

LUCIANI GASPAR DE TOLEDO

Extrato etanólico e óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: caracterização química e avaliação *in vitro* do potencial antifúngico

**São José do Rio Preto
2016**

LUCIANI GASPAR DE TOLEDO

Extrato etanólico e óleo essencial de *Cymbopogon
nardus* (L.) Rendle: caracterização química e
avaliação *in vitro* do potencial antifúngico

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto para a
obtenção do título de Mestre no
curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde. Eixo
temático: Medicina e Ciências
Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo
de Almeida

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2016

De Toledo, Luciani Gaspar

Extrato etanólico e óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.)

Rendle: avaliação, *in vitro*, do potencial antifúngico/ Luciani Gaspar de Toledo

São José do Rio Preto, 2016

94 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. *Cymbopogon nardus*; 2. Óleo essencial; 3. Extrato etanólico; 4. Atividade antifúngica; 5. *Candida spp*; 6. Análise química;

LUCIANI GASPAR DE TOLEDO

Extrato etanólico e óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: caracterização química e avaliação *in vitro* do potencial antifúngico

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Margarete
Teresa Gottardo de Almeida

2º Examinador: Profa. Dra. Tais Maria Bauab

3º Examinador: Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles
Nogueira

Suplente: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

Suplente: Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de
Mattos

São José do Rio Preto, 16/02/2016

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	9
ARTIGO 1.....	11
1. INTRODUCTION	13
2. MATERIALS AND METHODS.....	15
2.1. <i>Plant Material</i>	15
2.2. <i>Essential oil (EO) extraction</i>	15
2.3. <i>Citronellal</i>	16
2.4. <i>Gas chromatography (GC) analysis of EO</i>	16

2.4.1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	16
2.4.2. Gas chromatography (GC-FID)	17
2.5. Antifungal activity	17
2.5.1. Fungal strains	17
2.5.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).....	18
2.5.3. Determination of minimum fungicidal concentration (MFC)	19
2.6. Inhibition on <i>Candida albicans</i> hyphae growth.....	19
2.7. Time-kill assay	19
2.8. Biofilm assay	20
2.9. Cytotoxic activity.....	21
2.9.1. Cell lines	21
2.9.2. Cytotoxic assay	21
3. RESULTS AND DISCUSION	22
3.1. Chemical composition of essential oil.....	22
3.2. MIC and MFC determination of EO	25
3.3. MIC and MFC determination of citronellal	27
3.4. Inhibition on <i>Candida albicans</i> hyphae growth.....	28
3.5. Time-kill assay	29
3.6. Biofilm	31
4. CONCLUSION	33
5. Acknowledgments.....	33

6. REFERENCES.....	33
ARTIGO 2.....	38
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Material and Methods	42
Plant Material.....	42
Extract preparation.....	42
UPLC-ESI-QTOF-MS(/MS) analysis of extract.....	42
Solid phase extraction (SPE).....	43
Thin layer chromatography (TLC).....	44
Antifungal activity	44
Fungal strains	44
Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).....	44
Determination of minimum fungicidal concentration (MFC).....	45
Inhibition on <i>Candida albicans</i> hyphae growth.....	46
Time-kill assay.....	46
Biofilm assay.....	47
Cytotoxic activity.....	48
Cell lines	48
Cytotoxic assay	48
Results and Discussion.....	49

Solid phase extraction	49
Chemical analysis	49
MIC and MFC determination of ethanolic extract	55
MIC and MFC determination of fractions	57
Inhibition on <i>Candida albicans</i> hyphae growth.....	59
Time-kill assay	60
Effect of EE on mature biofilm.....	62
Cytotoxic evaluation	63
Conclusions.....	64
Acknowledgments.....	64
References.....	64
4. CONCLUSÕES	70
5. REFERÊNCIAS.....	72

Dedicatória

*Aos meus queridos pais,
Valdomiro e Maria, e aos
meus irmãos, Luciano e
Luciomar, por me darem o
privilégio de conhecer o amor
nesta vida.*

Agradecimentos

A Deus por me guiar em meus sonhos e ao meu anjo da guarda por sempre me fazer persistir.

À minha família por todo o apoio, em especial aos meus pais, Valdomiro e Maria, pelo amor infinito.

Aos meus irmãos, Luciano e Luciomar, por todo o companheirismo e por ser o meu elo único entre meu passado e meu futuro.

Às minhas cunhadas, Camila e Maria Emília por toda sensibilidade diante das realizações dos meus sonhos e por toda a nossa amizade.

Aos meus sobrinhos, Maria Carolina, Ana Julia e Felipe por darem sentido a minha vida e por me fazerem conhecer a pureza do amor.

À Profa. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela orientação, por todo o conhecimento científico e pessoal e pela amizade tão verdadeira. Sobretudo, pela orientação espiritual sempre presente nos momentos de dificuldades e por ser uma fonte inspiração na minha caminhada, me iluminado com a sua luz intrínseca.

