



ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO TIMOL COM A ANFOTERICINA B CONTRA *Rhizopus orizae*



STUDY OF THE ASSOCIATION OF TIMOL WITH ANFOTERICIN B AGAINST *Rhizopus orizae*

ANDRADE JÚNIOR, Francisco Patricio de^{1*}; TEIXEIRA, Anna Paula de Castro²; OLIVEIRA, Wylly Araújo de³; LIMA, Edeltrudes de Oliveira⁴; LIMA, Igara Oliveira⁵

¹ Graduando em Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Olho D'água da Bica S/N, cep 58175-000, Cuité – PB, Brasil
(fone: +55 84 98135-7242)

² Mestranda em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Olho D'água da Bica S/N, cep 58175-000, Cuité – PB, Brasil.
(fone: +55 84 9622-8013)

³ Prof. Dr. do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia e da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Olho D'água da Bica S/N, cep 58175-000, Cuité – PB, Brasil.
(fone: +55 083 3372-1982)

⁴ Profª Drª do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintético Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêutica, Castelo Branco, cep 58051-900, João Pessoa – PB, Brasil.
(fone: +55 083 3216-7026)

⁵ Profª. Drª. do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia e da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Olho D'água da Bica S/N, cep 58175-000, Cuité – PB, Brasil.
(fone: +55 083 3372-1982)

* Autor correspondente
e-mail: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

Received 13 June 2018; received in revised form 09 August 2018; accepted 09 August 2018

RESUMO

A mucormicose é uma infecção incomum que pode afetar vários sistemas como o respiratório, cutâneo, gastrointestinal, sistema nervoso central e órgãos profundos e apresenta altas taxas de mortalidade que podem variar de 70% a 100%. Os fungos do gênero *Rhizopus* são os responsáveis pelo maior número de casos dessa doença, tendo as espécies *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* como principais agentes etiológicos. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antifúngica do fitoconstituente timol contra cepas de *Rhizopus*, assim como avaliar a associação do monoterpeno timol à Anfotericina B. A avaliação da atividade antifúngica se deu através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), enquanto que a associação foi realizada pela metodologia de *Checkerboard*. A CIM do timol contra as cepas de *Rhizopus* foi de 256 µg/mL, enquanto que a CFM variou entre 512 µg/mL a 1024 µg/mL. O Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) da associação do timol com a anfotericina B foi 2,5 indicando que a associação entre o fitoconstituente e o fármaco foi indiferente. Diante dos resultados obtidos, o timol apresentou atividade antifúngica frente às cepas testadas e sua ação foi indiferente, quando associado à anfotericina B, nas condições avaliadas.

Palavras-chave: Associação, Anfotericina B, Timol, Fungos, *Rhizopus*.

ABSTRACT

Mucormycosis is an uncommon infection that can affect several systems such as respiratory, cutaneous, gastrointestinal, central nervous system and deep organs and has high mortality rates which can vary from 70% to 100%. Fungi of the *Rhizopus* genus are responsible for the largest number of cases of this disease, with the species *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* as the main etiological agents. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of thymol phytoconstituent against *Rhizopus* strains, as well as to evaluate the association of thymol monoterpene to Amphotericin B. The evaluation of the antifungal activity occurred through the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (CFM), while the association was performed by the Checkerboard methodology. The thymol MIC against the *Rhizopus* strains was 256 µg/mL, while the CFM ranged from 512 µg/mL to 1024 µg/mL. The Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of thymol association with amphotericin B was 2.5 indicating that the association between the drug and phytoconstituent was indifferent. In front of the results obtained, thymol presented antifungal activity against the strains tested; and its action was indifferent when associated with amphotericin B in the conditions evaluated.

Keywords: Association, Amphotericin B, Thymol, Fungi, *Rhizopus*.

INTRODUÇÃO

A mucormicose é uma infecção fúngica incomum que pode afetar diversos sistemas, incluindo o respiratório, cutâneo, gastrointestinal, sistema nervoso central e órgãos profundos (Al-Otaibi *et al.*, 2016).

Esta doença tem emergido como uma infecção potencialmente fatal de progressão rápida e com altas taxas de mortalidade (Petrikos; Skiada; Drogari-Apiranthitou, 2014).

Fungos da família Mucorales são os principais agentes responsáveis pelo desenvolvendo dessa doença, sendo o gênero *Rhizopus* (figura 1) o responsável pelo maior número de casos, tendo as espécies *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* como principais agentes etiológicos (Harrasser *et al.*, 2014).

