



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



ANA LUÍSA DE ARAÚJO LIMA

Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citronelal e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar

João Pessoa - PB

2018

ANA LUÍSA DE ARAÚJO LIMA

Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citronelal e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

João Pessoa- PB

2018

L732e Lima, Ana Luisa de Araújo.

Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de
cymbopogon winterianus Jowitt ex bor, citronelal e
geraniol sobre o gênero candida de origem hospitalar /
Ana Luisa de Araújo Lima. - João Pessoa, 2018.
142 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Coorientação: José Pinto de Siqueira Júnior.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Candidemia pediátrica. 3.
Atividade antifúngica. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira.
II. Siqueira Júnior, José Pinto de. III. Título.

UFPB/BC

ANA LUÍSA DE ARAÚJO LIMA

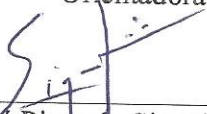
Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citrônella e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar

Tese de Doutorado aprovada em 23/04/2018

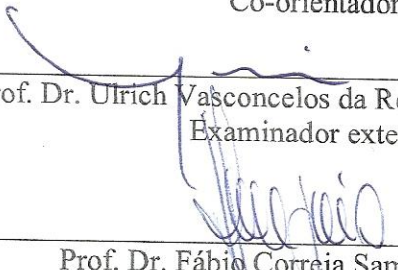
Banca examinadora


Prof.ª. Dr.ª. Edeltrudes de Oliveira Lima - UFPB

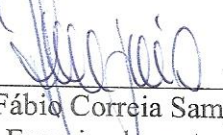
Orientadora


Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior - UFPB

Co-orientador


Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes – UFPB

Examinador externo


Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio – UFPB

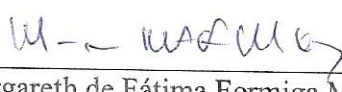
Examinador externo

Prof.ª. Dr.ª. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima – UFPB

Examinadora externa


Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes – UFPB

Examinador interno


Prof.ª. Dr.ª. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz – UFPB

Examinadora interna

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro – UFPB

Examinador interno

João Pessoa – PB

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por iluminar o meu espírito e guiar os meus caminhos levando-me sempre a águas tranquilas. Por sempre me amparar, não somente em todos os momentos desta jornada, mas desde o meu nascimento até os dias de hoje.

Aos meus pais, Jurandir e Rosário Lima, pelo amor incondicional; por serem meu porto seguro. **Ao meu esposo**, Diogo Pontes, pelo apoio, compreensão e amor. **Ao meu filho** que me proporciona a experiência de viver o maior e mais puro amor. **Aos meus irmãos**, Aline e Alcir Lima, e **aos meus familiares e amigos** por estarem presentes e se alegrarem com minhas pequenas vitórias.

À minha orientadora, professora Edeltrudes de Oliveira Lima. Agradeço por ter acreditado em mim e ter caminhado ao meu lado na construção deste trabalho, mostrando com clareza os passos a serem percorridos até a sua conclusão. **Ao meu co-orientador**, professor José Pinto de Siqueira Júnior pelo incentivo e apoio constantes neste projeto.

Às bancas examinadoras de qualificação e defesa de tese, bem como os suplentes, pelas significantes contribuições.

A todos os colegas de trabalho e companheiros de bancada do Laboratório de Micologia, especialmente: Abrahão Oliveira-Filho, Ana Luíza Perez, Janiere Sousa e Lilian Pinheiro pessoas incríveis que foram extremamente importantes para o desenvolvimento desta pesquisa.

À coordenação do Curso de **Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** e aos **professores** pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

À Universidade Federal da Paraíba, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades; **ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, **à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, **à Pró-Reitoria de Pós Graduação (PRPG)**, pelo apoio financeiro e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a consolidação deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

LIMA, A. L. A. **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citronelal e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar.** 142p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

Candidemia é uma preocupação na clínica pediátrica e a busca de novas drogas antifúngicas se apresenta como importante estratégia para melhorar o arsenal terapêutico contra esta infecção. O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (OECw), bem como seus fitoconstituintes majoritários citronelal e geraniol possuem propriedades farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana. Assim, os objetivos desse estudo foram identificar e estabelecer a frequência de espécies de *Candida* isoladas de candidemia de pacientes internados em um hospital público pediátrico de João Pessoa, Brasil; analisar a susceptibilidade antifúngica das cepas e estudar a atividade antifúngica do OECw, citronelal e geraniol contra esses micro-organismos. A identificação foi realizada usando os sistemas de CHROMagar e VITEK[®]2. O teste de susceptibilidade antifúngica foi determinado pelo sistema automatizado VITEK[®]2; a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas pela técnica de microdiluição; o possível mecanismo de ação dos produtos sobre a parede (0,8 M sorbitol) e membrana celular fúngica (ligação dos produtos ao ergosterol). A frequência de isolamento de *Candida albicans* foi de 60% e 40% de não-*albicans*, sendo 13% para *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa*. Todos os isolados foram sensíveis ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B, flucitosina, micafugina e caspofugina, com CIM variando entre 1-4, 0,12-2, 0,5-1, 1-1, 0,06-0,5 e 0,25-1 µg/mL, respectivamente. Apenas uma cepa de *C. albicans* foi intermediária ao fluconazol e voriconazol (CIM de 4 µg/mL). Para cepas de *C. albicans*, o valor de CIM₅₀ do OECw, citronelal e geraniol foi, respectivamente, de 64, 64 e 32 µg/mL. Já o valor de CFM₉₀ do OECw, citronelal e geraniol foi, na sequência 256, 128 e 64 µg/mL. Para espécies de *Candida* não-*albicans*, o valor de CIM₅₀ do OECw, citronelal e geraniol foi, consequentemente 128, 128 e 32 µg/mL. Já o valor de CFM₅₀ do OECw, citronelal e geraniol foi, respectivamente, de 128, 128 e 64 µg/mL. Envolvimento com a parede celular e ligação ao ergosterol foram excluídos como possíveis mecanismos dos produtos. Diante disso, conclui-se que *Candida albicans* foi a espécie predominante e as cepas não foram resistentes aos principais agentes antifúngicos. Este estudo é o primeiro a expor dados epidemiológicos sobre candidemia na população pediátrica em João Pessoa, Paraíba, Brasil. Além disso, o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra isolados de *Candida* spp., e, consequentemente, podem ser considerados como potenciais produtos antifúngicos.

Palavras chaves: Candidemia pediátrica, atividade antifúngica, *Cymbopogon winterianus*, óleos essenciais e Paraíba.

ABSTRACT

LIMA, A. L. A. **Study of the antifungal activity of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citronellal and geraniol on the genus *Candida* of hospital origin.** 142p. Thesis (Doctorate in Bioactive Synthetic and Natural Products - Concentration Area: Pharmacology) - Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

Candidemia is a concern in the pediatric clinic and the search for new antifungal drugs presents itself as an important strategy to improve the therapeutic arsenal against this infection. The essential oil of *Cymbopogon winterianus* (OECw), as well as its major citronellal and geraniol phytochemicals have pharmacological properties, including antimicrobial activity. Thus, the objectives of this study were identify and establish the frequency of *Candida* species isolated from candidemia of patients admitted to a pediatric public hospital in Joao Pessoa, Brazil; analyze the antifungal susceptibility of the strains and to study the antifungal activity of OECw, citronellal and geraniol against these microorganisms. Identification was performed using the CHROMagar and VITEK[®]2 systems. The antifungal susceptibility test was determined using the VITEK[®]2 automated system; minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) were determined by the microdilution technique; the possible mechanism of action of the products on the wall (0.8 M sorbitol) and fungal cell membrane (binding of the products to ergosterol). The isolation frequency of *Candida albicans* was 60% and 40% of non-*albicans*, with 13% for *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa*. All isolates were sensitive to fluconazole, voriconazole, amphotericin B, flucytosine, micafugin and caspofugin, with MICs ranging from 1-4, 0.12-2, 0.5-1, 1-1.0, 0.06-0.5 and 0.25-1 µg/mL, respectively. Only one *C. albicans* strain was intermediate to fluconazole and voriconazole (MIC 4 µg/mL). For *C. albicans* strains, the MIC₅₀ value of OECw, citronellal and geraniol was, respectively, 64, 64 and 32 µg/mL. The CFM₉₀ value of OECw, citronellal and geraniol was, in the sequence, 256, 128 and 64 µg/mL. For *Candida* non-*albicans* isolates, the MIC₅₀ value of OECw, citronellal and geraniol was therefore 128, 128 and µg/mL. The MFC₅₀ value of OECw, citronellal and geraniol was, respectively, 128, 128 and 64 µg/mL. Involvement with the cell wall and binding to ergosterol were excluded as possible mechanisms of the products. Therefore, it is concluded that *Candida albicans* was the predominant species and that the strains were not resistant to the main antifungal agents. This study is the first to present epidemiological data on candidemia in the pediatric population in João Pessoa, Paraíba, Brazil. In addition, the essential oil of *Cymbopogon winterianus*, citronellal and geraniol showed antifungal activity *in vitro* against *Candida* spp. isolates, and consequently can be considered as potential antifungal products.

Key-words: Pediatric candidemia, antifungal activity, *Cymbopogon winterianus*, essential oils and Paraíba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras.	20
Figura 2: Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i> .	21
Figura 3: Resposta imunológica na colonização.	25
Figura 4: Resposta imunológica na invasão.	26
Figura 5: Invasão tecidual de <i>Candida albicans</i> .	31
Figura 6: Alvos primários e modo de ação de vários agentes antifúngicos.	33
Figura 7: <i>Cymbopogon winterianus</i> .	40
Figura 8: Estruturas químicas do citronelal e geraniol.	42
Figura 9: Resumo esquemático da identificação e teste de susceptibilidade antifúngica utilizadas no estudo.	47
Figura 10: Técnica do esgotamento.	49
Figura 11: Resumo esquemático das metodologias utilizadas na investigação do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> , citronelal e geraniol.	52

Candidemia in pediatric hospital in the city of João Pessoa, Brazil: Identification, prevalence and antifungal susceptibility

Fig. 1. Identification of <i>Candida</i> isolates from candidemias in pediatric patients by CHROMagar <i>Candida</i> .	63
--	----

LISTA DE TABELAS

Candidemia in pediatric hospital in the city of João Pessoa, Brazil: Identification, prevalence and antifungal susceptibility

Table 1: Identification of <i>Candida</i> isolates from candidemias in pediatric patients by VITEK®2 automated system.	64
Table 2: <i>Candida</i> species prevalence rates.	65
Table 3: Antifungal susceptibility profile of isolates of <i>Candida</i> spp. of candidemias in pediatric patients by VITEK®2 automated system.	66

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) sobre isolados de *Candida albicans* de importância clínica pediátrica

Tabela 1: CIM, CFM, CFM:CIM, efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> , CIM da anfotericina B e fluconazol em cepas de <i>Candida albicans</i> .	77
Tabela 2: Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> contra <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.	77
Tabela 3: Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> contra <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL.	78

Antifungal Activity of Citronellal on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance

Table 1: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the citronellal, MIC of amphotericin B and fluconazole in <i>Candida albicans</i> strains.	91
Table 2: Effect of citronellal against <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of 0.8M sorbitol.	93
Table 3: Effect of geraniol and amphotericin B against <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of ergosterol 400 µg/mL.	93

Antifungal Activity of Geraniol on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance

Table 1: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the geraniol, MIC of amphotericin B and fluconazole in <i>Candida albicans</i> strains.	103
Table 2: Effect of geraniol against <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of 0.8M sorbitol.	104
Table 3: Effect of geraniol and amphotericin B against <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of ergosterol 400 µg/ml.	104

Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* essential oil, citronellal and geraniol on *Candida non-albicans* isolated of pediatric clinical importance

Table 1: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the essential oil of <i>Cymbopogon winterianus</i> and the MIC of amphotericin B and fluconazole in <i>Candida non albicans</i> strains.	114
Table 2: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the citronellal and the MIC of amphotericin B and fluconazole in <i>Candida non albicans</i> strains.	115
Table 3: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the geraniol and the MIC of amphotericin B and fluconazole in <i>Candida non albicans</i> strains.	116

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

ASD - Ágar Sabouraud dextrose

ATCC - *American Type Culture Collection*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FDA - *Food and Drug Administration*

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

Hsp90 - Proteína de choque térmico de chaperona molecular 90

ICS – Infecção de corrente sanguínea

IL- Interleucina

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MDP- Dipeptídeo muramil

NICUs - Unidades terapias intensivas neonatais

OE - Óleos essenciais

OECw - Óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*

OMS - Organização mundial de saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos

PKA- Proteína quinase A

RNA – Ácido ribonucleico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

UV - Ultravioleta

POP - Procedimento Operacional Padrão

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1 O GÊNERO <i>CANDIDA</i>.....	20
3.2 CANDIDEMIA.....	22
3.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE.....	24
3.3.1 Fatores relacionados ao hospedeiro ou fatores de riscos.....	25
3.3.2 Fatores relacionados ao micro-organismos ou fatores de virulência.....	28
3.4 TRATAMENTO DE CANDIDEMIA.....	32
3.4.1 Polineos.....	33
3.4.2 Azóis.....	34
3.4.3 Equinocandinas.....	35
3.4.4 Análogos de nucleotídeos.....	36
3.4.5 Outros antifúngicos.....	37
3.5 PRODUTOS NATURAIS.....	37
3.5.1 <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor.....	39
3.5.2 Citronelal e geraniol.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 LOCAIS DA PESQUISA.....	45
4.2 POSICIONAMENTO ÉTICO.....	45
4.3 MEIOS DE CULTURA.....	45
4.4 REAGENTES.....	45
4.5 CEPAS FÚNGICAS.....	46
4.5.1 Inóculos.....	46
4.6 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS.....	47
4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS.....	50
4.7.1 Identificação presuntiva por CHROMAgar <i>Candida</i>	50
4.7.2 Confirmação da identificação pelo sistema VITEK® 2.....	50

4.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS.....	51
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	52
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	53
4.11 EFEITO NA PAREDE CELULAR - ENSAIO COM SORBITOL.....	54
4.12 EFEITO NA MEMBRANA CELULAR - INTERAÇÃO COM O ERGOSTEROL.....	54
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 57
5.1 Candidemia in pediatric hospital in the city of João Pessoa, Brazil: Identification, prevalence and antifungal susceptibility.....	57
5.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela) sobre isolados de <i>Candida albicans</i> de importância clínica pediátrica.....	71
5.3 Antifungal Activity of Citronellal on <i>Candida albicans</i> Isolates of Pediatric Clinical Importance.....	86
5.4 Antifungal Activity of Geraniol on <i>Candida albicans</i> Isolates of Pediatric Clinical Importance.....	99
5.5 Antifungal Activity of <i>Cymbopogon winterianus</i> essential oil, citronellal and geraniol on <i>Candida non-albicans</i> isolated of pediatric clinical importance.....	109
 6 CONCLUSÕES.....	 122
 REFERÊNCIAS.....	 124
 ANEXOS	
ANEXO 1.....	141
ANEXO 2.....	142

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de infecções hospitalares tem aumentado ao longo das décadas, com espécies fúngicas representando mais de 25% das infecções sanguíneas adquiridas em hospitais (RICHARDSON, 2005). As espécies pertencentes ao gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 85% dessas infecções documentadas em ambiente hospitalar, incluindo infecções de corrente sanguínea (ICS), complicação conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; QUINDÓS, 2014). Desde os anos 80, *Candida* spp. é classificada como a quarta causa mais comum de doença infecciosa nosocomial e é associada com taxas de mortalidade de quase 50% (GUINEA, 2014). Além disso, a candidemia não só aumenta a taxa de mortalidade, mas também prolonga o tempo de permanência hospitalar e aumenta o custo total dos cuidados médicos.

Candida albicans é o principal patógeno fúngico oportunista de seres humanos, causando uma variedade de infecções em pacientes suscetíveis, que variam desde lesões de mucosas até candidíase sistêmica com risco de morte, em pacientes imunocomprometidos (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013). Esta espécie continua a ser a etiologia predominante, representando em torno de 50% de todos os casos de candidemias. No entanto, houve uma mudança epidemiológica nas últimas décadas. Algumas espécies de *Candida* não-*albicans* ganham importância no cenário clínico humano por representarem uma importante causa de candidemia grave, pois podem apresentar resistência ao fluconazol e a outros agentes antifúngicos (QUINDÓS, 2014). Portanto, torna-se necessária a identificação à nível de espécie da levedura, bem como a realização do teste de susceptibilidade antifúngica para seleção apropriada do antimicrobiano no tratamento de ICS (CHANG et al., 2017).

Os antifúngicos mais comuns usados contra este micro-organismo são os derivados azólicos, incluindo fluconazol, intraconazol e voriconazol; a anfotericina B; ou ainda as equinocandinas: caspofungina, anidulafungina e micafungina (AYENI et al. 1999; BERROUANE et al. 1999; DREW et al., 2013; EMRI et al., 2013). No entanto, o aumento de cepas de *Candida* resistentes às drogas azólicas, particularmente ao fluconazol (CANUTO e RODERO, 2002; CUENCA-ESTRELLA, 2014), às equinocandinas (BEYDA et al., 2012) e os vários efeitos adversos associados ao uso da anfotericina B, incluindo nefrotoxicidade e neurotoxicidade, faz com que o tratamento das enfermidades fúngicas seja muitas vezes ineficaz, sendo assim um grande desafio

clínico. (CHANDRASEKAR, 2011). Dessa forma, destaca-se a importância da busca de novas fontes terapêuticas para o tratamento das infecções fúngicas, que se apresentem mais eficazes e com menos efeitos adversos para o hospedeiro.

As plantas medicinais e seus produtos derivados e/ou substâncias sintéticas e semissintéticas são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica, uma vez que mais de 40% dos novos medicamentos registrados entre 1981-2006 foram obtidos ou inspirados a partir de compostos naturais (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al, 2013).

O gênero *Cymbopogon* é membro da família *Gramineae* e está amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América. Composto por 144 espécies, este gênero é famoso por seu alto teor de óleos essenciais que são utilizados na indústria de cosméticos, perfumaria e produtos farmacêuticos. *C. winterianus*, popularmente conhecida como citronela e Grama-Java é amplamente cultivada no Brasil e apresentou citronela e geraniol como componentes majoritários do seu óleo essencial que possui propriedades biológicas bem documentada na literatura, incluindo atividade antifúngica (AVOSEH et al., 2015).

Nesse sentido, a investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (OECw), bem como de seus fitoconstituintes majoritários: citronelal e geraniol contra cepas do gênero *Candida* isoladas de ambiente hospitalar pediátrico se apresenta como uma estratégia relevante na procura de substâncias com propriedades terapêuticas antifúngicas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência de espécies do gênero *Candida* de origem sanguínea de pacientes internados em um hospital público estadual pediátrico, em um período de seis meses; bem como avaliar as susceptibilidades antifúngicas dessas cepas;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial *Cymbopogon winterianus*, bem como de citronelal e geraniol sobre cepas de *Candida* spp.;
- Estudar a ação do óleo essencial *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol sobre a parede celular fúngica;
- Avaliar a ação do óleo essencial *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol sobre a membrana celular fúngica.

REFERENCIAL TEÓRICO

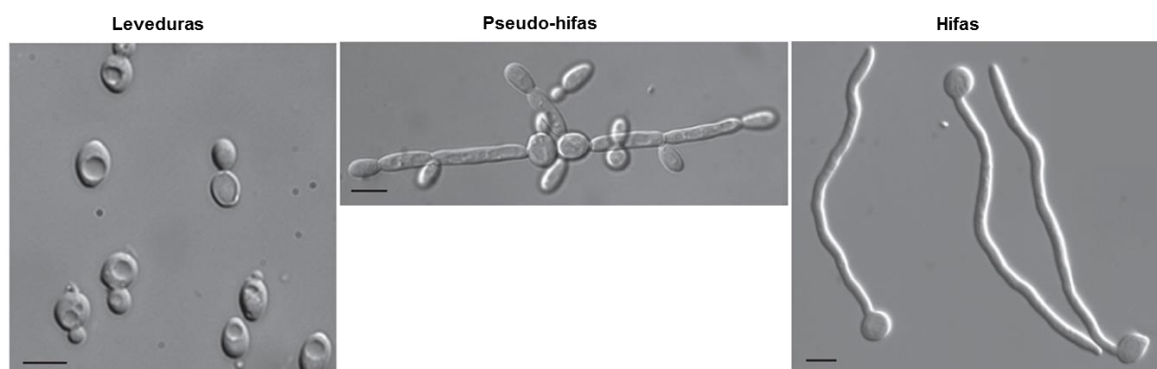
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O GÊNERO *CANDIDA*

Os fungos são seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. Podem ser unicelulares, como as leveduras; ou multicelulares como os fungos filamentosos. São organismos desprovidos de clorofila e celulose, o que os tornam incapazes de realizar fotossíntese, comportando-se, portanto, como seres heterotróficos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Várias espécies de fungos são patogênicas para o homem. Entre os mais importantes fungos oportunistas que causam doenças humanas, destacam-se as leveduras do gênero *Candida* que é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras como mostrado na Figura 1 (GOW et al., 2012).

Figura 1: Morfologia de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras.



Morfologia das formas de levedura, pseudo-hifa e hifa. As barras de escala na figura representam 5 μ m.
Fonte: Adaptado de Sudbery (2011).

De acordo com Sidrim e Rocha (2004) o gênero *Candida* spp. é classificado taxonomicamente no reino *Fungi*, divisao *Eumycota*, subdivisao *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* e apresenta cerca de 200 espécies, mas apenas uma minoria dessas espécies tem sido implicada na candidíase humana, pois cerca de 65% das espécies de *Candida* são incapazes de crescer a uma temperatura de 37 °C, o que as impedem de serem bem sucedidas como agentes patogênicos ou comensais de seres humanos (SILVA et al., 2014).

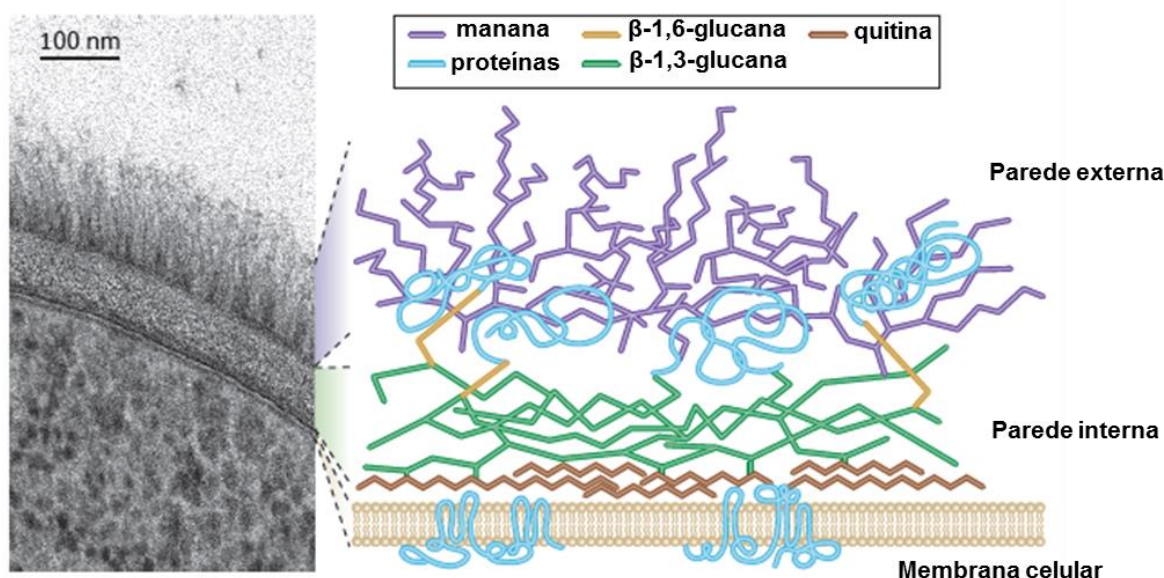
Em adultos e crianças, *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada nas patologias

fúngicas humanas. Entretanto, nas ultimas décadas tem sido observado significativo aumento de outras espécies: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides*. Essas e outras espécies, conhecidas como não-*albicans*, tem sido cada vez mais implicadas em processos infecciosos em adultos e crianças (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010), sendo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, frequentemente isoladas na população pediátrica (PAULA, 2006 e 2007; FRANÇA, 2008; RUIZ et al., 2013; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2013; NUCCI, 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

É importante ressaltar que as infecções invasivas causadas por espécies não-*albicans* são mais difíceis de serem tratadas devido à sua resistência inata ou adquirida a agentes antifúngicos com o consequente aumento da falha terapêutica (MORACE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Na parede celular bem conservada de *C. albicans*, podem distinguir-se duas camadas principais: uma camada externa composta de glicoproteínas e uma camada interna que contém polissacarídeos esqueléticos (Figura 2).

