

Estudo do potencial antifúngico do (R)-(+)-citronelal e associação com fluconazol e itraconazol em isolados de *Candida* vulvovaginal

Cássio Ilan Soares Medeiros¹; Daniele de Figueredo Silva¹; Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil cassioism@hotmail.com,
danielefigueredo31@gmail.com, edelolima@yahoo.com.br

Resumo: A incidência de infecções fúngicas vulvovaginais aumentou dramaticamente ao longo das últimas décadas, constituindo assim a segunda causa mais comum de candidíase vulvovaginal (VVC) após a vaginose bacteriana diagnosticada em 40% das mulheres com corrimento vaginal. Diante deste contexto, buscou-se avaliar neste estudo o potencial antifúngico do enantiômero (R)-(+)-citronelal [(R)-(+)-CT] isolado e associado a agentes terapêuticos de importância clínica frequentemente utilizados no tratamento da candidíase vulvovaginal. A CIM e a CFM do (R)-(+)-CT para 90% das cepas de *C. albicans* foram 16 e 32 µg/mL respectivamente. No ensaio de suscetibilidade, *C. albicans* apresentou alta resistência ao fluconazol e ao itraconazol, 12 (92,30%) das cepas. No ensaio de combinação do (R)-(+)-CT com o fluconazol e o itraconazol, a resistências foi revertida em 9 (75%) e 7 (58,33%) das cepas respectivamente. O (R)-(+)-CT apresentou atividade fungicida com CFM igual a CIM×2. Quando em combinação com fluconazol e itraconazol ampliou as zonas de inibição desses antifúngicos, diminuindo a resistência contra *C. albicans*.

Palavra-chave: Monoterpenoide, Anti-*C. albicans*, Agentes antifúngicos, Metabolismo secundário.

Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) afeta 75% de todas as mulheres pelo menos uma vez durante a vida, mais frequentemente durante a idade fértil (ADESIJI et al., 2011, GANDHI et al., 2015). Outro grupo menor de mulheres 6-9% experimentam a recorrência desta enfermidade (CVVR), definida como pelo menos 3 episódios sintomáticos nos 12 meses anteriores, embora alguns investigadores exigi ainda um episódio adicional (FOXMAN et al., 2013, JACK, SOBEL, 2016). Embora várias espécies de *Candida* tenham sido implicadas na CVV e CVVR, *Candida albicans* é o agente etiológico

predominante, causando 85-95% destas infecções (HONG et al., 2014, BEHZADI et al., 2015).

Uma variedade de agentes antifúngicos tem sido amplamente empregada para tratar essas infecções. Os azóis incluindo o fluconazol e o itraconazol têm sido utilizados sob vários esquemas terapêuticos para tratar esta enfermidade (SEKHAVAT et al., 2011). No entanto, devido a dinâmica da resistência antimicrobiana, que envolve uma complexa associação de múltiplos fatores inerentes ao hospedeiro e ao próprio fungo, vem sendo expressivo o fracasso terapêutico (ESPINEL-INGROFF, 2008). Em especial, os azólicos, antifúngicos mais comuns ao uso nesta enfermidade, vêm

apresentando um quadro desfavorável (PFALLER, 2012).

A atividade anti-*Candida* de óleos essenciais extraídos de plantas tem sido relatado em vários trabalhos nos últimos anos, e em consequência disso os óleos essenciais bem como alguns dos seus fitoconstituintes são usados topicamente na forma de cremes, géis e pessários para o tratamento de infecções microbianas (MONDELLO et al., 2006; AVOSEH et al., 2015; BATUBARA et al., 2015).

Os terpenóides, são componentes importantes dos óleos essenciais com vasta atividade biológica, incluindo uma ampla atividade antifúngica (LORENZI et al., 2009).

Além disso, existe um interesse crescente na utilização de terapia de combinação para evitar os efeitos colaterais associados com doses elevadas ou uso a longo prazo de drogas convencionais (WAGNER, 2006). Ele 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).

Neste contexto, buscou-se avaliar o potencial antifúngico do (R)-(+)-CT isolado e associado ao fluconazol e ao

itraconazol frequentemente utilizados no tratamento da candidíase vulvovaginal.

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 foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLEELAND, SQUIRES, 1991, HADACEK, GREGER, 2000, NCCLS / NCCLS, 2002).

Diluições seriadas foram realizadas para variar as concentrações de 1024-4 µg/mL. Os controlos 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 leveduras 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 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 (R)-(+)-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 (R)-(+)-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 (CUENCA-ESTRELLA, 2004, CLEELAND, SQUIRES, 1991).

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 o (R)-(+)-CT mostrou excelente eficácia antifúngica em 90% das cepas *C. albicans*. De acordo com os critérios de Morales et al., 2008, este fitoconstituente mostrou forte atividade anti-*C. albicans* porque o valor da CIM_{90%} foi menor que 100 µg/mL (A CIM do (R)-(+)-CT variou entre 64 e 16 µg/mL, no entanto este último corresponde

a inibição do crescimento fúngico em 90% das cepas ensaiadas (**Tabela 1**). Na literatura, este produto também mostrou ter boa atividade fungicida, bactericida, tripanocida e leishmanicida (ZORE et al., 2011, PEREIRA et al., 2015).

Neste trabalho, também constatou-se o efeito fungicida do (R)-(+)-CT em 90% das cepas *C. albicans* (CFM_{90%} = 32 µg/mL). De acordo com Hafidh et al., 2011 o efeito fungicida de um produto natural como o citronelal, é observado quando o quociente entre a CFM/CIM está compreendido entre 1 e 2 (**Tabela 2**).