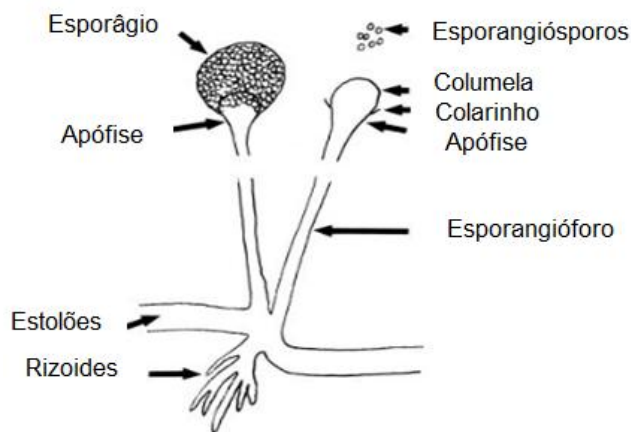


Figura 1. Representação micromorfológica de *Rhizopus* spp.

Fonte: Adaptado de RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000.

Os neutrófilos são a principal defesa contra estes fungos nos tecidos do hospedeiro. Assim, os indivíduos imunocomprometidos, são susceptíveis a proliferação fúngica e consequente desenvolvimento da mucormicose que pode apresentar-se nas formas clínicas: rino-cerebral, pulmonar, gastrointestinal, sistema nervoso central, subcutânea e de forma disseminada (Costa *et al.*, 2011; Pak *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2014)

Independentemente do órgão atingido por esta micose, a Anfotericina B (figura 2) é o fármaco de escolha, já que outros antifúngicos não se mostram eficazes contra estes microrganismos (Harvey; Champe; Fisher, 2008).

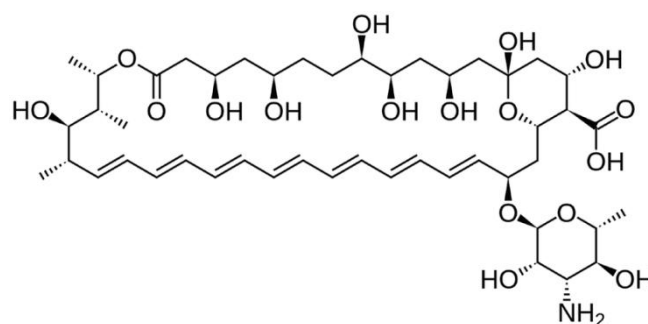


Figura 2. Estrutura química do fármaco Anfotericina B.

Fonte: FALCI; PASQUALOTTO, 2015.

A Anfotericina B se caracteriza por ser um antibiótico poliênico com atividade contra amplo espectro de fungos. Entretanto, possui vários efeitos adversos que contribuem para a baixa

adesão ao tratamento como calafrios, febre, náuseas, vômitos, cefaleia, hipotensão, tarquicardia, dispneia, além da nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e toxicidade hematalógica (Falci e Pasqualotto, 2015).

Levando em consideração a grande quantidade de efeitos adversos observados acerca de Anfotericina B para o tratamento de mucormicoses e a necessidade de outras alternativas terapêuticas eficazes, a busca por novas por novas formas e produtos para o combate a este tipo de infecção é essencial.

Dentre as possíveis novas alternativas têm-se o monoterpene timol (2-isopropil-5-metilfenol) (figura 3), que apresenta atividade antimicrobiana comprovada contra diversos microrganismos, sendo o principal monoterpene fenol isolado em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae, incluindo os gêneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* e *Monarda* (Marchese *et al.*, 2016).

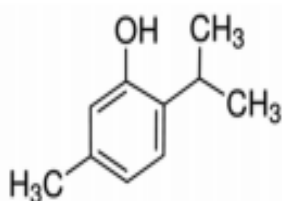


Figura 3. Estrutura química do monoterpene Timol.

Fonte: SOUZA; FERRAZ-FREITAS; OLIVEIRA, 2015.

