

AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL SINÉRGICO DE 2-ETIL-1-HEXANOL COM OUTROS ANTIFÚNGICOS FRENTE *Candida albicans*

Vitória Nodari de Oliveira (PIBIC/CNPq), Joana Gomes Vieira, Vinicius Alexandre, Pamela Tymniak (Coorientadora), Melyssa Fernanda Norman Negri (Orientadora). E-mail: mnegri@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB), Maringá, PR

Área e subárea: Ciências Biológicas/Microbiologia/Micologia

Palavras-chaves: Anfotericina B; Itraconazol; 5-fluorouracil.

RESUMO

Candida albicans é uma levedura capaz de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, o que contribui para a resistência a antifúngicos e falhas terapêuticas, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A busca por novas estratégias terapêuticas inclui a pesquisa de moléculas de *quorum sensing* (MQS), como o 2-etil-1-hexanol (2-EH). Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito sinérgico de 2-EH em associação com antifúngicos convencionais contra *C. albicans* (ATCC 90028). O ensaio de microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e, posteriormente, realizado o teste de *checkerboard* para análise das interações. Os resultados demonstraram resistência relativa ao itraconazol (CIM 8 µg/ml). Entretanto, a associação de 2-EH com itraconazol apresentou efeito sinérgico significativo (ICIF = 0,0688), reduzindo a CIM do fármaco na combinação em 128 vezes (para 0,0625 µg/ml) e a de 2-EH em 16 vezes (para 0,0016 g/ml). Já as combinações de 2-EH com anfotericina B e 5-fluorouracil resultaram em efeito aditivo (ICIF = 0,996), para ambos. Esses achados sugerem que 2-EH possui potencial antifúngico, favorecendo a redução das doses necessárias dos fármacos e consequentemente, da toxicidade. Conclui-se que o 2-EH representa uma alternativa promissora contra cepas resistentes de *Candida* spp., reforçando a necessidade de estudos adicionais para validar seu potencial terapêutico.

INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma levedura que faz parte da microbiota humana, contudo, apresenta potencial patológico, causando doenças superficiais e até mesmo sistêmicas. Além disso, *C. albicans* apresenta enorme capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, o que aumenta os riscos de infecção e falha no tratamento. Ademais, apresenta potencial patogênico oportunista, que costuma causar infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Lopes and Lionakis 2022). O uso frequente e profilático de fármacos, associado a

capacidade dos fungos de formar biofilme, vem propiciando o aumento de cepas resistentes. Assim, estudos por novas moléculas que tenham potencial farmacológico são necessários. Dentre eles, destaca-se o estudo de moléculas de *quorum sensing* (MQS) como abordagem alternativa ao tratamento antifúngico. Um exemplo de MQS é o farnesol de *C. albicans*, que vem demonstrando em diferentes trabalhos a contribuição para a redução da resistência a azóis em células de *Candida* spp. (Kovács and Majoros, 2020). Além disso, Veiga e colaboradores (2023), relataram a detecção da molécula 2-Etil-1-Hexanol (2-EH), uma MQS de *Fusarium oxysporum* que apresentou atividade fungicida contra células planctônicas de *F. oxysporum*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o potencial sinérgico da molécula 2-EH, uma MQS, em combinação com outros fármacos *in vitro* contra *C. albicans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas fúngicas e molécula

Para este estudo, foi utilizado uma cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) da *American Type Culture Collection* (ATCC). Anteriormente aos experimentos, o isolado foi reativado em Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Kasvi, Brasil) durante 48h. A molécula 2-EH, foi adquirida comercialmente.

Teste de suscetibilidade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, conforme o documento *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M27-A2, 2008) com modificações para a molécula 2-EH. Foram realizados controles positivos (apenas com as espécies fúngicas e meio de cultura) e controles negativos (apenas com meio de cultura para controle de esterilidade). A concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada após 24 horas por meio da transferência de 10 µL do conteúdo dos poços para uma placa contendo Sabouraud dextrose agar (SDA). A CFM foi definida como a menor concentração em que não houve crescimento do fungo.

Teste de sinergismo antifúngico (método de Checkerboard)

As interações antifúngicas entre antifúngicos comerciais e a molécula 2-EH foram avaliadas pelo método de *checkerboard*, conforme descrito por Vélez *et al.* (2024) com modificações. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo 100 µL de meio RPMI, onde ocorreu a diluída serialmente da 2-EH no eixo Y e os antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorouracil, itraconazol), foram diluídos no eixo X da mesma maneira. A suspensão do isolado fúngico 5×10^4 UFC/mL foi inoculada em todos os poços e a microplaca foi incubada em estufa a 35°C por 24h. Após a incubação, o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado com a ajuda da resazurina para leitura visual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre anfotericina B (AFB) e 2-EH apresentou efeito aditivo frente ao isolado de *C. albicans*, com o valor de ICIF $0,5 < \text{ICIF} \leq 1$, igual a 0,996 (**Figura 1A**). A CIM de AFB foi de 0,0625 µg/ml na combinação, duas vezes menor do que quando comparado ao fármaco sozinho com uma CIM de 0,125 µg/ml (**Figura 1A**). Além disso, a CIM de AFB corrobora com a padronização prevista pelo CLSI M27-A2 (2008) com faixa entre 0,5-2,0 µg/ml.

