



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRONELAL CONTRA *Candida* NÃO-*albicans* DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA EM PEDIATRIA

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CITRONELLAL AGAINST *Candida* NON-*albicans* OF PEDIATRIC CLINICAL IMPORTANCE



Ana Luísa de Araújo Lima¹; Abrahão Alves de Oliveira Filho²; Ana Luíza Alves de Lima Pérez³; Janiere Pereira de Sousa⁴; Lilian Sousa Pinheiro⁵; Hermes Diniz Neto^{6*}; José Pinto de Siqueira Júnior⁷ e Edeltrudes de Oliveira Lima⁸.

^{1,4,5,6,7,8}Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Castelo Branco III, cep 58059-900, João Pessoa- PB, Brasil.
Fone: (83)3216-7347 - Fax: (83)3216-7094.

²Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Jatobá, cep 58700-970, Patos - PB, Brasil.
Fone: (83)3511-3000.

³Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco III, cep 58059-900, João Pessoa- PB, Brasil.
Fone: (83)3216-7797.

* Autor correspondente
e-mail: hermes.dn@hotmail.com

Received 17 July 2018; received in revised form 10 August 2018; accepted 13 August 2018

RESUMO

Apesar da sua relação comensal, leveduras de gênero *Candida* podem infectar o ser humano, provocando candidíases que podem variar da forma superficial até a disseminada, ou candidemia. O agente etiológico mais comum destas infecções é *C. albicans*, porém, o perfil destas infecções fúngicas está mudando, onde as espécies não-*albicans* passam a ser os principais patógenos associados a candidíase. A alta taxa de mortalidade associada ao desenvolvimento de resistência contra os antifúngicos padrão são fatores que tornam a candidemia um grave problema de saúde pública mundial, sobretudo em pacientes fragilizados como crianças, especialmente quando existe um agravante como sistema imunológico suprimido. O citronelal, um dos principais fitoconstituintes dos óleos essenciais de diversas plantas, é um potencial candidato a agente antifúngico. Com o objetivo de avaliar o perfil antifúngico deste produto natural, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada contra cepas de *Candida* não-*albicans* provenientes de infecções sanguíneas em pacientes pediátricos. Foi observado que tanto a CIM₅₀ quanto a CFM₅₀ do citronelal foi de 128 µg/mL, atestando a eficácia antifúngica deste monoterpeno contra cepas de relevância clínica.

Palavras-chave: *Candida* não-*albicans*, candidemia, citronelal, monoterpeno, pediatria.

ABSTRACT

Despite their commensal interaction, *Candida* yeasts may infect the human being, causing candidiasis which can vary from a superficial to a disseminated form, namely candidemia. The most common etiological agent of these infections is *C. albicans*; however, the profile of these fungal infections is changing, where non-*albicans* species becomes the main pathogens associated with candidiasis. The high mortality rate associated with the development of resistance against standard antifungal agents are factors that make candidemia a serious public health problem worldwide, especially in fragile patients as children, especially when there is an aggravating as a suppressed immune system. Citronellal, one of the main phytochemicals of the essential oils of several plants, is a potential candidate for an antifungal agent. In order to evaluate the antifungal profile of this natural product, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) were determined against strains of *Candida* non-*albicans* from blood infections in pediatric

patients. It was observed that both MIC₅₀ and MFC₅₀ of citronellal were 128 µg/mL, attesting the antifungal efficacy of this monoterpene against strains of clinical relevance.

Keywords: *Candida non-albicans*, candidemia, citronellal, monoterpene, pediatrics.

