

## SENSIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* AO (S)-(-)-CITRONELAL E ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL E ITRACONAZOL NA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Cássio Ilan Soares Medeiros<sup>1</sup>; Daniele de Figueredo Silva<sup>1</sup>; Abrahão de Oliveira Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil [cassioism@hotmail.com](mailto:cassioism@hotmail.com),  
[danielefigueredo31@gmail.com](mailto:danielefigueredo31@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos-PB, Brasil [abraham.farm@gmail.com](mailto:abraham.farm@gmail.com)

**RESUMO:** Candidíase urinária é conhecida como a infecção fúngica hospitalar mais frequente em todo o mundo. *Candida albicans* é a causa mais comum de infecções fúngicas nosocomiais do trato urinário; e o aumento da candidíase do trato urinário levou ao aparecimento das espécies de *Candida* resistentes a antifúngicos. Neste trabalho, avaliou-se o potencial antifúngico do enatiômero (S)-(-)-citronelal [(S)-(-)-CT] contra 13 cepas de *C. albicans* e os efeitos deste em associação a antifúngicos utilizados no tratamento da CVV. A CIM e a CFM do (S)-(-)-CT para 90% das cepas de *C. albicans* foram 64 e 128 µg/mL respectivamente. No ensaio de suscetibilidade, *C. albicans* apresentou alta resistência ao fluconazol e ao itraconazol, 12 (92,30%) das cepas. Na associação do produto com o fluconazol e o itraconazol, a resistências foi revertida em 6 (50%) das cepas ensaiadas. Os resultados do presente estudo sugerem o (S)-(-)-CT como um potencial agente terapêutico para a CVV e CVVR. Entretanto, estudos adicionais são necessários para identificar o mecanismo de ação desta molécula contra *C. albicans*, bem como sua toxicidade.

**Palavra-chave:** Anti-*C. albicans*, Monoterpenoide, Terapia de combinação, Agentes antifúngicos.

### INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) também denominada de vaginite por *Candida* é uma infecção fúngica comum que afeta mulheres saudáveis de todas as idades, principalmente durante a idade reprodutiva (BEHZADI, BEHZADI, RANJBAR, 2015).

Estima-se que 75% de todas as mulheres adultas experimentem pelo menos um período de episódios de CVV durante a vida, com 6 a 9% desses indivíduos desenvolvendo infecções recorrentes ou candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) (DOVNIK et al., 2015; JACK,

SO

BEL, 2016). Felizmente a infecção é raramente fatal, mas normalmente está associada a algumas morbidades, tais como desconforto, dor, disfunções sexuais, secura vulvar, rachaduras, prurido, queimação, ulceração, corrimento vaginal anormal e finalmente custos de cuidados de saúde (DHARMIK, GOMASHE, UPADHYAY, 2013).

O principal agente etiológico da CVV é a *C. albicans*, causando 85-95% destas infecções, mas outras espécies conhecidas geralmente como *C. não-albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*) também são isoladas (ILKIT, GUZEL, 2011). A terapia prolongada e o aumento do uso de

antifúngicos no tratamento dos casos recorrentes da CVV são os fatores de riscos mais comuns no desenvolvimento de resistência aos azólicos nos isolados de *Candida* vaginal. Porém, os azóis possuem a vantagem de ser administrado por via oral, o qual aumenta sua potência (MOREIRA et al., 2014).

O aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos, reforça a necessidade de estudos desses patógenos, e à vigilância da suscetibilidade antimicrobiana é comumente usada na terapia e acompanhamento das rápidas mudanças nos padrões de resistência (LATA et al., 2012).

O citronelal fitocostituinte monoterpênico é uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas, como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus* que apresentam propriedades antimicrobiana, inseticida e anticâncer (AVOSEH et al., 2015; BATUBARA et al., 2015).

Além disso, existe um interesse crescente na utilização de terapia de combinação que inclui o uso de combinações de substâncias sintéticas, bem como de produtos naturais, juntamente com os medicamentos convencionais contra várias doenças infecciosas, tais como candidíase (WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

Os objetivos desse estudo foram determinar a suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* isoladas de secreções vaginais frente ao citronelal e verificar os efeitos da combinação deste monoterpeno a antifúngicos utilizados no tratamento da CVV.

## **METODOLOGIA**

### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

A determinação da CIM do produto sobre as cepas utilizadas nos ensaios biológicos foram determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLEELAND, SQUIRES, 1991, HADACEK, GREGER, 2000, NCCLS / NCCLS, 2002).

