

Atividade anti-*Candida tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- & (S)-(-)- citronelal em associação com cetoconazol

Anti-Candida tropicalis activity of (R)-(+)- & (S)-(-)- citronellal enantiomers in combination with ketoconazole

Cássio Ilan Soares Medeiros^{1*}, Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira², Janiere Pereira de Sousa³,
Abrahão Alves de Oliveira Filho³, Edeltrudes de Oliveira Lima⁴

¹Graduação em Ciências Biológicas, Faculdades Integradas de Patos (FIP) e Mestre em Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Paraíba; ²Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Santa Cruz, Rio Grande do Norte; ³Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, Paraíba; ⁴Doutora em Farmácia, USP, Professora Associada, UFPB

Resumo

Introdução: aproximadamente 75% das mulheres saudáveis experimentam pelo menos um episódio sintomático de candidíase vulvovaginal (CVV) durante sua vida. **Objetivo:** avaliar a atividade antifúngica contra cepas de *C. tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal [(R)-(+)- e (S)-(-)-CT] em associação com cetoconazol. **Metodologia:** o efeito antifúngico de ambos os enantiômeros foram quantificados e classificados como fungicida ou fungistático a partir dos resultados obtidos da microdiluição em meio líquido RPMI-1640 para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM). Foram realizados ensaios de associação do antifúngico padrão, cetoconazol com os fitoconstituintes por difusão em Agar e os resultados foram classificados como sinérgicos, antagônicos e indiferentes. **Resultados:** a CIM₅₀ e a CFM₅₀ dos compostos (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal foram respectivamente 16 e 64µg/mL e 2×CIM. Houve sinergismo para todas as cepas testadas com ambos os compostos, porém com maior efeito do enantiômero (S)-(-)-CT sobre as cepas LM 665 e LM 255 em relação ao enantiômero (R)-(+)-CT. **Conclusão:** os compostos naturais deste estudo mostraram efeito fungicida sobre as cepas testadas, bem como efeito sinérgico significativo quando associado ao cetoconazol. **Palavras-chave:** Sinergismo Farmacológico. Candidíase vulvovaginal. *Candida tropicalis*. Cetoconazol.

Abstract

Introduction: about 75% of healthy women experience at least one symptomatic episode of vulvovaginal candidiasis (VVC) during his lifetime. **Objective:** to evaluate the antifungal activity against *C. tropicalis* (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellal enantiomers [(R)-(+)- and (S)-(-)-CT] in combination with ketoconazole. **Methodology:** the antifungal effect of both enantiomers was quantified and classified as fungicide or fungistatic from the results obtained from microdilution in RPMI-1640 liquid medium to obtain minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). Assays of association of the ketoconazole standard antifungal with phytoconstituents by Agar diffusion were performed and the results were classified as synergistic, antagonistic and indifferent. **Results:** MIC₅₀ and MFC₅₀ of the (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellal compounds were respectively 16 and 64µg/mL and 2 × MIC. There was synergism for all the strains tested with both compounds, but with a greater effect of the (S)-(-)-CT enantiomer on the LM 665 and LM 255 strains in relation to the (R)-(+)-CT enantiomer. **Conclusion:** the natural compounds of this study showed a fungicidal effect on the strains tested, as well as a significant synergistic effect when associated with ketoconazole. **Keywords:** Pharmacological synergism. Vulvovaginal candidiasis. *Candida tropicalis*. Ketoconazole.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 75% das mulheres saudáveis experimentam pelo menos um episódio sintomático de candidíase vulvovaginal (CVV) durante sua vida¹. Em geral, 70 a 90% dos casos de CVV são causados por *Candida albicans*, no entanto, outras espécies de *Candida* não-albicans (CNA), incluindo *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* podem estar envolvidas na etiologia dessa infecção².

