

ESTUDO *IN SILICO* DO PERFIL ANTIMICROBIANO DO  $\beta$ -CITRONELOL:  
POTENCIALIDADE COMO ANTIFÚNGICO*IN SILICO* STUDY OF THE ANTIMICROBIAL PROFILE OF  $\beta$ -CITRONELLOL:  
POTENTIAL AS AN ANTIFUNGALSILVA, Daniele de Figueredo<sup>1</sup>; NETO, Hermes Diniz<sup>2\*</sup>; FERREIRA, Maria Denise Leite<sup>3</sup>;  
FILHO, Abrahão Alves de Oliveira<sup>4</sup>; LIMA, Edeltrudes de Oliveira<sup>5</sup>.<sup>1,2,3,5</sup>Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde<sup>4</sup>Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande\* Autor correspondente  
e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received 30 April 2019; received in revised form 19 July 2019; accepted 20 July 2019

## RESUMO

O  $\beta$ -citronelol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) vem exibindo uma série de efeitos farmacológicos que despertam o interesse a cerca de seu potencial antimicrobiano, uma vez que várias substâncias da classe dos monoterpenos também já demonstraram possuir atividade neste perfil. Além disso, a emergência de espécies fúngicas resistentes à farmacoterapia atual representa um grave desafio aos sistemas de saúde, tornando necessária a busca de novas alternativas terapêuticas eficazes para lidar com este problema. Neste estudo, buscou-se realizar a análise do perfil antimicrobiano do  $\beta$ -citronelol. O software Prediction of Activity Spectra for Substances ou (PASS) *online* foi utilizado para estudar a atividade antimicrobiana da molécula do  $\beta$ -citronelol por emprego da análise *in silico*. Em contrapartida, foi realizado um estudo antifúngico *in vitro* desse monoterpeno. Para isso, foi determinado sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela a realização da técnica de microdiluição em placas de 96 cavidades em Caldo Saboraud Dextrose/RPMI frente a cepas sensíveis de *Candida albicans*, sendo esse ensaio realizado em duplicata. Na análise *in silico* do perfil antimicrobiano, foi revelado que o monoterpeno  $\beta$ -citronelol apresentou ter um perfil de bioatividade antimicrobiana diversa. Para a atividade antifúngica apresentou um valor percentual com Pa: 58,4% (predominante) e sua CIM de 128  $\mu$ g/mL que foi equivalente para todas as cepas testadas. O estudo *in silico* da molécula do  $\beta$ -citronelol permitiu considerar que o monoterpenoide apresenta ter maior probabilidade em ser bioativo contra agentes provocadores de infecções fúngicas.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -citronelol, *Candida albicans*, perfil antimicrobiano, *in silico*.

## ABSTRACT

$\beta$ -citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) has been exhibiting a number of pharmacological effects that creates interest about its antimicrobial potential, since several substances of the monoterpene class have already demonstrated to possess activity in this profile. In addition, the emergence of fungal species resistant to current pharmacotherapy poses a serious challenge to health systems, making it necessary to search for new effective therapeutic alternatives to deal with this problem. In this study, the antimicrobial profile of  $\beta$ -citronellol was analyzed. The Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) online software was used to study the antimicrobial activity of the  $\beta$ -citronellol molecule by the use of *in silico* analysis. In contrast, an *in vitro* antifungal study of this monoterpene was carried out. For this purpose, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the microdilution technique in 96-well plates in Saboraud Dextrose Broth/RPMI against sensitive strains of *Candida albicans*, and this assay was performed in duplicate. In the *in silico* analysis of the antimicrobial profile, it was revealed that the monoterpene  $\beta$ -citronellol had a diverse antimicrobial bioactivity profile. For the antifungal activity, it presented a percentage value with Pa: 58.4% (predominant) and its MIC of 128  $\mu$ g/mL, which was equivalent for all strains tested. The *in silico* study of the  $\beta$ -citronellol molecule allowed us to consider that the monoterpenoid is very likely to be bioactive against agents that cause fungal infections.

**Keywords:**  $\beta$ -citronellol, *Candida albicans*, antimicrobial profile, *in silico*.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo das propriedades farmacológicas dos óleos essenciais tem gerado grandes perspectivas na descoberta de novas moléculas terpênicas que sejam de interesse terapêutico (Viriato, 2014). Os terpenos constituem a classe de metabólitos secundários mais difundindo entre os produtos naturais (Shahidi *et al.*, 1999). Biossinteticamente são formados pela condensação de unidade base de isopreno pela via do ácido mevalônico (Baser & Buchbauer, 2010).