Os fármacos podem ser utilizados de forma isolada ou associada, sendo a associação entre antimicrobianos vantajosa por permitir uma maior eficácia no tratamento farmacológico, além de proporcionar a diminuição dos efeitos adversos e consequente melhora na adesão ao tratamento.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo investigar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do monoterpene timol contra as cepas de *Rhizopus* spp. e associar esse fitoconstituente à anfotericina B para avaliar se existe sinergismo nessa combinação.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Inóculo

Foram utilizadas nos experimentos duas

cepas de *Rhizopus oryzae* (URL-4857 e LM-64) e uma cepa de *Rhizopus microsporus* (LM-5926). Os fungos foram cultivados em meio de cultura ASD, onde os tubos foram incubados por um período de 5 a 7 dias a 35°C. Após o período de incubação, os esporangiósporos foram suspensos pela adição de NaCl 0,85% estéril ao tubo contendo o meio de cultura juntamente com o fungo e em seguida foi agitado suavemente por 30 segundos e os esporangiósporos foram contados utilizando o hemocítmetro. A suspensão foi ajustada utilizando solução salina estéril para conter 5×10^4 esporangiósporos/mL (CLSI, 2010).

2.2. Agentes antifúngicos

O timol e a Anfotericina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções foram preparadas antes da realização dos testes, dissolvendo-as em Tween® 80 0,5%. Os veículos onde as drogas foram solubilizadas foram testados frente às cepas de *Rhizopus* no intuito de avaliar se o tween 80 poderia interferir na ação das drogas testadas ou possuir atividade biológica na presença das cepas utilizadas.

2.3. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração inibitória mínima do timol e da anfotericina B, foi determinada a partir da técnica de microdiluição. Em cada cavidade da placa de microdiluição foi adicionado 100 µL de caldo Sabouroud e posteriormente 100 µL da solução com o timol ou com a anfotericina B a serem testadas, obtendo-se por meio da diluição seriada 1:2 concentrações de 2.048 µg/mL até 0,5 µg/mL, por fim foram adicionados 10 µL do inóculo. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas e a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CLSI, 2010; Mota, 2013).

Após a determinação da CIM foram retirados 10 µL de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico e semeados em placas contendo Agar Saboround Dextrose (ASD), por fim as placas foram incubadas a 28°C durante 24 horas e em seguida o número de colônias foi determinada (Klepser *et al.*, 1998).

2.4. Estudo de associação através do método Checkerboard

A partir da CIM, foram preparadas soluções do timol e da anfotericina B em diferentes concentrações (CIM/8; CIM/4; CIM/2; CIM; 2xCIM; 4xCIM e 8xCIM). Em cada cavidade da placa de microdiluição foi adicionado 100 µL de caldo Sabouroud. Em seguida, adicionou-se 50 µL das diferentes concentrações de anfotericina B verticalmente nas cavidades da placa de microdiluição, enquanto que para o monoterpeno timol houve a adição de 50 µL de suas diferentes concentrações horizontalmente. Em seguida foi adicionado 20 µL do inóculo contendo a cepa *R. oryzae* LM-64. Todas as concentrações do timol foram combinadas e testadas com todas as concentrações da anfotericina B (D'Arrigo *et al.*, 2010). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliar a atividade dos dois fármacos combinados, foi determinada o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (IFIC) que é o somatório da Concentração Inibitória Fracionada de A (CIF de A) com a Concentração Inibitória Fracionada de B. O CIF de A é a CIM de A combinada/ CIM de A sozinha e o CIF de B é a CIM de B combinada/ CIM de B sozinha. Onde A é o timol e B é a anfotericina B. O sinergismo entre os fármacos ocorre quando a FIC é ≤ 0.5 ; a associação é considerada indiferente quando $FIC > 0.5$ ou ≤ 4.0 , enquanto que o antagonismo é constatado caso $FIC > 4.0$ (Tobudic *et al.*, 2010; Ruíz-Cendoya *et al.*, 2008; White *et al.*, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM do timol contra todas as cepas de *Rhizopus* testadas foi 256 µg/mL, enquanto a CIM da anfotericina B variou entre 4 e 8 µg/mL (Tabela 1).

Pode-se observar que o fitoconstituente timol apresentou atividade antifúngica. Considera-se que quando um produto apresenta, CIM entre 50-500 µg/mL indica que a substância testada possui atividade ótima, CIM com valores entre 600-1500 µg/mL indica atividade moderada e valores de CIM superiores a 1500 µg/mL são consideradas de atividade fraca (Sartoratto *et al.*, 2004).

Corroborando com os resultados obtidos, Mota *et al.*, (2012) observaram valores de CIM semelhantes tanto para a anfotericina B como para o monoterpeno timol em diferentes cepas de *Rhizopus*, que variou de 128 µg/mL à 256 µg/mL para o timol e 2 µg/mL à 4 µg/mL para a

anfotericina B.

