

ATIVIDADE ANTI-*C. ALBICANS* DA ASSOCIAÇÃO DO ENANTIÔMERO (S)-(-)-CITRONELAL COM MICONAZOL E ITRACONAZOL

Cássio Ilan Soares Medeiros¹; Abrahão Alves de Oliveira Filho²

¹Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil cassioism@hotmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos-PB, Brasil 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 da combinação do enantiômero (S)-(-)-citronelal [(S)-(-)-CT] com miconazol e itraconazol contra 11 cepas de *C. albicans* isoladas de secreções vulvovaginais. No ensaio de suscetibilidade, *C. albicans* apresentou boa sensibilidade ao miconazol, apesar da resistência de 23,07% observadas nesse estudo. A resistência ao itraconazol foi prevalente 12 (92,30%) das cepas. Na associação do produto com o miconazol a resistência foi completamente revertida. Para 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 em associação aos antifúngicos testados neste estudo, para um possível tratamento da CVV e CVVR. Entretanto, estudos adicionais são necessários para identificar o mecanismo de ação desta molécula contra *C. albicans*, bem como sua toxicidade.

Palavras-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, SOBEL, 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).

O aparecimento de cepas fúngicas resistentes aos medicamentos, reforça a necessidade de estudos desses patógenos, bem como da busca de produtos naturais e/ou sintéticos biologicamente ativos capazes de subjugar os mecanismos de resistência desses micro-organismos (DHARMIK, GOMASHE, UPADHYAY, 2013). À vigilância da suscetibilidade antimicrobiana é também comumente usada na terapia e acompanhamento das rápidas mudanças nos padrões de resistência (LATA et al., 2012).

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 citronelal fitoconstituente 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 como a candidíase (WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

Neste contexto, buscou-se avaliar o potencial antifúngico da associação do enantiômero (S)-(-)-citraonal [(S)-(-)-CT] com miconazol e itraconazol contra *C. albicans* isoladas de secreções vulvovaginais.

METODOLOGIA

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: miconazol (50 µg) e itraconazol (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 concentração inibitória mínima (CIM) do produto determinado em estudos anteriores (CIM_{90%}=64µg/mL) 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 (≥ 2 mm) em relação ao antifúngico isoladamente, negativo (antagonismo); quando a zona de inibição da associação foi (≤ 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

Neste estudo observou-se que para o miconazol, *C. albicans* apresenta boa sensibilidade, como mostra a (Tabela 1). O bom desempenho evidenciado para este antifúngico, contra *C. albicans* já foram observados em estudos anteriores (SOBEL, 1985). No entanto, a presença de 23,07% de

resistência a estas cepas fúngicas neste estudo, enfatiza a mudança para uma menor suscetibilidade a este fármaco (DALAZEN et al., 2011).

Há mais de uma década, são observados casos de sensibilidade reduzida ao itraconazol, e neste estudo foi observado um perfil de resistência de 92,30% das cepas fúngicas frente ao itraconazol com observação de resistência cruzada a isolados de *C. albicans* e não-*albicans*, pela exposição antecedente e prologada a este antifúngico. Por tanto, observa-se uma menor suscetibilidade ao itraconazol reportada para amostras clínicas vulvovaginais (**Tabela 1**). Desta forma, *C. albicans* mostra-se predominantemente resistente assemelhando-se ao perfil desse trabalho (FAVALESSA, MARTINS, HAHN, 2010; DALAZEN et al., 2011; SPAMPINATO, LEONARDI, 2013).

Os resultados referentes aos ensaios de combinação são mostrados na (**Tabela 2**), onde observa-se que os efeitos da interferência do (S)-(-)-CT sobre os antifúngicos variarão segundo o tipo de agente terapêutico e a cepa fúngica ensaiada. Porém, o sinergismo foi predominante sobre os dois antifúngicos ensaiados. Na associação do produto com o miconazol, resultou em sinergismo nas 13 (100%) cepas fúngicas. E em combinação com o itraconazol, resultou em efeito sinérgico em 11 (84,61%) das leveduras.

As pesquisas das interações de produtos naturais e sintéticos sobre a efetividade dos agentes antifúngicos convencionais nos parece bastante promissor se a combinação resulta em melhor espectro de atividade e toxicidade reduzida em comparação com os esquemas complementares de agente único (AHMAD et al., 2010). Desta forma, parece que a modificação da atividade antimicrobiana resultante de associações, com ampliação do perfil de sensibilidade de cepas fúngicas resistentes, mostra ser uma nova estratégia na clínica, com o potencial de ser um modificador do perfil de resistência (RIBEIRO et al., 2013).

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 (**Tabela 2**), (ZORE et al., 2011).

CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível observar que este enantiômero (S)-(-)-CT mostrou agir sinergicamente com miconazol e itraconazol. Assim este composto pode torna-se uma alternativa na quimioterapia antifúngica em associação com estes antifúngicos de referência no tratamento da CVV e CVVR. No entanto, existe a necessidade de mais estudos que visam correlacionar sua potente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* provando sua segurança para aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **J. Med. Microbiol.** v. 59, n. 10, p. 1178-1184, 2010.

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.

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

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

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

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N.L.; FUENTEFRIA, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.47, n.1, p.33-38, 2011.

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.

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.

FAVALESSA, O.C.; MARTINS, M.A.; HAHN, R.C. Aspectos micológicos e suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Rev. Socied. Bras. Med. Trop.**, v.43, n.6, p.673-677, 2010.

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.

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

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.

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.

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.

RIBEIRO, D.S.; VELOZO, E.S.; GUIMARÃES, A.G. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **J. Biotechn Biod.** v. 4, n. 1, p. 10-19, 2013.

SOBEL, J.D. Management of recurrent vulvovaginal candidiasis with intermitente ketoconazole prophylaxis. **Obstet. Gynecol.** v. 65, n. 3, p. 435-440, 1985.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternativa Antifungal Agents. **BioMed Res. International.** v. 2013, n. 1, p. 1-13, 2013.

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

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, 2011.

Tabela 1. Teste de suscetibilidade das cepas *C. albicans* a antifúngicos padrão. Média dos halos em (mm).

Antifungal susceptibility

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	Miconazole (50 µg)	Itraconazole (10 µg)
LM 852	23*	0**
LM 157	22*	0**
LM 152	27*	0**
LM 240	23*	15**
LM 0202	20**	0**
LM 246	30*	18**
LM 228	30*	20*
LM 227	22*	12**
LM 319	20**	18**
LM 16	24*	12**
LM 15	25*	0**
ATCC 76485	20**	16**
ATCC 76645	28*	13**

**Resistant; *Sensible

Tabela 2. Média dos diâmetros em (mm) do ensaio de combinação do (S)-(-)-CT com antifúngicos padrão contra *C. albicans* em meio sólido.

(S)-(-)-CT + Antifungals

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	Miconazole (50 µg)	Itraconazole (10 µg)
LM 852	42↑	18↑
LM 157	25↑	12↑
LM 152	40↑	22↑
LM 240	38↑	15I
LM 0202	40↑	24↑
LM 246	46↑	28↑
LM 228	40↑	28↑
LM 227	34↑	14↑
LM 319	40↑	24↑
LM 16	42↑	23↑
LM 15	32↑	12↑
ATCC 76485	40↑	20↑
ATCC 76645	34↑	0↓

↑ Synergism; ↓ Antagonism; I Indifferent