



ATIVIDADE ANTI-*Candida albicans* DA ASSOCIAÇÃO DO CITRONELAL COM A ANFOTERICINA B OU COM O CETOCONAZOL



ANTI-CANDIDA ALBICANS ACTIVITY OF THE ASSOCIATION OF CITRONELAL WITH ANFOTERICIN B OR WITH CETOCONAZOLE

SILVA, Patrícia Duarte Costa¹; SANTOS, Brenda Lavínia Calixto dos^{*2}; SOARES, Gustavo Lima³; OLIVEIRA, Wylly Araújo de⁴

^{1,2,3,4} Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Sítio Olho D'água da Bica, S/Nº, Cep 58175-000, Cuité-PB, Brasil
(Fone: +55 83 3372 1900)

* Autor correspondente
e-mail: bcalixto96@gmail.com

Received 2 August 2018; received in revised form 13 September 2018; accepted 15 September 2018

RESUMO

Infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* são responsáveis por altos índices de morbimortalidade, afetando principalmente imunocomprometidos. Dentre os fungos, *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas. Problema associado ao aumento de resistência dos fungos patogênicos aos agentes utilizados no esquema terapêutico e ao número limitado de drogas para a cura dessas infecções. Com isso, a busca por novos fármacos com atividade antifúngica tornou-se cada vez mais importante. O trabalho objetiva estudar a atividade antifúngica do citronelal isoladamente e em associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. A Concentração Inibitória Mínima do citronelal, anfotericina B e cetoconazol frente a cepas de *Candida albicans* foram avaliadas pela técnica da microdiluição, sendo ainda realizada a Concentração Fungicida Mínima do citronelal contra as mesmas cepas. Através da metodologia *checkerboard* foi determinado o efeito da combinação do citronelal com a anfotericina B ou com o cetoconazol. Este estudo demonstrou que a associação do citronelal com o cetoconazol mostrou-se aditivo contra uma das cepas de *C. albicans* e indiferente para outra cepa. Enquanto que a atividade combinada do citronelal com a anfotericina B demonstrou efeito indiferente para as cepas ensaiadas.

Palavras-chave: *Farmacoterapia, antifúngicos, checkerboard.*

ABSTRACT

Fungal infections caused by species of the genus *Candida* are responsible for high morbidity and mortality rates, mainly affecting immunocompromised individuals. Among fungi, *Candida albicans* is the most frequently isolated species of clinical specimens. A problem associated with increased resistance of pathogenic fungi to the agents used in the therapeutic regimen and the limited number of drugs to cure these infections. As a result, the search for new drugs with antifungal activity has become increasingly important. The aim of this study is to study the antifungal activity of citronellal alone and in combination with amphotericin B or ketoconazole. The Minimal Inhibitory Concentration of citronellal, amphotericin B and ketoconazole against strains of *Candida albicans* were evaluated by the microdilution technique, and the Minimum Fungicide Concentration of citronellal against the same strains was also performed. Through the *checkerboard* methodology the effect of the combination of citronellal with amphotericin B or with ketoconazole was determined. This study showed that the association of citronellal with ketoconazole was shown to be an additive against one of the strains of *C. albicans* and indifferent to another strain. While the combined activity of citronellal and amphotericin B demonstrated an indifferent effect on the strains tested.

Keywords: *Pharmacotherapy, antifungal, checkerboard.*

INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções invasivas causadas por fungos têm aumentado nas últimas décadas, especialmente nas grandes populações de doentes imunocomprometidos. As espécies do gênero *Candida* (Figura 1) são as causas mais comuns desse tipo de infecção. Estas leveduras são comensais em humanos saudáveis, mais podem tornar-se patogênicas quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos (PEIXOTO *et al.*, 2016; PILMIS *et al.*, 2016; OZER, DURMAZ, YULA, 2016).