INTRODUÇÃO

Pela possibilidade de se apresentar tanto de forma superficial, contaminando a mucosa vaginal e oral; quanto de forma sistêmica se disseminando pelos órgãos por via hematogênica ou linfática, a candidíase é uma infecção fúngica de importância clínica global (Peixoto et al., 2014). A forma mais grave da candidíase, a candidemia, é caracterizada pela disseminação das leveduras na corrente sanguínea do hospedeiro, que pode comprometer os sistemas vitais e ocasionar a morte do indivíduo. Em pacientes pediátricos, o caso merece maior atenção, visto que as taxas de mortalidade podem variar de 40% a 60% em pacientes com sistema imunológico deficiente (Steinbach, 2016; Colombo et al., 2014; Kim et al., 2013).

C. albicans é considerada a principal levedura patogênica oportunista, por ser a mais frequentemente isolada em humanos. Entretanto, nas últimas décadas tem sido observado significativo aumento do número de espécies não-*albicans* como os agentes patogênicos nos casos de candidemias, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. pelliculosa* e *C. glabrata*, entre outras (Chakrabarti et al., 2015). Notavelmente, estas espécies não-*albicans* tem exibido maiores taxas de resistência aos antifúngicos tradicionais, assinalando a gravidade da emergência destas novas linhagens (Xisto et al., 2017; Oliveira et al., 2014a; Ruiz et al., 2013; Yang et al., 2012).

Considerando as limitações dos antifúngicos existentes atualmente e a resistência apresentada pelos micro-organismos, a busca por novas fontes terapêuticas para o tratamento dessas infecções tem sido constante, buscando fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente. Nesse contexto, destaca-se a utilização dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente ativas (Khan et al. 2012; Morace et al., 2011; Svetaz et al. 2007).

Presente em grandes quantidades nos óleos essenciais de várias plantas do gênero *Cymbopogon*, o citronelal é o monoterpene responsável pelo aroma característico do capim-

limão (Quintans-Júnior et al 2008; Aguiar et al., 2014) e já demonstrou ser uma substância valiosa devido ao seu uso em síntese orgânica e pela sua gama de atividades biológicas (Wu et al., 2016; Lenardão et al., 2007).

Devido a seriedade da candidemia em pacientes pediátricos e o potencial biológico do citronelal, buscou-se avaliar a atividade deste monoterpene contra cepas de *C. não-albicans*, na tentativa de se obter um candidato a agente antifúngico eficaz.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Substâncias

O citronelal, a anfotericina B e o fluconazol foram obtidos na Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), o dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80 foram comprados na Labsynth Ltda. (Diadema, SP, Brasil). A emulsão dos produtos utilizada nos ensaios antifúngicos foi preparada no momento da execução dos testes. Os produtos foram solubilizados em DMSO, Tween 80 e água destilada, de forma a se obter uma concentração inicial de 1024 µg/mL. A mistura foi agitada durante 3 minutos em um aparelho Vortex (Fanem® Ltda., Guarulhos, SP, Brasil).

2.2. Meios de cultura

Para testar a atividade biológica dos produtos, foram utilizados o agar Sabouraud dextrose (ASD), adquirido da Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA), agar-fubá da HiMédia Laboratories (Mumbai, MH, Índia), e RPMI-1640 com L- glutamina sem bicarbonato de sódio da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Os meios foram preparados e usados de acordo com as instruções dos fabricantes. Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C, 1,0 atm durante 15 min.

2.3. Amostras fúngicas

Os ensaios foram realizados com seis cepas de *Candida não-albicans* isoladas de pacientes pediátricos com infecção da corrente sanguínea e duas cepas ATCC como padrão.

Duas cepas clínicas de *Candida tropicalis* (AM-01 e AM-12); duas cepas clínicas de *Candida parapsilosis* (AM-05 e AM-14) e duas cepas clínicas de *Candida pelliculosa* (AM-03 e AM-11). As cepas usadas como padrão foram: *C. tropicalis* ATCC-13803 e *C. parapsilosis* ATCC-22019. Estas cepas pertencem à coleção do laboratório de micologia da UFPB e foram mantidas em ASD a 4°C até a utilização nos testes.

