

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

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

Actividad anti-Candida tropicalis de los enantiómeros (R)-(+)- & (S)-(-)-citronelal en combinación con nistatina

Cássio Ilan Soares **MEDEIROS**¹
Heloísa Mara Batista Fernandes de **OLIVEIRA**²
Janiere Pereira de **SOUSA**¹
Abrahão Alves de **OLIVEIRA FILHO**³
Edeltrudes de Oliveira **LIMA**¹

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-085 João Pessoa, Paraíba, Brasil

²Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59200-000 Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brasil

³Universidade Federal de Campina Grande, 58429-140 Patos, Paraíba, Brasil

Resumo

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção ginecológica desafiadora com as quais muitas mulheres e médicos lutam. O agente etiológico é principalmente a *C. albicans*. No entanto, outras espécies não-*albicans*, sobretudo a *C. tropicalis* pode estar envolvida. O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal e os efeitos da combinação destes com a nistatina contra cepas de *C. tropicalis*. Portanto, foram aplicados protocolos experimentais para avaliar de maneira qualitativa e quantitativa a capacidade fungicida dos enantiômeros, como a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) em meio líquido RPMI-1640. Além disso, os ensaios de associação dos fitoconstituintes com a nistatina foram realizados através da técnica de difusão em meio sólido, agar sabouraud dextrose (ASD). Os compostos (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal mostraram-se fungicida frente às cepas testadas, tendo em vista que ambas as moléculas apresentaram a relação CFM₅₀/CIM₅₀ entre 1 e 2. Além de efeitos sinérgicos significativos com a nistatina, contra as cepas LM 255 e LM 665. Por tanto, esses fitoconstituintes podem ser promissores protótipos farmacológicos antifúngicos no futuro.

Descritores: Candidíase Vulvovaginal; Antifúngicos; *Candida tropicalis*; Nistatina.

Abstract

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a challenging gynecological infection with which many women and doctors struggle. The etiological agent is mainly *C. albicans*. However, other non-*albicans* species, especially *C. tropicalis*, may be involved. The objective of this study was to investigate the antifungal activity of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellal enantiomers and the effects of the combination of these with nystatin against *C. tropicalis* strains. Therefore, experimental protocols were applied to qualitatively and quantitatively evaluate the fungicidal capacity of enantiomers, such as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) in RPMI-1640 liquid medium. In addition, assays of association of phytochemicals with nystatin were carried out using the solid medium diffusion technique, Sabouraud dextrose agar (ASD). The compounds (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellal showed fungicide against the strains tested, considering that both molecules presented the ratio MFC₅₀/MIC₅₀ between 1 and 2. In addition to effects significant synergistic effects with nystatin against LM 255 and LM 665 strains. Therefore, these phytochemicals may be promising antifungal pharmacological prototypes in the future.

Descriptors: Vulvovaginal Candidiasis; Antifungals; *Candida tropicalis*; Nystatin.

Resumen

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección ginecológica desafiante con la que muchas mujeres y médicos luchan. El agente etiológico es principalmente la *C. albicans*. Sin embargo, otras especies no *albicans*, sobre todo la *C. tropicalis* puede estar involucrada. El objetivo de este estudio fue investigar la actividad antifúngica de los enantiómeros (R)-(+)- y (S)-(-)-citronelal y los efectos de la combinación de éstos con la nistatina contra cepas de *C. tropicalis*. Por lo tanto, se aplicaron protocolos experimentales para evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la capacidad fungicida de los enantiómeros, como la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM) en medio líquido RPMI-1640. Además, los ensayos de asociación de los fitoconstituyentes con la nistatina se realizaron a través de la técnica de difusión en medio sólido, agar sabouraud dextrosa (ASD). Los compuestos (R)-(+)- y (S)-(-)-citronelal se mostraron fungicida frente a las cepas probadas, teniendo en cuenta que ambas moléculas presentaron la relación CFM₅₀/CIM₅₀ entre 1 y 2. Además de efectos sinérgicos significativos con la nistatina, contra las cepas LM 255 y LM 665. Por lo tanto, estos fitoconstituyentes pueden ser prometedores prototipos farmacológicos antifúngicos en el futuro.

Descriptores: Candidiasis vulvovaginal; Antifúngicos; *Candida tropicalis*; Nistatina.

INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção ginecológica desafiadora com as quais muitas mulheres e médicos lutam. Ambos difíceis de conviver e difíceis de tratar, a condição é sub-pesquisada e, portanto, o tratamento é muitas vezes inconsistente com o que existe de evidência¹.

A CVV é uma infecção fúngica comum acometendo até 75% das mulheres durante a vida²⁻⁴. A CVV recorrente é mais rara, afetando entre 5-8% das mulheres em idade reprodutiva^{3,4}, mas podem afetar muito a qualidade de vida das mulheres, causando sintomas como pruridos, dor vulvovaginal, dispareunia, disúria e o clássico corrimento vaginal. É mais comumente causada por *Candida albicans*,

mas outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, embora mais raras, são mais comumente associadas à recorrência^{5,6}. Na verdade, *Candida* é um micro-organismo comensal encontrado em 10-20% das mulheres⁷.