A atividade antifúngica do timol não se restringe somente a cepas de *Rhizopus*, uma vez que, pesquisa indica que há atividade antifúngica deste fitoconstituente frente a cepas de *Candida* e *Microsporium canis* com CIM que variaram entre 39 µg/mL à 150 µg/mL e entre 8 µg/mL à 9,7 µg/mL, respectivamente (Fontenelle *et al.*, 2011). Em outro estudo que avaliou a atividade anti-*Candida* deste monoterpeno, observou-se que a CIM frente diversas cepas variaram entre 64 à 128 µg/mL (Guo *et al.*, 2009). A CFM do timol contra *Rhizopus* spp. está representada na tabela 2.

Os valores de CFM variaram entre 512 µg/mL a 1024 µg/mL, corroborando com estes resultados, Mota *et al.*, (2012) observaram que a CFM do timol frente a cepas de *Rhizopus* variou entre 128 µg/mL a 1024 µg/mL (Mota *et al.*, 2012). Castro *et al.*, (2015), por sua vez, verificaram que a CFM deste fitoconstituente frente a cepas do gênero *Candida* variaram entre 39 µg/mL a 78 µg/mL, enquanto Fontenelle *et al.*, (2011) observaram que os valores de CFM variaram entre 78 µg/mL a 310 µg/mL frente a cepas de *Candida* e entre 4,8 µg/mL à 9,7 µg/mL para cepas de *M. canis* (Fontenelle *et al.*, 2011).

A determinação de CIM e CFM *in vitro* se faz necessário, tendo em vista que, em pacientes (ou indivíduos) imunocompetentes e infecções não complicadas, os níveis de CIM serão geralmente suficientes para guiar a terapia antifúngica. Entretanto, no caso de indivíduos com sistema imune deficiente ou suprimido, o valor da CFM mostra-se mais útil para guiar a terapia da doença infecciosa (Dantas, 2013).

A associação entre antifúngicos pode diminuir a seleção de cepas resistentes e ao diminuir a concentração de cada fármaco isolado minimiza os efeitos colaterais e aumenta a efetividade. Por isso, foi realizado um estudo da associação entre o fitoconstituente timol e o fármaco anfotericina B, por meio do método de *checkerboard*.

O método de *checkerboard* avalia a evolução da CIM individual de cada fármaco na presença de um segundo fármaco, sendo uma das técnicas de associação mais utilizadas entre os pesquisadores (Santos, 2010). O Índice da Concentração Inibitória Fracionada da associação entre o timol e a anfotericina B foi igual a 2,5; por isso, a combinação entre eles foi considerada indiferente (Tabela 3).

A indiferença farmacológica se dá quando o mecanismo de ação de um fármaco não interfere no mecanismo de ação do outro, ou seja, os medicamentos não interagem sob nenhum aspecto de sua ação farmacodinâmica ou farmacocinética (Oliveira, 1986).

Estudos que utilizam o timol associado a fármacos utilizados na terapêutica antifúngica, demonstraram que a associação deste monoterpene com os fármacos nistatina e fluconazol apresentou-se sinérgica frente a cepas de *Candida albicans* (Castro *et al.*, 2015; Pemmaraju *et al.*, 2013). Enquanto que a associação entre timol e anfotericina B demonstrou efeitos sinérgicos frente cepas de *C. albicans* (Guo *et al.*, 2009).

Deste modo, é necessário salientar que este é o primeiro estudo que relata o efeito indiferente entre a combinação do timol e a anfotericina B para uma cepa de *R. oryzae*. Portanto, os achados aqui descritos podem nortear outros estudos que abordem a mesma temática como foco centralizador.

CONCLUSÕES

O fitoconstituente timol apresentou atividade antifúngica frente a cepas do gênero *Rhizopus* podendo representar uma nova possibilidade para a terapêutica antifúngica, e ao associá-lo a anfotericina B observou-se que esta combinação apresentou-se indiferente, nas condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

1. Al-Otaibi, A. M., Al-Shahrani, A. A., Al-Idrissi, E. M., Al-Abdely, H. M. *Saudi Med J*, **2016**, *37*, 569.
2. Petrikos, G., Skiada, A., Drogari-Apiranthitou, M. *Clin Microbiol Infect*, **2014**, *20*, 73.
3. Harrasser, N., Banke, I. J., Hauschild, M., Lenze, U., Prodingler, P. M., Toepfer, A., Peschel, C., Eisenhart-Rothe, R., Ringshausen, I., Verbeek, M. *BMC Infect Dis.*, **2014**, *14*, 6.
4. Costa, M. A., Reis, R. F., Seca, M., Queirós, J., Pinto, M. C., Araújo, M. *Oftalmologia*, **2011**, *55*, 359.
5. Pak, J., Tucci, V.T., Vicent, A.L., Sandin, R.L., Greene, J.N. *J Emerg Trauma Shock*, **2008**, *1*, 113.