O número de drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos ainda é bastante limitado, principalmente em comparação com o número de drogas antibacterianas. Os principais grupos de agentes antifúngicos com ação sobre espécies de *Candida* são representados pelos derivados azólicos e os antibióticos poliênicos (Quadro 1), sendo a anfotericina B recomendada para as formas mais graves de infecções, no entanto, seu uso está bastante relacionado a problemas de nefrotoxicidade. Além do mais, a extensa exposição dos microrganismos às drogas tem aumentado o processo de resistência, constituindo um sério problema na terapêutica das infecções fúngicas (BACKES, JURJIC, NEUMANN, 2015; DEORUKHKAR, SAINI, 2015, MOTTA *et al.*, 2016).

Com isso a busca por novas drogas e agentes mais eficazes para combater esse tipo de infecções vem se intensificando, e a associação entre agentes antimicrobianos é uma estratégia bastante estudada e tem como benefício a ampliação dos espectros de ação das drogas combinadas, a prevenção de resistência, a redução de dose e conseqüentemente a diminuição dos riscos de toxicidade das drogas utilizadas isoladamente, o que é essencialmente importante para medicamentos como a anfotericina B (BARBOSA, *et al.*, 2017). Os produtos de origens naturais são modelos atraentes para esse fim, pois muitas plantas são geralmente usadas na medicina popular como agentes antimicrobianos, na forma de óleos essenciais e extratos (CORREIA, 2016; CHAVES, *et al.*, 2018).

O objetivo desse trabalho foi estudar a

atividade antifúngica do citronelal quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol. As atividades de cada droga foram determinadas através da técnica de microdiluição por *checkerboard*, um método de diluição em caldo que visa determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada composto em combinação um com o outro. Além disso, foram determinadas as CIMs do citronelal, cetoconazol e anfotericina B contra as cepas de *Candida albicans* e avaliada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do citronelal frente ao mesmo fungo. Com isso, o trabalho objetiva estudar a atividade antifúngica do citronelal quando associado com a anfotericina B ou com o cetoconazol.

MATERIAL E MÉTODOS

A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do cetoconazol, anfotericina B e citronelal foram realizadas através do método de microdiluição em Caldo Sabouraud desxtrose (CSD) (CASTRO, LIMA, 2010; CASTRO, LIMA, 2011; CORTEZ *et al.*, 2015). A determinação da CIM de cada composto foi determinada em microplacas de 96 cavidades e CSD como meio de cultura, as substâncias foram diluídas seriadamente 1:2 para obtenção de concentrações entre 2.000 a 1,95 µg/mL. Os experimentos foram conduzidos com aproximadamente $1-5 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias/mL em cada cavidade. A última coluna da placa foi utilizada para o controle negativo (apenas CSD) e controle positivo do experimento (CSD e o microrganismo). Todos os testes foram realizados em triplicata.

As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C e a leitura foi feita após 24 horas, observando presença ou ausência de crescimento visível. A CIM foi considerada a menor concentração da substância testada que inibiu o crescimento do microrganismo. As cepas utilizadas foram: *Candida albicans* ATCC 76615, *Candida albicans* ICB-12, *Candida albicans* LM-410, *Candida albicans* LM-393 e *Candida albicans* LM-178.

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada em placa de Petri contendo ASD. Uma alíquota de 10 µL do conteúdo de cada uma das cavidades da placa de microdiluição que representam as 4 menores

concentrações onde não houve crescimento do microrganismo foi semeada em uma placa de Petri. Após 24-48 horas de incubação a 37°C, foi verificado o crescimento de colônias nas respectivas concentrações. A CFM correspondeu a menor concentração da droga que reduziu > 99,9% de células (ERNST *et al.*, 1999; MEDEIROS, *et al.*, 2018).