A forma de tratamento mais amplamente utilizada envolve uma intensa terapia com antifúngicos, seguida de um longo período de terapia de manutenção. Apesar de ser o tratamento padrão, existem muitas variações, muitos agentes terapêuticos e durações diferentes; no entanto, nenhum deles é particularmente eficaz^{8,9}. Por tanto, pesquisas com produtos naturais são importantes, com destaque aos metabólitos secundários das plantas como o

citronelal e seus enantiômeros pertencentes ao grupo dos monoterpenos. Estes são importantes componentes dos óleos essenciais de plantas dos gêneros *Cymbopogon*, *Eucalyptus*, *Melissa*, *Mentha*, *Allium* e *Cinnamomum* que apresentam vasta atividade biológica^{10,11}.

Como a monoterapia tem apresentado falhas nos esquemas de tratamentos dessas infecções, o desenvolvimento da terapia de combinação, que visa evitar os efeitos colaterais associados a doses elevadas, bem como o uso prolongado dos medicamentos tem sido investigada¹². Por tanto, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade anti-*C. tropicalis* dos enantiômeros (*R*)-(+)- e (*S*)-(-)-citronelal em associação com nistatina.

MATERIAL E MÉTODO

o Fitoconstituintes e Substâncias

As seguintes substâncias utilizadas neste trabalho foram obtidas comercialmente: (*R*)-(+)-citronelal e (*S*)-(-)-citronelal [(3*R*)-3,7-dimethyloct-6-enal e (3*S*)-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^{13,14}.

o 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.

o Inóculo

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 inóculo 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)^{15,16}.

o Determinações da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da atividade antifúngica para a determinação da CIM foi realizada pela técnica de diluição em microplacas 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. Foram 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 representa uma cepa. Em paralelo, os controles foram feitos para a viabilidade dos

micro-organismos e para susceptibilidade com o antifúngico padrão anfotericina B (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^{17,18}.

A atividade antifúngica dos enantiômeros foi interpretada (considerado ativo ou não) de acordo com os critérios propostos por Morales et al.¹⁹, 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.

o Antifungigrama e ensaios de associação in vitro

O antifungigrama foi realizado com o antifúngico nistatina (100UI) 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 nistatina (100UI) 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 seladas e 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^{20,21}.

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

RESULTADOS

A CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima para 50% das cepas testadas) foi de 16 e 64µg/mL para ambos os enantiômeros (*R*)-(+)- e (*S*)-(-)-citronelal respectivamente. No entanto, a CFM₅₀ (Concentração Fungicida Mínima para 50% das cepas fúngicas) para ambos os enantiômeros (*R*)-(+)- e (*S*)-(-)-citronelal respectivamente, foi de 32 e 64µg/mL.

Os achados do antifungigrama e do estudo de associação *in vitro*, mostrou sensibilidade das três cepas a nistatina isoladamente, bem como nas associações com os fitoconstituintes. No entanto, as interferências dos enantiômeros na efetividade da nistatina variaram. Tendo efeito sinérgico apenas do (*S*)-(-)-CT + NY sobre a cepa LM 665 e do (*R*)-(+)-CT + NY contra a cepa LM 255 (Tabela 1).

Tabela 1. Médias das zonas de inibição (em mm) da nistatina e da associação com os enantiômeros (*R*)-(+)- e (*S*)-(-)-CT contra *C. tropicalis*

Tratamentos/ Cepas fúngicas	LM 665	LM 255	ATCC 13803	Classificação
Nistatina (100UI)	20↓	20↓	28↓	>10 (S) ≤10 (R)
CIM _(R) + Nistatina	20↓	26↑	16↓	--
CIM _(S) + Nistatina	22↑	20↓	16↓	--
Controle de leveduras	+	+	+	--

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigada a atividade antifúngica *in vitro* dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal contra três cepas de *C. tropicalis*. Diante disto, constatou-se que ambos os fitoconstituintes apresentam excelente poder antifúngico com maior destaque para o enantiômero R que apresentou uma CIM₅₀ de 16µg/mL. No entanto, o S citronelal teve CIM₅₀ de 64µg/mL. Esses resultados corroborados com os estudos realizados por Morales et al.²² mostra que os compostos de origem vegetal para possuir forte/boa atividade antifúngica, precisão que suas CIMs estejam pelo menos compreendidas entre 50-500µg/mL. Além disso, este aspecto de atividade antifúngica de produtos derivados de plantas já foi observado em outros estudos com atividades antibacterianas e antiparasitárias^{23,24}.

