

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL EM LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* OBTIDAS DE AMBIENTE HOSPITALAR

Tatiane Moraes Ferreira¹, Fernando S. Silva², Milton Beltrame³, Sônia Khouri⁴

¹Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, tati.bio@ig.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, f2sb@hotmail.com.br

³Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Laboratório de Síntese Orgânica, beltrame@univap.br

⁴Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, soniak@univap.br

Resumo: O aumento considerável de infecções por *Candida* de origem hospitalar resistentes aos antifúngicos tem levado a estudos de novos fármacos. O citral vem sendo utilizado em pesquisas para verificar a ação antimicrobiana em fungos filamentosos. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica do citral contra leveduras do gênero *Candida*. Os testes foram realizados frente a 34 amostras de *Candida albicans* e 17 de *Candida tropicalis* coletadas de um Hospital Público Universitário. O método utilizado foi difusão em ágar Sabouraud (cavidade/placa) e incubados a 37 °C por 48 horas. O citral foi testado nas seguintes concentrações: 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60%. De acordo com os testes, foi constatado atividade antifúngica do citral em 100% das leveduras selecionadas. Das amostras estudadas, 76,5% cepas de *C. albicans* e 29,4% cepas de *C. tropicalis* foram sensíveis na concentração de 10%, formando halos de inibição, variando entre 8 a 11 mm de diâmetro. A partir destes resultados, sugere-se novos estudos do citral, já que mostrou ter atividade antifúngica contra *Candida* podendo, então, ser utilizado como componente na produção de um novo antifúngico.

Palavras-chave: citral, *Candida* spp, fungos e infecção hospitalar

Área do Conhecimento: IV - Ciências da Saúde

Introdução

Nos últimos 20 anos, têm-se observado um aumento de infecções invasivas ocasionadas por fungos. Desde a década de 90, têm-se constatado que a grande maioria das micoses tem como patógeno espécies do gênero *Candida*, que por sua vez mostram-se cada vez menos sensíveis e resistentes aos antifúngicos disponíveis [1]. Segundo Frost, Csóka e Stern, em 1996, o aumento das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* deve-se ao crescente uso de antibióticos de amplo espectro, drogas antifúngicas, agentes imunossupressores, e recentemente com a epidemia da AIDS [2].

C. albicans é a espécie mais freqüentemente isolada e considerada principal espécie envolvida na etiologia das infecções invasivas e superficiais [3, 4 e 5]. Entretanto, estudos têm mostrado uma crescente participação de espécies não-*albicans* nas infecções hospitalares em vários países [4].

Recentemente, Antunes et al. (2004) em um estudo realizado na Santa Casa Complexo Hospitalar, Brasil, mostraram que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 51,6% dos episódios de candidemia da Instituição, sendo *C. parapsilosis* responsável por 25,8% dos casos, seguida por *C. tropicalis* 13,3%, *C. glabrata* 3,3%, *C. Krusei* 1,7% e outras espécies 7,5% [6].

Desta forma, em consideração ao aumento das infecções hospitalares por leveduras do gênero *Candida*, muitos trabalhos vêm sendo realizados com óleos obtidos de diversas espécies vegetais, os quais têm sido aplicados em microrganismos como fungos e bactérias [7, 8 e 9]. Entre as plantas utilizadas destaca-se *Cymbopogon citratus*, o qual o óleo essencial tem mostrado ser ativo contra leveduras do gênero *Candida* [7]. Tal atividade segundo Onawunmi (1984) deve-se ao citral, componente majoritário do óleo [10].