Após a definição da CIM de cada droga antifúngica e do citronelal foram realizadas as combinações. O estudo de associação entre o cetoconazol e citronelal foi conduzido utilizando-se a técnica de microdiluição por *checkerboard*. Inicialmente, foram preparadas diluições do cetoconazol e do citronelal em sete concentrações diferentes CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8. Em seguida, 100 µL do CSD foram distribuídos nos poços da placa de microdiluição de 96 cavidades. Depois 50 µL da solução do antifúngico em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) foram adicionados no sentido vertical (ex.: cetoconazol) e 50 µL da solução do citronelal também em diferentes concentrações foram adicionados no sentido horizontal da microplaca. Desta maneira, as diversas concentrações do citronelal foram testadas na presença de várias concentrações do cetoconazol. Por último, foram acrescentados 20 µL do inóculo das cepas ICB-12 e ATCC 76615, previamente ajustadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland. O mesmo procedimento foi realizado para associação da anfotericina B e citronelal. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura foi feita após 24 - 48 horas para observar a presença ou ausência do crescimento fúngico (CASTRO, *et al.*, 2011; HIMRATUL-AZNITA, NOR-ZULAILA, NURUL-FATIAH, 2016).

O Índice da Concentração Inibitória Fracional (ICIF) foi calculado e acordo com a equação:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B$$

Onde o ICIF foi interpretado da seguinte forma: ≤ 0.5 sinergismo, > 0.5 e ≤ 1.0 aditivo, > 1.0 e < 4.0 representa indiferença e ≥ 4.0 ocorre antagonismo (DOERN, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinadas as concentrações

inibitórias mínimas do citronelal frente a quatro cepas de isolados clínicos ICB-12, LM-393, LM-410, LM-178 e frente a uma cepa padrão ATCC-76615. Conforme mostram os resultados da Tabela 1, nota-se que o citronelal apresentou inibição a todos os microrganismos ensaiados, sendo a maioria deles sensível à concentração de 250 µg/mL, ao passo que a CIM contra ICB-12 e ATCC-76615 foi 500 µg/mL.

Quanto aos valores das CFMs, observou-se que o citronelal apresentou atividade fungicida para as cepas LM-393, LM-410 e LM-178 na concentração 250 µg/mL. No entanto, os resultados obtidos para a ICB-12 e ATCC-76615 indicaram que CFM é quatro vezes maior do que as CIMs encontradas para essas cepas, como ilustrado na Tabela 1.

De acordo com Sartoratto e colaboradores (2004) as CIMs entre 50 e 500 µg/mL são consideradas com forte atividade antimicrobiana, com CIMs entre 600 e 1500 µg/mL atividade moderada e CIMs acima de 1500 µg/mL são considerada atividade fraca. Portanto, pode-se considerar que o citronelal possui forte atividade anti-*Candida albicans*, visto que a CIM variou de 250 a 500 µg/mL.

Resultados apresentados por Medeiros e colaboradores (2018), demonstraram CIM mais baixa do citronelal contra espécies de *Candida* com valores de 16 e 64 µg/mL. Do mesmo modo Zore *et al.*, (2011) estudaram a atividade anti-*Candida albicans* do citronelal e tiveram bons resultados de CIM.

Diversos estudos apontam atividade antimicrobiana do citronelal contra várias espécies de fungos, incluindo fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*) e dermatófitos. A literatura relata, por exemplo, valores de CIM e CFM que variaram de 0,6 a 5 µL/mL e 1,25 a 5 µL/mL, respectivamente, com a utilização do citronelal contra fungos dermatófitos (TOLBA, *et al.*, 2015).

Além disso, diferentes óleos essenciais demonstram significativas atividades antifúngicas como é o caso do óleo essencial da *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* que possui o citronelal como constituinte majoritário (LIN, *et al.*, 2015; VIEIRA, *et al.*, 2017). Como demonstrado por Park e colaboradores (2016) e Park e colaboradores (2018) óleo essencial da *Eucalyptus globulus* (citronela) foi efetivo contra espécies de gênero *Candida*.