Com relação ao tratamento da candidíase, vários agentes antifúngicos de uso tópico e sistêmico são utilizados de acordo com o quadro clínico e o estado geral da paciente³. No entanto, devido à ocorrência de fatores indesejáveis tais como o uso indiscriminado, a monoterapia e ao fenômeno da emergência de resistência a fármacos antifúngicos convencionais por parte de algumas cepas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e em geral a presença de efeitos tóxicos⁴, o estudo de produtos naturais a partir de plantas com propriedades terapêuticas, incluindo aquelas com atividade antimicrobiana, tem crescido bastante, não apenas visando estabelecer-se como recurso terapêutico alternativo, mas também pelas perspectivas de

Correspondente/Corresponding: *Cássio Ilan Soares Medeiros – End: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde – Campus I. – Castelo Branco – I 58051900 – João Pessoa, PB – Brasil – Tel: (83) 32167026 – E-mail: cassioism@hotmail.com

isolar substâncias com eficiência significativa e menores desvantagens⁵.

O citronelal é um monoterpreno, produto da condensação de unidades de isopreno C5 e são componentes importantes dos óleos essenciais (OE) ou plantas aromáticas, como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus* com vasta atividade biológica, dentre estas antimicrobiana, antioxidante, herbicida e inseticida⁶.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho se constituiu na análise *in vitro* da atividade ant-*C. tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citroneal em associação com cetoconazol.

METODOLOGIA

Fitoconstituintes e substâncias

As seguintes substâncias utilizadas neste trabalho foram obtidas comercialmente: (R)-(+)-citroneal e (S)-(-)-citroneal [(3R)-3,7-dimethyloct-6-enal e (3S)-3,7-dimethyl-6-octenal] (pureza > 90%), dimetilsulfóxido (DMSO) e tween 80 (0.02%) (todos da Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). O tween 80 e o DMSO foram solubilizados em uma proporção que não excedeu 0.5% nos testes, posteriormente foi diluído em água destilada estéril com os fitoconstituintes de modo a obter emulsões duplamente concentradas de 2048µg/mL^{7,8}.

Cepas fúngicas

Os ensaios foram realizados com três cepas fúngicas de *C. tropicalis*: LM 665, LM 255 (isolados clínicos) e uma cepa padrão: *C. tropicalis* ATCC 13803. Todas as amostras pertencem à coleção do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (LM, DCF, UFPB). Todas as cepas foram mantidas em agar sabouraud dextrose (ASD) à 4°C. Utilizou-se nos ensaios repiques de 24-48h incubadas a 35±2°C.

Inoculo

As suspensões foram preparadas a partir de culturas recentes semeadas em ASD e incubadas a 35±2°C durante 24-48h. Após a incubação, foi transferido aproximadamente 4-5 colônias (com uma alça estéril) para tubos de ensaio contendo 10mL de solução salina estéril (NaCl a 0.85%). As suspensões resultantes foram agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho Vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inoculo final foi normalizada utilizando uma suspensão de sulfato de bário (tubo de 0.5 na escala de McFarland). A concentração final obtida foi de 1-5 × 10⁵ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL)^{9,10}.

Determinações da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da atividade antifúngica para a determinação da CIM foi realizada pela técnica de diluição em microplaca nas quais, 100µL de meio líquido RPMI-1640

foram transferidos para as cavidades de uma placa de microdiluição de 96 poços com fundo em forma de "U" (Alamar, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, 100µL da emulsão dos produtos duplamente concentrados foram inoculados na primeira linha horizontal dos poços da placa. Foi realizadas diluições em série a uma razão de dois, onde uma alíquota de 100µL foi removida do poço mais concentrado para o poço seguinte, produzindo concentrações de 1024-8µg/mL. Finalmente, 10µL das suspensões fúngicas foram adicionadas em cada poço da placa, em que cada coluna representada uma cepa. Em paralelo, os controles foram feitos para a viabilidade dos micro-organismos e para susceptibilidade com o antifúngico padrão nistatina (100UI/mL). As placas foram seladas e incubadas a 35±2°C durante 24-48h. Após o tempo de incubação apropriado, a presença (ou ausência) de crescimento foi observada visualmente. A formação de cachos de células ou "botões" nos poços da placa foi observada. A CIM foi definida como a mais baixa concentração dos produtos que produziram uma inibição do crescimento visível das cepas fúngicas^{11,12}.

A atividade antifúngica dos enantiômeros foi interpretada (considerado ativo ou não) de acordo com os critérios propostos por Morales et al.¹³, forte/boa atividade (CIM 50-500µg/mL), atividade moderada (CIM 600-1500µg/mL), e produto inativo/nenhum efeito antimicrobiano (CIM > 1500µg/mL).

