

ASSOCIAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *CYMBOPOGON CITRATUS* FRENTE A LEVEDURAS DE ORIGEM HOSPITALAR

CAROLINA LAMBRECHT GONÇALVES¹; **CRISTINA HALLAL DE FREITAS²**;
PEDRO RASSIER DOS SANTOS²; **EVANDRO CARLOS PEREIRA³**;
ROGÉRIO ANTONIO FREITAG⁴; **PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE⁵**

¹*Laboratório de Micologia, Programa de Pós Graduação em Parasitologia - UFPel – carolina_lamg@yahoo.com.br*

²*Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia – Departamento de Microbiologia e Parasitologia / UFPel – cristinahallal@live.com; rassier1907@gmail.com*

³*Enfermeiro – evandropereiraenf@yahoo.com.br*

⁴*Departamento de Química Orgânica - rafreitag@gmail.com*

⁵*Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia – Departamento de Microbiologia e Parasitologia / UFPel – patsn@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares estão relacionadas com altos índices de morbidade e mortalidade em pacientes internados, tornando-as alvo de preocupações no Brasil e no mundo (CALIL et al., 2014). No ambiente hospitalar as infecções por fungos tornaram-se relevantes nos últimos anos, sendo responsáveis por surtos de infecções em pacientes imunossuprimidos (CAGGIANO et al., 2008).

Frente ao tratamento das infecções ocasionadas por leveduras encontram-se os derivados azólicos e o grupo das alilaminas, antifúngicos que atuam bloqueando a síntese do ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica por meio de diferentes vias (TAVARES, 2001; RICHARDSON; WARNOCK, 1993), entretanto, sua utilização contínua tem possibilitado o surgimento de cepas resistentes.

Como alternativa aos medicamentos convencionais, cresce o interesse por pesquisas envolvendo o uso de óleos essenciais, de forma isolada ou associada, como promoção de novas estratégias terapêuticas que acompanhem a evolução dos mecanismos de resistência adquiridos pelos micro-organismos nos últimos anos. Estudos, realizados no Brasil e no mundo, demonstram a sensibilidade de diferentes micro-organismos frente a *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido como capim-limão (ABE et al., 2003; BASSOLÉ; JULIANI, 2011).

Deste modo, o objetivo deste estudo foi de avaliar o efeito obtido a partir da interação do óleo essencial de *C. citratus* com antifúngicos comumente utilizados frente a leveduras isoladas de ambiente hospitalar.

2. METODOLOGIA

A espécie vegetal estudada foi adquirida por meio do distribuidor comercial (Luar Sul®). Para a obtenção do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus*, as folhas secas foram submetidas à extração com arraste de vapor através do aparelho Clevenger, de acordo com a FARMACOPEIA BRASILEIRA (2011).

Os micro-organismos utilizados são provenientes do ambiente hospitalar de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) situada no município de Pelotas, sendo as espécies de: *Candida tropicalis* (n=1), *Claviceps lusitaniae* (n=1), *Pichia guilliermondii* (n=3) e *Candida parapsilosis* (n=2).

As soluções com os antifúngicos Fluconazol (FLU) e Terbinafina (TER) foram preparadas de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2012), em concentrações que partiram de 64 ug/L e 8ug/mL, respectivamente, enquanto que, o OE teve sua concentração máxima estabelecida em 17.500 ug/mL. O teste de suscetibilidade, frente aos produtos acima citados, foi realizado utilizando-se a técnica de Microdiluição em Caldo estabelecida no documento M27-S4 (CLSI, 2012), de modo a obter a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada agente antifúngico.

As combinações de FLU+OE e TER+OE foram avaliadas empregando-se o método de *cherkerboard*. As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas, sendo a leitura realizada a partir da visualização do crescimento microbiano, representada pela turbidez observada nos cultivos, onde se estabeleceu a CIM da associação os compostos avaliados. Os testes foram realizados em duplicata.

As combinações foram interpretadas de acordo com o Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI), sendo classificadas como sinérgicas (FICI≤0,5), indiferentes (0,5 < FICI ≥ 4) ou antagonistas (FICI > 4), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{FICI} = (\text{CIM A na combinação/ CIM A isolado}) + (\text{CIM B na combinação/ CIM B isolado}).$$

Onde, CIM A e CIM B indicam a CIM de cada antifúngico e óleo essencial avaliado, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das CIMs dos agentes antifúngicos frente aos isolados hospitalares estão ilustrados na Tabela 1. Observou-se atividades efetivas em concentrações que variaram entre os isolados. *P. guilliermondii* apresentou maior resistência aos antifúngicos sintéticos ainda que apresentando a maior sensibilidade ao OE, com CIM de 1090 ug/mL. Entre as combinações antimicrobianas não foram observados efeitos antagônicos, com indiferença visualizada em 28,5%, com o FLU+OE, e 42,8% com a TER+OE e, ocorrência de sinergismo em 71,4% (FLU+OE) e 57,1% (TER+OE).