2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pelo método da microdiluição (Eloff, 1998). Culturas de *Candida* spp. foram semeadas em ASD e incubadas por 24-48 horas em temperatura de 37°C. Colônias dessas culturas foram suspensas em solução de 0,85% NaCl estéril e o inóculo foi padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL). Em placa de 96 poços foram distribuídos meio líquido de RPMI-1640 e o citronelal em concentrações de 1024 a 0,5 µg/mL. A determinação da CIM foi conduzida com aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL de microrganismos em cada poço. As placas foram incubadas à 37°C por 24-48 horas. Em 24-48 horas houve uma observação visual do crescimento fúngico. A CIM foi definida como a menor concentração do monoterpene que inibiu o crescimento visível da levedura (Hadacek & Greger, 2000; CLSI, 2008). Um controle negativo (sem drogas) foi realizado para confirmar a viabilidade celular fúngica (Eloff, 1998). Um controle de sensibilidade ao Tween 80 e DMSO foi realizado nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os produtos. Houve três independentes experimentos em duplicata em diferentes ocasiões. Os resultados foram expressos como a média aritmética da CIM.

2.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a CFM, 10 µL de cada poço sem o crescimento fúngico foi semeado em placas contendo ASD que por sua vez foram incubadas à 37°C por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração cultivada em placa com SDA em que o crescimento foi inferior a 3 UFC (Espinel-Ingroff et al., 2002). Um controle negativo (sem drogas) foi realizado para confirmar a viabilidade celular fúngica (Eloff, 1998). Um controle de sensibilidade ao Tween 80 e DMSO foi realizado

nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os produtos. Houve três independentes experimentos em duplicata em diferentes ocasiões. Os resultados foram expressos como a média aritmética da CFM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios estão expostos na Tabela 1. O citronelal exibiu valores de CIM variantes entre 64 e 256 µg/mL. A concentração de 256 µg/mL inibiu o crescimento microbiano de todas as cepas. Já 128 µg/mL inibiu o crescimento de 70% das cepas. A CFM variou entre 128 e 512 µg/mL, sendo a concentração de 128 µg/mL inibitória para 80% das leveduras. A natureza fungicida da substância é sugerida pelo resultado da razão entre a CFM/CIM para a maioria das cepas testadas, com efeito fungistático contra *Candida parapsilosis* (AM-05) e *Candida tropicalis* (AM-01). A CIM da anfotericina B variou entre 0,5 e 1 µg/mL, enquanto para o fluconazol variou entre 0,5 e 8 µg/mL. Os resultados para o ensaio controle não apresentou inibição do crescimento fúngico.

A seriedade das infecções fúngicas reside nas altas taxas de mortalidade associadas, com o recente agravante do surgimento de espécies não-*albicans* com resistentes a uma vasta lista de antifúngicos, o que resulta em esquemas terapêuticos que frequentemente fracassam e o paciente chega ao óbito. Na pediatria médica, esta realidade se torna mais preocupante ao lidar com uma população de pacientes normalmente fragilizadas e vulneráveis até mesmo aos esquemas terapêuticos tradicionais (Motta et al., 2017).

Uma estratégia para se contornar esta situação está na pesquisa de novos agentes antifúngicos nos produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, uma vez que estes produtos já apresentaram uma extensa lista das mais diversas atividades farmacológicas. Como componente principal nos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas, o monoterpene citronelal se torna um alvo valioso para estes tipos de pesquisa devido a sua importância bioativa (Quintans-Júnior et al., 2008).

Anteriormente o nosso grupo de pesquisas observou um perfil de atividade antimicrobiana semelhante para o citronelal, onde este fitoconstituente apresentou CIM de 128 µg/mL contra 90% das cepas de *C. albicans*

isoladas de infecções sanguíneas de pacientes pediátricos (Lima et al., 2017). Em outros estudos, o citronelal exibiu valores de CIM entre 16 e 512 µg/mL contra várias espécies fúngicas, incluindo *C. albicans* e *C. não-albicans*, atestando que os resultados encontrados no atual trabalho estão de acordo com os da literatura (Trindade et al., 2015).