Dentre todas as subclasses terpênicas, são reconhecidos que os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais ao estar presente em 90% da composição (Bakkalli *et al.*, 2008) e compreende um enorme potencial biológico, tais como: atividade anti-inflamatória e cicatrizante (Riella *et al.*, 2012), analgésica (Guimarães *et al.*, 2013), ações sedativa, hipnótica e hipotérmica (Camargo & Vasconcelos, 2014) e antimicrobiana (Saddig & Khayat 2010; Qiu *et al.*, 2010).

O  $\beta$ -citronelol monoterpeno componente desses óleos em muitas plantas aromáticas medicinais, como espécies de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (popularmente conhecidas como citronela) (Kpoviessi *et al.*, 2014 Andrade *et al.*, 2012) e *Eucalyptus citriodora* (Hook.) KD Hill & LAS Johnson (eucalipto) (Olivero-Verbel *et al.*, 2010) tem pronunciadas ações farmacológicas tais como: vasodilatadora, anti-inflamatória e anticonvulsivante (Bastos *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2006) o qual chamam atenção para uma análise de seu perfil antimicrobiano. O propósito deste trabalho foi estudar o perfil antimicrobiano do  $\beta$ -citronelol por análise *in silico*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) *online* (<http://www.way2drug.com/passonline>) é um software destinado para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos. O espectro de atividade biológica de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de

atividade biológica, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. *Pass online* dá várias facetas da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (Srinivas *et al.*, 2014).

PASS oferece previsões com base na probabilidade de novos efeitos e mecanismos de ação com espectro de atividade requerido entre os compostos a partir de bases de dados internas, antigas e comerciais. *Pass online* prevê o espectro de atividade biológica para as impressões modificadas, com base em sua fórmula estrutural, juntamente com diferentes descritores como antifúngica, antiviral, anti-helmíntico, antiprotozoários, etc., por isso, é possível estimar se os novos compostos têm um efeito particular (Srinivas *et al.*, 2014).

### 2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para metodologia de atividade antifúngica, foram selecionadas cepas sensíveis de *Candida albicans* (ATCC-76485, ATCC-76645, LM-178 e LM-615), todos esses exemplares de micro-organismos leveduriformes foram obtidos a partir da Micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba-Brasil.

Os ensaios de atividade antifúngica para o ( $\pm$ )- $\beta$ -citronelol 95% (Sigma-Aldrich/USA), foram realizados de acordo com os protocolos de Cleeland & Squires (1991), Hadacek & Greger (2000) e Standards Institute Laboratory (CSLI) (2008). A determinação da CIM de  $\beta$ -citronelol, sobre cepas de *Candida* foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células contendo 96 poços.

Inicialmente, foram distribuídos 100  $\mu$ L de Caldo Sabouraud Dextrose/RPMI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100  $\mu$ L da emulsão do produto teste duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024  $\mu$ g/mL até 2  $\mu$ g/mL. Por fim, foi adicionado 10  $\mu$ L dos inóculos de *C. albicans* nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foi realizado o controle positivo, com nistatina (Sigma-Aldrich®/USA), em uma concentração

padrão (100 UI/mL), que já demonstrou ser efetiva contra cepas de *Candida*, visto que o objetivo do seu uso é apenas garantir que as cepas fúngicas fossem sensíveis ao antifúngico padrão; e o controle negativo, com Caldo Sabouraud Dextrose/RPMI acrescido de 10 µL do inóculo de leveduras, formando um microambiente favorável ao crescimento das cepas.

A CIM foi definida como a menor concentração do produto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios da microplaca, quando em comparação com seu controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas no ensaio realizado em duplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise *in silico* do perfil antimicrobiano do β-citronelol, foi revelado que o monoterpeno apresenta ter uma maior tendência a produzir considerável atividade antifúngica representada em valor percentual com Pa: 58,4% (Figura 1).

No ensaio de microdiluição sucessiva (modelo *in vitro*) realizado em duplicata, a CIM encontrada para o β-citronelol, correspondeu a uma CIM de 128 µg/mL equivalente a todas as cepas fúngicas testadas (Tabela 1).