Citral é o nome dado a mistura natural de dois isômeros acíclicos monoterpreno aldeído: geranial (*trans*-citral, citral A) e neral (*cis*-citral, citral B) [11 e 12]. Pode ser encontrado naturalmente em folhas e frutas de várias espécies de plantas, incluindo limão, laranja, tomate e capim-limão [13, 14 e 15]. Por apresentar sabor e odor característico de limão, o citral é usado como condimento em alimentos, por exemplo, em goma de mascar, sorvetes e bebidas; e fragrância em cosméticos – sabonetes, detergentes, cremes, loções e perfumes [14 e 16]. Em adição o citral é usado como matéria prima na síntese de vitamina A, ionona e metil-ionona [17]. O componente citral possui, também, propriedades bactericida [18] e inseticida [19].

Além das aplicabilidades citadas, o citral vem sendo utilizado em pesquisas, no intuito de

verificar a ação antimicrobiana em fungos filamentosos [20]. Entretanto, são poucos os trabalhos realizados com leveduras. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do composto citral, frente a leveduras do gênero *Candida* obtidas de ambiente hospitalar.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba.

O composto citral (sintético) denominado: 3,7 Dimetil - 2,6 - octadienal (mistura da forma *cis* e *trans* à 95%) utilizado para os testes antifúngicos, foi obtido pela Empresa ACROS.

Para os testes microbiológicos foram estudadas 34 amostras de *Candida albicans* e 17 amostras de *Candida tropicalis*, isoladas de diversos materiais clínicos de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar (tempo de internação superior a 72 horas). A coleta foi realizada no Hospital Universitário de Taubaté (HUT), entre fevereiro de 2002 a fevereiro de 2003, com a aprovação da Comissão de Ética do HUT. Os dados dos pacientes estão arquivados no laboratório de Microbiologia e no serviço da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HUT.

Em placas de antibiograma estéreis, foi colocado 1 ml da suspensão do microrganismo, preparada em solução fisiológica a 0,9% e padronizada pelo tubo 0,5 da escala de MacFarland. Posteriormente, foi adicionado 70 ml de ágar Sabouraud dextrose – Difco Laboratórios Ltda. e homogeneizado pela técnica de Pourplate. As placas permaneceram mantidas em temperatura ambiente, até sua solidificação, e posteriormente foi realizado cavidades com canudos de plástico estéreis.

Para a preparação do citral foi utilizado epindorfes estéreis e óleo vegetal de amêndoa para sua diluição. As concentrações utilizadas foram: 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60%. Como controle positivo foi utilizado Nitrato de Miconazol a 100%.

Em cada cavidade foi aplicado, 20 µl de cada concentração do citral diluído, e na cavidade central foi aplicado o controle Nitrato de Miconazol. Após aplicado todas as concentrações, as placas foram mantidas à temperatura ambiente até a total pré-difusão. Posteriormente, foram colocadas em estufa a 37°C na qual foram mantidas por 48 horas.

Dado o período de incubação, foi feita a leitura das placas através dos halos de inibição formados. Para isto, foi medido, em milímetros, o diâmetro de cada um dos halos.

Resultados

Os resultados obtidos nos testes para avaliar a atividade antifúngica do composto citral contra as leveduras de *C. tropicalis* e *C. albicans* encontram-se registrados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

De acordo com os testes, foi constatado atividade antifúngica do citral em 100% das leveduras selecionadas. Das amostras estudadas, 76,5% das cepas de *C. albicans* e 29,4% das cepas de *C. tropicalis* foram sensíveis na concentração de 10%, formando halos de inibição variando, entre 8 a 11 mm de diâmetro. Conforme mostra a Tabela 2 na concentração de 15%, o citral inibiu o crescimento de 100% das amostras de *C. albicans*, com halos de inibição entre 10 a 15 mm de diâmetro. Já para *C. tropicalis* apenas a cepa 62 não apresentou sensibilidade na mesma concentração (Tabela 1).

Tabela 1 - Ação antifúngica (em mm) do citral contra cepas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes espécimes clínicos de pacientes internados no HUT - SP, 2002.