Ao Matheus Aparecido dos Santos Ramos, pela parceria profissional abençoada por Deus. Sobretudo, por ser um irmão de alma, seu anjo da guarda se encontrou com o meu e desde então nunca mais se separaram e a partir daí conheci a verdadeira cumplicidade e confiança que possa existir em uma amizade. Além disso, agradeço por ser uma inspiração me fortalecendo em seguir em frente e ainda pela motivação profissional e pessoal, sendo o meu porto-seguro.

À Larissa Sposito pelo companheirismo profissional e acima de tudo por toda a amizade verdadeira e companheirismo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Felipe Guiotti e Lucio Barros pela amizade verdadeira e por me sempre me acolherem como grandes amigos.

À vó Nilde por me acolher em sua casa como uma filha, por todos os momentos de alegria, pela jovialidade e paz de espírito que ela transmite e por todos os ensinamentos de vida.

Aos meus tios, Pedro, Fatima, Rui e Celso, aos meus primos, Jociene, Fabiano, Pedro Manoel, Ricardo, Lidia e Lucas por todo o carinho e companheirismo durante esta vida e por constituírem a minha segunda família.

Aos meus avós Benedito Amâncio Soares, Leontina Dias Soares, Francisco Gaspar de Toledo, Antônia de Souza e à tia Anita pela força espiritual recebida e por me guiarem em todas as etapas da minha vida.

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP:

À Luceli Ferreira de Souza, pela disposição e por ser sempre tão prestativa no desenvolvimento deste trabalho. À Natália Seron Brizzotti, Mayara Gambellini, Luis Paulo Teixeira, Maira Gazzola Arroyo, João Paulo Zen, Mariela Ribeiro, Maicon Henrique Caetano, Thiago Henrique Lemes, Beatriz Gomes Ricardo, Diego Maximiano, Fabio Buscariolo, Máisa Guimarães Sartim, Lorena Galete, Bianca Gottardo Almeida por todo o companheirismo e amizade.

Ao Eduardo José de Carvalho Reis e à Emília Cristina Gianizella Amorim por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes na companhia de um café.

Às queridas amigas, Crislene Barbosa Almeida, à Iara Thais Dias Mendes e à Renata Jorge Tiossi pela amizade verdadeira e confiança, todas sempre me emprestando o colo e os ouvidos diante das minhas dificuldades.

À Profa. Elza Maria Castilho por ter me acolhido em seu laboratório e pela disposição e atenção durante todos esses anos. Além disso, por toda a amizade e apoio espiritual na minha caminhada.

À Profa. Cleuzenir por também ter me acolhido em seu laboratório e pela amizade e companheirismo sempre presente durante todos esses anos, e que certamente se eternizarão.

À Profa. Vanderli Marchiori por todo o apoio, pela amizade infinita e pelos ombros sempre dispostos a me acolher. Sobretudo, por mexer seu caldeirão perfumando nossos dias sendo uma fonte de inspiração.

À Profa. Cinara Cassia Brandão de Mattos por toda atenção durante a solicitação de bolsa deste projeto, pelas contribuições científicas e pela amizade.

À Profa. Mara Correa Lelles Nogueira por todo apoio e amizade durante a realização deste projeto.

À Profa. Tais Maria Bauab, por ser parte do desenvolvimento deste trabalho me abrindo caminhos sempre de forma tão disposta, com muito carinho e atenção.

Sobretudo, por toda a disposição e trabalho em meu processo seletivo de doutorado, possibilitando novos caminhos.

A todos do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP/FCFAR, por todo auxílio.

Ao Prof. André Gonzaga dos Santos por me acolher em seu laboratório e por ter sido tão atencioso e prestativo.

A todos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP/FCFAR, por todo auxílio.

Ao Prof. Fernando Rogério Pavan por me receber em seu laboratório e por todo auxílio.

A todos do Laboratório de Micobacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP/FCFAR, por todo auxílio.

Ao Prof. David Hewitt por todo ensinamento e pelos momentos de psicoterapia em suas aulas de inglês.

À Luciana Lemos Palma por me fazer acreditar nas possibilidades da alma e do coração, e por todo companheirismo e cumplicidade, me fortalecendo na realização deste trabalho.

Às minhas queridas amigas de infância, adolescência e de toda a vida, Karla Green, Natália Bernardo, Mariele Simon, Elisama Brito, Roberta Green, Ana Paula Fais, Renata Ribeiro e Maria Claudia Piccolo por serem uma fonte de confiança e de amizade verdadeira durante toda a minha vida.