Para os testes de suscetibilidade, observa-se uma menor sensibilidade ao fluconazole e ao itraconazole reportada para amostras clínicas vulvovaginais (**Tabela 3**), (DALAZEN et al., 2011, ABACI, HALIKI-UZTAN, 2011). Desta forma, *C. albicans* mostra-se predominantemente resistente assemelhando-se ao perfil desse trabalho (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013).

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 4**), (ZORE et al., 2011).

Conclusão

Com base nos dados apresentados, o citronelal, apresentou atividade fungicida, sendo capaz de inibir uma infecção em seu início. Além disso, este monoterpene também mostrou agir sinergicamente com fluconazol e itraconazol. Assim este composto pode torna-se uma alternativa na quimioterapia antifúngica monoterapica para a CVV e a CVVR ou em combinação com drogas convencionais. No entanto, existe uma necessidade de mais estudos que visam correlacionar sua potente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* provando sua segurança para aplicação clínica.

Agradecimentos

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

Referências

- ABACI, O.; HALIKI-UZTAN, A. Investigation of the susceptibility of *Candida* species isolated from denture wearers to different antifungal antibiotics. **Afr. J. Microbiol. Res.** v. 5, n. 12, p. 1398-1403, 2011.
- ADESIJI, Y.O.; NDUKWE, N.; OKANLAWON, B.M. Isolation and antifungal sensitivity to *Candida* isolates in young females. **Cent. Eur. J. Med.** v. 6, n. 2, p. 172-176, 2011.
- 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.
- 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.
- 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. European. 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.
- 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.
- 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.
- ERNST, M.E.; KLEPSE, M.E.; WOLFE, E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagn. Micr. Infec. Dis.**, v.26, n.3-4, p.125-131, 1996.
- ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.
- 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.
- FOXMAN, B.; MURAGLIA, R.; DIETZ, J.P.; SOBEL, J.D.; WAGNER, J. Prevalence of recurrent vulvovaginal

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. **J. Low Genit. Tract Dis.** v. 17, n. 3, p. 340-345, 2013.

GANDHI, T.N.; PATEL, M.G.; JAIN, P. M. R. Antifungal Susceptibility of *Candida* Against Six Antifungal Drugs by Disk Diffusion Method Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **Int. J. Cur. Res. Rev.** v. 7, n. 11, p. 20-25, 2015.

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

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.

HONG, E.; DIXIT, S.; FIDEL, P.L.; BRADFORD, J.; FISCHER, G. Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition. **J. Low Genit. Tract Dis.** v. 18, n. 1, p. 31-38, 2014.

J.M.; AMARAL, L.; BOLLA, J.M. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram Negative species. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 5, p. 2209-2211, 2009.

JACK, D.; SOBEL, M.D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 214, n.1, p. 15-21, 2016.

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.

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.

LORENZI, V.; MUSELLI, A.; BERNARDINI, A.; BERTI L PAGÈS, MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.D.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORE, G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infect. Dis.** v. 6, n. 1, p. 158-165, 2006.

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.

NATIONAL 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).

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIERA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; 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.

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.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **Am. J. Med.** v. 125, n. 1, p. 3-13, 2012.

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.

SEKHAVAT, L.; TABATABAI, A.; TEZERJANI, F.Z. Oral fluconazole 150 mg single dose versus intra-vaginal clotrimazol treatment of acute vulvovaginal candidiasis. **J. Infect. Public Health.** v. 4, n. 4, p. 195-199, 2011.

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. Multitarget-therapy, the future of treatment for more than just functional dyspepsia. **Phytomedicine.** v. 13, n. 1, p. 122-129, 2006.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine.** v. 6, n. 1-3, 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. Valores da CIM_{90%} (µg/mL) do (R)-(+)-CT contra cepas de *C. albicans* por microdiluição.

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	(R)-(+)-CT MIC _{90%} (µg/mL)	Control negative	Control positive
LM 852	16	-	+
LM 157	16	-	+
LM 152	16	-	+
LM 240	16	-	+
LM 0202	16	-	+
LM 246	16	-	+
LM 228	16	-	+
LM 227	16	-	+
LM 319	16	-	+
LM 16	16	-	+
LM 15	16	-	+
ATCC 76485	16	-	+
ATCC 76645	32	-	+

(+) inhibition (-) no inhibition

Tabela 2. Valores da CFM_{90%} (µg/mL) do (R)-(+)-CT contra cepas de *C. albicans*.

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	(R)-(+)-CT MFC _{90%} (µg/mL)	Control negative	Control positive
LM 852	32	-	+
LM 157	32	-	+
LM 152	32	-	+
LM 240	32	-	+
LM 0202	32	-	+
LM 246	32	-	+
LM 228	32	-	+
LM 227	32	-	+
LM 319	32	-	+
LM 16	32	-	+
LM 15	64	-	+
ATCC 76485	32	-	+
ATCC 76645	32	-	+

(+) inhibition (-) no inhibition

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

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

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 combinação do (R)-(+)-CT com antifúngicos padrão contra *C. albicans* em meio sólido.

(R)-(+)-CT + Antifungals

Fungal strains/ <i>C. albicans</i>	Fluconazole (25 µg)	Itraconazole (10 µg)
LM 852	20↑	20↑
LM 157	25↑	0 I
LM 152	20↑	25↑
LM 240	25↑	15 I
LM 0202	12↑	20↑
LM 246	25↑	24↑
LM 228	25↑	20 I
LM 227	0 I	15↑
LM 319	14↓	20↑
LM 16	20↑	25↑
LM 15	20↑	17↑
ATCC 76485	30↑	25↑
ATCC 76645	30↑	0↓

↑ Synergism; ↓ Antagonism; I Indifferent