Cepa	Concentrações em % - (20µl)						
	10	15	25	35	50	60	NM
05	0	12	15	17	18	19	34
06	10	12	16	26	30	30	34
09	10	11	15	19	25	27	43
33	0	8	13	17	19	20	35
37	8	13	16	17	18	20	33
57	0	9	14	15	17	20	35
58	10	11	14	18	22	25	35
62	0	0	17	20	23	25	38
66	0	10	15	16	17	18	30
67	0	10	15	17	20	21	30
71	0	9	15	16	17	20	31
81	9	9	13	16	18	21	40
82	0	8	12	14	15	16	29
83	0	10	13	15	16	17	28
95	0	0	13	15	16	16	31
97	0	10	14	15	16	19	32
101	0	9	13	16	17	19	36

NM (Nitato de Miconazol)

Tabela 2 - Ação antifúngica (em mm) do citral contra cepas de *C. albicans* isoladas de diferentes espécimes clínicos de pacientes internados no HUT - SP, 2002.

Cepa	Concentrações em % - (20µl)						
------	-----------------------------	--	--	--	--	--	--

	10	15	25	35	50	60	NM
01	11	12	19	≥	≥	≥	40
03	11	14	18	24	33	34	52
08	0	10	14	15	17	18	28
11	11	14	20	27	30	30	49
12	10	12	17	23	30	32	48
13	9	11	17	25	27	29	47
14	9	13	20	23	27	27	47
15	10	14	18	25	26	26	47
20	11	13	16	18	20	22	40
23	9	14	20	23	24	26	52
24	9	14	18	24	27	34	43
25	8	13	20	26	26	26	47
30	0	11	14	17	19	21	31
31	9	11	16	19	22	24	47
34	0	11	13	15	19	19	44
35	8	10	15	16	17	20	40
55	9	11	16	17	19	21	51
56	11	13	20	22	24	26	47
60	11	12	17	21	30	34	37
61	9	11	16	20	24	26	40
64	0	10	15	18	24	26	40
65	9	11	14	19	24	29	34
69	0	12	15	19	21	22	36
70	0	12	16	22	22	23	35
72	10	13	16	18	21	25	35
73	10	12	15	19	20	22	40
74	0	12	16	22	23	23	40
78	9	13	17	20	20	21	40
85	9	11	16	18	20	22	50
86	0	15	17	24	26	28	40
87	8	10	16	20	23	26	43
91	10	14	15	18	20	24	40
94	10	12	15	19	24	28	43
104	10	13	16	20	22	25	37

NM (Nitato de Miconazol); ≥ (valor maior ou igual ao controle)

Discussão

Cada vez mais têm-se realizado pesquisas relacionadas aos microrganismos considerados de alta patogenicidade e resistência, como os fungos leveduriformes, filamentosos e as bactérias associadas com as infecções oportunistas, principalmente àquelas responsáveis por infecção hospitalar [7]. Assim, o aumento considerável de infecções por leveduras do gênero *Candida*, de origem hospitalar, resistentes aos antifúngicos, tem levado os pesquisadores a estudos de novos fármacos, sejam de origem natural ou sintético, com intuito de obter novos princípios ativos, para uma possível aplicação clínica.

Trabalhos realizados com óleo vegetal de *C. citratus* contra *Candida* têm sugerido ser o citral o responsável pela atividade antifúngica [18]. Embora a avaliação da atividade antimicrobiana do composto citral não ter sido muito estudada,

alguns autores têm mostrado bons resultados da ação antifúngica do referido composto contra espécies de fungos filamentosos [20] e espécies bacterianas [8 e 18].

Em nosso trabalho, a ação antifúngica do citral frente as leveduras de *Candida*, obtidas de ambiente hospitalar, apresentou excelentes resultados, já que todas as cepas foram sensíveis. Na concentração de 60% formaram halos de inibição com diâmetros de 34 mm, valores relativamente próximos ao antifúngico utilizado como controle. Além disso uma cepa (nº 01) de *C. albicans* mostrou halos de inibição superior ao do controle (Tabela 2).