O citronelal também é ativo contra

algumas espécies de bactérias como é o caso da *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Fusobacterium nucleatum* (VIEIRA, *et al.*, 2017; HARKATMADOURI, *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais são os mais investigados em consequência do seu menor custo e menor resistência microbiana (SEIXAS *et al.*, 2011). É possível que os óleos essenciais atuem na parede celular fúngica, causando extravasamento do conteúdo celular. A característica lipossolúvel dos óleos e de seus constituintes permite a interação com estruturas celulares que também tem uma constituição lipídica levando ao aumento da permeabilidade da membrana e consequente morte celular (DAGLI, *et al.*, 2015). Muitos estudos são necessários para elucidar com clareza o mecanismo de ação desses produtos.

Diferentes metodologias têm sido empregadas para verificar a atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus componentes, a microdiluição é o método mais eficiente para atestar a atividade antimicrobiana de substâncias naturais. Além de ser de fácil execução é também o que melhor oferece dados quantitativos e permite uma fácil interpretação, por isso é ótima escolha para pesquisa de novos produtos com potencial atividade antifúngica.

Os resultados da combinação entre citronelal e anfotericina B, e citronelal com cetoconazol pelo método de *Checkerboard* contra as cepas ICB-12 e ATCC 76615 estão ilustrados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Atividade de combinações contendo citronelal contra *C. albicans* tem sido menos investigada. Ressaltando a importância de se explorar cada vez mais a ação antimicrobiana dessa substância, uma vez reconhecida sua atividade antifúngica.

O pequeno arsenal de drogas antifúngicas e a emergência de resistência por espécies patogênicas, sobretudo por *C. albicans*, tem acarretado em dificuldades para tratamento dessas micoses, o que tem levado a necessidade urgente de medicamentos mais eficientes e mais seguros (WINGARD, 1995; SANGLARD, ODDS, 2002, MOTTA *et al.*, 2016). Daí a importância da combinação de drogas antifúngicas como terapia alternativa, principalmente, nos casos de pacientes com infecções fúngicas invasivas graves não responsivos à monoterapia antifúngica habitual (WIEDERHOLD, 2016).

Atividade de combinações contendo citronelal contra *C. albicans* tem sido menos investigada. Ressaltando a importância de se explorar cada vez mais a ação antimicrobiana dessa substância, uma vez reconhecida sua atividade antifúngica. Daí a importância da combinação de drogas antifúngicas como terapia alternativa, principalmente, nos casos de pacientes com infecções fúngicas invasivas graves não responsivos à monoterapia antifúngica habitual (DRAGO *et al.*, 2007; SPADER, 2017).

A avaliação da combinação sinérgica de substâncias de origem vegetal com medicamentos antifúngicos tornou-se uma importante área de interesse. Muitos estudos nesse sentido têm sido realizados para melhorar o desempenho biológico das drogas convencionais e permitir o uso de fármacos que apresentam considerável toxicidade (OLAJUYIGBE; AFOLAYAN, 2013).

CONCLUSÕES

O citronelal foi efetivo contra os fungos testados e sua associação com o cetoconazol mostrou aditividade para a cepa ATCC 76615. No entanto, a associação com a anfotericina B mostrou-se indiferente.