Tabela 1: Suscetibilidade de leveduras isoladas de ambiente hospitalar frente aos antifúngicos Fluconazol (FLU), Terbinafina (TER) e ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OE) avaliados de forma isolada ou associada (FLU+OE, TER+OE).

Micro-organismos	CIM ¹ Isolado (ug/mL)			FICI ²	Efeito	FICI	Efeito
	OE	FLU	TER				
<i>C. tropicalis</i>	2730	15,6	0,37	0,464	S ³	0,413	S
<i>C. parapsilosis</i>	6560	1,95	0,5	0,205	S	0,328	S

<i>C. parapsilosis</i>	4370	2,9	0,75	0,304	S	0,429	S
<i>C. lusitaniae</i>	8750	1,95	2	0,103	S	0,173	S
<i>P. guilliermondii</i>	1360	15,6	≥ 8	0,297	S	0,829	I
<i>P. guilliermondii</i>	1090	7,81	4	0,521	I ⁴	1,595	I
<i>P. guilliermondii</i>	1090	11,7	4	0,528	I	2,040	I

¹CIM: Concentração Inibitória Mínima; ²FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionária;

³S:Sinergismo; ⁴I: Indiferente.

Ainda que, com uma atividade antimicrobiana já descrita (ABE et al., 2003; KHAN et al., 2012), poucos são as pesquisas encontradas dedicadas a avaliar a interação do óleo essencial de *C. citratus* com agentes antimicrobianos, fato este, que justifica este estudo, porém, são comumente encontradas pesquisas que avaliam a esta interação com bactérias de interesse médico (ZAGO et al., 2009; BASSOLÉ; JULIANI, 2011 ; BETONI et al., 2006).

Os dados encontrados na literatura corroboram com os obtidos no presente estudo. KHAN et al. (2012) avaliou a resposta decorrente da interação do óleo de *C. citratus* com fluconazol obtendo-se um efeito sinérgico quando avaliado em isolados de *Candida albicans*, com FICI que variou de 0.156 a 0.375, observando-se indiferença na interação com anfotericina B. O óleo desta espécie também teve efeitos sinérgicos ao interagir com fluconazol frente a *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*, obtendo-se efeito indiferente (FICI de 0.562) e sinérgico (FICI de 0.312), respectivamente (KHAN; AHMAD, 2013).

A ocorrência de efeitos sinérgicos observada com o óleo essencial estudado pode estar associada ao seu mecanismo de ação, uma vez que, a interação entre drogas que atuem por meio de diferentes mecanismos e, em diferentes alvos, podem ter sua atividade elevada e auxiliar na minimização do fenômeno da resistência microbiana (CASANOVA; COSTA, 2017).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que a interação do óleo essencial de *C. citratus* com fluconazol e terbinafina proporciona efeitos sinérgicos e indiferentes em leveduras de origem hospitalar quando avaliada *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE,S.; SATO,Y.; INOUE,S.; ISHIBASHI,H.; MARUYAMA,N.; TAKIZAWA,T.; O SHIMA,H.; YAMAGUCHI,H. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.44, n.4, p.285-91, 2003.

BASSOLÉ,I.H.N.; LAMIEN-MEDA,A.; BAYALA,B.; OBAME,L.C.; ILBOUDO,A.J.; FRANZ,C.; NOVAK,J.; NEBIÉ,R.C.; DICKO,M.H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, v., 18, p. 1070–1074, 2011.

BETONI,J.E.C.; MANTOVANI,R.P.; BARBOSA;L.N.; DI STASI,L.C.; JUNIOR,A.F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011, 126 p.

CAGGIANO,G.; IATTA,R.; LANEVE,A.; MANCA,F.; MONTAGNA, MT. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v. 51, n.2, p. 123-28, 2008.

CALIL,K.; CAVALCANTI,G.S.; SILVINO,Z.R. Ações e/ou intervenções de enfermagem para prevenção de infecções hospitalares em pacientes gravemente enfermos: uma revisão integrativa. **Enfermagem Global**, v.13, n. 34, p. 406-424, 2014.

CASANOVA,L. M.; COSTA,S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.2, p. 575-595, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; 4th Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

KHAN,M.S.A.; AHMAD,I. *In vitro* antifungal activity of oil of *Cymbopogon citratus* and citral alone and in combination with fluconazole against azole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Pharmacognosy Communications**, v.3, n.3, p.29-34, 2013.

KHAN,M.S.A.; MALIK, A.; AHMAD,I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, p. 33–42, 2012.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal infection – Diagnosis and management**. London : Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.

TAVARES, W. **Azóis antifúngicos**. In. Tavares W, editor. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 869-86.

ZAGO,J.A.A.; USHIMARU,P.I.; BARBOSA,L.N.; JUNIOR, A.F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009 .