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

Antifungigrama e ensaios de associação in vitro

O antifungigrama foi realizado com o antifúngico cetoconazol (50µg) isoladamente. A interpretação dos resultados foi realizada com os critérios sensível ou resistente recomendados pelo (CECON) Ltd. (São Paulo, SP, Brasil). No ensaio de associação, o antifúngico cetoconazol (50µg) foi embebido com 10µL da CIM dos enantiômeros separadamente e posteriormente distribuídos em placas de Petri contendo ASD inoculado com 1mL das suspensões fúngicas. Em seguida, as placas foram incubadas a 35±2°C durante 24-48h. As interações dos fitoconstituintes com o agente antifúngico foi considerada positiva (sinergismo) quando a zona de inibição da aplicação combinada foi (≥ 2mm) em relação ao antifúngico isoladamente e como sendo negativa (antagonismo) quando a zona de inibição da associação foi (≤ 2mm) ao apresentado pelo antifúngico isolado e "interação 0" (indiferente) quando a zona de inibição da combinação foi a mesma que a do antifúngico sozinho^{14,15}.

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

RESULTADOS

Após a aplicação dos protocolos experimentais pode-se observar que os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-CT

apresentaram valores de CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima para 50% das cepas testadas) de 16 e 64 µg/mL respectivamente. A CFM₅₀ (Concentração Fungicida Mínima para 50% das cepas testadas) foram de 2×CIM para ambas as moléculas respectivamente.

A análise dos resultados expressos na (Tabela 1) mostra claramente as interações dos enantiômeros com o antifúngico cetoconazol frente às cepas de *C. tropicalis*. Portanto, houve interação positiva/sinergismo dos compostos frente a todas as cepas testadas em comparação com o antifúngico isoladamente bem como, a mudança do perfil de resistência das cepas LM 665 e LM 255.

Tabela 1 – Média das zonas de inibição (em mm) do cetoconazol e da associação com os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citrônella contra *C. tropicalis*.

Tratamentos/Cepas fúngicas	LM 665	LM 255	ATCC 13803
Cetoconazol	19**	17**	26*
CIM _(R) + Cetoconazol	25↑*	20↑*	45↑*
CIM _(S) + Cetoconazol	36↑*	25↑*	38↑*
Controle de leveduras	+	+	+

*Sensível (S); **Resistente (R); ↑ Sinergismo; ↓ Antagonismo; I Indiferente. Classificação do tamanho dos halos: ≥20 (S) <20 (R)

Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-CT apresentaram excelente efeito antifúngico para 50% das cepas de *C. tropicalis*. De acordo com os critérios estabelecidos por Morales et al.¹³, estes fitoconstituintes mostraram forte atividade antifúngica, pois os valores da CIM₅₀ foram inferiores a 100 µg/mL (MIC <100 µg/mL). Este perfil de atividade já foi observado em outros estudos com fungos, bactérias, tripanossomo e leishmania^{16,17}. O efeito fungicida desses compostos também foi avaliado e 50% das cepas de *C. tropicalis* (CFM₅₀ = 32 e 128 µg/mL respectivamente) foram susceptíveis. De acordo com Hafidh et al.¹⁸, o efeito fungicida de um produto natural, é observado quando o coeficiente entre a CFM/CIM está entre 1 e 2, que pode ser constatado neste trabalho.

Os potenciais efeitos antifúngicos de certos compostos bioativos de plantas têm atraído a atenção da comunidade científica, em grande parte como resultado do crescente problema da resistência a múltiplos fármacos entre fungos patogênicos e efeitos tóxicos da terapêutica utilizada^{19,20}. Pelo contrário, existem alguns relatórios sobre o efeito de agentes antifúngicos naturais isolados de plantas em combinação com agentes antifúngicos comerciais. Singh, Fatima e Hameed²¹, relataram que o citrônella conferiu significativa atividade antifúngica. Neste estudo, relatamos o efeito anti-*C. tropicalis* dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-CT em combinação com o agente antifúngico, cetoconazol.