REFERÊNCIAS

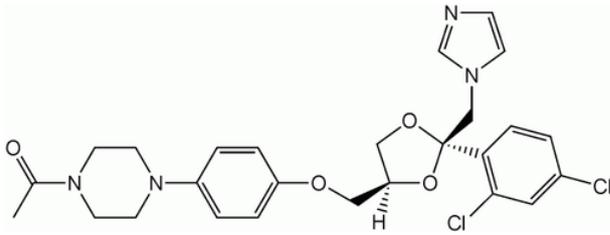
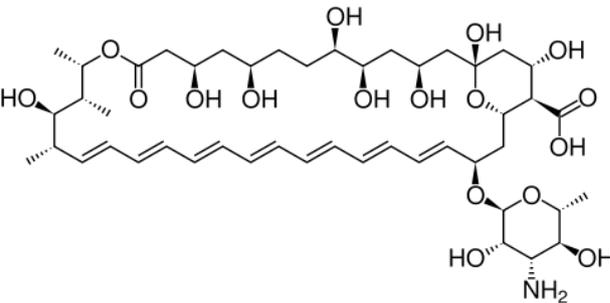
1. Backes, G. L., Jursic, B. S., Neumann, D. M. *Bioorg. Med. chem.* **2015**, 23, 13.
2. BarbosA, H. M., Albino, A. M., Cavalcante, F. S. A., Lima, R. A. S. *Am. J. of Basic Educ., Tech. Technol.*, **2017**, 4, 1.
3. Chaves, M. R. V., De Oliveira, G. M. G., Neto, M. J., Neves, F. M. D. L., Barbosa, I. M. *L. Rev. Saúde e Meio Ambiente*, **2018**, 1, 6.
4. Correia, A. F. Tese de pós- graduação, Universidade Federal de Brasília, Brasil, **2016**.
5. Dagli, N., Dagli, R., Mahmoud, R.S., Baroudi, K. J. *Int. Soc. Preventive and Community Dentistry*. **2015**, 5, 5.
6. Deorukhkar, S.C.; Saini, S. *Pravara Med*

- Review. **2015**, 7, 15.
7. Doern, C.D. J. Clin. Microbiol., **2014**, 52,12.
 8. Drago, L.; De Vecchi, E.; Nicola, L.; Gismondo, M.R. BMC Infect. Dis., **2007**, 7, 1.
 9. Ernst, E. J., Klepser, M. E., Ernst, M. E., Messer, S. A., Pfaller, M. A. Diagn. Microbiol. Infect. dis., [S. I.]. **1999**, 33, 3.
 10. Arkat-Madouri, L., Asma, B., Madani, K., Si Disse, Z.B.O., Rigou, P., Grenier, D., Allalou, H. Industrial Crops and Products. **2015**, 78.
 11. Ganis, P., Auitabile, G., Mechlinki, W., Schaffner, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. J. Amer. Chem. Soc. **1971**, 93, 4560-4564.
 12. Himratul-Aznita, W. H.; Nor-Zulaila, C. O.; Nurul-Fatihah, K. SpringerPlus, **2016**, 5, 1.
 13. <http://thunderhouse4yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>, acessado em setembro de **2018**.
 14. Lin, L., Cui, H., Zhou, H., Zhang, X.A., Bortolini, C., Chen, M. Chem. Commun. **2015**, 51.
 15. Medeiros, C. I. S., De Oliveira, H. M. B. F., De Sousa, J. P., De Oliveira Filho, A. A., Lima, E.O. Arch.f Health Investigation, **2018**, 7, 1.
 16. Motoa, G.; Muñoz, J.S.; Oñate, J.; Pallares, C.J.; Hernández, C.; Villegas, M.V. Rev. Iberoamericana de Micología, **2016**, 34, 1.
 17. Motta, F.A.; Dalla-Costa, L.M.; Muro, M.D.; Cardoso, M.N.; Picharski, G.L.; Jaeger, G.; Burger, M. J. ped. **2016**, 93, 2.
 18. Özer, T.T.; Durmaz, S.; Yula, E. J. Infect. Chemother.. **2016**, 22, 9.
 19. Park, J.W., Wendt, M., Heo, G.J. Lab. Ani. Res. **2016**, 32, 2.
 20. Peixoto, I.T.A., Furletti, V.F., Anibal, P.C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Busato De Feiria, S.N. Adv. in Med.I Plant Res. **2016**, 4, 2.
 21. Peixoto, L.R.; Rosalen, P.L.; Ferreira, G.L.S.; Freires, I.A.; De Carvalho, F.G.; Castellano, L.R.; De Castro, R.D. Arch. Oral Biol. **2016**, 73.
 22. Pilimis, B.; Puel, A.; Lortholary, O.; Lanternier, F. Clin. Microbio. Infect. **2016**, 22, 8.
 23. Sanglard, D.; Odds, F.C. Lancet Infect. Dis. **2002**, 2, 2.
 24. Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G. Braz. J. Microbiol. **2004**, 35.
 25. Seixas, P. T. L., Castro, H. C., Santos, G. R., Cardoso, D. P. Ver. Bras. Plant. Med. **2011**, 13, 1.
 26. Spader, T. B.; Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2017**.
 27. Staub, I., Cruz, Á. S., Pinto, T. D. J. A., Schapoval, E. E. S., Bergold, A. M. (2007). Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. Rev. Bras. Ciên. Farm. **2007**, 43(2), 301-307.
 28. Tolba, H., Moghrani, H., Benelmouffok, A., Kellou, D., Maachi, R. J. Mycolo. Méd. **2015**, 25, 4.
 29. Vieira, M., Bessa, L.J., Martins, M.R., Arantes, S., Teixeira, A.P.S., Mendes, A. Chem. Biod. **2017**, 14.
 30. Wingard, J.R. Clin. Infect. Dis. **1995**, 20, 1.
 31. Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., Karuppayil, S. M. Phytomed., Oxford. **2011**, 18, 13.