Figura 2: Estrutura da parede celular de *Candida albicans*.



Duas camadas distintas podem ser observadas na parede celular de *Candida albicans*. A camada externa é altamente enriquecida com polímeros de manose ligados O- e N- (mananas) que são covalentemente associados a proteínas para formar glicoproteínas, enquanto que a camada interna contém os polissacarídeos esqueléticos, quitina e β -1,3-glucana, que conferem força e forma celular. As proteínas da parede celular externa estão unidas a estrutura de parede interna predominantemente por restos de

glicosilfosfatidilinositol (GPI) que estão ligados ao esqueleto através de um β -1,6-glucana mais flexível. Fonte: Adaptado Gow (2012).

A parede celular é composta de 80-90% de carboidratos, sendo a camada externa constituída predominantemente por polímeros de manose de O e N (mananas) que são covalentemente associados a proteínas para formar glicoproteínas. A camada interna da parede celular contém os polissacarídeos esqueléticos, quitina e β -1,3-glucana, que conferem força e forma celular da levedura. As proteínas da parede celular da camada externa estão ligados a esta estrutura predominantemente por restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que estão ligados aos polissacarídeos esqueléticos através de um β -1,6-glucana mais flexível. Nas células de levedura de *C. albicans*, a quitina normalmente constitui aproximadamente 2% do peso seco da parede celular, enquanto que o β -1,3-glucana e o β -1,6-glucana representam 40% e 20%, respectivamente.

Candida spp. podem ser encontradas em variados ecossistemas, como objetos inanimados, solo, alimentos, água, plantas e animais; podendo estabelecer com os mesmos relacionamentos simbióticos, latentes, comensais ou patogênicos (ZANETTI, 2010). Além disso, as espécies de *Candida* colonizam pele e várias membranas mucosas, incluindo boca, vagina, uretra, tubo digestivo e área respiratória superior de 30-70% de seres humanos saudáveis em algum momento de sua vida sem causar doença (GOW et al., 2012).

Entretanto, em algumas circunstâncias, tais como na ausência ou deficiência de resposta imune adequada do hospedeiro impede o controle eficiente sobre a colonização das leveduras nas mucosas, o que pode levar a uma infecção. Logo, essas mesmas leveduras tornam-se patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio na sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas. Também existem vários fatores de virulência do fungo, incluindo capacidade para aderir às células epiteliais, formação de biofilme, capacidade de formar hifas e secreção de enzimas extracelulares que contribuem para a patogenicidade da *Candida*. Existe, portanto, fatores ligados ao hospedeiro e/ou ao micro-organismo que influenciam na transformação dessas leveduras de saprófitas para parasitas (KIRKPATRICK, 1994; OLIVEIRA et al., 2014).

3.2 CANDIDEMIA

As infecções fúngicas constituem um grave problema de saúde pública mundial, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos que possuem maior susceptibilidade a estes micro-organismos (HINRICHSEN et al., 2008; ROCHA e

VIEIRA, 2014). Na prática médica, as infecções pelos fungos oportunistas adquirem importância cada vez maior, principalmente em ambientes hospitalares, cuja incidência de infecções nosocomiais por fungos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas acarretando altos índices de morbidade, mortalidade, maior duração das internações hospitalares e maiores custos de saúde (CRUZ et al., 2007; TAMURA et al., 2007).

Candidemia é a denominação para infecção de corrente sanguínea (ICS) causadas por leveduras do gênero *Candida* spp. Desde os anos 80, essas leveduras correspondem a cerca de 85% das infecções fúngicas de origem hospitalar e são a terceira causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 30% em crianças e a 50% em adultos (ST-GERMAIN et al., 2001; TAVANTI et al., 2005; WISPLINGHOFF et al., 2014; QUINDÓS, 2014; STEINBACH, 2016).

Muitos estudos epidemiológicos têm descrito a distribuição das espécies, suscetibilidade aos antifúngicos e fatores de risco na população adulta. No entanto, existem poucos trabalhos sobre candidemia na população pediátrica (GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2013; NUCCI 2013; OLIVEIRA et al., 2014). É importante realçar que as taxas de candidemia sofrem variações regionais significativas, que podem refletir diferenças entre pacientes, assistência médica e epidemiologia hospitalar local (HAJJEB, 2004; PFALLER, 2006; SPILLIOPOULOU et al., 2010).

Nos Estados Unidos (EUA), um estudo retrospectivo sobre a incidência de candidemia em 2000 relatou 0,43 casos pediátricos/1000 internações hospitalares em comparação com 0,30 casos adultos/1000 internações hospitalares (ZAOUTIS et al., 2005). *Candida* spp. é o terceiro patógeno mais frequente isolado em infecções de corrente sanguínea (ICS) pediátricas nos Estados Unidos e na Europa (RAYMOND e AUJARD 2000; WISPLINGHOFF et al., 2003), representando cerca de 9% de todos os isolados. Sendo as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Enterococcus* representando o primeiro e segundo agente casuístico de ICSs, com 43,3% e 9,4%, respectivamente (WISPLINGHOFF et al., 2003). *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* são as duas espécies frequentemente isoladas de candidemias nessas regiões.

Um estudo de vigilância multicêntrico e retrospectivo na população pediátrica com candidemia foi conduzido em 23 hospitais de 8 países da América Latina, incluindo o Brasil, Argentina, Chile, Colômbia, Equador, Honduras, México e Venezuela, entre novembro de 2008 e outubro de 2010 e relatou uma incidência

mediana de 0,81/1000 admissões. As principais espécies isoladas em neonatos e crianças foram *Candida albicans* (43,8% e 35,7%), *C. parapsilosis* (27,0% e 26,3%) e *C. tropicalis* (14,6% e 14,6%), respectivamente (SANTOLAYA et al., 2014). O elevado isolamento de *C. parapsilosis* em pacientes pediátricos poderia ser explicado pelo fato de que esta espécie está relacionada com a prematuridade, presença de cateteres venosos centrais e a utilização da nutrição parenteral (COLOMBO et al., 2006; PAULA et al., 2006).

No Brasil, dados epidemiológicos sobre esse tema são escassos. Um dos poucos estudos que avaliou a frequência de leveduras do gênero *Candida* isoladas de sangue de pacientes pediátricos em um hospital público da cidade de São Paulo, entre 2007 e 2010, revelou uma prevalência de 37,5% de *C. albicans*, 24% de *C. tropicalis*, 22,1% de *C. parapsilosis*, 5,8% de *Pichia anomala*, 4,9% de *C. guilliermondii*, 2,9% de *C. krusei*, 1,9% de *C. glabrata* e 0,9% de *C. pararugosa* (1%) (OLIVEIRA et al., 2014).

Acredita-se que o principal mecanismo de transmissão da candidemia seja por via endógena, mediante condições de debilidade do hospedeiro e lesões de vários sítios anatômicos onde a *Candida* spp. faça parte da microbiota local, destacando-se o trato gastrointestinal, mucosa oral ou pele colonizados previamente com as leveduras (ARENDRUP, 2013). Estes micro-organismos podem então atingir a corrente sanguínea causando a candidemia e se disseminar para tecidos de um ou mais órgãos, causando a candidíase invasiva (COLOMBO e GUIMARAES, 2003; DALLE et al., 2010).

Outro mecanismo para a transmissão é por via exógena, a qual ocorre principalmente por meio das mãos de profissionais da saúde que cuidam dos pacientes (GIOLO, 2010). *Candida parapsilosis* é apontada como a principal espécie transmitida por este meio em crianças (HEDDERWICK et al., 2000). Também estão arrolados o contato com indivíduos colonizados, implante de próteses, sondas, cateteres ou drenos, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas por fungos (EGGIMAN et al., 2003; GIOLO, 2010). Quase 75% dos recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal são colonizados até 1 mês de idade (BALEY, 1986) por transmissão vertical durante o parto vaginal ou pós-natal via contato com a pele materna ou a pele de profissionais de saúde (HEDDERWICK et al., 2000; BENDEL, 2003).

3.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE

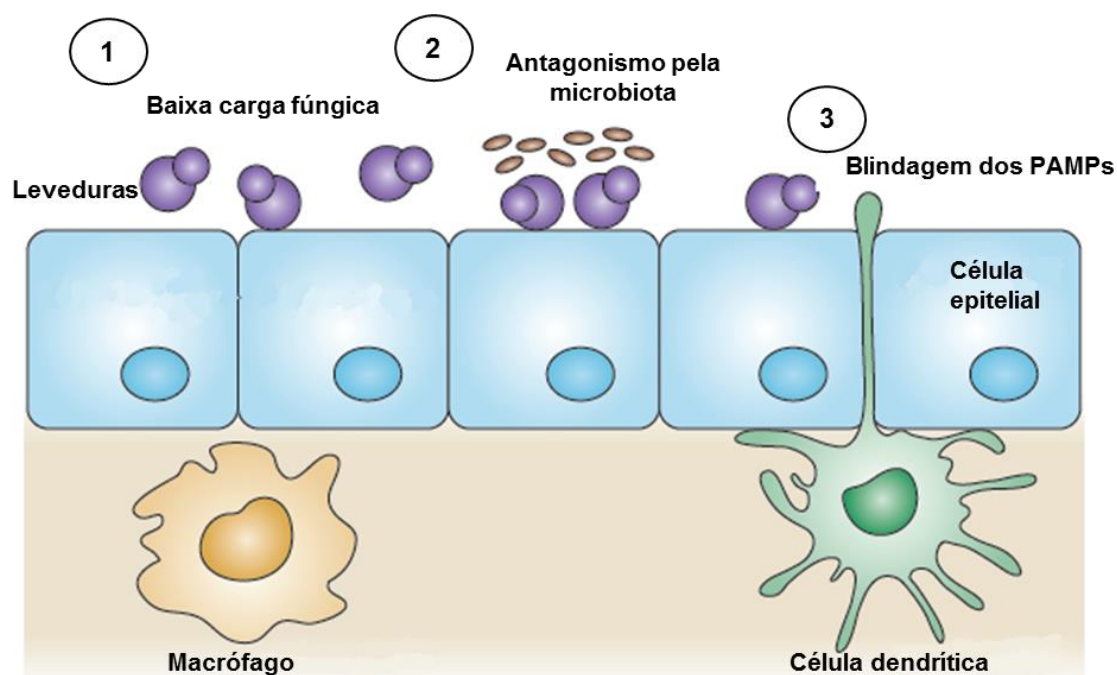
3.3.1 Fatores relacionados ao hospedeiro ou fatores de riscos

A capacidade de produção de infecção por espécies de *Candida* depende mais do hospedeiro do que do fungo. A candidíase pode ocorrer pelo rompimento do equilíbrio levedura-hospedeiro, que pode ser desencadeado pelas alterações das barreiras teciduais, da microbiota autóctone e da resposta imune (DRAGO et al., 2000; CALDERONE e FRONZI, 2001).

O modo como o sistema imunológico interage com as várias formas morfológicas de fungos é mal compreendida. No caso de *C. albicans*, uma possibilidade intrigante é que o reconhecimento diferencial de leveduras e hifas pode ser fundamental para os mecanismos através dos quais diferentes respostas imunes são suscetíveis durante a colonização e invasão.

Resumidamente, a Figura 3 mostra a resposta imunológica no equilíbrio levedura-hospedeiro.

Figura 3: Resposta imunológica na colonização.

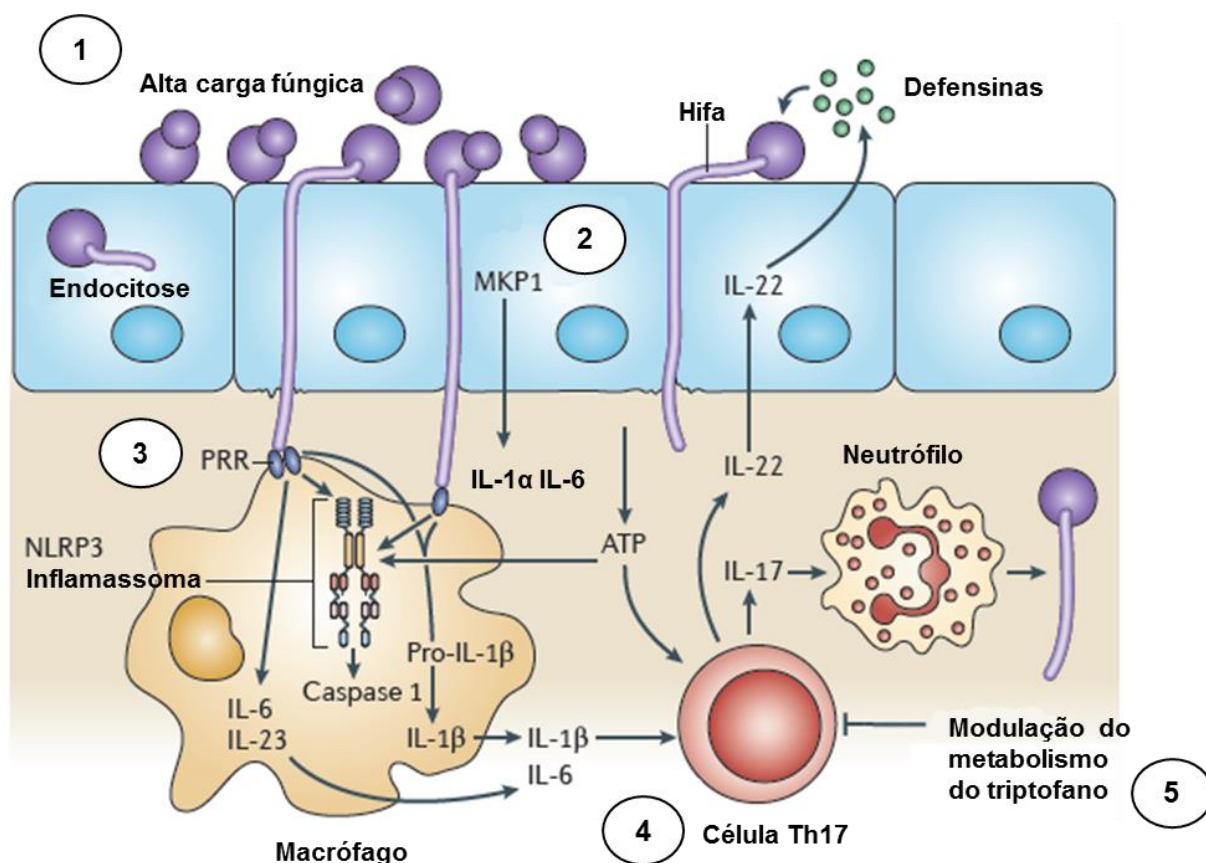


Colonização de *Candida albicans* em superfícies mucosas e pele. 1) A baixa carga fúngica em superfícies mucosas e pele não induz o dano de células epiteliais e, como resultado, nenhuma produção de citocina é induzida pelas células epiteliais, macrófagos ou células dendríticas. 2) A microbiota atua como antagonista natural contra o abundante crescimento fúngico. 3) Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) responsáveis pela ativação do inflamassoma estão ocultos, e não induzem a produção de interleucina-1 β (IL-1 β) ou resposta mediada pelas células T auxiliares 17 (T_H17). Fonte: Adaptado de Gow (2012).

A microbiota atua como antagonista natural contra o crescimento fúngico abundante. A resposta imunológica em indivíduos saudáveis também mantém o número baixo de leveduras colonizando a pele, uma vez que algumas células imunológicas responsáveis pelo reconhecimento primário de patógenos na pele e mucosas reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) presentes nas células das leveduras, porém não induzem uma resposta inflamatória com dano celular epitelial (CHENG et al., 2011; GOW et al., 2012). Portanto, existe uma tolerância imunológica das mucosas aos micro-organismos colonizadores.

Já a Figura 4 evidencia a resposta imunológica na presença de invasão tecidual por *Candida albicans*.

Figura 4: Resposta imunológica na invasão.



Invasão de superfícies mucosas por *C. albicans*. 1) A alta carga fúngica favorece a morfogênese. 2) A formação de hifas estimula a resposta inflamatória ativando a via MAPK fosfatase 1 (MKP1) nas células epiteliais. Isso desencadeia a produção de citocinas IL-1 α e IL-6. 3) As hifas também ativam o complexo NLRP3 inflamassoma e induzem a produção de IL-1 β pelas células imunológicas como macrófagos, o que estimula as células TH17 a produzir citocinas. 4) As citocinas produzidas pelas células TH17 como IL-17 ativam os neutrófilos, enquanto a IL-22 induz a liberação de defensinas pelas células epiteliais que auxiliam no mecanismo de defesa antifúngica na mucosa. 5) A modulação do metabolismo do triptofano pelas hifas de *C. albicans* pode reduzir a respostas TH17. Legenda: MAPK1: Proteína cinase ativa por mitógeno fosfatase 1; PRRs: receptores de reconhecimento de padrões. Fonte: Adaptado de Gow (2012).

Nesse caso, o processo inflamatório que tem a finalidade de eliminar o patógeno acontece em resposta a mudança da forma leveduriforme para hifas que tem um papel importante na invasão. Por um lado, as hifas induzem a produção de citocinas pelas células epiteliais, induzindo não só a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) ativada pelas leveduras, mas também uma segunda via MAPK que leva à ativação da MAPK fosfatase 1 (MKP1) que desencadeia a produção de citocinas inflamatórias interleucinas (IL): IL-1 α e IL-6, estimulando o recrutamento leucocitário para o local onde está ocorrendo a invasão tecidual. Por outro lado, as hifas também ativam o inflamassoma e induzem a produção de mais IL-1 β pelos macrófagos, estimulando as células T_H17 produzirem as citocinas IL-17 e IL-22, as quais ativam os neutrófilos e induzem a liberação de defensinas de células epiteliais, respectivamente; Ambos os efeitos são componentes cruciais do mecanismo de defesa antifúngico da mucosa. As hifas de *C. albicans* ainda modulam o metabolismo de triptofano que podem diminuir as respostas do tipo T_H17 favorecendo a invasão tecidual fúngica (van DE VEERDONK et al., 2011; CHENG et al., 2011; GOW et al., 2012).

Portanto, qualquer situação que leve a imunossupressão é considerada um fator de risco ou condição predisponente relacionado ao hospedeiro a desenvolver infecção fúngica. Os principais fatores de risco descritos na literatura, em adultos e crianças, são a presença de doenças base e sua severidade, tais como diabetes, Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), leucemias, linfomas e outros tipos de câncer, doenças do sistema nervoso central, dentre outras patologias; a maior utilização de procedimentos médicos invasivos com consequente rompimento da barreira anatômica, incluindo transplante de órgãos, cateterização, ventilação mecânica, nutrição parenteral, implantação de próteses, etc (SINGHI e DEEP, 2009; STEINBACH, 2016). É interessante ressaltar que a presença de doenças de base associadas à imunodepressão assim como a realização de procedimentos médicos invasivos facilitam a ocorrência de infecções sistêmicas por leveduras de menor patogenicidade, ampliando o número de espécies potencialmente causadoras de fungemias em pacientes expostos a fatores de risco (ZAOUTIS, 2010).

Dentre os fatores de risco, ainda incluem internação de longo prazo em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), infecção bacteriana prévia, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de quimioterápicos, antifúngicos com consequente seleção de espécies menos sensíveis pela pressão de antifúngicos como o fluconazol, uso de agentes corticosteroides por período prolongado, imunossupressores, citostáticos, dentre

outros. Esses pacientes apresentam infecções frequentemente mais severas e de progressão rápida, com difícil diagnóstico e tratamento (HINRICHSSEN et al., 2008; STEINBACH, 2016).

Destaca-se também alguns estados fisiológicos do hospedeiro mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecção fúngica, incluindo mulheres em uso de anticoncepcionais de alta dosagem, gravidez, estado nutricional deficiente e extremos de idades como crianças e idosos (ZAOUTIS, 2010; STEINBACH, 2016).

3.3.2 Fatores relacionados ao micro-organismos ou fatores de virulência

Há algumas décadas acreditava-se que as leveduras participavam passivamente do processo de patogênese no estabelecimento da infecção fúngica. Assim, a debilidade orgânica ou imune do hospedeiro era considerada o único mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção oportunista. Atualmente esse conceito vem sendo modificado. É consenso que esses micro-organismos participam ativamente do processo fisiopatogênico da doença, utilizando-se de mecanismos de agressão denominados fatores de virulência (TAMURA et al., 2007).

Os principais fatores de virulência das leveduras são: capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, que degradam os tecidos do hospedeiro; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão às células e tecidos; formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp.; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio. Entretanto, acredita-se que haja uma ação sinérgica entre vários mecanismos de agressão, os quais, em associação a debilidade na resposta do hospedeiro, podem conduzir a candidíase (CALDERONI e FONZE, 2001).

O evento primário na infecção por *Candida* é a adesão às superfícies do hospedeiro, que é necessário para a colonização inicial (Figura 5). Para que ocorra adesão, o primeiro estágio depende da aproximação ou do contato inicial entre a parede celular da levedura e a superfície da célula do hospedeiro ou de materiais médico-hospitalares (NOBILE et al., 2008; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010). Esse processo está condicionado a interferência de fatores biológicos e não biológicos. Entre os principais fatores não biológicos são reconhecidas as interações químicas que ocorrem entre as macromoléculas, como as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (DUNNE, 2003). Em relação aos fatores

biológicos, a adesão é mediada por mecanismos moleculares específicos, principalmente por meio de proteínas chamadas de adesinas que são estruturas que aumentam a capacidade do fungo em aderir a superfícies inanimadas ou células/tecidos animais (NOBILE et al., 2008).

Após a levedura aderir a superfície, novos micro-organismos costumam interagir, promovendo a formação de uma comunidade plural de seres microscópicos envolvidas por uma matriz extracelular, em que há dependência metabólica de grau variável entre seus constituintes, caracterizando, assim, a estrutura conhecida como biofilme (RAMAGE et al., 2001; NOBILE et al., 2008; MATHÉ e VAN DIJCK, 2013). Biofilmes de *Candida* podem se desenvolver tanto sob os tecidos quanto em próteses, cateteres e outras superfícies. Os biofilmes apresentam elevada resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos agentes antifúngicos, o que acaba por favorecer o estabelecimento do processo patogênico (SOLL, 2008; MATHÉ e VAN DIJCK, 2013).

Estudos relatam que a capacidade de formar hifas eleva a habilidade de aderência da levedura aos tecidos do hospedeiro devido ao aumento da superfície de contato do mesmo, consequentemente facilitando a invasão tecidual e levando a disseminação das leveduras a órgãos internos do corpo humano (ODDS, 1994; CALDERONI e FONZI, 2001). Portanto, as hifas tem sido relacionadas com as formas mais virulentas, que possivelmente ocorrem devido a resposta de *C. albicans* ao estresse ambiental (GOW et al., 2012).

Pseudo-hifa é outra estrutura morfológica observada em *C. albicans*, produzida durante sua reprodução por brotamento, na qual os brotos não se destacam da célula-mãe, ocorrendo, então, um encadeamento de células, cuja forma lembra uma hifa (GOW et al., 2012). O tubo germinativo é um prolongamento contínuo da célula-mãe leveduriforme produzido no início do processo de filamentação, sendo considerado uma forma de transição entre a levedura e o micélio (SOLL, 2008).