Utilizado dentro de um ambiente regulatório e estimulada pela legislação recente (Marchant, 2012; ANVISA, 2012) as abordagens assistidas por computador (*in silico*) preveem por simulação o comportamento biológico de moléculas sobre o meio metabólica de mamíferos (Marchant, 2012).

Estas ferramentas computacionais se enquadram dentro de um repertório proposto de modelos alternativos para avaliação não somente de características farmacológicas como toxicológicas de um composto, além de modelos *in vitro*. Por isso, podem ser aplicadas para estudo de moléculas naturais, sintéticas, bem como, hipotéticas, realizados de forma rápida, reprodutível, normalmente baseado em biorreguladores humanos, fornecendo assim, resultados que podem levar a progressão de novas aplicações terapêuticas (Srinivas *et al.*, 2014; Angelo *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi revelado que o β-citronelol apresentou ter um perfil variado de atividades antimicrobianas, mas, dentre todos os efeitos detectados, a atividade antifúngica foi

predominante; a qual essa prevista propriedade foi confirmada nos ensaios *in vitro* contra as cepas de *C. albicans*.

O potencial anti-*C. albicans* aqui revelado por β-citronelol, também já foi obtida por outras estruturas monoterpênicas como eugenol (Miao *et al.*, 2007), timol (Guo *et al.*, 2009) e carvacrol (Manohar *et al.*, 2001) e dessa forma, isso mostra que a bioatividade evidenciada por β-citronelol acrescenta na capacidade antifúngica que monoterpenos apresentam contra o agente leveduriforme patogênico, oportunista mais comum aos seres humanos: *C. albicans* (Giolo & Svidzinski, 2010).

Esses achados, além de evidenciarem que os monoterpenos contém um grande potencial bioativo antifúngico, também confirmam que as abordagens *in silico* são úteis para descobrir uma nova droga com maior precisão, ao possibilitar orientação nos ensaios biológicos a serem realizados e otimizar tempo e investimentos que são aplicados durante esse processo.

### 4. CONCLUSÕES

O advento de modelos computacionais para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos permite avaliar diversos parâmetros de uma substância de maneira rápida, econômica e ambientalmente viável. O estudo *in silico* do β-citronelol demonstrou que este monoterpeno possui um amplo potencial bioativo, desde como antibacteriano até antiprotozoário e também como antifúngico, atividade esta que foi confirmada por ensaios *in vitro* contra cepas de *Candida albicans*, patógeno de grande relevância clínica mundial. A confirmação dos resultados obtidos *in silico* através de ensaios *in vitro* demonstram que esta molécula é um valioso candidato para a obtenção de novos fármacos para diferentes utilidades, ressaltando a necessidade de estudos futuros com este monoterpeno em outras áreas da química e farmacologia.

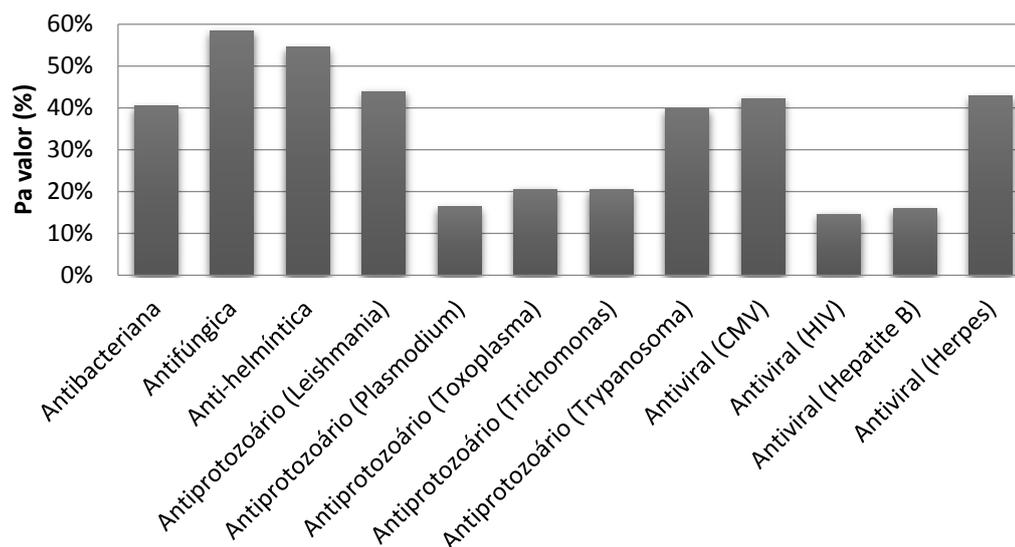
### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal da Paraíba e a CAPES pelo apoio estrutural e financeiro para a realização deste trabalho..