6. Souza, J. M., Sproesser Júnior, A. J., Felippu Neto, A., Fuks, F. B., Oliveira, C. A. C. *Einstein*, **2014**, *12*, 350.
7. Harvey, R. A., Champe, P. C., Fisher, B. C. *Microbiologia Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, **2008**.
8. Falci, D. R., Pasqualotto, A. C. *Clin Biomed Res.*, **2015**, *35*, 82.
9. Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Lorenzo, A. D., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S. M. *Food Chem.*, **2016**.
10. CLSI. Manual clinical and laboratory standards institute, **2002**, *22*, 50.
11. Mota, K. S. L. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. e Fitoconstituintes Contra *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*: Interação com Ergosterol [tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, **2013**.
12. Klepser, M. E., Ernst, E. J., Ernst, M. E., Messer, S. A., Pfaller, M. A. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 1391.
13. D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P. M., Bisignano, G. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 322.
14. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Graninger, W., Presterl, E. J. *Antimicrob Chemother*, **2010**, *65*, 274.
15. Ruiz-Cendoya, M., Rodriguez, M. M., Mariné, M., Pastor, F. J., Guarro, J. *Int J Antimicrob Agents.*, **2008**, *32*, 420.
16. White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., Bosso, J. A. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**, *40*, 1918.
17. Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G. *Braz J Microbiol*, **2004**, *35*, 280.
18. Mota, K. S. L., Pereira, F. O., Oliveira, W. A., Lima, I. O., Lima, E. O. *Molecules*, **2012**, *17*, 14433.
19. Fontenelle, R. O., Morais, S. M., Brito, E. H., Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Lima, Y. C., Brasil, N. V., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J., Rocha, M. F. *Molecules*, **2011**, *16*, 6431.
20. Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X., Yu, L. *J Med Microbiol*, **2009**, *58*, 1079.
21. Castro, R. D., Souza, T. M., Bezerra, L. M., Ferreira, G. L., Costa, E. M., Cavalcanti, A. L. *BMC Complement Altern Med.*, **2015**, *15*, 7.
22. Dantas, T. B. Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero

- Penicillium [dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, **2013**.
23. Santos, R. D. T. Perfil de susceptibilidade e resultados da associação de antifúngicos: um novo método [dissertação]. Lisboa: Universidade de Lisboa, **2010**.
 24. Oliveira, D. S. *Caderno de Farmácia*, **1986**, 2, 110.
 25. Pemmaraju, S. C., Pruthi, P. A., Prasad, R., Pruthi, V. *Indian J Exp Biol.*, **2013**, 51, 1037.
 26. Souza, C. R. F., Ferraz-Freitas, P., Oliveira, W. P. C. *Química Nova*, **2016**, 39, 986.
 27. Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., Baker, D. J. *Clin Microbiol Rev.*, **2000**, 13, 301.

Tabela 1. CIM do timol e Anfotericina B contra cepas de *Rhizopus spp.*

Cepa	Controle positivo	Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)	Timol ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Rhizopus orizae</i> LM – 64	+	8	256
<i>Rhizopus microsporus</i> LM – 5926	+	4	256
<i>Rhizopus orizae</i> URL – 4857	+	8	256

+Crescimento fúngico.

Tabela 2. CFM do timol frente a cepas de *Rhizopus*.

Cepa	Controle positivo	Timol ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Rhizopus orizae</i> LM – 64	+	1024
<i>Rhizopus microsporus</i> LM – 5926	+	512
<i>Rhizopus orizae</i> URL – 4857	+	512

+Crescimento fúngico.

Tabela 3. Determinação da FIC da associação entre o fitoconstituente timol e a Anfotericina B frente à cepa de *Rhizopus orizae* LM-64.

Cepa	Combinação A	CIF A	CIF B	ICIF	Interpretação
	+ B				
<i>Rhizopus orizae</i> LM-64	Timol + Anfotericina B	0,5	2.0	2.5	Indiferente