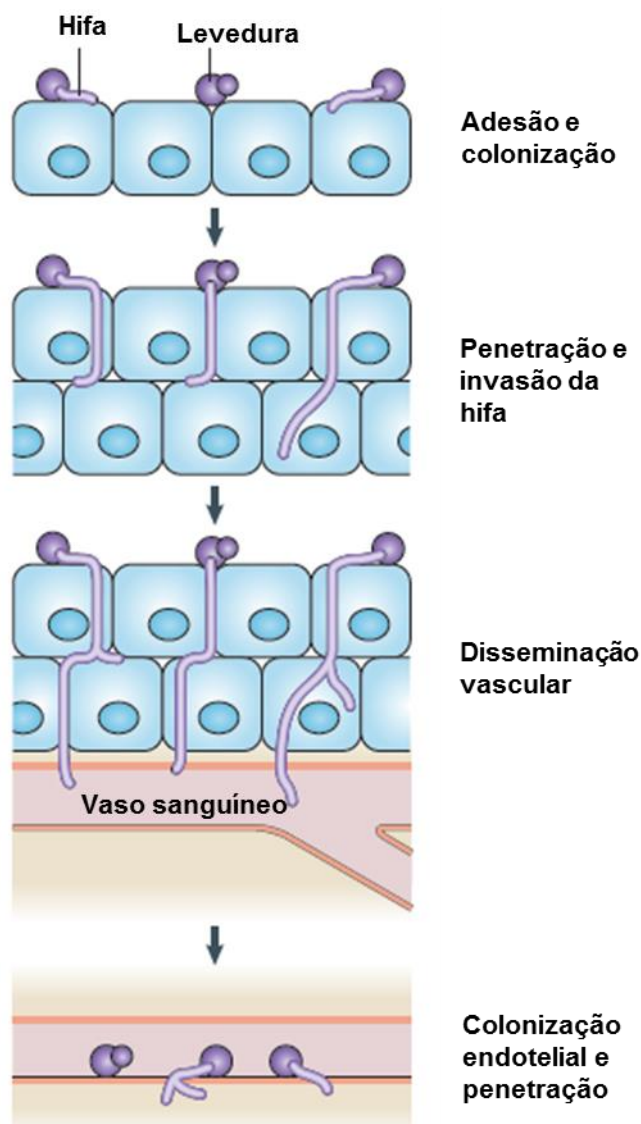
A capacidade da levedura em alterar sua morfologia é denominada dimorfismo ou polimorfismo ou morfogênese celular e é um dos mais importantes mecanismos encontrados na patogênese da candidíase. A morfogênese pode ser induzida por diversos mecanismos e estresses ambientais. O dipeptídeo muramil (MDP) e CO₂, glicose e aminoácidos estimulam a formação de hifas ativando a via proteína quinase A (PKA) na célula fúngica (MAIDAN et al., 2005; XU et al., 2008; HALL et al., 2010). Além disso, a molécula de detecção de quórum farnesol, que se acumula em altas

densidades celulares de *C. albicans*, inibe a formação de hifas por regulação negativa da sinalização PKA, indicando que a densidade celular provavelmente afeta a morfogênese no local da infecção (DEVEAU et al., 2010).

A incorporação física de células de *C. albicans* dentro de uma matriz, ambientes com pH neutros e alcalinos, hipóxia e baixos níveis de nitrogênio como resultado da inanição pela alta densidade celular fúngica estimulam o desenvolvimento de hifas por ativarem os fatores de transcrição: Czf1, Rim101, Efg1 e Efh1 (STICHTERNOOTH et al., 2009 e 2011) e Cph1 (MAIDAN et al., 2005), respectivamente. O desenvolvimento de hifas também pode ser estimulado pelas altas temperaturas (STICHTERNOOTH et al., 2011). O desenvolvimento de hifas é inibido a temperaturas inferiores a 35 ° C através da ação da proteína de choque térmico de chaperona molecular 90 (Hsp90) (SHAPIRO et al., 2009).

Além disso, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado por células fagocíticas, a radiação ultravioleta (UV), a hidroxureia e as deleções de genes podem levar a danos no ácido desorribonucleico (DNA) fúngico ou interferências na reparação do dano ao DNA fúngico e na replicação do DNA fúngico são considerados como estresses genotóxicos e também podem causar a filamentação celular (LENG et al., 2000; BACHEWICH et al., 2003; SHI et al., 2007).

Figura 5: Invasão tecidual de *Candida albicans*.



Os vários passos na invasão tecidual por *Candida albicans*, em uma superfície celular epitelial estéril: adesão ao epitélio; penetração epitelial e invasão por hifas; disseminação vascular, que envolve a penetração de hifas nos vasos sanguíneos e a sementeira de leveduras na corrente sanguínea; e, finalmente, colonização endotelial e penetração durante a doença disseminada. Fonte: Adaptado Gow (2012).

As leveduras ainda são capazes de secretar enzimas extracelulares que destroem as membranas celulares do hospedeiro, favorecendo posterior invasão tecidual (FURLANETO-MAIA et al., 2008). As principais enzimas produzidas tanto por *C. albicans* quanto não *albicans* são as proteinases e fosfolipases. As fosfolipases são um grupo de enzimas cuja secreção, em *C. albicans*, é regulada pelo gene *PLB1*. Esta expressão é afetada por fatores nutricionais, condições do ambiente (temperatura e pH) e fase de crescimento da levedura. Fosfolípidios presentes na membrana das células humanas e animais são os substratos (OMBRELLA et al., 2008; SILVA et al., 2014).

As proteinases são reguladas por uma família de genes *SAP*. Possuem atividade proteolítica, ou seja, usam proteínas como substrato. Degradam colágeno, queratina, peptídeos localizados na superfície de mucosas e podem, ainda, atuar sobre componentes do sistema imunológico, como imunoglobulinas, complemento e citocinas, facilitando a invasão das leveduras aos tecidos do hospedeiro (KUMAR et al., 2006).

Diversos estudos tem demonstrado a relação entre o aumento na síntese e a atividade das enzimas extracelulares fosfolipases e proteinases, com a elevação do potencial patogênico das leveduras, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; SILVA et al., 2014).

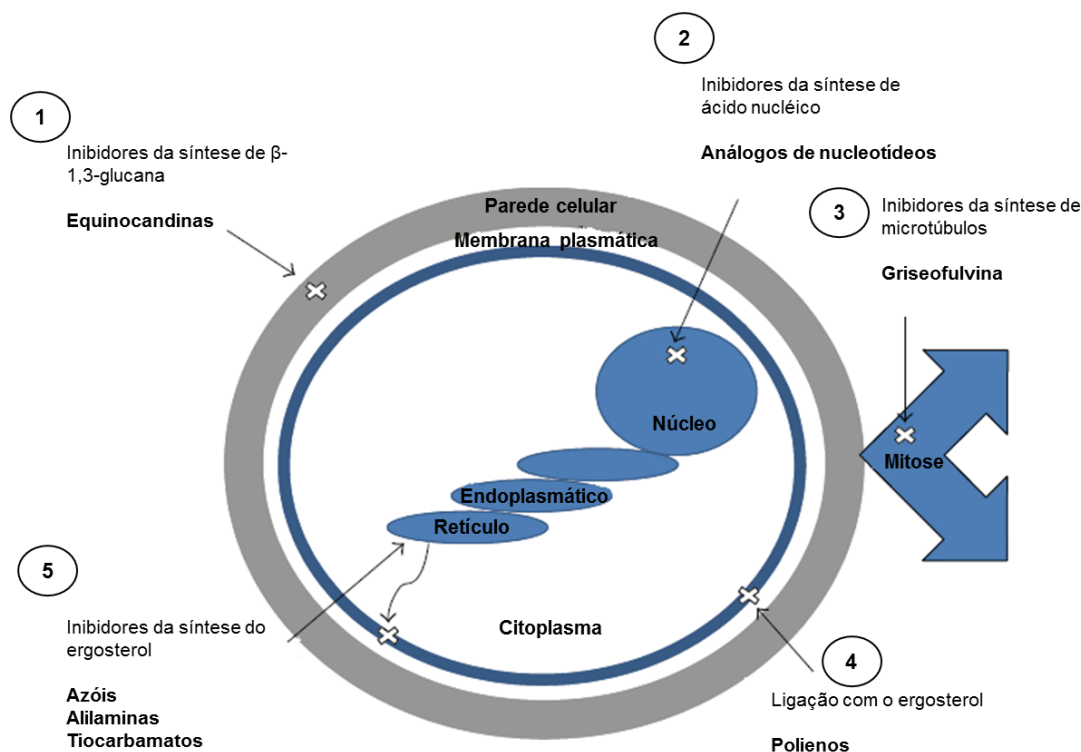
Por fim, as leveduras são capazes de produzir substâncias denominadas hemolisinas que destroem as hemácias com a finalidade de obter ferro que está complexado ao grupamento heme da hemoglobina. O elemento inorgânico ferro é indispensável no desenvolvimento dos micro-organismos em geral, inclusive das leveduras, e a obtenção desse elemento é essencial para o estabelecimento de um processo infeccioso (KUMAMOTO e VINCES, 2005; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

3.4 TRATAMENTO DE CANDIDEMIA

O tratamento da candidíase sistêmica segue dois elementos fundamentais. Primeiro é a identificação e remoção da fonte mais provável da fungemia e a segunda é terapia medicamentosa para acelerar a depuração da infecção (SINGHI e DEEP, 2009).

Vários antifúngicos com mecanismos de ação diferentes são utilizados no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp.. As três principais classes são os poliênicos, azólicos e equinocandinas que atuam em diferentes locais da parede ou membrana celular fúngica e são as principais classes empregadas no tratamento de candidemia em adultos e crianças no Brasil (KATZUNG, 1998; COLOMBO et al., 2013). Além das três principais classes de drogas, vários outros agentes podem ser adicionados ao arsenal antifúngico, incluindo alilaminas (terbinafina), tiocarbamatos (tolnaftato), análogos de nucleotídeos (flucitosina), griseofulvina e outros (Figura 6) (CHANDRASEKAR, 2011).

Figura 6: Alvos primários e modo de ação de vários agentes antifúngicos.



Mecanismo de ação de vários antifúngicos. 1) Equinocandinas são inibidores da síntese de β -1,3-glucana, comprometendo a estrutura da parede celular fúngica. 2) Análogos de nucleotídeos agem no núcleo, inibindo a síntese de ácido nucléico. 3) Griseofulvina inibe a síntese de microtúbulos, impedindo a mitose. 4) Polienos ligam-se ao ergosterol, promovendo alteração da permeabilidade da membrana plasmática. 5) Azóis, alilaminas e tiocarbamatos são inibidores da síntese do ergosterol, principal componente da membrana plasmática fúngica. Fonte: Adaptado de Spampinato e Leonardi (2013).

3.4.1 Polienos

Os polienos possuem ação fungicida de amplo espectro e a anfotericina B é considerada droga de primeira escolha, junto com o fluconazol, para tratamento de candidíase sistêmica na pediatria (SINGHI e DEEP, 2009; CHANDRASEKAR, 2011). Os derivados poliênicos como nistatina e anfotericina B ligam-se com o ergosterol, principal componente lipídico da membrana celular fúngica, resultando na produção de poros aquosos. Consequentemente, a permeabilidade celular é alterada e leva ao vazamento de componentes citosólicos e, portanto, morte fúngica (Figura 6) (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013).

O desoxicolato de anfotericina B é importante no tratamento das infecções fúngicas invasivas, incluindo candidemias em crianças (ASCHER et al., 2012). Geralmente, a dose diária recomendada é de 0,7mg/kg para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e até 1 mg/kg para *C. glabrata* e *C. krusei*. O uso da anfotericina B

convencional leva a efeitos adversos durante sua administração, incluindo náusea, vômitos, tremores, febre e nefrotoxicidade como principal efeito adverso (GIANNATTASIO et al., 2014).

Outros produtos lipídicos de anfotericina B (anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e dispersão coloidal de anfotericina B) são amplamente utilizados em pacientes de unidades terapias intensivas neonatais (NICUs) (GIANNATTASIO et al., 2014). Estas formulações parecem não ter toxicidades renais ou hepáticas significativas, porém apresentam custo elevado (CHANDRASEKAR, 2011). Outra desvantagem dessas formulações lipídicas de anfotericina B é a penetração renal limitada que foi associada com maior mortalidade em lactentes tratados com essa formulação do que lactentes tratados com desoxicolato de anfotericina B ou fluconazol (ASCHER et al., 2012). Além disso, as formulações lipídicas não são indicadas para tratamento de infecções urinárias fúngicas (GIANNATTASIO et al., 2014).

A resistência aos polienos é incomum apesar da utilização extensiva por mais de 30 anos. Existem relatos de cepas de *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* com susceptibilidade diminuída à anfotericina B (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013). O mecanismo de resistência aos derivados poliênicos parece envolver alterações nos genes *ERG3* e *ERG6* que codificam algumas enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol. Isolados de *Candida* spp. resistentes aos polienos apresentam teor de ergosterol diminuído nas membranas celulares e aumento da atividade da catalase (CHANG et al., 2017).

3.4.2 Azóis

A maior família de drogas antifúngicas é a dos azóis, abrangendo duas grandes classes, os imidazóis e os triazóis. Os principais representantes empregados no tratamento de candidíase dos imidazóis são miconazol, clotrimazol e cetoconazol; já dos triazóis de primeira geração são fluconazol e itraconazol, e de segunda geração são voriconazol, posaconazol e ravucoazol (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013).

Os derivados azólicos interrompem a biossíntese do ergosterol, principal esterol presente na membrana celular fúngica. Eles inibem a enzima do citocromo P450 fúngica, a 14- α -desmetilase que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14- α -metil do lanosterol, comprometendo a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de lanosterol (14- α -metilesterol). Isso desagrega o arranjo dos lipídios de membrana, comprometendo às funções de determinados sistemas

enzimáticos ligados à membrana, como ATPase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo assim, o crescimento e a replicação dos fungos (Figura 6) (FORTÚN, 2011; CHANG et al., 2017).

Muitos azóis são eficazes tanto para uso tópico como para o tratamento e profilaxia de infecções fúngicas invasivas para a maioria das espécies de *Candida*. O fluconazol apresenta excelente segurança e tolerabilidade, boa penetração na maiorias dos fluidos e tecidos do organismo e possui atividade antifúngica de amplo espectro, e junto com anfotericina B são considerados medicamentos de primeira escolha para tratamento das formas de candidíase invasivas em crianças (FORTÚN, 2011). Entretanto, os azólicos são geralmente fungistáticos, em vez de fungicida, e seu uso prolongado contribui para o desenvolvimento de resistência (KHAN et al., 2010). A resistência aos antifúngicos azólicos pode ser intrínseca (primária) ou adquirida. *Candida krusei* apresenta forte resistência intrínseca ao fluconazol, enquanto *C. glabrata* e *C. lusitaniae* têm susceptibilidade intrínseca reduzida ao fluconazol e, com frequência crescente, estão evoluindo a resistência de alto nível ao fluconazol (PERLIN et al., 2015).

O uso generalizado de fluconazol pode estar contribuindo para o aumento da incidência de infecções por *Candida* com resistência adquirida e/ou infecções por *Candida* não-albicans intrinsecamente resistentes. Os principais mecanismos de resistência aos fármacos antifúngicos azólicos incluem:

- 1) diminuição da concentração efetiva de fármaco devido à ativação de transportadores/bombas de efluxo, como *CDR1* e *CDR2* em *C. albicans*, ou super-expressão do alvo de fármaco Erg11; (SANGLARD, 2016);
- 2) alteração na estrutura do sítio alvo dos azóis (14- α -desmetilase), mutação no gene *ERG11* que codifica a enzima-alvo impede a ligação dos azóis ao sítio enzimático (CHANG et al., 2017);

4.4.3 Equinocandinas

As equinocandinas representam uma nova classe de agentes antifúngicos que inibem a síntese de parede fúngica por bloqueio não competitivo da β -1,3-D-glicano sintase (Figura 6). Os principais representantes das equinocandinas são caspofungina, anidulafungina e micafungina que inibem a síntese de 1,3-glicano, um polímero de glicose que é necessário para manter a estrutura das paredes celulares fúngicas. Na ausência deste polímero, as células fúngicas perdem a integridade, acontece a lise e

morte celular. A caspofungina e micafungina são medicamentos de segunda escolha no tratamento das formas de candidíase invasiva que são refratárias à anfotericina B e/ou fluconazol (KHAN et al., 2010; CHANDRASEKAR, 2011; FORTÚN, 2011).

Embora as equinocandinas tenham atividade antifúngica contra quase todas as espécies de *Candida*, existem relatos de aumento de incidência da resistência adquirida em infecções causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em seres humanos (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013). Mais ainda, relatou-se o surgimento de resistência a ambos equinocandinas e azóis em isolados clínicos de *C. glabrata* (ALEXANDER et al., 2013). Além disso, a resistência intrínseca à equinocandina de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. guilliermondii* já foi descrita na literatura (CANT'ON et al., 2006; GARCIA-EFFRON et al., 2008).

A resistência às equinocandinas deve-se principalmente a mutações no gene *FKS* que codifica a enzima-alvo (β -1,3-D-glicano sintase) do antifúngico. Porém, a falha no tratamento clínico com equinocandinas para a candidíase é raro, com exceção de infecções causadas por *C. glabrata*, uma espécie bem conhecida multirresistente (CHANG et al., 2017).

4.4.4 Análogos de nucleotídeos

A flucitosina é o principal representante, é um análogo de pirimidina. É transportado para células fúngicas por permeases de citosina. Em seguida, é desaminada para 5-fluorouracilo e fosforilada para 5-fluorodeoxiuridina monofosfato. Este nucleótido fluorado inibe a timidilato sintase e, portanto, interfere na síntese de DNA. O monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina pode ainda ser fosforilado e incorporado ao ácido ribonucleico (RNA), afetando assim o RNA e a síntese proteica (Figura 6) (CHANG et al., 2017).

A resistência primária à flucitosina é incomum entre os isolados clínicos de *Candida* spp.. Já a resistência adquirida é bem documentada durante a monoterapia com este agente. O mecanismo de resistência envolve à captação diminuída da droga pela perda da atividade da permeasse ou pela diminuição da atividade enzimática necessária para converter a flucitosina em 5-fluoruracil. A uracil fosforibosiltransferase, outra enzima na via da pirimidina, também é importante na formação do 5-fluoruracilmonofosfato, e a perda de sua atividade é suficiente para conferir resistência à flucitosina (BOWYER et al., 2011).

3.4.5 Outros antifúngicos

As alilaminas (naftifina e terbinafina) e os tiocarbamatos também perturbam a membrana celular inibindo a esqualeno-epoxidase, enzima envolvida na biossíntese do ergosterol. Griseofulvina (uma espirodictetona tricíclica, isolada pela primeira vez de *Penicillium griseofulvum*) atua através interrupção da produção de microtúbulos citoplasmáticos desfazendo o eixo mitótico, inibindo a mitose fúngica e multiplicação do fungo (Figura 6).

Apesar do arsenal antifúngico disponível atualmente, ainda existem grandes limitações no uso desses agentes no tratamento da candidíase. O repertório antifúngico é considerado limitado e apresenta importantes efeitos colaterais ao hospedeiro, em parte devido à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade em identificar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos (COLOMBO et al., 2013; GUINEA, 2014). O tratamento de candidemia não é sempre efetivo, pois a recorrência é comum e as taxas de morbidade e mortalidade são consideradas altas, o que evidencia em parte, a limitada eficácia dos fármacos antifúngicos disponíveis, devido a sua biodisponibilidade insuficiente, interação medicamentosa significativas, dentre outros fatores (CHANDRASEKAR, 2011; BEYDA et al., 2012). A eficácia terapêutica das drogas antifúngicas também é comprometida pelo aumento de infecções causadas por cepas de *Candida* resistentes as classes antifúngicas (CANUTO e RODERO, 2002; CUENCA-ESTRELLA, 2014). Dessa forma, destaca-se a importância da busca de novas fontes terapêuticas para o tratamento das infecções fúngicas, que se apresentem mais eficazes e com menos efeitos adversos para o hospedeiro. Nesse sentido, apresentam-se como uma importante alternativa de fonte terapêutica os estudos com plantas medicinais e seus derivados.

3.5 PRODUTOS NATURAIS

Produto natural é definido como substância ou composto químico, produzidos por um ser vivo, que geralmente tem atividade biológica ou farmacológica e que pode ser usado como fonte ou inspiração de produtos farmacêuticos. Os produtos naturais podem ser obtidos de diferentes fontes, incluindo animais, bactérias, algas, fungos e plantas (BROWN et al., 2014; GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

O uso terapêutico das plantas medicinais para tratar e prevenir diversas enfermidades é uma forte característica da espécie humana, tão antigo quanto à própria

humanidade e encontrado praticamente em todas as civilizações e grupos culturais conhecidos (KHAN et al., 2009; OLIVEIRA BARROS, 2010). Atualmente, o interesse nos recursos naturais continua proeminente, uma vez que pesquisas são intensas com a finalidade de produzir novos medicamentos a partir de produtos naturais, especialmente de origem vegetal, por diversas razões: como pela ineficiência da medicina convencional ou pela falta de acesso por grande parte da população ao tratamento farmacológico convencional (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Mundialmente, o uso tradicional das plantas medicinais contribui significativamente com os cuidados com a saúde, embora seus constituintes químicos nem sempre sejam conhecidos (MUKHERJEE et al., 2015). No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas nas zonas rurais e urbanas de acordo com as tradições populares desenvolvidas pelos nativos ou trazidas para o país pelos europeus, africanos e asiáticos (RATES, 2001). Existem iniciativas governamentais que estimulam o uso racional de plantas medicinais no país, como por exemplo a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), instituída em 2006 e a elaboração em 2008 da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), composta por 71 nomes de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS). Essas políticas públicas tem como objetivo principal garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006 e 2008).

Em relação às aplicações das plantas medicinais com propósito antimicrobiano, a ideia de que certas plantas tinham potencial cicatrizante ou curativo era bem aceita muito antes da descoberta dos próprios ‘micróbios’ pela humanidade. Atualmente, sabe-se que essas plantas continham substâncias ou produtos químicos que exerciam atividades biológicas, nesse caso, propriedades antimicrobianas (PEREIRA, 2009).

Resumidamente, os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. Os primeiros são essenciais à sobrevivência de todos os vegetais (lipídios, proteínas e carboidratos); já os últimos são importantes na adaptação ao meio no qual a planta está inserida. Os metabólitos secundários geralmente apresentam estrutura complexa e diversa, baixo peso molecular, distribuição restrita, marcantes atividades biológicas e são encontradas em concentrações relativamente baixas nas plantas (LE BOURVELLEC et al., 2015; MUKHERJEE et al. 2015). Os principais metabólitos secundários com atividade

biológica são os alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos e os óleos essenciais.

Dentre os metabólitos derivados de plantas medicinais, destacam-se os óleos essenciais (OEs), também conhecidos como óleos voláteis ou óleos éteros, são extraídos de plantas aromáticas geralmente encontradas em países de clima temperado e tropical. OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Eles podem ser obtidos de todas as partes das plantas, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes ou cascas e podem conter de vinte a sessenta componentes diferentes e normalmente, ocorre a predominância de dois ou três componentes em maiores concentrações. (BAKKALI et al., 2008; REGNAULT-ROGER et al., 2012). Os componentes dos OEs variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, estéres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até mesmo compostos com enxofre. Quimicamente, a maioria dos OEs é composta de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo que estes últimos preponderam (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Até o momento, são conhecidos aproximadamente 3.000 OEs, 300 dos quais são amplamente empregados pela indústria farmacêutica, de saneantes, de cosméticos, de produtos agrícolas e alimentícia devido às suas ações bactericida, fungicida, antiparasitária, antiviral, inseticida e condimentar, além de outras propriedades medicinais (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial extraído das folhas da planta *Cymbopogon winterianus* também tem relevância econômica, uma vez que é empregado nas indústrias de perfumaria, cosmética, farmacêutica e aromatizante e é rico em citronelal, geraniol e citronelol (BLANK et al., 2007; PEREIRA, 2009). Nos últimos anos, as propriedades antifúngicas tanto do OE de *C. winterianus*, bem como de seus isolados citronelal e geraniol têm sido amplamente estudadas (MARCOS-ARIAS et al., 2011; ZORE et al., 2011; CARMO et al., 2012).