Seguindo os parâmetros de Sartoratto et al. (2004), onde estabelece que um produto com CIM < 500 µg/mL possui forte/ótima atividade antimicrobiana, o citronelal pode ser caracterizado como uma substância de ótima atividade antimicrobiana, devido a sua CIM de 128 µg/mL. Na literatura, já foi demonstrado também que o citronelal é ativo contra bactérias e fungos, incluindo o gênero *Candida* (Aguiar et al., 2014; Lopez-Romero et al., 2015; Singh et al., 2016).

Uma substância antifúngica pode exercer um efeito fungicida ou fungistático de acordo com a sua concentração. Conhecer a natureza da atividade de uma certa substância se torna relevante ao considerar que indivíduos imunocompetentes conseguem tratar sua infecção de forma eficaz com o auxílio de uma substância fungistática, porém, em indivíduos imunodebilitados, uma substância fungicida se torna a melhor opção (Monk & Goffeau, 2008).

Uma maneira de analisar se esta substância é fungicida ou fungistática se dá através do cálculo da razão entre a CFM e a CIM observadas como proposto por Hafidh et al. (2011) onde a relação CFM/CIM entre 1/1 e 2/1 indica que a substância possui atividade fungicida, enquanto uma razão CFM/CIM > 2:1 indica que a atividade é de natureza fungistática. Uma vez que a razão CFM/CIM do citronelal para a maioria das cepas foi de 1/1, pode-se considerar que este fitoconstituente é um agente fungicida, com exceção para as cepas *Candida parapsilosis* (AM-05) e *Candida tropicalis* (AM-01), que se mostraram pouco sensíveis e a substância exerceu apenas efeito fungistático. Este resultado corrobora com os achados anteriores onde o monoterpeno foi fungicida contra cepas de *C. albicans* (Lima et al., 2017).

CONCLUSÕES

Ao atestar a ótima atividade antifúngica do citronelal, este trabalho contribui com a busca de novos agentes terapêuticos para serem

usados nos casos de infecções fúngicas em pacientes pediátricos, sobretudo aquelas causadas pelas perigosas espécies não-*albicans*. Contudo, vale salientar que a implementação deste fitoconstituente na terapêutica clínica ainda está numa fase inicial, sendo necessário ainda compreender os mecanismos de ação envolvidos e determinar a segurança deste fármaco para o paciente.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar, R.W.S.; Ootani, M.A.; Ascencio, S.D. et al. *The Scientific World Journal*, **2014**, 2014, 1-8.
2. Bilia, A.R.; Santomauro, F.; Sacco, C. et al. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2014**, 2014, 159819.
3. Chakrabarti, A.; Sood, P.; Rudramurthy, S.M. et al. *Intensive Care Med*, **2015**, 41, 285.
4. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA. 2008.
5. Colombo, A.L.; Guimarães, T.; Sukienik, T. et al. *Intensive Care Med*, **2014**, 40, 1489.
6. Eloff, J.N; *Planta Med.* **1998**, 64, 711 – 713.
7. Espinel-Ingroff, A.; Chaturvedi, V.; Fothergill, A. et al. *J Clin Microbiol*, **2002**, 40, 3776– 3781.
8. Frost, D.J.; Brandt, K.D.; Cugier, D. et al. *J Antibiot*, **1995**, 48, 306–310.
9. Hadacek, F.; Greger, H. *Phytochem Anal*, **2000**, 11, 137–147.
10. Hafidh, R.R.; Abdulmir, A.S.; Vern, L.S. et al. *Open Microbiol J*, **2011**, 5, 96–106.
11. Khan, S.M.A.; Malik, A.; Ahmad, I. *Med Mycol*, **2012**, 50, 33–42.
12. Kim, S.H.; Yoon, Y.K.; Kim, M.J. et al. *J Antimicrob Chemother*, **2013**, 68, 2890–2897.