Não houve resistência em nenhuma das cepas selecionadas, porém os diâmetros dos halos de inibição formados nas amostras de *C. tropicalis* foram relativamente menores quando comparadas com as amostras de *C. albicans*.

Estudo realizado por Onawunmi (1989), demonstrou bons resultados da atividade antifúngica do citral contra distintas espécies de fungos: *C. albicans*, *C. pseudotropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporun gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* [10]. Colaborando com estes resultados, Schuck et al., em 2001, ao testar o citral contra levedura de *C. albicans*, obtiveram resultados semelhantes aos nossos, tendo halos de inibição com diâmetro superior ao antifúngico nistatina utilizado como controle [8].

São poucos os trabalhos relacionados com a avaliação da atividade antifúngica do citral contra leveduras do gênero *Candida*, registrados em literatura. Entretanto, pesquisas realizadas com fungos filamentosos como *Aspergillus flavus*, tem demonstrado que o citral age na estrutura da membrana e parede celular, no DNA e na mitocôndria do fungo [20].

Contudo, mesmo com a escassez de dados, nossos resultados estão de acordo com a literatura, portanto, acrescentando informações da atividade antifúngica do citral contra leveduras.

Conclusão

Os resultados obtidos comprovaram atividade antifúngica do composto citral contra leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. Entretanto, sugere-se novos estudos do citral, para que este composto possa ser utilizado, futuramente, como componente na produção de um novo antifúngico.

Referências

- [1] SILVA, V.; DIAZ, M.C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect.* v.19, p.149-156, 2002.

- [2] FROST, G.I.; CSÓKA, T.; STERN, R. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. **Trends Glycosci. Glycotechnol.** v.8, p.419-434, 1996.
- [3] COLOMBO, A.L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.34, p.281-286, 1999.
- [4] PFALLER, M.A. et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Clin. Microbiol.** v.39, n.9, p.3254-3259, 2001.
- [5] CROCCO, E.I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An bras Dermatol.** v.79, n.6, p.689-697, 2004.
- [6] ANTUNES A.G.V. et al. Candidemia in a brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.46, n.5, p.239-241, 2004.
- [7] LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. **R Bras Ci Saúde.** v.3, n.1/3, p.51-64, 1999.
- [8] SCHUCK, V.J.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev Bras Ciên Farm.** v.37, n.1, 2001.
- [9] CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology.** v.79, p.213-220, 2002.
- [10] ONAWUNMI, G.O. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. **J. Crude Drug Res.** v.27, n.2, p. 121-126, 1989.
- [11] FORMACEK, V.; KUBECZKA, K. Essential oil analysis by capillary chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. **New York: J. Wiley,** p.155-160, 1982.
- [12] WEISS, E.A. Essential oil crops: Wallingford, UK: **CAB International**, p.59-137, 1997.
- [13] FURIA, T.E.; BELLANCA, N. **Fenaroli Handbook of flavor ingredients.** 2ed. Cleveland: Chemical Rubber Company Press, 1975.
- [14] OPDYKE, D.L.J. Monographs on fragrance raw materials citral. **Food cosmet. Toxicol.** v.17, p.259-266, 1979.
- [15] LEWINSOHN, E. et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae. **Annals of Botany Company.** v.81, p.35-39, 1998.
- [16] COUNCIL OF EUROPE. **Natural flavouring substances, their sources, and added artificial flavouring substances.** Partial agreement in the social and public health field. List 1, n.109, p.147. Strasbourg, France, 1974.
- [17] BUDAVARI, S (Ed). **The merck index**, 11 ed. Rahway: Merck and company, 1989. p.362.
- [18] ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology.** v.12, p.279-286, 1984.
- [19] RICE, P.J.; COATS J.R. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and souther corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology.** v.87, p.1172-1179.
- [20] LUO, M. et al. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica.** v.36, n.4, p.277-283, 2004.