## 6. REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2 ed. Brasília, Distrito Federal. 2012.
2. Andrade, M.A.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R. *et al. Rev Ciên Agron.* **2012**, 43(2), 399-408.
3. Angelo, V.; Max, D.; Markus, A.L. *Bas Clin Phar Tox.* **2006**, 99(3), 195-208.
4. Bakkalli, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. *et al. Food Chem Toxicol.* **2008**, 46(2), 446-75.
5. Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. *New York: CRC Press Taylor & Francis Group*, **2010**.
6. Bastos, J.F.A.; Moreira, I.J.A.; Ribeiro, T.P. *et al. Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2009**, 106(4), 331-337.
7. Camargo, S.B.; Vasconcelos, D.F.S.A. *Rev Ciênc Méd Biol.* **2014**, 13(3), 381-7.
8. Cleeland, L.; Squires, E. *Baltimore: Williams & Wilkins*, **1991**.
9. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA. 2008.
10. Giolo, M.P.; Svidzinski, T.I.E. *J Bras Patol Med Lab.* **2010**, 46(3), 225-34.
11. Guimarães, A.G.; Quintans, J.S.S.; Quintans, L.J. *Phytother Res.* **2013**, 27(1), 1-15.
12. Guo, N.; Liu, J.; Wu, X. *et al. J Med Microbiol.* **2009**, 58, 1074-79.
13. Hadacek, F.; Greger, H. *Phytochem Anal.* **2000**, 11(3), 137-47.
14. Kpoviessi, S.; Bero, J.; Agbani, P. *et al. J Ethnopharmacol.* **2014**, 151(1), 652-59.
15. Manohar, V.; Ingram, C.; Gray, J. *et al. Mol Cell Biochem.* **2001**, 228, 111-17.
16. Marchant, C.A. *WIREs Comp Mol Sci.* **2012**, 2(3), 424-34.
17. Miao, H.; Minquan, D.; Mingwen, F. *et al. Mycopathologia.* **2007**, 163, 137-43.
18. Olivero-Verbel, J.; Nerio, L.S.; Stashenko, E.E. *Pest Manag Sci.* **2010**, 66(6), 664-68.
19. Qiu, J.; Feng, H.; Lu, J. *et al. Appl Environ Microbiol.* **2010**, 76(17), 5846-51.
20. Riella, K.R.; Marinho, R.R.; Santos, J.S. *et al. J Ethnopharmacol.* **2012**, 143(2), 656-63.
21. Saddiq, A.A.; Khayyat, S.A. *Pest Biochem Physiol.* **2010**, 98(1), 89-93.
22. Shahidi, F.; Kolodziejczyk, P.; Whitaker, J.R. *et al. New York: Springer Science+Business Media.* **1999**.
23. Sousa, D.P.; Goncalves, J.C.R.; Quintans-Júnior, L. *et al. Neurosci Lett.* **2006**, 401(3), 231-23.
24. Srinivas, N.; Sandeep, K.S.; Anusha, Y. *et al. Int Inv J Biochem Bioinform.* **2014**, 2(3), 20-29.
25. Su, Y.W.; Chao, S.H.; Lee, M.H. *et al. Planta Med.* **2010**, 76(15), 1666-1671.
26. Viriato, A. *Mundo saúde.* **2014**, 38(1), 40-50.

## $\beta$ -citronelol



**Figura 1:** Previsão de atividade antimicrobiana do  $\beta$ -citronelol obtidas pela ferramenta PASS on-line.

**Tabela 1:** CIM, CFM, CFM/CIM e efeito do citronelal e CIM da anfotericina B e fluconazol contra cepas das espécies de *Candida* não-*albicans*.

Cepas fúngicas	$\beta$ -citronelol CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	Controle negativo	Controle positivo
<i>C.a</i> ATCC-76485	128	-	+
<i>C.a</i> ATCC-76645	128	-	+
<i>C.a</i> LM-178	128	-	+
<i>C.a</i> LM-615	128	-	+

Legenda: +, efeito inibitório; -, sem efeito inibitório.