Diluições seriadas foram realizadas para variar as concentrações do produto de 1024-4 µg/mL. Os controles foram feitos para a viabilidade e a suscetibilidade das células fúngicas com o antifúngico padrão anfotericina B. As placas foram incubadas a 35±2 °C durante 24-48h. Após o tempo de incubação, a presença (ou ausência) de crescimento foi observada visualmente. A CIM foi definida como sendo a mais baixa concentração do produto que produziu uma inibição visível do crescimento microbiano.

A atividade antimicrobiana do produto foi interpretada (considerado ativo ou não), de acordo com os critérios propostos por Morales et al, 2008: atividade boa/forte

(CIM: <100 µg/mL); atividade moderada (CIM: 100-500 µg/mL); fraca atividade (CIM: 500-1000 µg/mL); e produto inativo / nenhum efeito antimicrobiano (CIM: > 1.000 µg/mL).

A CFM foi definida como sendo a menor concentração do produto que inibiu o crescimento das levedura ou permitindo ocorrer crescimento inferior a três UFCs, resultando assim em atividade fungicida 99,9% (ERNST et al., 1996, ESPINEL-INGROFF, 2002).

Os ensaios de atividade biológica foram realizados em duplicata, e os resultados foram expressos como a média aritmética da CIM e da CFM.

#### **Ensaio de suscetibilidade**

O teste de suscetibilidade fúngica foi realizado com base na técnica de disco-difusão em meio sólido (BAUER, et al., 1966; KONEMAN et al., 1993; HADACEK, GREGER, 2000). Neste ensaio foram utilizados os seguintes antifúngicos: fluconazol (25 µg) e itraconozol (10 µg) A interpretação dos resultados foi realizada utilizando os critérios sensível ou resistente recomendados pela (CECON) Ltd. (São Paulo, SP, Brazil) e o CLSI, 2009.

#### **Estudo de associação *in vitro***

Os ensaios de suscetibilidade da combinação do (S)-(-)-CT com os agentes

antifúngicos, foram realizados também com base na técnica de disco-difusão em meio sólido (OLIVEIRA et al., 2006, OSTROSKY et al., 2008).

Neste ensaio, os discos de antifúngicos nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 10 µL da CIM do produto, e posteriormente dispensados em placas de Petri contendo ASD inoculados com 1 mL das suspensões fúngicas. Em seguida, as placas foram incubadas a 35±2 °C por 24-48h.

As interações do (S)-(-)-CT com os agentes antifúngicos foram considerados positivos (sinergismo), quando a zona de inibição da aplicação combinada foi ( $\geq 2$  mm) em relação ao antifúngico isoladamente, negativo (antagonismo), quando a zona de inibição da associação foi ( $\leq 2$  mm) ao apresentado pelo antifúngico isolado e “interação 0” (indiferente), quando a zona de inibição da combinação foi igual ao do antifúngico isoladamente (CLEELAND, SQUIRES, 1991; CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos pela média aritmética dos diâmetros formados nos dois ensaios paralelamente.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A CIM do produto frente as cepas fúngicas variou entre 128 e 64 µg/mL, no entanto este último corresponde a inibição do crescimento fúngico em 90% das cepas

ensaiadas (**Tabela 1**). Neste estudo, observou-se que este monoterpeno apresenta excelente eficácia antifúngica, pois de acordo com Morales et al., 2008, este fitoconstituente mostrou forte atividade anti-*C. albicans*, pois o valor da CIM<sub>90%</sub> foi menor que 100 µg/mL. Na literatura, este enantiômero também mostrou ter boa atividade fungicida, bactericida, tripanocida e leishmanicida (ZORE et al., 2011a; PEREIRA et al., 2015).

A CFM do (*S*)-(-)-CT foi determinada por esgotamento em meio sólido obtendo desta forma o valor de 128 µg/mL, correspondendo a CIM × 2 para 90% da população de *C. albicans* como pode ser observado na (**Tabela 2**). Assim constatou-se o efeito fungicida do (*S*)-(-)-CT para todos os micro-organismos, exceto para a cepa LM 16 que foi 256 µg/mL. De acordo com Hafidh et al., 2011, o efeito fungicida de um produto natural como o citronelal, é observado quando a razão entre a CFM/CIM está compreendido entre 1 e 2.

