemas nefrotóxicos e carcinogênicos (Garmendia e Vero, 2016).

O uso recorrente dos agentes antifúngicos desperta preocupações devido à seleção de cepas resistentes (Sahu *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2014). Os triazóis são o pilar do tratamento da aspergilose, embora a resistência a esses agentes antifúngicos possa estar associada à ineficiências nos tratamentos.

Infecções refratárias muitas vezes exigem uma mudança para outros agentes antifúngicos (Kano *et al.*, 2016). A anfotericina B é também frequentemente utilizada para o tratamento da aspergilose (Fortún *et al.*, 2012).

Novas alternativas para o controle de infecções fúngicas tem sido buscadas atualmente, sobretudo frente aos insucessos nos tratamentos com antifúngicos convencionais, devido ao surgimento de resistência pelos fungos. Novas perspectivas envolvem o uso de produtos obtidos de origem natural com atividade antimicrobiana (Castro e Lima, 2011).

A pesquisa de novas moléculas com potencial de atividade biológica surge como importante ferramenta terapêutica, permitindo tanto explorar novos alvos terapêuticos, como propor novas formas de atuar sobre alvos terapêuticos já estabelecidos (Fuentefria *et al.*, 2016). Recentemente, tem-se buscado utilizar os óleos essenciais ou seus constituintes isolados para o tratamento de infecções fúngicas (Pekmezovic *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antifúngica do carvacrol contra espécies de *Aspergillus*, assim como avaliar sua interação quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para realização dos testes foram utilizadas nove cepas fúngicas de *Aspergillus*: *A. flavus* LM-26, *A. flavus* LM-3, *A. flavus* LM-247, *A. flavus* LM-210, *A. flavus* LM-2, *A. flavus* ATCC-13013, *A. fumigatus* ATCC-46913, *A. fumigatus* ATCC-16913, *A. fumigatus* IPP-210.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo, utilizando como meio o caldo sabouraud dextrose (Castro e Lima, 2011; Cortez *et al.*, 2015). O inóculo fúngico foi preparado contendo aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  conídios/mL, com o auxílio do hemocítmetro (Abbaszadeh *et al.*, 2014). A concentração inicial do carvacrol testada foi 1024 µg/mL e diluída seriadamente 1:2 até a concentração final de 8 µg/mL. As concentrações iniciais da anfotericina B e do cetoconazol foram de 1024 µg/mL e diluídas seriadamente 1:2 até a concentração

final de 1 µg/mL.

Os experimentos foram conduzidos com inóculo contendo  $1-5 \times 10^5$  conídios/mL em cada cavidade da placa de microdiluição. As soluções foram preparadas com o auxílio de DMSO (dimetilsulfóxido). Controles positivos com DMSO nas mesmas concentrações utilizadas no teste foram realizados.

Os ensaios foram incubados, em estufa a aproximadamente 35 °C, durante 48 horas. Foi considerada como CIM, a menor concentração da substância testada capaz de produzir inibição visual do crescimento das cepas fúngicas utilizadas nos ensaios microbiológicos (CLSI, 2008).

## 2.2. Associação das substâncias

Para realização da associação do carvacrol com a anfotericina B ou com o cetoconazol foram preparadas, separadamente, diferentes soluções do carvacrol e dos antifúngicos nas concentrações de CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8.

O estudo das associações foi realizado pela técnica do checkerboard para determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), utilizando placas estéreis de microdiluição com 96 cavidades. As soluções foram distribuídas na placa de forma que todas as concentrações da substância A (carvacrol), na horizontal, combinassem com todas as concentrações da substância B (anfotericina B ou cetoconazol), na vertical.

O experimento da associação foi conduzido com inóculo contendo aproximadamente  $1-5 \times 10^5$  conídios/mL em cada cavidade. Para realização das associações foram utilizadas duas cepas fúngicas de *Aspergillus*.

Os ensaios foram incubados em estufa, a 35 °C, por 48 horas e após esse período foi determinada a CIM da associação.

O ICIF foi calculado através da equação;  $ICIF = CIF^A + CIF^B$ . Onde Concentração Inibitória Fracionária<sup>A</sup> ( $CIF^A$ ) foi calculado pela relação;  $CIM^A$  combinado/ $CIM^A$  sozinho, enquanto que o  $CIF^B = CIM^B$  combinado/ $CIM^B$  sozinho (Hemaiswarya *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011). Sendo A o carvacrol, e B a anfotericina ou o cetoconazol.

O ICIF foi classificado da seguinte forma: sinergismo ( $\leq 0,5$ ), indiferença ( $>0,5 < 4$ ) e antagonismo ( $\geq 4$ ) (Hemaiswarya *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o carvacrol apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas de *Aspergillus* utilizadas no ensaio, sendo observados alguns resultados com ação mais eficaz que o cetoconazol. O cetoconazol e a anfotericina B inibiram o crescimento de todas as cepas (Tabela 1).

A associação do carvacrol com a anfotericina B contra *A. flavus* ATCC-13013 apresentou sinergismo, porém o mesmo resultado não foi observado na mesma associação contra *A. fumigatus* ATCC-16913 (Tabela 2). As associações do carvacrol com o cetoconazol contra *A. flavus* ATCC-13013 e *A. fumigatus* ATCC-16913 foram indiferente e antagonista, respectivamente (Tabela 3).