A terapia antifúngica para infecções por *Candida* é desafiadora, pois o tratamento em se é difícil devido à natureza eucariótica das células desses micro-organismos, que são semelhantes às células hospedeiras²⁵. Além disso, há poucos antifúngicos disponíveis para tratar infecções causadas por esses fungos. A classe dos antifúngicos azólicos é amplamente utilizada, infelizmente são geralmente fungistáticos, em vez de fungicida, e seu uso prolongado contribui para o desenvolvimento de cepas resistentes^{26,27}. A nistatina, mesmo em sua formulação convencional, produz efeitos tóxicos que limitam seu uso parenteral, restringindo-se a aplicações superficiais²⁸. Desta forma, pesquisas com produtos naturais derivados de plantas com efeitos fungicidas podem ser alternativas promissoras. Diante dos resultados das CFMs mostrados anteriormente, pode-se observar o efeito fungicida de ambas as moléculas em estudo, pois de acordo com Hafidh et al.²⁹ o efeito fungicida de um produto natural é observado quando a razão entre CFM/CIM está entre 1 e 2.

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 da nistatina isoladamente e da combinação deste com os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal. Nenhuma das três cepas testadas mostrou-se resistente a nistatina. No entanto, a associação do enantiômero R com a nistatina, mostrou resultado compatível com efeito sinérgico para a cepa LM 255. A combinação da nistatina com o enantiômero S também se mostrou sinérgica para a cepa LM 665, tendo em vista que houve aumento significativo do tamanho da zona de inibição (≥ 2 mm) em relação ao antifúngico isoladamente^{30,31}.

CONCLUSÃO

Este estudo mostra os efeitos fungicidas dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal. São promissoras protótipos farmacológicos a serem introduzidos à terapêutica anti-*Candida* isoladamente. No entanto, estudos mais profundos são necessários para avaliar os possíveis efeitos decorrentes da combinação destes fitoconstituintes com a nistatina, que apresentou efeitos sinérgicos em apenas duas cepas. O esclarecimento exato dos mecanismos de ação desses compostos também é necessário, bem como estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Watson C, Pirotta M. Recurrent vulvovaginal candidiasis: current management. Aust Fam Physician. 2011; 40(3):149-51.
2. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol. 1998; 178(2):203-11.
3. Foxman B, Marsh JV, Gillespie B, Sobel JD. Frequency and response to vaginal symptoms among white and African American women: results of a random digit dialing survey. J Womens Health. 1998; 7(9):1167-74.
4. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007; 369(9577): 1961-71.
5. Horowitz BJ. Mycotic vulvovaginitis: a broad overview. Am J Obstet Gynecol. 1991; 165(4 Pt 2):1188-92.
6. Monga A, Dobb S. Gynaecology. 19. ed. London: Hodder Arnold; 2011.
7. Lindner JG, Plantema FH, Hoogkamp-Korstanje JA. Quantitative studies of the vaginal flora of healthy women and of obstetric and gynaecological patients. J Med Microbiol. 1978; 11(3):233-41.
8. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis: a prospective study of the efficacy of maintenance ketoconazole therapy. N Engl J Med. 1986; 315(23):1455-8.
9. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ et al. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis. 2004; 38(2):161-89.
10. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini A, Berti L, Pagès JM, Amaral L et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram Negative species. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(5):2209-11.
11. Avoseh O, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji A. Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. Molecules. 2015; 20(5):7438-53.
12. Wagner H. Multitarget-therapy, the future of treatment for more than just functional dyspepsia. Phytomedicine. 2006; 13(1): 122-9.
13. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(1):108-13.
14. Pereira Fde O, Mendes JM, Lima IO, Mota KSL, Oliveira WA, Lima Ede O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. Pharm Biol. 2014; 53(1):1-7.
15. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. 3.ed. CLSI-document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.
16. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacog. 2008; 18(1):301-7.
17. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural

- products: methodologies, comparability of results and assay coices. *Phytochem Analysis*. 2000; 11(1):137-47.
18. Nattinal committee for clinical laboratory standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Villanova 2002; 17:M27-A2.
 19. Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*. 2008; 13(1):790-4.
 20. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(1):854-69.
 21. Oliveira RAG, Lima EO, Viera WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(1):77-82.
 22. Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*. 2008; 13(4):790-4.
 23. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 2001; 18(13):1181-90.
 24. Pereira Carneiro JN, Albuquerque RS, Figueiredo LN, Targino MAJ, Vieira de Brito DI, Rolón M et al. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Cad Cult Ciênc*. 2015; 13(2):29-36.
 25. Alczuk SDES, Bonfim-Mendonça PDES, Rocha-Brischiliari SC, Shinobu-Mesquita CS, Martins HP, Gimenes F et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on vaginal candida spp. isolation in hiv-infected compared to hiv-uninfected women. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57(2):169-74.
 26. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA et al. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res Microbiol*. 2010; 161(10):816-23.
 27. Keniya MV, Fleischer E, Klinger R, Cannon RD, Monk BC. Inhibitors of the *Candida albicans* major facilitator superfamily transporter Mdr1p responsible for fluconazole resistance. *PLoS One*. 2015; 10(5):1-16.
 28. Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(6):353-62.
 29. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Abu Bakar F, Jahanshiri F, Sekawi Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*. 2011; 5:96-106.
 30. Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(1):1289-96.
 31. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. 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*. 2008; 62(5):1031-6.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Cássio Ilan Soares Medeiros
cassioism@hotmail.com

Submetido em 22/10/2017

Aceito em 07/12/2017