Com relação aos efeitos combinados de agentes antifúngicos *in vitro*, a Tabela 1 mostra a média aritmética

dos halos de inibição resultantes do efeito antifúngico do cetoconazol isoladamente e da combinação deste com os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-CT. Principalmente, o efeito anti-*Candida* da combinação dos fitoconstituintes com o cetoconazol contra todas as cepas testadas foi classificada como sinérgico, tendo em vista que houve aumento significativo (≥ 2mm) em relação ao antifúngico isoladamente do tamanho da zona de inibição resultante da ação combinada dos produtos naturais com o antifúngico padrão para as cepas LM 665 e LM 255, com maior efetividade do enantiômero (S) em relação ao (R)^{22,23}.

O aumento nos compostos antifúngicos disponíveis isolados de produtos naturais levou a procura de melhores estratégias de eficácia, como o uso de agentes antifúngicos isolados de plantas medicinais em combinação com antifúngicos comuns, pois se observa uma diminuição da sensibilidade microbiana a monoterapia¹⁴. Além disso, as combinações sinérgicas de agentes antifúngicos podem ter efeitos positivos. Por exemplo, as terapias de combinação de antifúngicos podem aumentar a taxa de morte dos fungos, reduzir a duração da terapia, evitar o surgimento da resistência aos medicamentos, expandir o espectro de atividade e diminuir a toxicidade relacionada à droga ao permitir o uso de doses mais baixas de agentes antifúngicos^{24,25}.

CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos nesse estudo descrevem os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-CT como promissores agentes antifúngicos, com efeito fungicida e um potencial fármaco para a terapia antifúngica combinada ao cetoconazol. No entanto, mais estudos que mostrem seu mecanismo de ação, bem como seus efeitos farmacológicos e toxicológicos *in vitro* e *in vivo* são necessários.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- MENDLING, W. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. *Mycoses*, Berlin, v. 55, n. 3, p. 1-13, 2012.
- ILKIT, M.; GUZEL, A. B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit. Rev. Microbiol.*, Boca Raton, v. 37, n. 1, p. 250-261, 2011.
- FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J. Med. Mycol.*, Paris, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016.
- ZHAO, C. et al. *In vitro* inhibitory activity of probiotic products against oral *Candida* species. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 121, n. 1, p. 254-262, 2016.

5. MISHRA, R. et al. Antimicrobial Efficacy of Probiotic and Herbal Oral Rinses against *Candida albicans* in Children: A Randomized Clinical Trial. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Birmingham, v. 9, n. 1, p. 25-30, 2016.
6. AVOSEH, O. et al. *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 7438-7453, 2015.
7. NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
8. PEREIRA, F. O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharm. Biol.**, Lisse, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2014.
9. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard**. Third Ed. Wayne, USA: CLSI; 2008. v. 28. n. 14.
10. OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 18, n. 30, p. 1-7, 2008.
11. HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay coices. **Phytochem Analysis**, Chichester, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2000.
12. NATTINAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Villanova: NCCLS 2002. M27-A2. v. 22. n. 15.
13. MORALES, G. et al. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 1, p. 790-794, 2008.
14. CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 54, n. 1, p. 854-869, 2004.
15. OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.
16. ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, n. 13, p. 1181-1190, 2011.
17. PEREIRA CARNEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. **Cad. Cult. Ciênc.**, Ceará, v. 13, n. 2, p. 29-36, 2015.
18. HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. **The Open Microbiol. J.**, Hilversum, v. 5, n. 1, p. 96-106, 2011.
19. TIM CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 343-356, 2005.
20. RUKAYADI, Y. et al. Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin B. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 1302-1311, 2009.
21. SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 465-472, 2016.
22. SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **J. Appl Microbiol.**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 1289-1296, 2004.
23. KARPANEN, T. J. et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 62, n. 1, p. 1031-1036, 2008.
24. POLAK, A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**. Berlin, v. 42, n. 1, p. 355-370, 2000.
25. ZHU, L. P.; GIL-LAMAINERE, C.; MULLER, F. M. C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**. Berlin, v. 47, n. 1, p. 319-325, 2004.

Submetido em: 12/07/2017

Aceito em: 24/08/2017