O perfil de resistência das leveduras foi observado para 12 (92,30%) das cepas fúngicas frente ao fluconazol e ao itraconazol (**Tabela 3**). Dessa forma, a alta frequência de resistência aos azólicos trabalhados neste estudo, demonstra o crescente perfil de resistência ao gênero

*Ca*

*ndida* (RUIZ-CAMPS, CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Os resultados referentes aos ensaios de combinação são mostrados na (**Tabela 4**), onde observa-se que os efeitos da interferência do enantiômero sobre os antifúngicos variarão segundo o tipo de agente terapêutico e a cepa fúngica ensaiada. Porém, o sinergismo foi predominante sobre os antifúngicos ensaiados. Na associação do produto com o fluconazol, resultou em efeito sinérgico em 13 (100%) das cepas fúngicas. E em combinação com o itraconazol, resultou em efeito sinérgico em 11 (84,61%) das leveduras.

É provável que devido ao grau de lipofilicidade, o (*S*)-(-)-CT tenha interagido com os componentes da bicamada fosfolipídica da membrana fúngica afetando dessa forma o grau de fluidez, além de interferir em rotas de sinalização envolvidas na síntese de polissacarídeos como o β-glucano, manano e quitina, importantes para a manutenção da parede celular de *C. albicans*. Portanto, essas interações podem ocasionar maior influxo dos agentes antifúngicos, resultando em aumento das zonas de inibição e diminuindo desta forma a resistências destas leveduras (BRAGA et al., 2007; ZORE et al., 2011b).

**Conclusão**

Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstrou que o citronelal tem significativa atividade antifúngica contra *C. albicans*, sendo este fungicida para a maioria das cepas ensaiadas. Além disso, este monoterpene também mostrou agir sinergicamente com os antifúngicos testados, importantes para a monoterapia e a terapia de combinação no tratamento da CVV e CVVR. Desta forma esse produto mostra ser relevante e promissor como um potencial antifúngico o qual pode ser considerado como um protótipo alternativo para a produção de um novo e futuro antifúngico, e assim contribuindo para o arsenal existente de produtos com comprovada atividade antifúngica contra *C. albicans*. Investigações dessa natureza são importantes, uma vez que proporcionam expectativas claras para estudos farmacológicos futuros, com vista a um melhor entendimento do mecanismo de ação do citronelal, sua toxicidade, e sua possível aplicação terapêutica.

#### AGRADECIMENTOS

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

#### REFERÊNCIAS

BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. Urinary tract infections and *Candida albicans*. **Cent. Eur. J. Urol.**, v.68, n.1, p.96-101, 2015.

DOVNIK, A.; GOLLE, A.; NOVAK, D.; ARKO, D.; TAKAC, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Derm-venereol.** v.24, n.1, p. 5-7, 2015.

JACK, D.; SOBEL, M.D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.1, n.1, p. 15-21, 2016.

DHARMIK, P.G.; GOMASHE, A.V.; UPADHYAY, V.G. Susceptibility Pattern of Various Azoles Against *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis. **J. Obstet. Gynecol. India.** v.63, n.2, p.135-137, 2013.

ILKIT, M.; GUZEL, A.B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.37, n.1, p.250-261, 2011.

MOREIRA, D.; AULER, M.E.; RUIZ, S.L.; SILVA, E.H.; HAHN, R.C.; PAULA, C.R. Species distribution and antifungal susceptibility of yeasts isolated from vaginal mucosa. **Rev. Patol. Trop.**, v.43, n.1, p.48-56, 2014.

LATA, R.P.; JAYSHRI, D.P.; PALAK, B.; SANJAY, D.R.; PARUL, D.S. Prevalence of *Candida* infection and its Antifungal susceptibility pattern in tertiary care hospital, Ahmedabad. **Nat. J. Med. Res.** v.2, n.4, p.439-441, 2012.

AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules.** v.20, n.5, p.7438-7453, 2015.

BATUBARA, I.; SUPARTO, I.H.; SA'DIAH, S.; MATSUOKA, R.; MITSUNAGA, T. Effects of Inhaled Citronella Oil and Related Compounds on Rat Body Weight and Brown Adipose

Tissue Sympathetic Nerve. **Nutrients**. v.7, n.3, p.1859-1870, 2015.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. v.16, n.2-3, p.97-110, 2009.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. **Antibiot. Lab. Med.**, v. 3, p. 739-787, 1991.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay coices. **Phytochem Analysis**. v.11, n.3, p.137-147, 2000.

NATTINAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Villanova, NCCLS, v.17, n.9 (Document M27-A2).

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; LOYOLA, L.A. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**. v.13, n.4, p.790-794, 2008.