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) juntamente com o timol (2-isopropil-5-metilfenol) são os constituintes majoritários dos óleos essenciais de alguns exemplares da família Lamiaceae, como orégano (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*), sendo sintetizados por essas espécies como uma ferramenta de defesa química contra a ação de microorganismos fitopatogênicos (Numpaue *et al.*, 2011). Desse modo, a eficácia antifúngica *in vitro* do carvacrol possa ser decorrente dessa finalidade.

Os óleos essenciais juntamente com seus constituintes isolados, a exemplo do carvacrol, são comumente relatados apresentando atividade antifúngica contra uma ampla gama de fungos (Numpaue *et al.*, 2011; Simović *et al.*, 2014). Tal atividade pode ser utilizada como uma alternativa mais segura aos fármacos convencionais (Simović *et al.*, 2014).

Em concordância com as concentrações inibitórias encontradas no presente estudo, Abbaszadeh *et al.* (2014) apontam a atividade antifúngica do carvacrol contra *A. flavus* e *A. fumigatus*, obtendo CIM igual a 100 µg/mL.

A atividade antifúngica do carvacrol é relacionada, por diversos autores, com a sua capacidade de atuar na membrana celular

fúngica causando um desequilíbrio iônico e omeostático acarretando no colapso e morte celular (Numpaque *et al.*, 2011; Simović *et al.*, 2014).

Há um desequilíbrio entre o número de novos antifúngicos encontrados e o surgimento de resistência fúngica. Tal fato tem incentivado diversos ensaios *in vitro* da combinação de antifúngicos. Relatos de associações sinérgicas demonstram vantagens frente a monoterapia, tais como; aumento no espectro e na potência da atividade da substância, redução de doses de substâncias tóxicas e redução do risco de surgimento de resistência. Por outro lado, uma interação antagônica da associação de substâncias antifúngicas pode aumentar o risco de toxicidade e diminuir a atividade antifúngica das substâncias. Desse modo, é de grande importância para a prática clínica a determinação da interação antagônica *in vitro* entre agentes antifúngicos (Campitelli *et al.*, 2017).

Apesar da busca por atividade sinérgica de associações de antifúngicos, alguns estudos relatam interações divergentes nas associações *in vitro* das substâncias, variando de efeito sinérgico ao antagonismo (Martín-Peña *et al.*, 2014; Campitelli *et al.*, 2017).

Os resultados encontrados no presente ensaio estão de acordo com a literatura. Estudos têm apontado associação de substâncias de origem natural, como os óleos essenciais, com a anfotericina B sendo observada atividade sinérgica. Em seu estudo El-Ahmady *et al.* (2013) realizou a associação da anfotericina B com óleo essencial de tomilho contra *Aspergillus*, indicando atividade sinérgica na associação das substâncias, assim como também efeito aditivo. Mahboubi e Bidgoli (2010) indicaram atividade sinérgica na associação do óleo essencial de *Myrtus communis* com a anfotericina B, contra *Aspergillus* e *Candida albicans*.

Freitas *et al.* (2013) realizaram a combinação do carvacrol com antifúngicos, por metodologia diferente da adotada em nosso trabalho, demonstrando atividade indiferente na combinação do carvacrol com a anfotericina B. A combinação do carvacrol com a nistatina apresentou atividade semelhante, pois a atividade das substâncias associadas permaneceu a mesma de quando utilizadas isoladamente. Em contrapartida a associação do carvacrol com o benzoilmetronidazol demonstrou

que a CIM do benzoilmetronidazol foi elevada em oito vezes quando comparada com a sua CIM isolada, considerada combinação antagônica.

## CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que o carvacrol é um promissor candidato a fármaco antifúngico. Sua combinação com a anfotericina B, assim como demonstrada por outros estudos, pode ser uma alternativa futura no combate das infecções por *Aspergillus*. Enquanto que o resultado da sua associação com o cetoconazol não apresentou vantagens frente à monoterapia.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFCG – Campus Cuité – pelo suporte para realização dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Asare, K. A.; Jahng, M.; Pincus, J. L.; Massie, C.; Leea, S. A. *Med. Mycol. Case*, 2013, 2, 6.
2. Borges, C. T. S.; Travassos, V. A.; Figueiredo, L. C.; Dragosavac, D.; Faez, D. C. S.; Passos, A. I. M. *Rev. Bras. Promoç. Saúde*, 2016, 29, 107.
3. Castro, R. D.; Lima, E. O. *Rev. Bras. Plantas Med*, 2011, 13, 203.
4. Chotirmall, S. H.; Mirkovic, B.; Lavelle, G. M.; Mcelvaney, N. G. *Mycopathologia*, 2014, 178, 363.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard - 3. ed. CLSI document M27-A3. Wayne, 2008.