3.5.1 *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor

A família *Poaceae*, também conhecida como *Gramineae*, possui cerca de 800 gêneros e 10.000 espécies distribuídas universalmente com grande importância econômica (LONGHI-WAGNER, 2012; EKPENYONG et al., 2015). *Cymbopogon* é um importante gênero da família *Poaceae*, com aproximadamente 140 espécies

descritas, mundialmente distribuídas em regiões de climas semitemperado a tropical (SILVEIRA et al., 2012; EKPENYONG et al., 2015).

A espécie *C. winterianus* (Figura 7), conhecida popularmente como citronela e Grama-Java é uma planta perene que pode chegar até um metro de altura (SHASANY et al., 2000; PEREIRA et al., 2011; AVOSEH et al., 2015).

Figura 7: *Cymbopogon winterianus*.



Fonte: PEREIRA et al., 2011.

A infusão de suas folhas frescas é utilizada na medicina popular para o tratamento de ansiedade e epilepsia (QUITANS-JÚNIOR et al., 2008). Essa espécie é largamente cultivada na Índia e Brasil, servindo como importante fonte de produção de óleos essenciais a partir de suas folhas. Esses óleos essenciais são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, farmacêutica e aromatizantes (SHASANY et al., 2000; QUITANS-JÚNIOR et al., 2008).

Entre suas atividades biológicas, destacam-se as ações antitumoral (GANJEWALA et al., 2009), antibacteriana (DUARTE et al., 2007; SCAZZOCCHIO et al., 2016), anticonvulsivante (SILVA et al., 2010a), antioxidante (SILVA et al., 2010b), inseticida (SILVA et al., 2016) e antifúngica (OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011), incluindo atividade contra *Candida* spp. (BLANK et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011b e 2015a).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus* foi descrita na literatura contra fungos do gênero *Trichophyton* (PEREIRA et al., 2011), *Aspergillus* (OLIVEIRA, 2011a) e *Candida* spp. (OLIVEIRA, 2011a; OLIVEIRA et al., 2011b e 2015). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do OECw foi de 625 µg/mL e 1250 µg/mL, respectivamente, contra cepas de *Candida albicans* de importância clínica adulta (OLIVEIRA et al., 2011b).

3.5.2 Citronelal e Geraniol

Embora os OEs ocorram, geralmente, como misturas complexas, aproximadamente 90% dessa mistura são compostos terpênicos que são uma classe de substâncias naturais de origem vegetal formados por unidades de isopreno (C₅H₈). Os principais terpenos encontrados em OEs são os monoterpenos (DE SOUSA, 2011; MACHADO et al., 2011) que apresentam duas unidades isoprênicas e 10 átomos de carbono, e os sesquiterpenos, com três unidades isoprênicas e 15 átomos de carbono (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial extraído da planta *Cymbopogon winterianus* de diferentes partes do Brasil mostrou que os dois componentes majoritários são os monoterpenos citronelal e geraniol (BALNK et al., 2007; PEREIRA, 2009; AVOSEH et al., 2015).

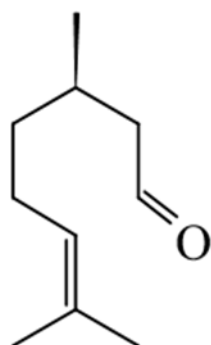
Citronelal é um monoterpeno (Figura 8A) que apresenta-se como líquido oleoso com odor de limão, com fórmula molecular C₁₀H₁₈O, nome IUPAC 3,7-dimetiloct-6-en-1-al (LIU et al., 2016). Este monoterpeno pode ser encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas como: citronela, capim-limão, eucalipto citriodora, entre outros. Citronelal é bastante utilizado em fragâncias nas indústrias cosmética e saneante (AVOSEH et al., 2015).

A literatura também tem evidenciado que o citronelal possui ação anticonvulsivante (MELO et al., 2011a), antinoceptiva (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; SANTOS et al., 2016), antioxidante (MELO et al., 2011b), anti-inflamatória (de SANTANA et al., 2013), antitumoral (MAßBERG et al., 2015), antibacteriana (LOPEZ-ROMERO et al., 2015) bem como antifúngica contra isolados de *Penicillium* (WU et al., 2016), *Aspergillus* (NAKAHARA et al., 2003; AGUIAR et al., 2014); e *Candida* spp. de importância clínica adulta (TRINDADE et al., 2015; SINGH et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

A atividade antifúngica do citronelal contra *Candida albicans* e *Candida* não-albicans foi demonstrada por Singh et al. (2016) com CIM de 1 mg/mL, por Trindade et al. (2015) com CIM₇₅ e CFM_{58,3} de 256 µg/mL e por Oliveira et al. (2016) com CIM₅₀ de 256 µg/mL e CFM₅₀ de 512 µg/mL que consideraram o citronelal como bom agente anti-*Candida*.

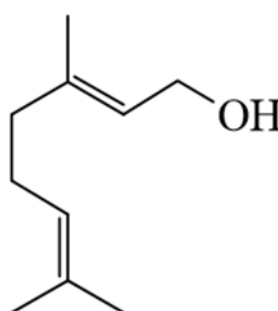
Figura 8: Estruturas químicas do citronelal e geraniol.

A) Citronelal



IUPAC: 3,7-dimetil-oct-6-en-1-al

B) Geraniol



IUPAC: 3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol

Fonte: AVOSEH et al., 2015

Geraniol é um álcool acíclico (Figura 8B), com odor floral, que se apresenta como líquido oleoso ligeiramente amarelo, com fórmula molecular C₁₀H₁₈O e nome IUPAC 3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol (LIU et al., 2016). Este monoterpene pode ser encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas como: citronela, gerânio, limão, laranja, amora e palmarosa (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Além da sua utilização em fragrâncias, a literatura tem evidenciado que o geraniol possui potente atividade repelente e inseticida (JEON et al., 2009; KALLAAYONE et al., 2009); ações anti-helmíntica (HIERRO, 2004), antioxidante (IBRAHIM et al., 2015; OZKAYA et al., 2016), anti-inflamatória (WANG et al., 2016), antinoceptiva (CHIRUMBOLO e BJØRKLUND, 2017), antitumoral (CARNESECCHI et al., 2002; CHO et al., 2016; LEE et al., 2016), cardioprotetiva (CRESPO et al., 2017), antibacteriano (ASAD et al., 2013; MILADINOVIĆ et al., 2014) e antifúngica (MARCOS-ARIAS et al., 2011; SINGH et al., 2016), incluindo contra *Candida albicans* de importância clínica adulta (LEITE et al., 2015).

A propriedade antifúngica do geraniol contra *Candida albicans* foi demonstrada por Leite et al. (2015) com CIM₉₀ de 16 µg /mL, por Tampieri et al. (2005) com CIM de 100 µg/mL, por Sharma (2016) CIM de 30-130 µg/mL e por Shweta et al. (2016) com CIM de 256 µg/mL.

Diante do exposto, a investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus*, bem como do citronelal e geraniol contra cepas do gênero *Candida* de importância clínica pediátrica se apresenta como uma estratégia relevante na procura de novas substâncias com propriedades antifúngicas com a perspectiva de desenvolver nova droga antifúngica, segura e eficaz para o tratamento de candidemias.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAIS DE PESQUISA

O isolamento, identificação e o teste de susceptibilidade antifúngica das cepas clínicas de *Candida* spp. de origem sanguínea foram realizados em um hospital público pediátrico, João Pessoa – Paraíba (PB); os demais ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 POSICIONAMENTO ÉTICO

Para realização deste trabalho foi levado em consideração os aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos, preconizados pela Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). A aquisição das cepas clínicas de *Candida* spp. aconteceu mediante anuência do diretor geral do hospital (Anexo 1) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, sob o Protocolo nº 0721/2016, CAAE: 61847516.50000.5188 (Anexo 2).

4.3 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco®, USA), CHROMagar (Difco®, Detroit, MI, USA), RPMI-1640-L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®/São Paulo/SP/Brasil). Os meios de culturas foram preparados de acordo com as instruções do fabricantes.

4.4 REAGENTES

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* ex Bor foi fornecido pelo Dr. Paulo Alves Wanderley do Centro de Formação de Tecnólogos, Campus III, da UFPB, Bananeiras – PB. Já os monoterpenos (geraniol e citronelal), sorbitol, ergosterol e os

antifúngicos (anfotericina B e fluconazol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. As emulsões, nas diferentes concentrações, foram preparadas no momento de execução dos ensaios, dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e Tween 80 (Sigma-Aldrich®) a 2% e utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada.

Os cartões de identificação fúngica (ID-YST) e do teste de susceptibilidade antifúngica (AST-YS07) foram adquiridos da BioMérieux.

4.5 CEPAS FÚNGICAS

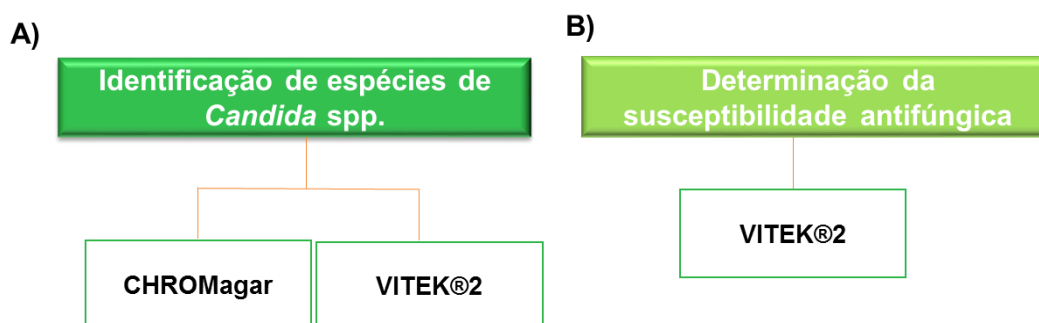
Foram utilizadas quinze cepas clínicas de *Candida* spp., sendo nove cepas de *C. albicans* (AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 e AM-15), 2 cepas de *C. parapsilosis* (AM-05 e AM-14), 2 cepas de *C. tropicalis* (AM-01 e AM-12) e 2 cepas de *C. pelliculosa* (AM-03 e AM-11); e três cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, que fazem parte da Micoteca do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas / CCS / UFPB. Todas as cepas foram mantidas em ASD a uma temperatura de 4°C.

4.5.1 Inóculos

Para preparação dos inóculos, as cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ASD e incubadas à 35-37 °C por 24-48 horas. Colônias desta cultura foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 1,8 a 2,20 de McFarland ajustado por absorbância via calibrador densicheck (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) para os ensaios de identificação e susceptibilidade antifúngica automatizados e padrão 0,5 de McFarland ajustado visualmente ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) para os demais experimentos (CLEELAND e SQUIRES, 1991; HADACEK e GREGER, 2000).

A sequência de metodologias utilizadas para identificação e teste de susceptibilidade antifúngica está apresentada na Figura 9 (A e B).

Figura 9: Resumo esquemático da identificação e teste de susceptibilidade antifúngica utilizado no estudo.



4.6 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS

No período de seis meses, durante a atividade laboratorial de rotina de um hospital público pediátrico foram isoladas cepas clínicas de hemoculturas positivas para *Candida* spp.. Para este estudo, foi considerado pacientes pediátricos crianças de 0 a 17 anos de idade. Um episódio de candidemia foi definido como infecção por *Candida* envolvendo pelo menos uma cultura sanguínea positiva para o micro-organismo. Se vários episódios de candidemia ocorreram no mesmo paciente durante o período de estudo, apenas o primeiro episódio de candidemia foi incluído na análise.

De acordo com as recomendações do Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do documento Procedimento Operacional Padrão (POP) do hospital e das instruções do fabricante do frasco de hemocultura seguem descritos a técnica de coleta, transporte, armazenamento, processamento e interpretação de hemoculturas positivas para *Candida* spp. que foram adotadas para este trabalho (BRASIL, 2013a).

Técnica de coleta:

- ✓ Após seguir todas as recomendações de biossegurança, removeu-se os selos da tampa de frascos de hemocultura pediátrico (Hemoprov III NEWprov, São Paulo

- SP) e fez-se a desinfecção prévia nas tampas com álcool 70%. Manteve-se o algodão sobre o frasco até o momento da coleta.
- ✓ Após escolher a veia do paciente, fez-se antissepsia da pele utilizando algodão embebido em álcool 70%, friccionando a pele em círculos semi-abertos a partir do ponto a ser puncionado, deixando secar por 30 segundos. Repetiu-se o procedimento utilizando novo algodão.
- ✓ Procedeu-se a coleta de 1mL sangue com auxílio de garrote, seringa e agulha estéreis. Sempre que possível coletou-se duas amostras de hemoculturas consecutivamente de dois sítios anatômicos diferentes antes de iniciar a antibioticoterapia.
- ✓ Sem trocar a agulha, dispensou-se o sangue através da tampa, previamente desinfetada, do frasco de hemocultura.
- ✓ Identificou-se cada frasco com as informações do paciente e enviou-se ao laboratório juntamente com a solicitação médica devidamente preenchida.

Transporte e conservação: Os frascos de hemocultura foram enviados ao laboratório imediatamente ou até no máximo duas horas após a coleta, em temperatura ambiente.

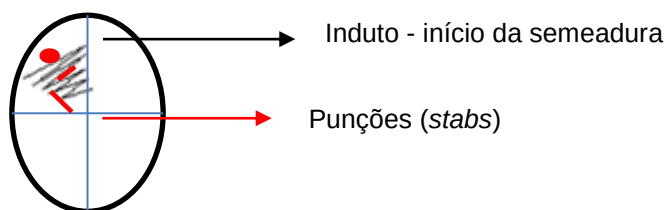
Armazenamento/preservação: Os frascos de hemocultura foram mantidos dentro da estufa (temperatura $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por até 7 dias, quando é feito o último semeio.

Processamento da amostra: Após inspeção inicial e identificação da amostra no caderno de registro de culturas do setor, procedeu-se a semeadura pela técnica de esgotamento conforme descrito a seguir:

Após 24-48 horas de incubação: Homogeneizou-se o frasco moderadamente, invertendo o frasco para cima e para baixo. Fez-se assepsia da tampa do frasco com álcool a 70% e aspirou-se uma alíquota de aproximadamente 0,5mL da amostra com seringa e agulha estéreis. Fez-se o semeio nos meios agar sangue (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e Sabouraud dextrose (ASD) (Difco[®], Detroit, MI, USA). Incubaram-se os meios de agar sangue a 35°C / 24-48h horas / em atmosfera com 5 – 10% de CO_2 e o meio ASD a 35°C / 24-48 horas / atmosfera normal.

- ✓ Se não houve crescimento fúngico evidenciado macroscopicamente nos meios, repetiu-se o procedimento descrito acima após 48, 72 horas e 7 dias após incubação.

Figura 10: Técnica de esgotamento no meio agar sangue



Confecção do Gram a cada semeio:

- ✓ Com o lápis, identificou-se a lâmina (no lado fosco) com o número do protocolo do paciente e o material;
- ✓ Aspirou-se uma alíquota de aproximadamente 0,5mL da amostra com uma seringa e agulha estéreis e transferiu-se para a lâmina, fazendo movimentos circulares delicadamente para espalhar a amostra;
- ✓ Fixou-se no calor da chama do bico de Bunsen e corou-se pelo método de Gram.

A interpretação de cultura positiva para *Candida* spp.. foi seguida conforme o Modulo 8 - Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica do manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde da ANVISA (BRASIL, 2013b). A confirmação do gênero *Candida* bem como a identificação da espécie foram realizadas posteriormente conforme descrito no item 4.7.

Interpretação presuntiva de cultura positiva para *Candida* spp.:

- ✓ Crescimento fúngico nos meios semeados evidenciados pela macromorfologia característica de fungos leveduriformes, colônias brancas de aspecto opaco.
- ✓ Exame microscópico direto com salina: uma gota de salina e uma alçada da cultura suspeita de *Candida* spp. foram depositadas numa lâmina de microscopia, colocou-se uma lamínula sob a preparação e com a objetiva de 10x e 40x a lâmina foi analisada. O aspecto morfológico se apresentou como células leveduriformes em brotamento, únicas ou múltiplas, em geral de forma arredondada ou alongada.
- ✓ Exame microscópico com coloração pelo método de Gram: A distensão sanguínea foi corada pelo método de Gram e a lâmina avaliada em microscópio ótico na objetiva de imersão (100x). O aspecto morfológico se apresentou como células leveduriformes em brotamento, únicas ou múltiplas, em geral de forma arredondada ou alongada. Presença

ou não de pseudo-hifas. Todas as estruturas foram Gram-positivas.

- ✓ Exame microscópico direto com tinta nanquim: A pesquisa de cápsula, característica marcante das leveduras do gênero *Cryptococcus*, foi feita com uma gota de tinta nanquim e uma alçada da cultura. A cápsula, constituída de material polissacarídico, aparece como um halo claro ao redor dos blastoconídios de *Cryptococcus* e contrastam com o fundo negro da lâmina. O aspecto morfológico observado foi ausência do halo claro ao redor das leveduras, sugerindo portanto, negatividade para a pesquisa da capsula.

Os isolados de *Candida* spp. foram semeados em agar Sabouraud dextrose – ASD (Difco[®], Detroit, MI, USA) e incubados a 35° C por 24 ou 48 horas. As cepas foram mantidas em ASD a 4 ° C até serem processados para o estudo. Foram transportados ao laboratório de Micologia da UFPB para realização dos ensaios farmacológicos. 24 ou 48 horas antes de cada teste, os isolados foram subcultivados em ASD e CHROMagar (Difco[®], Detroit, MI, EUA) para garantir pureza e viabilidade.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS

4.7.1 Identificação presuntiva por CHROMagar *Candida*

CHROMagar *Candida* é um meio seletivo e diferencial que contém substratos cromogênicos que reagem com enzimas produzidas pelos micro-organismos produzindo colônias com várias pigmentações. Essas enzimas são espécie específicas, permitindo que as leveduras sejam identificadas ao nível de espécie por suas características de colônia e cor (VIJAYA et al., 2011; GOLIA et al., 2013; SARIGUZEL et al., 2015). Todas as cepas isoladas foram semeadas no meio CHROMagar *Candida* (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas em estufa 35 a 37 ° C durante 48 horas. A morfologia das colônias, incluindo cor, tamanho e textura no meio, foi analisada como instruções do fabricante. A produção de cor e morfologia foram registradas e fotografadas.

4.7.2 Confirmação da identificação pelo sistema VITEK[®]2

A confirmação de identificação das leveduras foi realizada pelo sistema comercial automatizado VITEK[®]2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) usando o cartão de identificação (ID-YST). A preparação e análises dos isolados foram realizadas

de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, a suspensão de cada cepa clínica foi inoculada diretamente no equipamento VITEK®2 com cartão ID-YST. A identificação da levedura foi baseada em testes bioquímicos e atividades enzimáticas. Após um período de incubação de 15 h, o resultado foi comparado ao banco de dados ID-YST, o que levou à identificação final do micro-organismo (PFALLER et al., 2007; ECE, 2014). As taxas de prevalência de espécies de *Candida* foram calculadas.

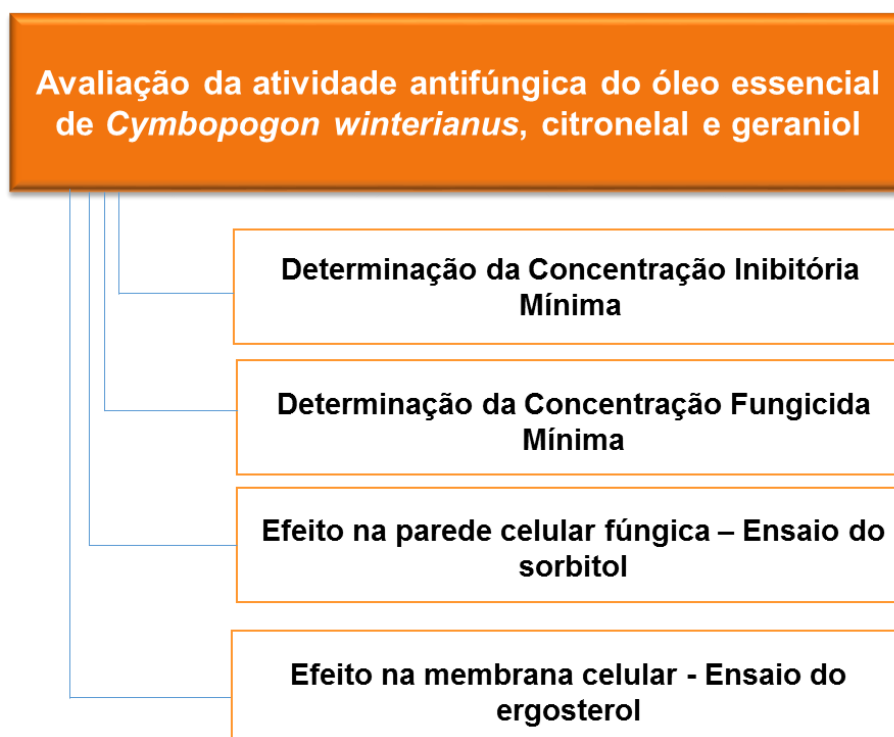
O cartão de identificação (ID-YST) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) contém 64 micropoços, onde cada poço contém substratos de identificação que permite identificar mais que 50 leveduras diferentes e baseia-se em 46 testes bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, a utilização da fonte de nitrogênio e as atividades enzimáticas (FARINA et al., 2011).

4.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS FÚNGICAS CLÍNICAS

A susceptibilidade antifúngica das cepas clínicas para a anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina e flucitosina foi realizada no sistema VITEK®2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), usando o cartão de susceptibilidade fúngica (AST-YS07) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a suspensão de cada levedura foi inoculada junto com o cartão AST-YS07 diretamente no aparelho VITEK®2. O cartão AST-YS07 continha diluições em série dos antifúngicos citado acima. Após o período de 18 h de incubação, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para cada cepa clínica. Os resultados das CIMs foram utilizados para atribuir aos isolados as categorias sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R), com base no ponto de corte da configuração do VITEK®2 "documentos M27-S4 da CLSI 2012 + EUCAST 2012" aplicada na rotina diagnóstico no momento do estudo (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2008; PFALLER et al., 2012; ECE, 2014).

A sequência de metodologias utilizadas para a investigação da atividade do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol está apresentada na Figura 11.

Figura 11: Resumo esquemático das metodologias utilizadas na investigação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol.



4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM dos produtos: óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal, geraniol, anfotericina B e fluconazol foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (CLEELAND e SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2006; MOREIRA et al., 2010). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do caldo RPMI-1640 duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da emulsão dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontra a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, colocando-se nas cavidades 100 µL do caldo RPMI-1640 duplamente concentrado, 100

μL de água destilada estéril e 10 μL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo solvente utilizado na preparação das emulsões (DMSO 5% e Tween 80 2%), foi feito um controle no qual foi colocado nas cavidades 100 μL do caldo RPMI-1640 duplamente concentrado, 100 μL da solução DMSO 5% e Tween 80 2%) e 10 μL da suspensão. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 μL do caldo RPMI-1640 em orifícios sem a suspensão dos fungos. As placas foram seladas e incubadas a 35-37°C por até 24-48 horas para realização da leitura.