ERNST, M.E.; KLEPSE, M.E.; WOLFE, E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. **Diagn. Micr. Infec. Dis.**, v.26, n.3-4, p.125-131, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M.G. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.10, p.3776-3781, 2002.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWEL-JÚNIOR, V.R.; SAMERS, H.M. **Diagnóstico Microbiológico**. 2. ed. Texto Atlas. Editora Médica Pan Americana, 1993, p. 452-485.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2. ed. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIERA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.** v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they?. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v.54, n.5, p.854-869, 2004.

ZORE, G.B.; THAKRE, A.D.; RATHOD, V.; KARUPPAYIL, S.M. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth,

dimorphism and sensitization. **Mycoses**. v. 54, n. 4, p. e99-e109, 2011a.

ZORE, G.B.; THAKRE, A.D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**. v. 18, n. 13, p. 1181-1190, 2011b.

PEREIRA CARNEIRO, J.N.; ALBUQUERQUE, R.S.; FIGUEIREDO, L.N.; TARGINO, M.A.J.; VIEIRA DE BRITO, D.I.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; CORONEL, C.; COUTINHO, H. D.M.; MORAIS-BRAGA, M.F.B. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. **Cad. Cult. Ciênc**. v. 13, n. 2, p. 29-36, 2015.

HAFIDH, R.R.; ABDULAMIR, A.S.; VERN, L.S.; ABU BAKAR, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. **The Open Microbiol. J**. v. 5, n. 1, p. 96-106, 2011.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistêmico. **Enferme infec. Microbiol. Clin**. v. 27, n. 6, p. 353-362, 2009.

BRAGA, P.C.; ALFIERI, M.; CULICI, M.; DAL SASSO M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. **Mycoses**. v. 50, n. 6, p. 502-506, 2007.

**Tabela 1.** Valores da CIM<sub>90%</sub> (µg/mL) do (S)-(-)-CT contra cepas de *C. albicans* por microdiluição em caldo.

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	(S)-(-)-CT MIC <sub>90%</sub> (µg/mL)	Control negative	Control positive
LM 852	64	-	+
LM 157	64	-	+
LM 152	64	-	+
LM 240	64	-	+
LM 0202	64	-	+
LM 246	64	-	+
LM 228	64	-	+
LM 227	64	-	+
LM 319	64	-	+
LM 16	64	-	+
LM 15	64	-	+
ATCC 76485	128	-	+
ATCC 76645	64	-	+

(+) inhibition (-) no inhibition

**Tabela 2.** Valores da CFM<sub>90%</sub> (µg/mL) do (S)-(-)-CT contra cepas de *C. albicans*.

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	(S)-(-)-CT MFC <sub>90%</sub> (µg/mL)	Control negative	Control positive
LM 852	128	-	+
LM 157	128	-	+
LM 152	128	-	+
LM 240	128	-	+
LM 0202	128	-	+
LM 246	128	-	+
LM 228	128	-	+
LM 227	128	-	+
LM 319	128	-	+
LM 16	256	-	+
LM 15	128	-	+
ATCC 76485	128	-	+
ATCC 76645	128	-	+

(+) inhibition (-) no inhibition

**Tabela 3.** Teste de suscetibilidade das cepas de *C. albicans* a antifúngicos padrão. Média dos halos de inibição em (mm).

### Antifungal susceptibility

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	Fluconazole (25 µg)	Itraconazole (10 µg)
LM 852	0**	0**
LM 157	0**	0**
LM 152	12**	0**
LM 240	0**	15**
LM 0202	0**	0**
LM 246	17**	18**
LM 228	20*	20*
LM 227	0**	12**
LM 319	16**	18**
LM 16	0**	12**
LM 15	0**	0**
ATCC 76485	0**	16**
ATCC 76645	0**	13**

\*\*Resistant; \*Sensible

**Tabela 4.** Média dos diâmetros em (mm) do ensaio de associação do (S)-(-)-CT com antifúngicos padrão em meio sólido.

### (S)-(-)-CT + Antifungals

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	Fluconazole (25 µg)	Itraconazole (10 µg)
LM 852	20↑	18↑
LM 157	12↑	12↑
LM 152	18↑	22↑
LM 240	25↑	15I
LM 0202	18↑	24↑
LM 246	20↑	28↑
LM 228	30↑	28↑
LM 227	18↑	14↑
LM 319	22↑	24↑
LM 16	18↑	23↑
LM 15	15↑	12↑
ATCC 76485	22↑	20↑
ATCC 76645	20↑	0↓

↑ Synergism; ↓ Antagonism; I Indifferent