Para 5-fluorouracil (5-FC) e 2-EH a interação também foi aditiva entre os compostos frente ao isolado, com o valor de ICIF $0,5 < \text{ICIF} \leq 1$, igual a 0,996 (**Figura 1B**). A CIM de 5-FC na combinação foi de 0,0625 µg/ml, uma concentração 2 vezes menor do que a CIM do fármaco sozinho, que foi de 0,125 µg/ml (**Figura 1B**). A CIM do fármaco corrobora com a padronização prevista pelo CLSI M27-A2 (2008) com faixa entre 0,5-2,0 µg/ml. Isto demonstra que esta associação diminui a CIM do fármaco e molécula discretamente na interação aditiva.

Ademais, a CIM do fármaco itraconazol (ITC) testado para *C. albicans* foi de 8 µg/ml (**Figura 1C**). Visto a falta de relatos na literatura e a carência de resultados padronizados no documento CLSI-M27-A2 (2008), para a cepa ATCC 90028, este resultado demonstra que para esta cepa de *C. albicans* este fármaco apresentou-se mais resistente.

A avaliação da interação entre ITC e 2-EH demonstrou sinergismo entre os compostos, frente ao isolado de *C. albicans*, com o valor de ICIF $\leq 0,5$, igual a 0,0688 (**Figura 1C**). A CIM de ITC na combinação foi de 0,0625 µg/ml, uma concentração 128 vezes menor do que a do fármaco sozinho, promovendo um resultado promissor. Além disso, para 2-EH, a CIM na combinação foi de 0,0016 g/ml, uma concentração 16 vezes menor do que quando comparada a molécula sozinha, com CIM de 0,0260 g/ml (**Figura 1C**).

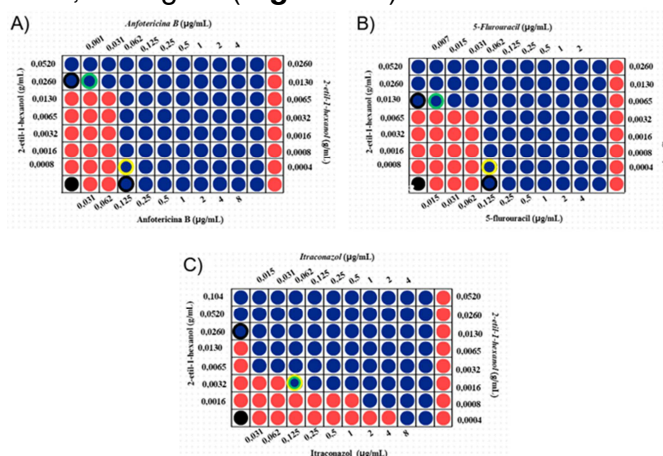


Figura 1 – Potencial sinérgico da molécula 2-etil-1-hexanol (2-EH) em combinação com fármacos comerciais. (A) anfotericina B (AFB); (B) 5-fluorouracil (5-FC) e (C) itraconazol (ITC).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a MQS 2-EH tem potencial para modular a atividade antifúngica contra *C. albicans*. Quando combinada ao ITC, apresentou interação sinérgica significativa, pela redução expressiva da CIM dos dois compostos. Por outro lado, nas combinações com AFB e 5-FC a interação foi aditiva, levando a reduções mais discretas da CIM. Esses dados sugerem que 2-EH é uma alternativa promissora para enfrentar cepas resistentes de *Candida* spp. Com isso, se faz imprescindível a continuação de estudos como este e o aprofundamento desta temática.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Estadual de Maringá e ao Grupo de Pesquisa OneMyco.

REFERÊNCIAS

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A2, Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Yeasts: **Approved Standard (3rd Edition)**. 2008. Acesso em: 18 agosto 2025.

LOPES, J.P.; LIONAKIS, M.S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121. 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.2019950>. Acesso em: 18 agosto 2025.

KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Fungal *quorum sensing* molecules: A review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), v. 6, n. 3, p. 99, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/99>. Acesso em: 18 agosto 2025.

VEIGA, F. F. et al. Detection of 2-ethyl-1-hexanol and its modulating effect in biofilm of *Fusarium oxysporum*. **Molecular microbiology**, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.15194>. Acesso em: 18 agosto 2025.

VÉLEZ, N. *et al.* Pore-forming peptide C14R exhibits potent antifungal activity against clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida auris*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 14, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2024.1389020/full>. Acesso em: 18 agosto 2025.