Às queridas amigas de pós-graduação *lato sensu*, Ana Carolina Garcia, Gabriele Comachio, Simone Penha, Renata Ferracioli, Rosana Loiola, Sandra Giacomelli, Rosana Bugati, Ellen Vieira, Regiane Nobre por sempre vibrarem com as minhas conquistas e por toda a amizade durante os dois anos de pós-graduação.

A todos os meus queridos alunos que me fizeram acreditar em meus sonhos dando sentido a minha vida profissional.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta dissertação Mestrado.

Epígrafe

“A felicidade só é verdadeira se for partilhada”

(Christopher McCandless)

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

Figura 1: *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.....4

ARTIGO 1

Figure 1. Inhibitory effect of EO on transition of *C. albicans* from yeast to hyphal form.
..... 28

Figure 2. Time-kill curves of *Candida* spp following exposure essential oil (EO) and amphotericin-B. Control represents the untreated *Candida* cells. 30

Figure 3. Percentage of inhibition of essential oil (EO) against biofilms of *Candida* species..... 31

ARTIGO 2

Figure 1. Total ion chromatogram (TIC) of EE obtained in the positive mode..... 49

Figure 2. Total ion chromatogram (TIC) of EE obtained in the negative mode..... 51

Figure 3. Inhibitory effect of EE on transition of *C. albicans* from yeast to hyphal form.
..... 59

Figure 4. Time-kill curves of *Candida* spp following exposure ethanolic extract and amphotericin-B. Control represents the untreated *Candida* cells. 61

Lista de Tabelas

ARTIGO 1

Table 1. Composition of essential oil from the leaves of <i>C. nardus</i>	23
Table 2. MIC values ($\mu\text{g/mL}$) and MFC values ($\mu\text{g/mL}$) of essential oil (EO) from <i>Cymbopogon nardus</i> against <i>Candida</i> species.	25
Table 3. MIC values ($\mu\text{g/mL}$) and MFC values ($\mu\text{g/mL}$) of citronellal against <i>Candida</i> species.....	28
Table 4. Anti-biofilm effect of EO against <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> and <i>C. parapsilosis</i> . 31	
Table 5. Cytotoxic activity of essential oil of <i>Cymbopogon nardus</i> and citronellal.....	32

ARTIGO 2

Table 1. Data of SPE fractions.....	49
Table 2. Proposed phenolic compounds detected in <i>C. nardus</i> extract by UPLC-ESI-QTOF-MS(/MS).	53
Table 3. MIC and MFC values of <i>C. nardus</i> extract against <i>Candida</i> species.....	55
Table 4. MIC values of fractions (A-G) from <i>Cymbopogon nardus</i> against <i>Candida</i> species.....	58
Table 5. Concentration of EE against mature biofilm of <i>Candida</i> species.....	63
Table 6. Cytotoxic activity of ethanolic extract of <i>Cymbopogon nardus</i>	63

Lista de abreviaturas e siglas

AmB- Amphotericin-B

ATCC- American Type Culture Collection

CEP-FAMERP- Comitê de Ética em Pesquisa- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

CFU- Colony-forming unit

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- Dimetilsulfoxide

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid

EE- Ethanolic extract

EO- Essential oil

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FLU- Fluconazole

GC-MS- Gas chromatography-mass spectrometry

GC-FID- Gas chromatography-flame ionization detector

IC₅₀- Half maximal inhibitory concentration

MIC- Minimal inhibition concentration

MFC- Minimal fungicidal concentration

MOPS- 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

MS- mass spectra

SDA- Sabouraud Dextrose Agar

SDB- Sabouraud Dextrose Broth

SPE- Solid phase extraction

TIC- Total ion chromatogram

TLC- Thin layer chromatography

t_R- Time retention

TTC- 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

UPLC-MS- Ultra-performance liquid chromatography-mass-spectrometry

UPLC-ESI-QTOF-MS(/MS)- Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization quadruple time-of-flight/mass spectrometry

XTT-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[carbonyl(phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide

Resumo

Introdução: Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas isolados da biota humana no trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal, que podem levar ao desenvolvimento de lesões superficiais até infecções disseminadas, especialmente em situações de imunossupressão. O alto custo para tratamento de infecções, a elevada toxicidade, e o surgimento de cepas resistentes justificam a busca de novos agentes terapêuticos. A biodiversidade vegetal é rica em princípios ativos que têm contribuído com o desenvolvimento de novos e efetivos medicamentos, mais econômicos e de fácil acesso populacional. *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, é uma planta popularmente conhecida como citronela e cultivada em áreas subtropicais e tropicais da Ásia, África e América, incluindo o Brasil. Os óleos essenciais presentes em plantas do gênero *Cymbopogon* têm sido amplamente estudados, porém, a análise química e microbiológica do extrato etanólico de *C. Nardus*, é pouco explorada. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico, *in vitro*, do extrato etanólico (EE) e do óleo essencial (OE) das folhas de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela) frente isolados clínicos de *Candida* spp. **Material e Métodos:** Foram consideradas as espécies: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis sensu stricto* e *C. orthopsilosis*. O EE foi obtido por extração em banho ultrassônico e analisado por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC-ESI-QTOF-MS). O OE foi extraído por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). A atividade antifúngica do EE e do OE foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ensaio *time-kill*, inibição do crescimento hifal de *C. albicans* e inibição de biofilme maduro. Adicionalmente, a avaliação citotóxica (determinação de IC₅₀) foi estabelecida em linhagens celulares HepG-2 (hepática) e MRC-5 (fibroblasto). **Resultados:** Os resultados da análise química do EE evidenciaram presença de flavonas e fenilpropanoides glicosilados. De acordo com a análise química do OE, os principais compostos observados foram monoterpenos contendo oxigênio: citronelal, geranial, geraniol, citronelol e neral. Os ensaios biológicos mostraram importante atividade antifúngica para o EE (CIM de 1000 a 125 µg/mL) e, para o OE (CIM de 1000 a 250 µg/mL). A inibição do crescimento ocorreu para todas as espécies avaliadas frente aos produtos, EE e OE. O EE (1000 até 31 µg/mL) e OE (1000 até 15,8 µg/mL) inibiram o desenvolvimento da hifa de *C. albicans*, durante 12 e 24 horas, além de inibir o biofilme maduro das espécies de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, nas concentrações de 50xCIM e 10xCIM, respectivamente. O EE apresentou os menores valores de IC₅₀ para HepG-2 (322 µg/mL) e MRC-5 (181,1 µg/mL) em comparação com o óleo essencial - IC₅₀ para HepG-2 (96,6 µg/mL) e MRC-5 (33,1 µg/mL). **Conclusões:** O EE e OE de *C. nardus* apresentam-se como uma fonte promissora de novas moléculas com atividade antifúngica com destaque à inibição dos principais fatores de virulência: formação de hifa e biofilme.

Palavras-chave: *Cymbopogon nardus*; óleo essencial; extrato etanólico; atividade antifúngica; *Candida* spp; análise química;

Abstract

Introduction: *Candida* spp are opportunistic pathogens isolated from human biota in the gastrointestinal tract, oral and vaginal mucosa, which can lead to the development of superficial lesions to disseminated infections, especially in immunosuppression. The high toxicity, the high cost of treatment and the emergence of resistant strains justify the search for new therapeutic agents. The plant biodiversity is rich in active ingredients that have contributed to the development of new and effective drugs, less expensive treatments and population access. *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle is a plant popularly known as citronella and cultivated in subtropical and tropical areas of Asia, Africa and America, including Brazil. Essential oils present in the *Cymbopogon* genus plants have been widely studied, but there are few studies involving chemical analysis and microbiological ethanol extract of *C. nardus*. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the antifungal potential, *in vitro*, of ethanol extract (EE) and essential oil (EO) from the leaves of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronella) clinical isolates against of *Candida* spp. **Material and Methods:** In this study the species *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* sensu stricto and *C. orthopsilosis* were selected. EE was obtained by extraction ultrasonic bath and analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC-ESI-QTOF-MS). The EO was extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The antifungal activity of EE and EO was performed by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), time-kill assay inhibition of hyphal growth of *C. albicans* and inhibit mature biofilm. Additionally, the cytotoxic evaluation (determination of IC₅₀) was assessed in HepG-2 cell lines (hepatic) and MRC-5 (fibroblast). **Results:** The results of the chemical analysis of EE showed presence of glycosylated flavones and glycosylated phenylpropanoids. According to the EO chemical analysis, the main compounds observed were monoterpenes containing-oxygen: citronellal, geranial, geraniol, citronellol and neral. Biological assays showed effective antifungal activity of EE (MIC 1000 to 125 µg / ml) and of EO (MIC 1000 the 250 µg/ml). In the time-kill assay was observed inhibition of growth of the species tested for EE and EO. The hyphal growth of *C. albicans* was inhibited by EE (1000 to 31 µg/ml) and the EO (1000 to 15.8 µg/ml) for 12 and 24 hours. The EE and EO inhibit mature biofilm species *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* at concentrations of 50xCIM and 10xCIM, respectively. EE exhibited the lower IC₅₀ values for HepG-2 (322 µg/ml) and MRC-5 (181.1 µg/ml) than essential oil that showed IC₅₀ values for HepG-2 (96.6 µg/ml) and MRC-5 (33.1 µg/ml). **Conclusions:** The EE and EO from *C. nardus* present as a promising source of new molecules with antifungal activity especially to the inhibition of the main virulence factors such as formation of hyphae and biofilm.

Key-words: *Cymbopogon nardus*; essential oil; ethanolic extract; antifungal activity; *Candida* spp; chemical analysis;

INTRODUÇÃO