A CIM para os produtos testados foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. A CIM₅₀ e CIM₉₀ foi considerada como a concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico no mínimo 50% e 90%, respectivamente. Houve três experimentos independentes em duplicata em diferentes ocasiões. Os resultados foram expressos como a média aritmética das CIMs. A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os critérios de Sartoratto et al., (2004): 50-500 $\mu\text{g/mL}$ = forte/ótima atividade; 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade; > de 1500 $\mu\text{g/mL}$ = fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007); ou de Morales et al., (2008): CIM <100 $\mu\text{g/mL}$ = forte/ótima atividade; CIM 100-500 $\mu\text{g/mL}$ = atividade moderada; CIM 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ = fraca atividade e CIM >1000 $\mu\text{g/mL}$ = produto inativo ou nenhum efeito antimicrobiano (MORALES et al., 2008).

4. 10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 20 μL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico nas placas de microdiluição foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 35-37 °C por 24-48 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração em que o crescimento foi inferior a 3 colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Os ensaios foram realizados em duplicata em três experimentos independentes e os resultados expressos pela média aritmética das CFMs (ESPINEL-INGROFF et al., 2002; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

A relação CFM/CIM foi usada para especificar a natureza do efeito antimicrobiano contra um patógeno particular. De acordo com Hafidh e colaboradores,

quando a relação CFM/CIM está entre 1:1 e 2:1, o produto químico é considerado fungicida. Por outro lado, se a relação é $> 2:1$, é mais provável que seja fungistático (HAFIDH et al., 2011).

4.11 EFEITOS NA PAREDE CELULAR - ENSAIO COM SORBITOL

Este método se baseia na medida dos danos que os compostos com atividade antifúngica produzem aos componentes da parede celular fúngica. Caso o produto atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIMs dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos.

A determinação da CIM do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol, frente às cepas de *Candida albicans* (AM-09 e ATCC 60193) na presença do sorbitol, foram realizada pela técnica de microdiluição, conforme descrito anteriormente. Neste caso foi utilizado caldo de RPMI previamente adicionado de sorbitol (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ) (PM = 182,17) a 0,8 M. Após incubação a 35-37 °C, as placas foram lidas após 48 horas e 7 dias (FROST, 1995; ZACCHINO, 2001). Este ensaio foi realizado em dois experimentos independentes, em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos resultados.

4.12 EFEITOS NA MEMBRANA CELULAR - INTERAÇÃO COM O ERGOSTEROL

Na perspectiva de investigar os efeitos dos compostos na membrana celular de cepas de *Candida* spp., o ensaio de interação com o ergosterol foi realizado, conforme descrito a diante:

Muitos fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, ocasionando danos à membrana celular fúngica (VALGUS, 2003). Caso os efeitos dos produtos naturais sobre a célula fúngica sejam devido à ligação ao ergosterol presente na membrana, pode-se verificar se esses produtos interagem diretamente com o esterol. Pois, na presença de ergosterol exógeno no meio de cultura ocorrerá prevenção na ligação dos produtos ao ergosterol da membrana. Dessa maneira, a CIM dos produtos tendem a aumentar na presença do ergosterol exógeno, porque precisará de uma

concentração muito maior deles para que possam interagir com ergosterol da membrana fúngica.

A determinação da CIM do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol, frente às cepas de *Candida albicans* (AM-09 e ATCC 60193) na presença do ergosterol exógeno, foram realizada pela técnica de microdiluição, conforme descrito anteriormente. Neste caso foi utilizado o meio RPMI-1640 previamente adicionado 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich®). Os valores de CIM dos produtos foram então comparados na ausência e presença de ergosterol exógeno. Foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B visto que possui mecanismo de ação conhecido, no qual ocorre interação com ergosterol da membrana, para servir de controle positivo dos resultados. As CIMs foram determinadas após 48 horas de incubação a 35-37 °C. (ESCALANTE et al., 2008). Este ensaio foi realizado em dois experimentos independentes, em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Candidemia in pediatric hospital in the city of João Pessoa, Brazil:

Identification, prevalence and antifungal susceptibility

Artigo submetido na Revista Cubana de Farmácia.

ISSN: 0034-7515, Qualis CAPES na área de Farmácia B4

Candidemia in pediatric hospital in the city of João Pessoa, Brazil: Identification, prevalence and antifungal susceptibility

Ana Luísa de Araújo Lima^I, Lilian Sousa Pinheiro^I, Abrahão Alves de Oliveira Filho^{II}, Edeltrudes de Oliveira Lima^I, José Pinto de Siqueira Júnior^I

^IProgram in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

^{II}Academic Unit Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Paraíba, Brazil

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were to identify yeasts of the genus *Candida* and establish the prevalence of *Candida* species, in a six-months period, isolated from peripheral blood of pediatric patients hospitalized in a public pediatric hospital of the city of João Pessoa, Brazil, as well evaluate the antifungal susceptibilities of strains.

Methods: The yeasts were isolated from blood of patients treated at the public pediatric hospital of the city of João Pessoa, Brazil. Identification of *Candida* was performed using CHROMagar and VITEK[®]2 systems. Antifungal susceptibility was determined by using VITEK[®]2 fungal susceptibility cards and results were evaluated by using the CLSI M27-S4 document.

Results: In a six months period, a total of 15 yeasts were isolated and *Candida albicans* was the most frequent species (9) with prevalence rate of 60%. The prevalence of *Candida* non-*albicans* species (6) was 40%, including 13.33% to *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa*. All isolates were susceptible to amphotericin B, flucytosine, micafungin and caspofungin. Only one strain of *C. albicans* were found to be intermediate to fluconazole and voriconazole.

Conclusion: *Candida albicans* was the predominant species followed by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. pelliculosa*. In addition, our study did not found resistant isolates to antifungal agents over the trial period. This is the first description of prevalence and antifungal susceptibility profile of *Candida* species in João Pessoa, Brazil in this population.

Keywords: Candidemia; *Candida* spp.; pediatric; identification; prevalence; antifungal susceptibility; Brazil.

RESUMEN

Objetivo: Los objetivos de este estudio fueron identificar las levaduras del género *Candida* y establecer la prevalencia de las especies de *Candida*, en el período de seis meses, aislado a partir de sangre periférica de pacientes pediátricos hospitalizados en un hospital pediátrico público de la ciudad de João Pessoa, Brasil, así como evaluar la susceptibilidad antifúngica de cepas.

Métodos: Las levaduras se aislaron a partir de sangre de los pacientes tratados en el hospital pediátrico público de la ciudad de João Pessoa, Brasil. La identificación de *Candida* se ha realizado mediante sistemas Chromagar y VITEK[®]2. susceptibilidad

antifúngica se determinó mediante el uso de VITEK®2 tarjetas de susceptibilidad de hongos y los resultados se evaluaron utilizando el documento CLSI M27-S4.

Resultados: En el período de seis meses, un total de 15 levaduras se aislaron y *Candida albicans* fue la especie más frecuente (9) con una tasa de prevalencia del 60%. La prevalencia de especies no *albicans Candida* (6) fue de 40%, incluyendo a 13: 33% *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. pelliculosa*. Todas las cepas fueron sensibles a la anfotericina B, flucitosina, micafungina y caspofungina. Sólo se encontró una cepa de *C. albicans* a ser intermedia a fluconazol y voriconazol.

Conclusión: *Candida albicans* fue la especie predominante seguida por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. pelliculosa*. En addition, nuestro estudio no se encuentran aislados resistentes a los antifúngicos más el período de prueba. Esta es la descripción primera de prevalencia y perfil de susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* en Joao Pessoa, Brasil en esta población.

Palabras clave: Candidemia; *Candida* spp.; pediátricos; de identificación; de prevalência; sensibilidad antifúngica; Brasil.

INTRODUCTION

Candidemia is an important concern in the clinical medicine related to the public health, mainly because of the high mortality rates in hospitalized and immunocompromised children. Worldwide, *Candida* species represents the third most common cause of healthcare-acquired blood stream infections (BSI) and the mortality associated with pediatric candidiasis can exceeds 30%.^{1,2} In Brazil, the incidence of candidemia in terciary public hospitals is approximately 2.5 per 1000 hospital admission³, however candidemia data of pediatric patients are still sparse.⁴ *Candida* spp., particularly *C. albicans*, are a classical opportunistic pathogen residing harmlessly as a commensal in approximately 50% of individuals, kept in check by immune system and a protective bacterial microbiome of the gut and other mucosal surfaces. This fungus can also cause systemic infection and induce damage to many organs especially in immunocompromised patients.⁵

The few studies about candidemia in the pediatric population in Brazil showed that *C. albicans* remains the most frequent species of yeast isolated from BSI in hospitalized children, but candidemias caused by non-albicans species has been increasing. The isolates of *C. non-albicans* species includes *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. pararugosa*.^{6,7} Moreover, invasive infections caused by non-albicans species are more difficult to be treated due to its innate or acquired resistance to antifungal agents with consequent increase in

therapeutic failure. Therefore the treatment administration should be based on the species-level identification and antifungal susceptibility.⁷

Considering that in Brazil, particularly in northeastern, there are few data about the prevalence and antifungal susceptibility profile of *Candida* species on candidemia episodes in pediatric population, this study had as its objective to identify yeasts of the genus *Candida* isolated from peripheral blood of pediatric patients hospitalized in a public hospital of the city of João Pessoa, Paraíba, Brazil, and establish its prevalence, as well as evaluate the antifungal susceptibilities of strains, in a six-months period.

MATERIAL AND METHODS

CLINICAL YEAST ISOLATION

In period of six-months, 15 clinical yeasts of *Candida* sp.-positive blood culture of pediatric patients between 0 and 18 years of age detected during the routine activity of the pediatric hospital in João Pessoa, Paraíba, Brazil, were included for identification and antifungal susceptibility test. An episode of candidemia was defined as *Candida* infection involving at least one blood culture. If multiple episodes of candidemia occurred in the same patient during the study period, only the first episode of candidemia was included in the analysis. The isolates were maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) at 35 or 4°C until processed for the study. 24 or 48 hours before testing, each isolate was subcultured on SDA (Difco, Detroit, MI, USA) and CHROMagar (Difco, Detroit, MI, USA) to ensure purity and viability. This study was submitted to the local ethics committee of Health Sciences Center of Federal University of Paraíba, Brazil.

PRESUMPTIVE IDENTIFICATION BY CHROMAGAR CANDIDA

CHROMagar *Candida* is a selective and differential medium that contains chromogenic substrates that react with enzymes secreted by microorganisms producing colonies with various pigmentations. These enzymes are species specific, allowing yeasts to be identified to the species level by their colour and colony characteristics.^{8,9} All strains were plated on CHROMagar *Candida* (Difco, Detroit, MI, USA) for 48 hours at 37°C.

The morphology of colonies, including color, size, and textures on medium, was analyzed as manufacturer's instructions. The production of color and morphology were recorded and the photographs were recorded.

IDENTIFICATION CONFIRMATION BY VITEK®2 SYSTEM

The yeasts identification confirmation was performed by the VITEK®2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automated commercial system using the identification card (ID-YST). Preparation and analyses of isolates were performed according to the manufacturer's instructions. In summary, yeast suspension was directly inoculated into VITEK®2 equipment with ID-YST card. The yeast identification was based on biochemical tests and enzymatic activities. After an incubation period of 15 h, the profile result was compared to the ID-YST database, which led to the final identification of the microorganism.¹⁰ The *Candida* species prevalence rates were calculated.

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING

Antifungal susceptibility for amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin, micafungin and flucytosine was performed on VITEK®2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) system, using the fungal susceptibility card (AST-YS07) against all strains and according to the manufacturer's instructions. Briefly, yeast suspension was directly inoculated into VITEK®2 susceptibility testing device using AST-YS07 cards that contained serial twofold dilutions of antifungals. After the incubation period, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each yeast. The MICs results were used to assign isolates into susceptible (S), intermediate (I), or resistant (R) category, based on the VITEK®2 breakpoint setting “document M27-S4 from CLSI 2012” applied in the routine diagnostics at the time of the study.^{10,11}

RESULTS

The presumptive identification by CHROMagar *Candida* exhibited nine strains green colonies (Fig. 1B, D, F, G, H, I, J, M and O) and two dark blue colonies (Fig. 1A and L)

featuring *C.albicans* and *C.tropicalis*, respectively. Four strains exhibited pink colonies dark to pale (Fig. 1C, E, K and N) which did not allow to identify the species level, these strains were characterized as *Candida* spp.

The VITEK®2 system identified nine strains as *C.albicans* (AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 and AM-15), two as *C.tropicalis* (AM-01 and AM-12), two as *C.parapsilosis* (AM-05 and AM-14) and two as *C. pelliculosa* (AM-03 and AM-11) – Table 1. All isolates had a single identification with a confidence value or probability of $\geq 98.0\%$.

As show in table 2, the prevalence rate of *Candida albicans* was 60% and non-albicans species was 40%. The other microorganisms prevalence rate was 13.33% to *C.*

tropicalis, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa*.

Susceptibility of different *Candida* species to antifungal agents: amphotericin B, caspofungin, micafungin, fluconazole, voriconazole and flucytosine; and the MICs range of antifungal agents are presented in Table 3. Eight (88.89%) of all *C. albicans* isolates was found to be susceptible to all antifungal agents tested; only one (11.11%) of *C. albicans* isolates were intermediate to voriconazole (MIC 2 $\mu\text{g/mL}$) and fluconazole (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$). In addition, all isolates (100%) of *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. pelliculosa* were susceptible to the antifungal agents tested.

DISCUSSION

The identification of *Candida* isolates to the species level is required to aid the selection of the appropriate antifungal agent for treatment of invasive candidiasis.^{12,13} The conventional methods of yeast identification (which mainly consist of assimilation and fermentation characteristics) may take several days, the use of available chromogenic media and automated systems helps to reduce the time for isolation and identification and allows to start early the therapeutic regime. Moreover, assists the control the rise in antifungal agent resistance by reducing the time taken for presumptive identification.^{13,14}

During the six-months period, a total of 15 episodes of candidemia were detected and all clinical strains of yeasts were initially identified by CHROMagar system. As can be seen in fig. 1, nine strains exhibited green colonies (fig. 1 B, D, F, G, H, I, J, M and O)

and two dark blue colonies (fig. 1 A and L) featuring *C.albicans* and *C.tropicalis*, respectively. Four strains exhibited pink colonies dark to pale (fig. 1 C, E, K and N) which did not allow to identify the species level, these strains were characterized as *Candida* spp.

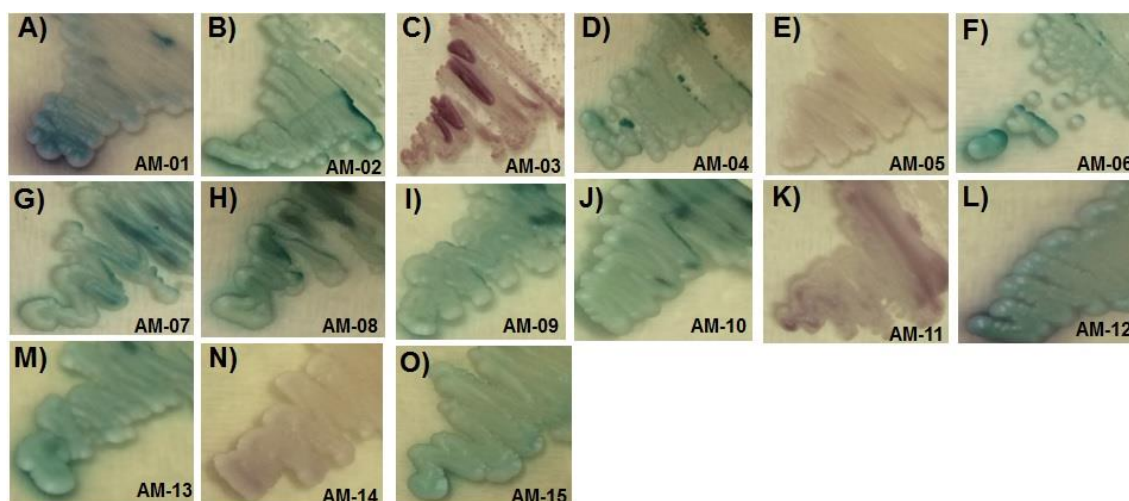


Fig. 1. Identification of *Candida* isolates from candidemias in pediatric patients by CHROMagar *Candida*.

In our study, all *Candida* species, which were identified by CHROMagar were confirmed by VITEK®2 system that identified nine strains as *C.albicans* (AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 and AM-15), two as *C.tropicalis* (AM-01 and AM-12), two as *C.parapsilosis* (AM-05 and AM-14) and two as *C. pelliculosa* (AM-03 and AM-11). For all isolates, the confidence values or probability of yeast identification was $\geq 98.0\%$ (table 1). Thus, the CHROMagar *Candida* was able to identify correctly 11 strains: 9 *C. albicans* and 2 *C. tropicalis*. These results are in agreement with the literature, which reports that the specificity and sensitivity of the medium is high only for *C.albicans*, *C.tropicalis* and *C. krusei*^{15,16} and the VITEK®2 system is an accurate method that is able to identify 50 different yeasts based on 47 biochemical tests that measure the utilization of a carbon source, use of a nitrogen source, and enzyme activities.^{12,13,17}

Table 1. Identification of *Candida* isolates from candidemias in pediatric patients by VITEK®2 automated system.

Isolates	Species	Probability (%)
AM-01	<i>C. tropicalis</i>	99
AM-02	<i>C. albicans</i>	99
AM-03	<i>C. pelliculosa</i>	98
AM-04	<i>C. albicans</i>	99
AM-05	<i>C. parapsilosis</i>	99
AM-06	<i>C. albicans</i>	98
AM-07	<i>C. albicans</i>	98
AM-08	<i>C. albicans</i>	99
AM-09	<i>C. albicans</i>	99
AM-10	<i>C. albicans</i>	99
AM-11	<i>C. pelliculosa</i>	99
AM-12	<i>C. tropicalis</i>	99
AM-13	<i>C. albicans</i>	99
AM-14	<i>C. parapsilosis</i>	98
AM-15	<i>C. albicans</i>	99

The frequency of *Candida* varies geographically, which might reflect differences among patients, hospitals, health care assistance, and hospital epidemiology.^{18,19} In our study, as can be seen in table 2, the prevalence rate of *Candida albicans* was 60% and non-*albicans* species was 40%. These data are in agreement with studies that demonstrate *C. albicans* is the most frequent species, 40-60%, of yeast isolated from candidemia in children.^{3,20,21} However, study performed in Brazil by Oliveira et al. (2014) that evaluated the frequency of *Candida* species in 104 yeasts isolated from blood of pediatric patients in a public hospital of the city of São Paulo during a four-year period, showed for *C. albicans* and non-*albicans* a prevalence rate of 37.5% and 62.5%, respectively.⁷ We emphasize in our study that 15 children with fungemia were observed in a shorter period than the study previously mentioned. Another study performed in Brazilian pediatric patients in a hospital in Porto Rico, the non-*albicans* species represented around 83% of the isolates; meanwhile *C. albicans* was responsible for 17% of the cases.²² Finally, Hinrichsen et al. (2008) conducted a study on candidemia to investigate the species distribution in a hospital in Recife, northeastern Brazil and concluded that non-*albicans* species accounted for more than 50% of the cases.²³ This difference in results can be explained by the limitation of our study that used small sized samples.

In addition, our results demonstrated the prevalence rate to *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa* was 13.33% (table 2). Similar results are described by different authors that reported *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* as the non-*albicans* species most

commonly isolated among fungemic pediatric patients.^{7,18,19} However, fungemia due to *C. pelliculosa* have been reported rarely in the literature, in most cases in pediatric patients and the transmission is associated with cross-contamination of the hands of healthcare workers or parentes.^{24,25,26} Therefore, the epidemiological relevance of this study should be highlighted considering that in Brazil are few cases reported of *C. pelliculosa* as etiologic agent of candidemia.^{7,25}

Table 2. *Candida* species prevalence rates.

Species	Total	Prevalence (%)
<i>C. albicans</i>	9	60.00
<i>Non-albicans</i> species	6	40.00
<i>C. tropicalis</i>	2	13.33
<i>C. parapsilosis</i>	2	13.33
<i>C. pelliculosa</i>	2	13.33

Considering the susceptibility patterns of *Candida* spp. are unknown in the hospital cited in this study and the emergence of resistance to antifungal agents described in the literature, we performed the antifungal susceptibility test to evaluate the susceptibility profile of clinical isolates by using the VITEK[®]2 system. The results were evaluated by CLSI M27-S4 document and are summarized in table 3. Eight (88.89%) of all *C. albicans* isolates was found to be susceptible to micafungin, caspofungin, flucytosine, fluconazole, voriconazole and amphotericin B. However, one (11.11%) of *C. albicans* isolates were intermediate to voriconazole (MIC 2 µg/mL) and fluconazole (MIC 4 µg/mL), suggesting that resistance to azole agents may occur. Similarly to our data, other authors referred up to 100% of *C.albicans* isolated in blood cultures were susceptible to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin.^{27,28,29}

Additionally, all (100%) *C.parapsilosis* *C. tropicalis* and *C. pelliculosa* isolates included in this study were susceptible to all the studied antifungals (table 3). Our data is consistent with previous Brazilian series where fluconazole resistance is basically confined to *C. glabrata* and *C. krusei* strains. Moreover, the literature demonstrated that antifungal resistance was not common in strains of pediatric population in Brazil^{3,7}, especially *Candida* resistance to echinocandins and amphotericin B.^{27,29,30} On the other hand, recently, Bizerra et al. (2014) published the first case of echinocandin resistance in Brazil.³¹ In general, we did not detect antifungal agents-resistant *Candida* strains in

our study, suggesting that the detection of resistant isolates was not a common phenomenon in the public pediatric hospital in João Pessoa.

Table 3. Antifungal susceptibility profile of isolates of *Candida* spp. of candidemias in pediatric patients by VITEK®2 automated system.

Antifungal/Species (n° of isolates)	Antifungal susceptibility			MIC (µg/mL)
	Category			Range
	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)	
Amphotericin B (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-1
<i>C.albicans</i> (9)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-1
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-0.5
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-1
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-0.5
Caspofugin (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-1
<i>C.albicans</i> (9)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-0.25
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-0.25
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.5-1
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-0.25
Micafungin (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0.06-0.5
<i>C.albicans</i> (9)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0.06-0.06
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.06-0.06
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-0.5
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.06-0.06
Fluconazole (15)	14 (93.34)	1 (6.66)	0 (0)	1-4
<i>C.albicans</i> (9)	8 (88.89)	1 (11.11)	0 (0)	1-4
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	4-4
Voriconazole (15)	14 (93.34)	1 (6.66)	0 (0)	0.12-2
<i>C.albicans</i> (9)	8 (88.89)	1 (11.11)	0 (0)	0.12-2
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.12-0.12
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.12-0.12
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25-0.5
Flucytosine (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C.albicans</i> (9)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1
<i>C. pelliculosa</i> (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1-1

Legend: MIC: minimum inhibitory concentration; Susceptible, intermediate and resistant according to the recommended breakpoints given by the CLSI M27-S4, 2012.

Given the results presented, it can be concluded that the predominant species of the *Candida* genus, isolated from candidemia in pediatric patients in this public hospital in João pessoa, Paraíba, Brazil, was *Candida albicans* followed by *C. parapsilosis*, *C.*

tropicalis and *C. pelliculosa*. In addition, our study did not find resistant isolates to amphotericin B, caspofungin, micafungin, fluconazole, voriconazole and flucytosine over the trial period. It has been shown the importance of such infections caused by *Candida* species in this population, and thus, this study provides local epidemiologic data possibly useful both for diagnosis and treatment.

We emphasize that continuous monitoring is needed to assess trends in this institution and more comprehensive studies in local pediatric hospitals are needed to better characterize the epidemiology and the antifungal susceptibility profile of candidemia in these health units and we recognize the importance of such information to impact empiric antifungal therapy.