13. Lenardao, E.J.; Botteselle, G.V.; de Azambuja, F. et al. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 6671-6712.
14. Lima, A.L.; Perez, A.L.; Sousa, J.P. et al. *Latin American Journal Of Pharmacy*, **2017**, 36, 2042-2047
15. Lopez-Romero, J.C.; González-Ríos, H.; Borges, A. et al. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2015**, 2015, 795435.
16. Monk, B.C.; Goffeau, A. *Sci*, **2008**, 321, 367-9.
17. Morace G.; Borghi, E.; Iatta, R., et al. *BMC Infect Dis*, **2011**, 11, 130.
18. Motta, F.A.; Dalla-Costa, L.M.; Muro, M.D. et al. *J Pediatr*, **2017**, 93, 165–171.
19. Oliveira VKP, Ruiz LS, Oliveira NAJ, et al.. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **2014**, 56, 301-5.
20. Peixoto, J.V.; Rocha, M.G.; Nascimento, R.T.L. et al. *Braz J Surg Clin Res*, **2014**, 8, 75–82.
21. Quintans-Júnior, L.J.; Souza, T.T.; Leite, B.S. et al. *Phytomedicine*, **2008**, 15, 619–624.
22. Ruiz, L.S.; Khouri, S.; Hahn, R.C. et al. *Mycopathologia*, **2013**, 175, 231-9
23. Sartoratto, A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C. et al. *Braz J Microbiol*, **2004**, 35, 275-280.
24. Simões, E.R.; Santos, E.A.; de-Abreu, M.C. et al. *J Intercult Ethnopharmacol*, **2015**, 4, 256-63.
25. Singh, S.; Zeeshan, F.; Hameed, S.; *Rev Soc Bras Med Trop*, **2016**, 49, 465-472.
26. Steinbach, W.J.; *J Fungi*, **2016**, 2, 5.
27. Svetaz, L.; Agüero, M.B.; Alvarez, S. et al. *Planta Med*, **2007**, 73, 1074-80.
28. Trindade, L.A.; de-Araújo-Oliveira, J.; de-Castro, R.D. et al. *Clin Oral Invest*, **2015**, 19, 2223.
29. Wu, Y.; Qiuli, O.Y.; Nengguo, T.; *J Food Sci Technol*, **2016**, 53, 3853–3858.
30. Xisto, M.I.D.S.; Caramalho, R.D.F.; Rocha, D.A.S. et al. *J Antimicrob Chemother*, **2017**, 72, 988–992.
31. Yang, Y.L.; Lin, C.C.; Chang, T.P. et al. *Plos One*, **2012**, 7, e34609–e34609.

Tabela 1: CIM, CFM, CFM/CIM e efeito do citronelal e CIM da anfotericina B e fluconazol contra cepas das espécies de *Candida não-albicans*.

Leveduras	Citronelal (µg/mL)				Anf (µg/mL)	Fic (µg/mL)	Controle ^a
	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$	Efeito	CIM	CIM	
<i>C. tropicalis</i>							
ATCC-13803	128	128	1:1	Fungicida	0.5	0.5	+
AM-01	128	512	4:1	Fungistático	1	1	+
AM-12	128	128	1:1	Fungicida	0.5	0.5	+
<i>C. parapsilosis</i>							
ATCC 22019	128	128	1:1	Fungicida	0.5	0.5	+
AM-05	128	512	4:1	Fungistático	1	1	+
AM-14	256	512	2:1	Fungicida	0.5	4	+
<i>C. pelliculosa</i>							
AM-03	64	128	2:1	Fungicida	1	8	+
AM-11	64	128	2:1	Fungicida	1	8	+

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; CFM, concentração inibitória mínima; Anf, anfotericina B; Fic, fluconazol; ^a crescimento fúngico em RPMI-1640, DMSO (5%) e Tween 80 (2%), sem agente antifúngico.