6. Cortez, L. E. R.; Yamaguchi, M. U. Cortez, D. A. G.; Pesco, D. C. S. *Mundo Saúde*, 2015, 39, 433.
7. Fortún, J.; Meije, Y.; Fresco, G.; Moreno, S. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín*, 2012, 30, 201.
8. Fuentefria, A. M.; Andrade, S. F.; Silveira, G. P.; Kulkamp, I.; Pippi, B.; Machado, M. M.; Oliveira, L. F. S.; Cruz, L.; Frizzo, C.; Martins, A. F. J. *Infect. Control*, 2016, 5.
9. Garmendia, L.; Vero, S. *Int. J. Food Microbiol*, 2016, 216, 31.
10. Gibbons, J. G.; Rokas, A. *Trends Microbiol*, 2013, 21, 14.
11. Gomes, D.; Pereira, M.; Bettencourt, A. F. *Braz. J. Pharm. Sci*, 2013, 49.
12. Kano, R.; Sobukawa, H.; Murayama, S. Y.; Hirose, D.; Tanaka, Y.; Kosuge, Y.; Hasegawa, A.; Kamata, H. *J. Infect. Chemother*, 2012, 22, 133.
13. Pekmezovic, M.; Rajkovic, K.; Barac, A.; Senerović, L.; Arsenijevic, V. A. *Biochem. Eng. J*, 2015, 99, 131.
14. Sahu, J. K.; Ganguly, S.; Kaushik, A. *Chin. J. Nat. Med*, 2013, 11, 456.
15. Srinivasan, A.; Opez-ribot, J. L.; Ramasubramanian, A. K. *Drug Discov. Today Technol*, 2014, 11, 65.
16. Steinbach, W. J.; Marr, K. A.; Anaissie E. J.; Azie, N.; Quan, S. P.; Meier-kriesche, H. U.; *et al.* *J. Infect*, 2012, 65, 453.
17. Vermeulen, E.; Maertens, J.; Meersseman, P.; Saegeman, V.; Dupont, L.; Lagrou, K. *Clin. Microbiol. Infect*, 2014, 20, 333.
18. Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A. K.; Doble, M. *Phytomedicine*, 2008, 15, 639.
19. Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D. I.; Domingues, F. C. *Phytomedicine*, 2011, 19, 42.
20. Numpaque, M. A.; Oviedo, L. A.; Gil, J. H.; García, C. M.; Durango, D. L. *Trop. Plant Pathol*, 2011, 36.
21. Simović, M.; Delas, F.; Gradvol, V.; Kocevski, D.; Pavlović, H. J. *Intercult. Ethnopharmacol*, 2014, 3, 91.
22. Campitelli, M.; Zeineddine, N.; Samaha, G.; Maslak, S. J. *Clin. Med. Res*, 2017, 9, 451.
23. Martín-peña, A.; Aguilar-guisado, M.; Espigado, I.; Cisneros, J. M. *Clin. Infect. Dis*, 2014, 59, 1437.
24. El-ahmady, S.; El-shazly, M.; Milad, R. J. *Appl. Pharm. Sci*, 2013, 3, 26.
25. Mahboubi, M.; Bidgoli, F. G. *Phytomedicine*, 2010, 17, 771.
26. Abbaszadeh, S.; Sharifzadeh, A.; Shokri, H.; Khosravi, A. R.; Abbaszadeh, A. J. *Mycol. Med*, 2014, 24, 51.
27. Freitas, M. A.; Andrade, J. C.; Guedes, G. M. M.; Tintino, S. R.; Souza, C. E. S.; Leite, N. F.; Gondim, C. N. F. L.; Moraes-braga, M. F. B.; Matias, E. F. F.; Coutinho, H. D. M. *Biosci. J*, 2013, 29, 781.

**Tabela 1.** CIM do carvacrol, da anfotericina B e do cetoconazol contra *Aspergillus*.

CEPA	CIM carvacrol	CIM anfotericina	CIM cetoconazol
<i>A. flavus</i> LM-26	64 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL
<i>A. flavus</i> LM-3	32 µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
<i>A. flavus</i> LM-247	32 µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
<i>A. flavus</i> LM-210	256 µg/mL	2 µg/mL	32 µg/mL
<i>A. flavus</i> LM-2	32 µg/mL	2 µg/mL	32 µg/mL
<i>A. flavus</i> ATCC-13013	64 µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
<i>A. fumigatus</i> ATCC-46913	32 µg/mL	2 µg/mL	32 µg/mL
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	32 µg/mL	2 µg/mL	128 µg/mL
<i>A. fumigatus</i> IPP-210	16 µg/mL	2 µg/mL	1024 µg/mL

Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 2.** Associação do carvacrol com a anfotericina B.

Cepa	CIF carvacrol	CIF anfotericina	ICIF	Interação
<i>A. flavus</i> ATCC-13013	0, 125	0, 125	0, 25	Sinergismo
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	0, 125	1, 0	1, 125	Indiferença

Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 3.** Associação do carvacrol com o cetoconazol.

Cepa	CIF carvacrol	CIF cetoconazol	ICIF	Interação
<i>A. flavus</i> ATCC-13013	1, 0	0, 125	1, 125	Indiferença
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	8,0	0, 25	8, 25	Antagonismo

Fonte: Dados da pesquisa.