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

1. Steinbach WJ. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. *J Fungi* 2016;2:5.
2. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JÁ, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005;41:1232–1239.
3. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006;44:2816–23.
4. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010;51:561-70.
5. da Silva AD, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 2016;34:111-118.
6. Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia* 2013;175:231-9.
7. Oliveira VKP, Ruiz LS, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo ASA, Nishikaku AS, Paula CR. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in

the city of são paulo, brazil: study in the period 2007-2010. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014;56:301-305.

8. Vijaya D, Harsa TR, Nagaatnamma T. *Candida* specification using chrom agar. *J Clin and Diagn Res* 2011;5:755–777.

9. Golia SK, Reddy KM, Karjigi S, Hittinahalli V. Speciation of *Candida* using chromogenic and corn meal agar with determination of fluconazole sensitivity. *Al Amen J Med Sci* 2013;6:163–166.

10. Ece G. Distribution of Yeast-Like Fungi at a University Hospital in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7:e13141.

11. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50(9):2846–56.

12. Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK. Identification of Uncommon *Candida* Species Using Commercial Identification System. *J Microbiol Biotechnol* 2016;26(8)(Epub ahead of print).

13. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Pol J Microbiol* 2016;65:111-114.

14. Nadeem [SG](#), Hakim ST, Kazmi [SU](#). Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med* 2010;5:2144.

15. Baumgartner C, Freydiere A, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996;34:454-456.

16. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHRO-Magar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34:58-61.

17. Graf B, Thomas A, Edith Z, Ulf B. Göbel. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1782–85.

18. Spiliopoulou A, Vamvakopoulou S, Bartzavali C, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED, Christofidou M. Eleven year retrospective survey of candidaemia in a university hospital in southwestern Greece. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1378–81.

19. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2006;44:760–3.
20. Festekjian A, Neely M. Incidence and predictors of invasive candidiasis associated with candidemia in children. *Mycoses* 2011;54:146-53.
21. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Corte J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *Plos One* 2013;8:e59373.
22. Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, Colón E, Sánchez-Rivera C, Nieves-Plaza M, et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *ProHealth Sci* 2010;29:26-9.
23. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L, Rêgo L, Lira C, Almeida L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2208;41:394-398.
24. Kalkancı A, Dizbay M, Turan O, Fidan I, Yalçın B, Hirfanoğlu I, Kuştimur S, Aktaş F, Sugita T. Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2010;52:42-49.
25. da Silva CM, de Carvalho Parahym AM, Leão MP, de Oliveira NT, de Jesus Machado Amorim R, Neves RP. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a neonatal intensive care unit: a possible clonal origin. *Mycopathologia* 2013;175:175-9.
26. Otağ F, Yarpuzlu M, Gülbudak H, Arslanköylü AE, Fouad AA, Emekda G. *Candida Pelliculosa* Fungemia Cases in Pediatric Intensive Care Unit. *J Pediatr Inf* 2015;9:85-9086.
27. Motta AL, Almeida GM, Almeida JN Júnior, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis* 2010;14:441–8.
28. Da Costa VG, Quesada RM, Abe AT, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia* 2014;178:243–50.
29. Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoSOne* 2016;11(1):e0146909.

30. Santos ER, Dal forno CF, Hernandez MG, Kubiça TF, Venturini TP, Chassot F, Santurio JM, Alves SH. Susceptibility of candida spp. isolated from blood cultures as evaluated using the m27-a3 and new m27-s4 approved breakpoints. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2014;56:477-482.
31. Bizerra FC, Jimenez-Ortigosa C, Souza ACR, Breda GL, Queiroz-Telles F, Perlin DS, et al. Breakthrough Candidemia Due to Multidrug-Resistant Candida glabrata during Prophylaxis with a Low Dose of Micafungin. Antimicrob. Agents Chemother 2014;58:2438–40.

**5.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela)
sobre isolados de *Candida albicans* de importância clínica pediátrica**

Artigo submetido na Revista Cubana de Planta Medicinales.

ISSN: 1028-4796, Qualis CAPES na área de Farmácia B4

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) sobre isolados de *Candida albicans* de importância clínica pediátrica

Actividad antifúngica del aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) en aislados de *Candida albicans* de importancia clínica pediátrica

Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* (citronela) essential oil on *Candida albicans* isolates of pediatric clinical importance

Ana Luísa de Araújo Lima^I, Ana Luiza Alves de Lima Pérez^{II}, Janiere Pereira de Sousa^I, Lilian Sousa Pinheiro^I, Abrahão Alves de Oliveira Filho^{III}, Edeltrudes de Oliveira Lima^I, José Pinto de Siqueira Júnior^I

^I Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba (PB), Brasil.

^{II} Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal da Paraíba (PB), Brasil.

^{III} Unidade acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal de Campina Grande (PB), Brasil.

Contato: Ana Luísa de Araújo Lima, e-mail: analuisalima2@hotmail.com

RESUMO

Introdução: Candidemia é uma importante preocupação na medicina clínica pediátrica, principalmente por causa das altas taxas de mortalidade em crianças hospitalizadas e imunocomprometidas. O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* possui propriedades farmacológicas, incluindo atividade antifúngica

Objetivo: avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) contra isolados de *Candida albicans* de importância clínica pediátrica.

Métodos: A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelas técnicas de microdiluição em caldo. Também investigamos o possível mecanismo de ação do óleo essencial sobre a parede (0,8 M sorbitol) e membrana celulares (ligação do óleo essencial *C. winterianus* ao ergosterol).

Resultados: Para 80% dos isolados, a CIM do óleo foi 128 µg/mL e para 90% das cepas, a CFM foi 256 µg/mL. Envolvimento com a parede celular e ligação ao ergosterol foram excluídos como possíveis mecanismos de ação.

Conclusão: Assim, o óleo essencial de *C. winterianus* apresentou potencial antifúngico *in vitro* contra cepas de *C. albicans*, mas não envolveu ação sobre a parede celular ou ergosterol e mais estudos são necessários para descrever completamente o seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: atividade antifúngica; *Cymbopogon winterianus*; óleo essencial; *Candida albicans*; candidemia; criança.

RESUMEN

Introducción: La candidemia es una preocupación importante en la medicina clínica pediátrica, principalmente debido a las altas tasas de mortalidad en niños hospitalizados e inmunocomprometidos. El aceite de *Cymbopogon winterianus* esencial tiene propiedades farmacológicas, incluyendo la actividad antimicrobiana.

Objetivos: evaluar el aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) para la actividad antifúngica contra cepas de *Candida albicans* de importancia clínica pediátrica.

Métodos: La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración fungicida mínima (MFC) se determinaron mediante las técnicas de microdilución en caldo. También se investigó la posible acción esencial del aceite en las paredes celulares (sorbitol 0,8 M) y las membranas celulares (aceite de *C. winterianus* esencial para la unión al ergosterol).

Resultados: Para el 80% de los aislamientos, la CIM del aceite fue de 128 µg / mL; Y para el 90% de cepas, el MFC fue de 256 µg / mL. La participación con la pared celular y la unión al ergosterol se excluyeron como posibles mecanismos de acción.

Conclusiones: Por lo tanto, el aceite esencial de *C. winterianus* mostró un potencial antifúngico in vitro contra cepas de *C. albicans*, pero no implicó acción sobre la pared celular o ergosterol y se necesita un estudio adicional para describir completamente su mecanismo de acción.

Palabras clave: actividad antifúngica, *Cymbopogon winterianus*, aceite esencial, *Candida albicans*; candidemia; niño.

ABSTRACT

Introduction: Candidemia is an important concern in the pediatric clinical medicine, mainly because of the high mortality rates in hospitalized and immunocompromised children. *Cymbopogon winterianus* oil essential has pharmacological properties, including antimicrobial activity.

Objective: to evaluate the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) for antifungal activity against *Candida albicans* isolates of pediatric clinical importance.

Method: The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the broth microdilution techniques. We also investigated possible oil essential action on cell walls (0.8M sorbitol) and cell membranes (*C. winterianus* oil essential to ergosterol binding).

Results: For 80% of isolates, the MIC of the oil was 128 µg/mL and for 90% of strains, the MFC was 256 µg/mL. Involvement with the cell wall and ergosterol binding were excluded as possible mechanisms of action.

Conclusion: Thus, *C. winterianus* oil essential showed *in vitro* antifungal potential against strains of *C. albicans*, but did not involve action on the cell wall or ergosterol and further study is needed to completely describe its mechanism of action.

Keywords: antifungal activity; *Cymbopogon winterianus*; essential oil; *Candida albicans*; Candidemia; child.

INTRODUÇÃO

Candidemia é uma importante preocupação na medicina clínica pediátrica, principalmente por causa das altas taxas de mortalidade em crianças hospitalizadas e imunocomprometidas. Mundialmente, as espécies de *Candida* representam a terceira causa mais comum de infecções adquiridas de corrente sanguínea (ICS) e a mortalidade associada à candidíase pediátrica pode ultrapassar 30%¹. *Candida* spp., particularmente *C. albicans*, são patógenos oportunistas clássicos que habitam inofensivamente cerca de 50% dos indivíduos, mantidos sob controle pelo sistema imunológico e pelo microbioma bacteriano protetor do intestino e outras superfícies mucosas². Este fungo também pode causar infecções sistêmicas e induzir danos para muitos órgãos especialmente em paciente imunocomprometidos³.

Considerando que *C. albicans* é a espécie mais frequente isolada de (ICS) em população pediátrica no Brasil; considerando ainda o aumento da resistência aos agentes antifúngicos com consequente aumento na falha terapêutica⁴ e, além disso, o número de agentes antifúngicos disponíveis atualmente para tratamento de candidíase sistêmica é limitado e apresenta alta toxicidade⁵, destaca-se a importância de pesquisas de novos compostos antifúngicos que poderiam constituir alternativas aos fármacos existentes^{6,7}.

Nesse contexto, nossa atenção se voltou para as atividades antifúngicas de plantas aromáticas devido às suas potenciais propriedades biológicas⁸. *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor pertence a família *Poaceae*, é uma erva aromática medicinal, popularmente conhecida como "citronela", cultivada na Índia e no Brasil. Esta planta medicinal tem vários usos, como anti-tumoral⁹, antibacterino¹⁰, anticonvulsivante¹¹, antioxidante¹², inseticida¹³ e atividades antimicóticas, incluindo contra *Candida* spp.,^{14,15}.

Devido às propriedades antifúngicas deste óleo essencial, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* para atividade antifúngica contra cepas hospitalares de *Candida albicans* oriundas de ICS de pacientes pediátricos.

MÉTODOS

Óleo essencial

O óleo essencial das folhas frescas de *C. winterianus* Jowitt ex Bor foi obtido por hidrodestilação pelo Dr. Paulo Alves Wanderley da Universidade Federal da Paraíba

(UFPB). A identificação da planta foi realizada pela Dra. Rita Baltazar de Lima, do Laboratório de Botânica da UFPB. A exsicata foi registrada sob o código JPB 41387 e depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier na UFPB.

Amostras fúngicas

Os ensaios foram realizados com nove cepas hospitalares, AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 e AM-15 de *Candida albicans* isolados de ICS de pacientes pediátricos e uma cepa usada como padrão, *C. albicans* ATCC 60193. Esses micro-organismos pertencem a micoteca do laboratório de micologia da UFPB e foram mantidos em agar Sabouraud dextrose (ASD) a 4°C até serem usados nos testes.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A CIM foi determinada pelo método da microdiluição¹⁶. Culturas de *Candida* spp. foram semeadas em ASD e incubadas por 24-48 horas em temperatura 37°C. Colônias dessa cultura 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 caldo de RPMI-1640 e óleo essencial de *C. winterianus* 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 micro-organismos 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 óleo que inibiu o crescimento visível da levedura^{17,18}. Para determinar a CFM, 10µL 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 UFC¹⁹. Um controle negativo (sem drogas) foi realizado para confirmar a viabilidade celular fúngica¹⁶. 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 e CFM.

Ensaio do Sorbitol

A CIM do óleo essencial de *C. winterianus* foi determinada com *C. albicans* (ATCC 60193 e AM-09) usando a técnica de microdiluição (Alamar, Diadema, SP, Brazil) como descrito previamente¹⁸. O ensaio foi realizado utilizando meio com e sem sorbitol (controle) para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antifúngica do produto teste na parede celular da levedura. O sorbitol (VETEC Química Fina Ltda Brasil) foi adicionado ao meio de cultura numa concentração final de 0,8 M. Após incubação a 37 °C, as placas foram lidas 48 horas e após 7 dias^{20,21}. Este ensaio foi realizado em dois independentes experimentos, em duplicata e as médias aritméticas foram calculadas.

Efeito do ergosterol sobre a CIM do óleo essencial de *C. winterianus*

A CIM do óleo essencial de *C. winterianus* foi determinada com *C. albicans* (ATCC 60193 e AM-09) usando a técnica de microdiluição na presença e ausência de 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich Brazil). Anfotericina B foi usado como droga controle. A CIM foi determinada após 48 horas de incubação. Este ensaio foi realizado em dois independentes experimentos, em duplicata e as médias aritméticas foram calculadas^{21,22}.

RESULTADOS

Conforme observado na Tabela 1, a CIM do óleo essencial testado variou entre 64 e 256 µg/mL. A concentração de 256 µg/mL inibiu o crescimento de todas as cepas, enquanto 128 e 64 µg/mL foram capazes de inibir 80% e 60% das cepas testadas, respectivamente. A CFM₉₀ (concentração fungicida mínima capaz de inibir 90% dos isolados fúngicos) do óleo essencial de *C. winterianus* foi 256 µg/mL. A relação entre CFM/CIM mostrou um efeito bactericida para todas as cepas testadas. A CIM da anfotericina B variou entre 0,5 e 1 µg/mL. Com relação ao fluconazol, a CIM variou entre 0,5 e 8 µg/mL. Os resultados para o controle não mostraram inibição de crescimento fúngico.

Tabela 1. CIM, CFM, CFM:CIM, efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, CIM da anfotericina B e fluconazol em cepas de *Candida albicans*.

Leveduras	Óleo essencial de <i>C. winterianus</i> (µg/mL)				AnfB (µg/mL)	Fluc (µg/mL)	Controle das cepas ^a
	CIM	CFM	CFM:CIM	Efeito	CIM	CIM	
<i>C. albicans</i>							
ATCC 60193	128	128	1:1	cida	0,5	0,5	+
AM-02	64	64	1:1	cida	1	1	+
AM-04	128	256	2:1	cida	1	1	+
AM-06	64	64	1:1	cida	1	1	+
AM-07	64	64	1:1	cida	0,5	0,5	+
AM-08	64	128	2:1	cida	0,5	0,5	+
AM-09	64	64	1:1	cida	0,5	0,5	+
AM-10	256	256	1:1	cida	1	8	+
AM-13	64	128	2:1	cida	1	0,5	+
AM-15	256	512	2:1	cida	0,5	0,5	+

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; CFM, concentração fungicida amínima; AnfB, anfotericina B; Fluc, fluconazol; cida, fungicida; ^acrescimento fúngico em RPMI-1640, DMSO (5%), e Tween 80 (2%), sem antíngicos ou óleo essencial.

O valor da CIM do óleo essencial contra *C. albicans* ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de sorbitol foi o mesmo: 128 e 64 µg/mL, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* contra *Candida albicans* ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de sorbitol 0,8M.

Droga	CIM (µg/mL)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
Óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	128	128	64	64

A Tabela 3 mostra as CIMs do óleo essencial de *C. winterianus* contra ATCC 60193 na ausência e na presença de ergosterol que permaneceram iguais (128 µg/mL); As CIMs do óleo essencial contra AM-09 também não alteraram na ausência e na presença de ergosterol (64 µg/mL). Já o valor da CIM da anfotericina B aumentou mais de 100 vezes na presença de ergosterol, variando de 0,5 a 64 µg/mL na ausência e na presença de ergosterol, respectivamente.

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* contra *Candida albicans* ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de ergosterol 400 µg/mL.

Drogas	CIM (µg/mL)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
Óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	128	128	64	64
Anfotericina B	0,5	64	0,5	64

DISCUSSÃO

Infecções de corrente sanguínea (ICS) estão entre as principais causas de morte em pacientes pediátricos hospitalizados. Candidemia causada principalmente por *Candida albicans* representa um grande problema em hospitais em todo o mundo^{23,24} com alta taxa de mortalidade apesar da terapia antifúngica^{25,26}. A resistência dos micróbios aos agentes antimicrobianos tem implicações potencialmente graves para o controle e o tratamento da candidíase invasiva²⁷. Portanto, é necessário estudar produtos naturais, tais como plantas ou seus extratos e fitoconstituintes.

Os produtos naturais, particularmente as plantas medicinais, persistem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra doenças²⁸. Os óleos essenciais, que são ricos em mono e sesquiterpenos, representam outra fonte de potencial valor comercial devido às suas diversas atividades farmacológicas, incluindo antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, outros²⁹. O óleo essencial do gênero *Cymbopogon* foi descrito como forte ação antifúngica³⁰. Além disso, membros de nosso grupo realizaram a caracterização química dos constituintes do óleo estudado neste trabalho via cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa e mostraram que os constituintes majoritários foram citronelal (23,59%), geraniol (18,81%) e citronelol (11,74%) que também apresentaram forte atividade antifúngica^{31,32}. Nosso estudo é o primeiro a usar apenas isolados de *Candida albicans* oriundo de ICS de pacientes pediátricos para avaliar as propriedades antifúngicas do óleo essencial de *C. winterianus*.

A CIM do óleo essencial de *C. winterianus* variou entre 64 e 256 µg/mL. A concentração de 256 µg/mL inibiu o crescimento de todas as cepas, enquanto 128 e 64 µg/mL foi capaz de inibir 80% e 60% das cepas testadas, respectivamente. A CFM do

óleo variou entre 64 e 512 µg/mL; sendo 256 µg/mL capaz de inibir 90% das cepas fúngicas. Anfoterina B e fluconazol foram usados como controles positivos porque são os fármacos antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidemia na pediatria³³. A CIM da anfotericina B e fluconazol variou entre 0,5-1 e 0,5-8 µg/mL, respectivamente. Os resultados para o controle das cepas não mostraram inibição de crescimento fúngico (Tabela 1).

Em acórdância com os resultados acima e baseado com os critérios propostos por Sartoratto e colaboradores³⁴, o óleo essencial de *C. winterianus*, anfotericina B e fluconazol apresentaram forte atividade antifúngica contra *Candida albicans* porque seus valores de CIM foram inferiores a 500 µg/mL. Na literatura, o óleo essencial de *C. winterianus* demonstrou ser ativo contra bactérias, incluindo *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*³⁵ e *E. coli* sorotipos enterotoxigênico, enteroinvasivo e enteropatogênico³⁶; fungos: contra espécies de *Trichophyton*³⁷, espécies de *Aspergillus*¹⁵ e contra *Candida* spp.^{38,39}. A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus* contra *Candida albicans* foi demonstrada por alguns autores que evidenciaram altos valores de CIM^{36,38}, em contraste com nossos resultados.

Além disso, de acordo com Hafidh e colaboradores⁴⁰, a relação CFM/CIM é usada para especificar a natureza do efeito antimicrobiano contra um patógeno particular. Quando a relação CFM/CIM está entre 1:1 e 2:1, o produto químico é considerado fungicida. Por outro lado, se a relação é > 2:1, é mais provável que seja fungistático. No presente estudo, as razões CFM/CIM do óleo essencial de *C. winterianus* foram 1 ou 2, o que sugere que o óleo tem efeito fungicida contra as cepas testadas. Outros estudos com isolados de *C. albicans* também relataram o efeito fungicida do óleo essencial de *C. winterianus*, utilizando o método do tempo de morte^{38,39}. A atividade fungicida é clinicamente mais importante do que a atividade fungistática. O uso profilático de fármacos fungistáticos tem sido associado a uma maior frequência de resistência inata ou adquirida em isolados clínicos⁴¹.

Duas cepas de *Candida albicans* (ATCC 60193 e AM-09) foram utilizadas para os testes adicionais. Para investigar a ação do produto na parede celular fúngica, realizou-se o ensaio de sorbitol. Sorbitol é um protetor osmótico usado para estabilizar protoplastos de fungos, protegendo a parede celular fúngica contra tensões ambientais, particularmente alterações osmóticas. Produtos que agem na parede celular causam lise de células fúngicas na ausência de sorbitol, mas os fungos podem crescer na presença de

sorbitol. Este efeito é detectado por aumentos no valor de CIM observado em meio com sorbitol em comparação com o valor de CIM em meio sem sorbitol (meio padrão)^{6,20}. No presente trabalho, a CIM do óleo essencial contra *C. albicans* ATCC 60193 e AM-09 na ausência e presença de sorbitol foi a mesma: 128 e 64 µg/mL, respectivamente (Tabela 2). Os resultados sugerem que o óleo essencial de *C. winterianus* não atua modificando a parede celular fúngica, mas provavelmente afetando outro alvo. Resultados semelhantes foram observados por Pereira e colaboradores³⁷ onde os valores de CIM foram inalterados para este óleo na presença e ausência de sorbitol contra dermatófitos do gênero *Trichophyton* e por Carmo e colaboradores⁴² que avaliaram o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* contra *Malassezia* spp.

O próximo passo do trabalho foi determinar se o óleo essencial de *C. winterianus* atua afetando o ergosterol na célula fúngica. Ergosterol é o principal esterol de leveduras e, portanto, é necessário para o crescimento e função normal da membrana das células. Além de servir como um biorregulador da fluidez da membrana, assimetria e integridade da membrana, o ergosterol contribui para o bom funcionamento das enzimas ligadas à membrana⁴³. Se a atividade do composto fosse causada pela ligação do ergosterol, aumentaria a CIM do composto quando o ensaio fosse conduzido com a presença de ergosterol porque o ergosterol exógeno impediria a ligação ao ergosterol nas membranas fúngicas²¹. Assim, a CIM do óleo essencial de *C. winterianus* e da anfotericina B foi determinada com e sem a adição de ergosterol.

Como pode ser visto na tabela 3, o óleo essencial de *C. winterianus* não apresentou alterações nos valores de CIM. Isto indica que o mecanismo de ação do óleo não envolve complexação com ergosterol. A anfotericina B, um controle positivo com uma interação conhecida com ergosterol²¹, mostrou um valor de CIM cerca de 100 vezes maior na presença de ergosterol (Tabela 3). Estudos com *Candida albicans*, resultados similares foram observados por Leite e colaboradores³² quando perceberam que o valor de CIM do geraniol, um dos constituintes majoritários do óleo, não foi alterado na presença de ergosterol exógeno. No entanto, esses resultados são inconsistentes com estudos prévios, nos quais, na presença de ergosterol, o valor de CIM do óleo essencial de *C. winterianus* aumentou³⁹. Os achados deste trabalho são interessantes, mas os mecanismos de ação para o óleo essencial do *C. winterianus* precisam de ser investigados.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* possui atividade antifúngica significativa contra os isolados de *Candida albicans* de importância clínica pediátrica. O mecanismo provável da ação do óleo parece não envolver parede celular ou ligação ao ergosterol de membrana fúngica. Portanto, este trabalho é apresentado como relevante e assim contribuindo para o arsenal existente de produtos com atividade antifúngica comprovada contra *Candida albicans*. No entanto, são necessários mais estudos para investigar se o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* age sobre outros alvos na célula fúngica.

REFERÊNCIAS

1. Steinbach WJ. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. *J. Fungi* 2016; 2(1):5-13.
2. Ha JF, Italiano CM, Health CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns* 2011; 37(2):181-95.
3. da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 2016; 28(34):111-118.
4. Oliveira VKP, Ruiz LS, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo ASA, Nishikaku AS, Paula CR. Fungemia caused by *Candida* species in a Children's Public Hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2014; 56(4):301-5.
5. Khan SMA, 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* 2012; 50:33-42.
6. Svetaz L, Agüero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, et al. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med* 2007;73(10):1074-80.
7. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005; 366(9490):1013-25.
8. Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11:142-151.