Figura 1. Representação de espécies do gênero *Candida* em Ágar Sabouraud-Dextrose
Fonte: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>, 2018.

Quadro 1. Demonstração da estrutura química e espectro de ação dos antifúngicos utilizados.

Antifúngicos	Estrutura química	Espectro de ação
Cetoconazol	 <p>Fonte imagem: http://www.wikiwand.com/pt/Cetoconazol</p>	<p><i>Candida</i>, <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Sporothrix schenckii</i>.</p>
Anfotericina B	 <p>Fonte imagem: https://pt.wikipedia.org/wiki/Polieno</p>	<p>Antifúngico com maior espectro de ação. Leveduras clinicamente importantes (<i>Candida albicans</i>, <i>Cryptococcus neoformans</i>); Microorganismos responsáveis por micoses endêmicas (<i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Blastomyces dermatitidis</i>) e fungos filamentosos patogênicos (<i>Aspergillus Fumigatus</i>)</p>

Fonte: Staub *et al.*, 2007; Ganis *et al.*, 1971.

Tabela 1. Resultados das CIMs do cetoconazol e anfotericina B e as CIMs e CFMs do citronelal frente às cepas estudadas

Cepas	Citronelal (µg/mL)		Cetoconazol (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)
	CIM	CIM	CIM	CFM
ICB 12	500	64	0,03125	2000
ATCC 76615	500	8	0,125	2000
LM – 393	250	250	0,25	250
LM – 410	250	31,25	0,25	250
LM – 178	250	250	0,5	250

Fonte: Autores, 2018.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com a Anfotericina B sobre cepa de *C. albicans* ICB-12 e ATCC 76615.

Cepa	CIM das drogas associadas (µg/mL)		CIF ^a		ICIF ^b	Interação
	Citronelal	Anfotericina B	Citronelal	Anfotericina B		
ICB-12	500	0,004	1	0,125	1,125	Indiferente
ATCC 76615	1000	0,125	2	1	3	Indiferente

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF; Fonte: Autores, 2018.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) depois da combinação do citronelal com o cetoconazol sobre cepa de *C. albicans* ICB-12 e ATCC 76615.

Cepa	CIM das drogas associadas (µg/mL)		CIF ^a		ICIF ^b	Interação
	Citronelal	Cetoconazol	Citronelal	Cetoconazol		
ICB-12	500	8	1	0,125	1,125	Indiferente
ATCC 76615	62,5	4	0,125	0,5	0,625	Aditivo

^aConcentração Inibitória Fracionada; ^bÍndice CIF; Fonte: Autores, 2018.