9. Ganjewala D, Silviya S, Khan K. Biochemical composition and antibacterial activities of *Lantana Camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *Eur Asia Journal Bioscience* 2009; 3:69–77.
10. Scazzocchio F, Garzoli S, Conti C, Leone C, Renaioli C, Pepi F, Angiolella L. Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. *Nat Prod Res* 2016; 30(17):1909-18.
11. Silva MR, Ximenes RM, da Costa JG, Leal LK, de Lopes AA, Viana GS. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 381: 415 - 26.
12. Silva C F, Moura FC, Mendes MF, Pessoa FLP. Extraction of *Citronella* (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO₂, experimental data and mathematical modelling. *Braz J ChemEng* 2010; 28:343–350.
13. Silva CT, Wanderley-Teixeira V, Cunha FM, Oliveira JV, Dutra Kde A, Navarro DM, Teixeira ÁA. Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem* 2016; 118:347-52.
14. Blank AF, Costa AG, Arrigoni-Blank MF, Cavalcanti SCH, Alves PB, Inneco R, et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Braz J Pharmacogn.* 2007; 17(4):557-64.
15. Oliveira WA. Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Doctoral thesis, Federal University of Paraíba, Brazil. 1–164. 2011.
16. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64:711–713.
17. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 2000; 11(3):137–147.
18. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA. 2008.
19. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and

- established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J. Clin Microbiol* 2001; 40(10):3776–3781.
20. Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. 1995. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J of Antibiotics* 1995; 48(4):306–310.
 21. Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod* 2008; 71(10):1720-1725.
 22. Gungi S, Arima K, Beppu T. Screening of antifungal according to activities inducing morphological abnormalities. *Agric Biol Chem.* 1983;47(9):2061-9.
 23. Pfaller MA, Dikema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:133–163.
 24. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *C. albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14:e954–966.
 25. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 2011; 6:e24198.
 26. Fisher BT, Vendetti N, Bryan M, Prasad PA, Russell Localio A, Damianos A, Coffin SE, Bell LM, Walsh TJ, Gross R, Zaoutis TE. 2016. Central Venous Catheter Retention and Mortality in Children With Candidemia: A Retrospective Cohort Analysis. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2016; 5:403–408.
 27. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Pol J Microbiol.* 2016;65(1):111-4.
 28. Simões ER, Santos EA, de Abreu MC, Silva Jdo N, Nunes NM, da Costa MP, Pessoa OD, Pessoa C, Ferreira PM. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J Intercult Ethnopharmacol* 2015; 4(3):256-63.
 29. Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 2014:159819.
 30. Keyal U, Huang X, Bhatta AK. Antifungal effect of plant extract and essential oil. *Chin J Integr Med.* 2016; [Epub ahead of print].

31. Quitans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NMN, Bonjardim LR, Santos MRV, Alves PB, Blank AF, Antonioli AR. Phytochemical screening and anticonvulsivante activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in Rodents. *Phytomedicine* 2008; 15:619-624.
32. Leite MC, de Brito BAP, Sousa JP, Oliveira EL. 2015. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol* 2015; 53:275-84.
33. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses* 2015; 58(1):10-21.
34. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35:275-280.
35. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2007; 18:414–420.
36. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oil from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol* 2007; 111:197-201.
37. Pereira FO, Wanderley PA, Viana FAC, Lima RB, Sousa FB, Lima EO. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. *Braz J Microbiol* 2011; 42:233-42.
38. Oliveira WA, Pereira FO, Luna GCDG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, Lima EO. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. *Braz J Microbiol* 2011; 42(2):433-41.
39. Oliveira WA, Arrua JMM, Wanderley PA, Lima RB and Lima EO. Effects of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. *Rev Pan-Amaz Saude* 2015; 6(1):21-26.
40. Hafidh RR, Abdulamir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J.* 2011; 5:96–106.
41. Monk BC, Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Sci.* 2008; 321:367-9.

42. Carmo ES, Pereira FO, Moreira ACP, Brito LL, Gayoso CW, Costa JGM, Lima EO. Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2012; 71(2):386–91.
43. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *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.

5.3 Antifungal Activity of Citronellal on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance

Artigo publicado na *Latin American Journal of Pharmacy*.

ISSN: 0326-2383 (printed ed.); 2362-3853 (on line ed.), Qualis CAPES na área de Farmácia B3

Antifungal Activity of Citronellal on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance

Ana L.A. LIMA^{1*}, Ana L.A.L. PÉREZ², Janiere P. SOUSA³, Lilian S. PINHEIRO¹, Abrahão A. OLIVEIRA-FILHO⁴, José P. SIQUEIRA-JÚNIOR¹, Edeltrudes O. LIMA¹

¹Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

²Posgraduate Program in Dentistry School of Dentistry, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

³Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil

⁴Academic Unit Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Paraíba, Brazil

*Corresponding author: analuisalima2@hotmail.com

SUMMARY. Citronellal is a plant-derived monoterpene alcohol that has a broad spectrum of activity. The aim of this study was to evaluate the citronellal for antifungal activity against *Candida albicans* isolates of pediatric clinical importance. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the broth microdilution techniques. We also investigated possible citronellal action on cell walls (0.8M sorbitol) and cell membranes (citronellal to ergosterol binding). For 90% of isolates, the MIC and MFC of the phytochemical was 128 µg/mL. Involvement with the cell wall and ergosterol binding were excluded as possible mechanisms of action. Thus, citronellal showed *in vitro* antifungal potential against strains of *C. albicans*, but did not involve action on the cell wall or ergosterol and further study is needed to completely describe its mechanism of action.

Keywords: antifungal activity, *Candida albicans*, citronellal, pediatric.

RESUMEN. El citronelal es un alcohol monoterpenico que tiene un amplio espectro de actividad. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del citronelal frente a aislados de *Candida albicans* de importancia clínica pediátrica. La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración fungicida mínima (MFC) se determinaron mediante microdilución en caldo. También se investigó la posible acción del citronelal sobre las paredes celulares (sorbitol 0,8 M) y las membranas celulares (unión citronelal a ergosterol). Para el 90% de los aislamientos, los valores de MIC y MFC para el citronelal fueron de 128 µg/mL. La interacción con la pared celular y la unión al ergosterol se excluyeron como posibles mecanismos de acción. Por lo tanto, si bien el citronelal mostró potencial antifúngico *in vitro* contra las cepas de *C. albicans*,

su acción no implica efecto sobre la pared celular o el ergosterol, por lo que se requiere de mayores estudios para describir completamente su mecanismo de acción.

Palabras clave: actividad antifúngica, *Candida albicans*, citronellal, pediatría.

INTRODUCTION

Candida albicans is an opportunistic fungus residing in the human body that can cause systemic infection and induce damage to many organs especially in immunocompromised patients.¹ Candidemia is an important concern in the pediatric clinical medicine, mainly because *Candida* species represents the third most common cause of healthcare-acquired blood stream infections (BSI) and the mortality can exceeds 30% in hospitalized and immunocompromised children². The constrained armory of conventional antifungal treatments for systemic pediatric candidiasis depends profoundly on polyenes, azoles and echinocandins that have high costs and toxicity or stern side effects.³ Increased resistance to antifungal agents represents the major deterrent against effective therapies.⁴ Therefore, it highlights the importance of research of new antifungals compounds which could constitute alternatives to the existing drugs.⁵

Monoterpenes have been proposed to play beneficial roles in diverse physiological systems; citronellal is a monoterpene present in the essential oil of several aromatic plants, such as *Corymbia citriodora* and plants of the gender *Cymbopogon*, as *C. nardus* and *C. winterianus*.^{6,7} The pharmacological activities of citronellal include: anticonvulsant⁸, antioxidant⁹, anti-inflammatory¹⁰, antinociceptive^{11,12}, antitumor¹³, antibacterial¹⁴ and insecticide¹⁵. Its antifungal activity has been demonstrated against fungi from adult clinical importance: *Penicillium*¹⁶, *Aspergillus*^{7,17}; and *Candida* spp, including against *Candida albicans*^{18,19,20}. Due to the antifungal properties of this monoterpene, the aim of our study was to evaluate the citronellal for antifungal activity against hospital strains of *Candida albicans* from BSI of pediatric patient.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Citronellal, amphotericin B, fluconazole, ergosterol and sorbitol were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil), whereas dimethylsulfoxide (DMSO) and Tween 80 were purchased from Labsynth (Laboratories Ltd., Diadema, SP, Brazil). The emulsion used in the antifungal assays was prepared at the time of the execution of the tests. The drugs were dissolved in DMSO, Tween 80 and sterile distilled water was

used to obtain an initial concentration of 1024 µg/mL. The mixture was kept under stirring for 3 minutes, in a Vortex apparatus (Fanem® Ltd., Guarulhos, SP, Brazil).

Growth media

In order to test the biological activity of the products, Sabouraud glucose agar (SGA) were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), agar-cornmeal from HiMédia Laboratories (Mumbai, MH, India), and RPMI-1640, with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) culture media were used. They were prepared and used according to the manufacturers' instructions. The media were solubilized in distilled water and sterilized by autoclaving at 121°C, 1.0 atm. for 15 min.

Fungal strains

The assays were performed with nine hospital strains, AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 and AM-15 of *Candida albicans* isolated from BSI of pediatric patients and one strain used as standard, *C. albicans* ATCC 60193. These strains belong to the collection of the Mycological Laboratory of the UFPB and were maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) at 4°C until used in tests.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The MIC was determined by the microdilution method²¹. Cultures of *Candida* spp. were placed on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated for 24-48 hours at temperature 37°C. Colonies of this culture were suspended in sterile 0.85% NaCl and the inoculum was standardized according to the scale of 0.5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL). In a 96-well plate was added liquid medium RPMI-1640 and citronellal concentrations of 1024 to 0.5 µg/mL. The MIC determination was conducted with approximately $1-5 \times 10^5$ CFU/mL of the microorganism in each well. The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. In 24-48 hours there was a visual observation of fungal growth. The MIC was defined as the lowest oil concentration that inhibited visible growth of the yeast^{22,23}. The antimicrobial activity of the products was interpreted (considered active or not), according to the criteria proposed by Morales *et al.*²⁴: strong/good activity (MIC: <100 µg/mL); moderate activity (MIC: 100–500

$\mu\text{g/mL}$); weak activity (MIC: 500–1000 $\mu\text{g/mL}$); and inactive product/no antimicrobial effect (MIC: >1000 $\mu\text{g/mL}$).

To determine the MFC, 10 μL of each of the wells without fungal growth was seeded on a plate containing SDA, the SDA plating were incubated at 37°C for 24–48 hours. The MFC was considered as the lowest concentration cultivated in plate with SDA in which growth was less than 3 CFU²⁵. A negative control (without drugs) was performed to confirm cell viability²¹. A sensitivity control to Tween 80 and DMSO was performed at the same concentrations used to dissolve the products. There were three independent experiments in duplicate on different occasions and the results were expressed as the arithmetic mean of the MIC and MFC.

Sorbitol assay

MIC of citronellal was determined with *C. albicans* (ATCC 60193 and AM-09) using the broth microdilution method in 96-well plates (Alamar, Diadema, SP, Brazil) as previously described²³. The assay was performed using medium with and without sorbitol (control) to evaluate possible mechanisms involved in the antifungal activity of the test product on the yeast cell wall. The sorbitol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) was added to the culture medium to give a final concentration of 0.8 M. Following incubation at 37°C, the plates were read at 48 hours and after 7 days^{26,27}. This assay was carried out in two independent assays, in duplicate and the geometric means were calculated.

Effect of ergosterol on MIC of citronellal

The MIC of citronellal against *C. albicans* (ATCC 60193 and AM-09) was determined by the microdilution method using 96 wells microplates in absence and presence of 400 $\mu\text{g/mL}$ of ergosterol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil). Amphotericin B was used as a control drug. The MIC was determined after 48 h of incubation. This assay was carried out in two independent assays, in duplicate and the geometric means were calculated^{27,28}.

RESULTS AND DISCUSSION

Candida albicans is a major fungal pathogen of the pediatric patients causing a variety of infections including blood stream infections (BSI) with high mortality rate despite antifungal therapy²⁹. The resistance of microbes to antimicrobial agents has

potentially serious implications for the control and treatment of invasive candidiasis³⁰. Thus, there is a need for the development of novel antifungal agents, which may meet the above challenges.

The natural products, particularly their phytochemicals, persist as an important source of new therapeutic agents against diseases³¹. Phytoconstituents are therefore important due to their various pharmacological activities including antifungal and antibacterial effects³². Citronellal is a monoterpene alcohol constituting about 24 % as a main component of *C. winterianus* essential oil⁶ and anti-*Candida albicans* potential of the citronellal was tested in this study against isolates of pediatric clinical importance.

Yeasts	Citronellal (µg/mL)				AmB (µg/mL)	Fluc (µg/mL)	Control strains ^a
	MIC	MFC	MCF: MIC	Effect	MIC	MIC	
<i>C. albicans</i>							
ATCC 60193	64	128	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-02	64	64	1:1	cide	1	1	+
AM-04	64	128	2:1	cide	1	1	+
AM-06	64	64	1:1	cide	1	1	+
AM-07	64	64	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-08	64	128	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-09	64	64	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-10	128	128	1:1	cide	1	8	+
AM-13	64	128	2:1	cide	1	0.5	+
AM-15	256	256	1:1	cide	0.5	0.5	+

Table 1. MIC, MFC, MFC:CIM and effect of the citronellal, MIC of amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans* strains.

Legend: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; AmB, amphotericin B; Fluc, fluconazole; cide, fungicide; tatic, fungistatic; ^ayeast growth in RPMI-1640, DMSO (5%), and Tween 80 (2%), without antifungal or oil essential.

Trindade *et al.*¹⁸ demonstrated that citronellal have proven antifungal activity and are able to inhibit the *in vitro* adherence to the dental implants of *C. albicans*. Also, there have been reports in the literature that citronellal inhibited the virulent attributes of yeast-to-hypha transition and biofilm formation^{19,33}.

In the present study, citronellal showed potential antifungal activity against *C. albicans* confirming the results obtained in previous studies. The MIC of citronellal

tested ranged between 64 and 256 µg/mL. The concentration of 256 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 64 and 128 µg/mL was able to inhibit 80% and 90% of the strains tested, respectively. MFC of the substance ranged between 64 and 256 µg/mL; being 128 µg/mL able to inhibit 90% of the fungal strains. Amphotericin B and fluconazole were used as positive controls because they are the most commonly used antifungal drugs for the treatment of candidemia in pediatrics³. The MIC of the amphotericin B and fluconazole ranged between 0.5-1 and 0.5-8 µg/mL, respectively. The results for the control showed no fungal growth inhibition (Table 1).

According to the above results and to the criteria proposed by Morales *et al.*²⁴, the citronellal, amphotericin B and fluconazole exhibited a strong antifungal activity against *Candida albicans* because their majority MIC values were lower than 100 µg/mL. In the literature, citronellal proved to be active against bacteria, including against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*¹⁴ and fungi: against *Penicillium*¹⁶, *Aspergillus*^{17,7} and *Candida* species^{18,19,20}.

Antifungal activity of citronellal against *Candida albicans* and non-*albicans* was demonstrated by Zore *et al.*³³ and Singh *et al.*¹⁹ with high MIC values, in contrast to our results. In accordance with the citronellal majority MIC value (MIC₈₀ and MFC₉₀= 128 µg/mL) in the present study, similar results were found by Trindade *et al.*¹⁸ (MIC₇₅ and MFC_{58,3}= 256 µg/mL) and Oliveira *et al.*²⁰ (MIC₅₀= 256 µg/mL and MFC₅₀=512 µg/mL) who considered citronellal to be a good anti-*Candida* agent.

In addition, according Hafidh *et al.*³⁴ the MFC/MIC ratio is used to specify the nature of the antimicrobial effect against a particular pathogen. When the MFC/MIC ratio is between 1:1 and 2:1, the chemical is considered fungicidal. On the other hand, if the ratio is > 2:1, it is more likely to be fungistatic. In the present study, the MFC/MIC ratios of citronellal were 1 or 2, this suggests that pytochemical has a fungicidal effect against the strains tested. This result is similar with previous study that reported citronellal as fungicidal at MIC 0.384% (v/v) against strains of *C. albicans*, using the time dependent kill curve assay³³. Fungicidal activity is clinically more important than fungistatic activity. The prophylactic use of fungistatic drugs has been associated with an increased frequency of innate or acquired resistance in clinical isolates³⁵.

Drug	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Without sorbitol	With sorbitol	Whitout sorbitol	With sorbitol
Citronellal	64	64	64	64

Table 2. Effect of citronellal against *Candida albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of 0.8M sorbitol.

Due to its pronounced anti-*C. albicans* activity, citronellal has been studied in more detail using two strains of *Candida albicans* (ATCC 60193 and AM-09). To investigate the action of the product on the fungal cell wall we performed the sorbitol assay. Sorbitol is an osmotic protector used to stabilize fungi protoplasts, protecting the fungal cell wall from environmental stresses, particularly osmotic changes. Products that act on the cell wall cause lysis of fungal cells in the absence of sorbitol, but fungi can grow in the presence of sorbitol. This effect is detected by increases in the MIC value as observed in medium with sorbitol as compared to the MIC value in medium without sorbitol (standard medium)^{5,26}. In the present work, the MIC of the citronellal against *C. albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of sorbitol was the same: 64 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2).

Our data suggest that this phytochemical does not primary act by modifying the fungal cell wall, but probably by affecting another target and more studies is required to elucidated the citronellal's mechanism of action against this strains. Singh *et al.*¹⁹ obsererd that the citronellal has anti-*candida* effect independent of cell wall integrity using the phenotypic susceptibility assay in the presence of cell wall disrupting agents. The authors observed no hypersensitivity of *C.albicans* cells to citronellal (250 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of the cell wall-perturbing agents.

Drugs	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Without ergosterol	With ergosterol	Whitout ergosterol	With ergosterol
Citronellal	64	64	64	64
Amphoterecin B	0.5	64	0.5	64

Table 3. Effect of geraniol and amphotericin B against *Candida albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$.

The next step of this work was to evaluate the potential effect of citronellal on ergosterol in the fungal cell. Ergosterol is the main sterol of yeasts and, thus is necessary for growth and normal membrane function of cells. Besides, working as a bioregulator of membrane fluidity, asymmetry and membrane integrity, ergosterol contributes to the proper function of membrane-bound enzymes³⁶. If the activity of compound was caused by binding ergosterol, it would increase the MIC of compound when the assay was conducted with the presence of ergosterol because the exogenous ergosterol would prevent the binding to ergosterol in the fungal membranes²⁷. Thus, the MIC of citronellal and amphotericin B was determined with and without the addition of ergosterol. As can be seen in Table 3, citronellal displayed no changes in MIC values. Thus indicating that the primary mechanism of action of citronellal does not necessary involve complexation of ergosterol. Amphotericin B, a positive control having a known interaction with ergosterol²⁵, showed a MIC value about 100 times greater in the presence of this sterol (Table 3).

Different results were found when the researchers stated that citronellal interfered with membrane homeostasis, by increasing the hypersensitivity of the fungi to membrane-perturbing agents, reducing ergosterol levels, and diminishing glucose-induced H⁺ extrusion¹⁹. In addition, it was demonstrated that citronellal inhibits *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest at S phase of cell cycle³³. Besides, it has been found that the antifungal activity (membrane-damaging effect) of citronellal is independent of the cell wall and the calcineurin signaling pathway¹⁹. The difference between ours and the above published results could be explained by the different methodologies and different microorganisms used in the studies.

Furthermore, even the anti-*Candida* activity mechanisms of citronellal are not clear, it has been reported the induced attenuation of *Candida albicans* virulence attributes, i.e, citronellal inhibits the virulent attributes of yeast-to-hypha transition and biofilm formation. It also reduced cell adherence to polystyrene surface and the human oral epithelial cells and oxidative and genotoxic stresses were induced via an increased production of reactive oxygen species¹⁹.

The results here obtained are interesting but, in order to justify and validate their clinical application, the mechanisms of action for citronellal against *Candida albicans* isolates from pediatric clinical importance need to be better investigated.

CONCLUSION

The present study demonstrated that citronellal showed excellent antifungal activity against *Candida albicans* isolates from pediatric clinical importance. The likely primary mechanism of the citronellal's action appears not to involve cell walls, or binding to membrane ergosterol. Therefore, the test product is presented as a relevant and thus contributing to the existing arsenal of products with proven antifungal activity against *Candida albicans*.

REFERENCES

1. da Silva D.A., Lee K.K., Raziunaite I., Schaefer K., Wagener J., Yadav B., Gow N.A. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions (2016) *Curr Opin Microbiol.* **34**: 111 - 118.
2. Steinbach W.J. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children (2016) *J. Fungi.* **2**: 5 - 10.
3. Tragiannidis A., Tsoulas C., Groll A.H. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines (2015) *Mycoses.* **58**: 10 - 21.
4. Khan S.M.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* (2012) *Med Mycol.* **50**: 33 – 42.
5. Svetaz L., Agüero M.B., Alvarez S., Luna L., Feresin G., Derita M., Tapia A., Zacchino S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action (2007) *Planta Med.* **73**: 1074 - 80.
6. Quintans-Júnior L.J., Souza T.T., Leite B.S., Lessa N.M.N., Bonjardim L.R., Santos M.R.V., Alves P.B., Blank A.F., Antonioli A.R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents (2008) *Phytomedicine.* **15**: 619–624.
7. Aguiar R.W.S., Ootani M.A., Ascencio S.D., Ferreira T.P.S., Santos M.M., dosSantos G.R. Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species (2014) *The Scientific World Journal.* **2014**: 1-8.
8. Melo S.M., Guimarães A.G., Santana M.F., Siqueira R.S., De Lima A.C.B., Dias A.S., Santos M.R.V., Onofre A.S.C., Quintans J.S.S., Sousa D.P., Almeida J.R.G.S.,

- Estevam C.S., Araujo B.S., Quintans-Júnior L.J. Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal (2011) *Biol Res.* **44**: 363-368.
9. Melo M.S., Santana M.T., Guimarães A.G., Siqueira R.S., Sousa D.P., Santos R.V., Bonjardim L.R., Araújo A.A.S., Onofre A.S.C., Lima J.T., Almeida J.R.G.S., Quintans-Júnior L.; J. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents (2011) *Rev. Bras. Farmacogn.* **21**: 697–703.
10. de Santana M.T., de Oliveira M.G.B., Santana M.F., De Sousa D.P., Santana D.G., Camargo E.A., de Oliveira A.P., Almeida J.R.G., Quintans-Júnior L.J. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice (2013) *Pharm. Biol.* **51**: 1144–1149.
11. Quintans-Júnior L.J., da Rocha R.F., Caregnato F.F., Moreira J.C.F., da Silva F.A., Araújo A.A., dos Santos J.P.A., Melo M.S., de Sousa D.P., Bonjardim L.R., Gelain D.P. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass (2011) *J. Med. Food.* **14**: 630–639.
12. Santos P.L., Brito R.G., Oliveira M.A., Quintans J.S.S., Guimarães A.G., Santos M.R.V., Menezes P.P., Serafini M.R.S., Menezes I.R.A., Coutinho H.D.M., Araújo A.S.A., Quintans-Júnior L.J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model (2016) *Phytomedicine.* **23**: 948–957.
13. Maßberg D., Simon A., Häussinger D., Keitel V., Gisselmann G., Conrad H., Hatt H. Monoterpene (–)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor (2015) *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **566**: 100 – 109.
14. Lopez-Romero J.C., González-Ríos H., Borges A., Simões M. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (2015) *Evid Based Complement Alternat Med.* **2015**: 795435.
15. Reis S.L., Mantello A.G., Macedo J.M., Gelfuso E.A., da Silva C.P., Fachin A.L., Cardoso A.M., Beleboni R.O. Typical Monoterpenes as Insecticides and Repellents against Stored Grain Pests (2016) *Molecules.* **3**: 258-268.
16. Wu Y., Qiuli OuYang, Nengguo Tao. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. (2016) *J Food Sci Technol.* **53**: 3853–3858.

17. Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T., Trakoontivakorn G., Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass) (2003) *Japan Agricultural Research Quarterly*. **37**: 249–252.
18. Trindade L.A., de Araújo Oliveira J., de Castro R.D., de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal (2015) *Clin Oral Invest*. **19**: 2223–2231.
19. Singh S., Zeeshan F. and Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes (2016) *Rev Soc Bras Med Trop*. **49**: 465-472.
20. Oliveira H.M.B.F., Filho A.A.O., Lima E.O., Júnior, J.P.S. Antifungal effect of synthetic isomer (R)-(+)-citronellal against *Candida* strains. (2017). *Latin American Journal of Pharmacy* **36**: 408-411.
21. Eloff J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria (1998) *Planta Med*. **64**: 711 –713.
22. Hadacek F., Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice (2000) *Phytochem Anal*. **11**: 137 – 147.
23. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA.
24. Morales G., Paredes A., Sierra P., Loyola L.A. Antimicrobial activity of three *baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile (2008) *Molecules*. **13**: 790– 794.
25. Espinel-Ingroff A., Chaturvedi V., Fothergill A., Rinaldi M.G. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study (2002) *J. Clin Microbiol*. **40**: 3776 – 3781.
26. Frost D.J., Brandt K.D., Cugier D., Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly (1995) *J of Antibiotics*. **48**: 306 – 310.
27. Escalante A., Gattuso M., Pérez P., Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman (2008) *J Nat Prod*. **71**: 1720 - 1725.
28. Gungi S., Arima K., Beppu T. Screening of antifungal according to activities inducing morphological abnormalities (1983) *Agric Biol Chem*. **47**: 2061 - 9.

29. Fisher B.T., Vendetti N., Bryan M., Prasad P.A., Russell Localio A., Damianos A., Coffin S.E., Bell L.M., Walsh T.J., Gross R., Zaoutis T.E. Central Venous Catheter Retention and Mortality in Children With Candidemia: A Retrospective Cohort Analysis (2016) *J Pediatric Infect Dis Soc.* **5**: 403 – 408.
30. Stefaniuk E., Baraniak A., Fortuna M., Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar Candida Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for Candida spp. Identification (2016) *Pol J Microbiol.* **65**: 111 - 4.
31. Simões E.R., Santos E.A., de Abreu M.C., Silva J.N., Nunes N.M., da Costa M.P., Pessoa O.D., Pessoa C., Ferreira P.M. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils (2015) *J Intercult Ethnopharmacol.* **4**: 256 - 63.
32. Singh B.R., Singh V., Singh R.K., Ebibeni N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin (2011) *IRJPP.* **1**: 228– 236.
33. Zore G.B., Thakre A.D., Rathod V., Karuppayil S.M. Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization (2001) *Mycoses.* **54**: 99–109.
34. Hafidh R.R., Abdulamir A.S., Vern L.S., Bakar F.A., Abas F., Jahanshiri F., Sekawi Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product (2011) *Open Microbiol J.* **5**: 96 – 106.
35. Monk B.C., Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals (2008) *Science.* **321**: 367 - 9.
36. Khan A., Ahmad A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A., Manzoor N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity (2010) *Res Microbiol.* **161**: 816 - 23.

**5.4 Antifungal Activity of Geraniol on *Candida albicans* Isolates of Pediatric
Clinical Importance**

Artigo publicado na *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical
Research*.

ISSN: 0975-4873, Qualis CAPES na área de Farmácia B3

Antifungal Activity of Geraniol on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance

Lima A L A^{1,*}, Pérez A L A L², Sousa J P³, Pinheiro L S¹, Oliveira-Filho A A⁴,
Siqueira-Júnior J P¹, Lima E O¹

¹Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

²Posgraduate Program in Dentistry School of Dentistry, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

³Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil.

⁴Academic Unit Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Paraíba, Brazil.

*Author for correspondence: analuisalima2@hotmail.com

ABSTRACT

Geraniol is a plant-derived monoterpene alcohol that has antifungal effect. The aim of this study was to evaluate the geraniol for antifungal activity against *Candida albicans* isolates of pediatric clinical importance. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the broth microdilution techniques. We also investigated possible geraniol action on cell walls (0.8M sorbitol) and cell membranes (Geraniol to ergosterol binding). For 90% of isolates, the MIC and MFC of the phytochemical was 64 µg/ml. Involvement with the cell wall and ergosterol binding were excluded as possible mechanisms of action. Thus, geraniol showed *in vitro* antifungal potential against strains of *C. albicans*, but did not involve action on the cell wall or ergosterol and further study is needed to completely describe its mechanism of action.

Keywords: Antifungal activity, geraniol, *Candida albicans*, pediatric.

Received: 15th March, 17; **Revised** 29th March, 17, **Accepted:** 16th April, 17; **Available Online:** 25th April, 2017

INTRODUCTION

Candida spp., particularly *C. albicans*, are an opportunistic fungus residing in the human body due to its commensal nature¹. This fungus can also cause systemic infection and induce damage to many organs especially in immunocompromised patients². Candidemia is an important concern in the pediatric clinical medicine, mainly because *Candida* species represents the third most common cause of healthcare-acquired blood stream infections (BSI) and the mortality can exceeds 30% in hospitalized and immunocompromised children³.

The constrained armory of conventional antifungal treatments for systemic pediatric candidiasis depends profoundly on polyenes, azoles and echinocandins that have high costs and toxicity or stern side effects^{4,5}. Increased resistance to antifungal agents represents the major deterrent against effective therapies⁶. Therefore, it highlights the importance of research of new antifungals compounds which could constitute alternatives to the existing drugs^{7,8}.

Monoterpenes have been proposed to play beneficial roles in diverse physiological systems; geraniol is a plant-derived monoterpene with a rose scent and a slightly sweet flavor, widely found in the volatile oil of various plants: citronela, geranium, vanilla and rose oils. It is widely used as a spice ingredient and in cosmetics, fragrances, shampoos, soaps and other non-cosmetic products, including household and other detergents⁹. The pharmacological activities of geraniol include: cardioprotection¹⁰, antioxidant¹¹, anti-inflammatory¹², antinociceptive¹³, antitumor¹⁴, antibacterial¹⁵, insecticide¹⁶ and antimycotic activities, including against *Candida* spp.¹⁷.

Due the antifungal properties of this monoterpene, the aim of our study was to evaluate the geraniol for antifungal activity against hospital strains of *Candida albicans* from BSI of pediatric patient.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Geraniol, amphotericinB, fluconazole, ergosterol and sorbitol were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil), whereas dimethylsulfoxide (DMSO) and Tween 80 were purchased from Labsynth products for Laboratories Ltd. (Diadema, SP, Brazil). The emulsion used in the antifungal assays was prepared at the time of the execution of the tests. The drugs were dissolved in DMSO, Tween 80 and sterile distilled water was used to obtain an initial concentration of 1024 µg/ml. The mixture was kept under stirring for 3 minutes, in a Vortex apparatus (Fanem® Ltd., Guarulhos, SP, Brazil).

Growth media

To test the biological activity of the products, Sabouraud glucose agar (SGA) were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), agar-cornmeal from HiMédia Laboratories (Mumbai, MH, India), and RPMI-1640, with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) culture media were used. They were prepared and used according to the manufacturers' instruction. The media were solubilized in distilled water and sterilized by autoclaving at 121°C, 1.0 atm. for 15 min.

Fungal strains

The assays were performed with nine hospital strains, AM-02, AM-04, AM-06, AM-07, AM-08, AM-09, AM-10, AM-13 and AM-15 of *Candida albicans* isolated from BSI of pediatric patients and one strain used as standard, *C. albicans* ATCC 60193. These strains belong to the collection of the Mycological Laboratory of the UFPB and were maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) at 4°C until used in tests.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The MIC was determined by the microdilution method¹⁸. Cultures of *Candida* spp. were placed on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated for 24-48 hours at temperature 37°C. Colonies of this culture were suspended in sterile 0.85% NaCl and the inoculum was standardized according to the scale of 0.5 McFarland (1.5×10^6 CFU/ml). In a 96-well plate was added liquid medium RPMI-1640 and geraniol concentrations of 1024 to 0.5 µg/ml. The MIC determination was conducted with approximately 1.5×10^5 CFU/ml of the microorganism in each well. The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. In 24-48 hours there was a visual observation of

fungal growth. The MIC was defined as the lowest oil concentration that inhibited visible growth of the yeast^{19,20}. The antimicrobial activity of the products was interpreted (considered active or not), according to the criteria proposed by Morales *et al.* (2008): strong/good activity (MIC: <100 µg/ml); moderate activity (MIC: 100–500 µg/ml); weak activity (MIC: 500–1000 µg/ml); and inactive product/no antimicrobial effect (MIC: >1000 µg/ml)²¹.

To determine the MFC, 10 µl of each of the wells without fungal growth was seeded on a plate containing SDA, the SDA plating were incubated at 37°C for 24–48 hours. The MFC was considered as the lowest concentration cultivated in plate with SDA in which growth was less than 3 CFU²². A negative control (without drugs) was performed to confirm cell viability¹⁸. A sensitivity control to Tween 80 and DMSO was performed at the same concentrations used to dissolve the products. There were three independent experiments in duplicate on different occasions and the results were expressed as the arithmetic mean of the MIC and MFC.

Sorbitol assay

MIC of geraniol was determined with *C. albicans* (ATCC 60193 and AM-09) using the broth microdilution method in 96-well plates (Alamar, Diadema, SP, Brazil) as previously described²⁰. The assay was performed using medium with and without sorbitol (control) to evaluate possible mechanisms involved in the antifungal activity of the test product on the yeast cell wall. The sorbitol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) was added to the culture medium to give a final concentration of 0.8 M. Following incubation at 37°C, the plates were read at 48 hours and after 7 days^{23,24}. This assay was carried out in two independent assays, in duplicate and the geometric means were calculated.

Effect of ergosterol on MIC of geraniol

The MIC of geraniol against *C. albicans* (ATCC 60193 and AM-09) was determined by the microdilution method using microplates of 96 wells in the absence and in the presence of 400 µg/ml of ergosterol (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil). Amphotericin B was used as a control drug. The MIC was determined after 48 h of incubation. This assay was carried out in two independent assays, in duplicate and the geometric means were calculated^{24,25}.

RESULTS AND DISCUSSION

Candida albicans is a major fungal pathogen of the pediatric patients causing a variety of infections including blood stream infections (BSI) with high mortality rate despite antifungal therapy^{26,27}. The resistance of microbes to antimicrobial agents has potentially serious implications for the control and treatment of invasive candidiasis²⁸. Thus, there is a need for the development of novel antifungal agents, which may meet the above challenges.

The natural products, particularly their phytochemicals, persist as an important source of new therapeutic agents against diseases²⁹. Phytoconstituents are therefore important due to their various pharmacological activities including antifungal and antibacterial effects^{30,31}. Geraniol is a monoterpene alcohol constituting about 20 % as a main component of *C. winterianus* essential oil^{32, 17} and anti-*Candida albicans* potential of the geraniol was tested in this study against isolates of pediatric clinical importance.

Table 1: MIC, MFC, MFC:CIM and effect of the geraniol, MIC of amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans* strains.

Yeasts	Geraniol (µg/ml)				AmB (µg/ml)	Fluc (µg/ml)	Control strains ^a
	MIC	MFC	MCF: MIC	Effect	MIC	MIC	
<i>C. albicans</i>							
ATCC 60193	32	64	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-02	32	32	1:1	cide	1	1	+
AM-04	32	64	2:1	cide	1	1	+
AM-06	32	32	1:1	cide	1	1	+
AM-07	64	64	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-08	32	64	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-09	32	32	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-10	32	32	1:1	cide	1	8	+
AM-13	32	64	2:1	cide	1	0.5	+
AM-15	128	256	2:1	cide	0.5	0.5	+

Legend: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; AmB, amphotericin B; Fluc, fluconazole; cide, fungicide; tatic, fungistatic; ^ayeast growth in RPMI-1640, DMSO (5%), and Tween 80 (2%), without antifungal or oil essential.

The MIC of geraniol tested ranged between 32 and 128 µg/ml. The concentration of 128 µg/ml inhibited the growth of all strains, while 32 and 64 µg/ml was able to inhibit 80% and 90% of the strains tested, respectively. MFC of the oil ranged between 32 and 256 µg/ml; being 64 µg/ml able to inhibit 90% of the fungal strains. Amphotericin B and fluconazole were used as positive controls because they are the most commonly used antifungal drugs for the treatment of candidemia in pediatrics⁵. The MIC of the amphotericin B and fluconazole ranged between 0.5-1 and 0.5-8 µg/ml, respectively. The results for the control showed no fungal growth inhibition (Table 1).

According to the above results and to the criteria proposed by Morales *et al.* (2008), the geraniol, amphotericin B and fluconazole exhibited a strong antifungal activity against *Candida albicans* because their MIC values were lower than 100 µg/ml. In the literature, geraniol proved to be active against bacteria, including against *Streptococcus mutans*^{15,33} fungi: against *Trichophyton* species³⁴, *Aspergillus* species and against *Candida* spp.³⁵, including fluconazole-resistant and susceptible-dose dependent *Candida* isolates³⁶.

In accordance with the geraniol MIC value (MIC₉₀ = 64 µg/ml) in the present study, similar study results were found by Leite *et al.* (2015) (MIC₉₀ = 16 µg/ml)¹⁷, by Tampieri *et al.* (2005) (MIC = 100 µg/ml)³⁷, by Sharma (2016) (MIC of 30-130µg/ml)³⁸ and by Shweta *et al* (2016) (MIC = 256 µg/ml)³⁹, who considered geraniol to be a good anti-*Candida* agent. It was even more effective than that previously reported where it exhibited antifungal activity against *C. albicans* at or above 300 µg/ml^{40,41,36}.

In addition, according Hafidh *et al.* (2011) the MFC/MIC ratio is used to specify the nature of the antimicrobial effect against a particular pathogen. When the MFC/MIC ratio is between 1:1 and 2:1, the chemical is considered fungicidal. On the other hand, if the ratio is > 2:1, it is more likely to be fungistatic⁴². In the present study, the MFC/MIC ratios of geraniol were 1 or 2, this suggests that phytochemical has a fungicidal effect against the strains tested. This result is in accordance with previous studies that also reported the fungicidal effect of geraniol, using the kill time method in strains of *C.*

*albicans*¹⁷ (Leite *et al.* 2015) and using agar disc diffusion assay in strains of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*³⁸. Fungicidal activity is clinically more important than fungistatic activity. The prophylactic use of fungistatic drugs has been associated with an increased frequency of innate or acquired resistance in clinical isolates⁴³. Our results are encouraging as they indicate that geraniol is fungicidal and not fungistatic and also suggest that it may help in resolving the issue of drug resistance due the use of fungistatic drugs in fungal strains.

Table 2: Effect of geraniol against *Candida albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of 0.8M sorbitol.

Drug	MIC (µg/ml)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Without sorbitol	With sorbitol	Whitout sorbitol	With sorbitol
Geraniol	32	32	32	32

Due to its pronounced anti-*C. albicans* activity, geraniol has been studied in more detail using two strains of *Candida albicans* (ATCC 60193 and AM-09). To investigate the action of the product on the fungal cell wall we performed the sorbitol assay. Sorbitol is an osmotic protector used to stabilize fungi protoplasts, protecting the fungal cell wall from environmental stresses, particularly osmotic changes. Products that act on the cell wall cause lysis of fungal cells in the absence of sorbitol, but fungi can grow in the presence of sorbitol. This effect is detected by increases in the MIC value as observed in medium with sorbitol as compared to the MIC value in medium without sorbitol (standard medium)^{7,23}. In the present work, the MIC of the geraniol against *C. albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of sorbitol was the same: 32 µg/ml (Table 2). The results suggest that this phytochemical does not act by modifying the fungal cell wall, but probably by affecting another target. Similar results were observed by Leite *et al.* (2015) where the MIC values were unchanged for geraniol in presence and absence of sorbitol against *Candida albicans* strains¹⁷.

Table 3: Effect of geraniol and amphotericin B against *Candida albicans* ATCC 60193 and AM-09 in the absence and presence of ergosterol 400 µg/ml.

Drugs	MIC (µg/ml)			
	ATCC 60193		AM-09	
	Without ergosterol	With ergosterol	Whitout ergosterol	With ergosterol
Geraniol	32	32	32	32
Amphoterecin B	0.5	64	0.5	64

The next step of this work was to determine if geraniol acts by affecting ergosterol in the fungal cell. Ergosterol is the main sterol of yeasts and thus is necessary for growth and normal membrane function of cells. Besides serving as a bioregulator of membrane fluidity, asymmetry and membrane integrity, ergosterol contributes to the proper function of membrane-bound enzymes⁴⁴. If the activity of compound was caused by binding ergosterol, it would increase the MIC of compound when the assay was conducted with the presence of ergosterol because the exogenous ergosterol would

prevent the binding to ergosterol in the fungal membranes²⁴. Thus, the MIC of geraniol and amphotericin B was determined with and without the addition of ergosterol. As can be seen in table 3, geraniol displayed no changes in MIC values. This indicates that the primary mechanism of action of geraniol does not involve complexation with ergosterol. Amphotericin B, a positive control having a known interaction with ergosterol²⁴, showed a MIC value about 100 times greater in the presence of sterol (Table 3). Leite *et al.* (2015) observed similar results in *Candida albicans*, when described that the MIC value of geraniol was not altered in the presence of exogenous ergosterol¹⁷.

Several studies have reported the mechanism of anti-*Candida* activity of geraniol appears to be associated with damage in the membrane integrity. According to Sharma *et al.* (2016) the geraniol disrupts cell membrane integrity and function by interfering with ergosterol biosynthesis and inhibiting the PM-ATPase that plays a crucial role in fungal cell physiology and hence is a promising new antifungal target for drugs³⁸. Zore *et al.* (2011) have shown that geraniol increased the rate of potassium leakage out of whole cells, increasing the membrane permeability (by decreasing phase transition temperature of dipalmitoyl phosphatidyl choline vesicles), and inhibited growth of *C. albicans* and *S. cerevisiae*⁴¹.

In addition, Shweta *et al.* (2016) reveals the mechanisms of action of geraniol on clinical *Candida albicans* isolates from diabetic patients suffering from oral candidiasis affects the fungal membrane and cell wall. The membrane tampering was observed by depleting ergosterol levels and altering plasma membrane ATPase activity leading disruption not only membrane but cell wall integrity as well. The data also reveal that geraniol causes mitochondrial dysfunction, impaired iron homeostasis and the function calcineurin signaling pathway is indispensable for *C.albicans* cells to sustains geraniol stress³⁶. The difference between ours and the results presented above could be explained by the different methodologies and different microorganisms used in the works.

Furthermore, it has been reported in the literature that geraniol inhibits both virulence attributes of hyphal morphogenesis and biofilm formation^{17,36,38}. The findings of this work are interesting, but mechanisms of action for geraniol against *Candida albicans* isolates from pediatric clinical importance need to be better investigated in order to justify and validate the later clinical application.

CONCLUSION

The present study demonstrated that geraniol has excellent antifungal activity against *Candida albicans* isolates from pediatric clinical importance. The likely primary mechanism of the geraniol's action appears not to involve cell walls, or binding to membrane ergosterol. Therefore, the test product is presented as a relevant and thus contributing to the existing arsenal of products with proven antifungal activity against *Candida albicans*. In addition, this information is important for future pharmacological applications of geraniol with the prospect of developing a new, safe and effective antifungal for the treatment of systemic mycoses. However, preclinical and clinical studies are needed to investigate whether geraniol acts on other targets in the fungal cell and to correlate the potent *in vitro* - *in vivo* antifungal activity, thus confirming the efficacy and safety of the compound for later clinical application.

REFERENCES

1. Hà JF, Italiano CM, Health CH, Shih S, Rea S, Wood FM. 2011. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns* 2011; 37: 181 – 95.
2. da Silva DA, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 2016; 34: 111 - 118.
3. Steinbach WJ. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. *J. Fungi* 2016; 2: 5 - 10.
4. Tournu H, Serneels J, Van Dijck P. Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Curr Drug Targets*. 2005; 6: 909–922.
5. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses* 2015; 58: 10 - 21.
6. Khan SMA, 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*. *Med Mycol* 2012; 50: 33 – 42.
7. Svetaz L, Agüero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, Tapia A, Zacchino S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med* 2007; 73: 1074 - 80.
8. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005; 366: 1013 - 25.
9. Lapczynski A, Bhatia SP, Foxenberg RJ, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on geraniol. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:S160–S170.
10. Crespo R, Wei K, Rodenak-Kladniew B, Mercola M, Ruiz-Lozano P, Hurtado C. Effect of geraniol on rat cardiomyocytes and its potential use as a cardioprotective natural compound. *Life Sci*. 2017; [Epub ahead of print].
11. Ozkaya A, Sahin Z, Gorgulu AO, Yuce A, Celik S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016; 6(1):29-35.
12. Wang J, Su B, Zhu H, Chen C, Zhao G. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. *Exp Ther Med*. 2016; 12(6):3607-3613.
13. Chirumbolo S, Bjørklund G. The Antinociceptive Activity of Geraniol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017; 120(2):105-107.
14. Lee S, Park YR, Kim SH, Park EJ, Kang MJ, So I, Chun JN, Jeon JH. Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. *Cancer Med*. 2016; 5(10):2899-2908.
15. Asad A S, Chonglong W, Young-Ryun C, Jae-Yean K, Eui-Sung C, Seon-Won K. Enhancement of geraniol resistance of *Escherichia coli* by MarA overexpression. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013; 115(3): 253–258.
16. Merlini V, Luparia M, Porta A, Zanoni G, Vidari G. Biomimetic cyclization of geraniol derivatives, a useful tool in the total synthesis of bioactive monocyclic terpenoids. *Nat Prod Commun*. 2011; 6:465–476.
17. Leite MC, de Brito BAP, Sousa JP, Oliveira EL. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol* 2015;53: 275 - 84.
18. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64: 711 – 713.

19. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 2000; 11: 137 – 147.
20. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA.
21. 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– 794.
22. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J. Clin Microbiol* 2002; 40: 3776 – 3781.
23. Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J of Antibiotics* 1995; 48: 306 – 310.
24. Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod* 71: 1720 - 1725.
25. Gungi S, Arima K, Beppu T. 1983. Screening of antifungal according to activities inducing morphological abnormalities. *Agric Biol Chem* 47: 2061 - 9.
26. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. 2011. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 6: e24198.
27. Fisher BT, Vendetti N, Bryan M, Prasad PA, Russell Localio A, Damianos A, Coffin SE, Bell LM, Walsh TJ, Gross R, Zaoutis TE. Central Venous Catheter Retention and Mortality in Children With Candidemia: A Retrospective Cohort Analysis. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2016; 5: 403 – 408.
28. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. 2016. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Pol J Microbiol.* 65: 111 - 4.
29. Simões ER, Santos EA, de Abreu MC, Silva Jdo N, Nunes NM, da Costa MP, Pessoa OD, Pessoa C, Ferreira PM. 2015. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J Intercult Ethnopharmacol* 4: 256 - 63.
30. Lima IO, N´obrega FM, Oliveira WA et al. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm Biol* 2012; 50 (12): 1536–1541.
31. Singh BR, Singh V, Singh RK, Ebibeni N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *IRJPP* 2011; 1(9): 228– 236.
32. Quitans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NMN, Bonjardim LR, Santos MRV, Alves PB, Blank AF, Antonioli AR. 2008. Phytochemical screening and anticonvulsivante activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in Rodents. *Phytomedicine* 15: 619 - 624.
33. Singh D, Kumar TRS, Gupta VK, Chaturvedi P. Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations. *Indian J Exp Biol* 2012; 50 (10): 714–717.
34. Pereira FO, Mendes JM, Lima IO, Mota KSL, Oliveira WA, Lima EO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against

- Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm Biol*, 2015; 53(2): 228–234.
35. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Dur'an C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (6): 878–884.
 36. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quind'os G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11: 119.
 37. Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 2005; 159 (3): 339–345.
 38. Sharma Y, Khan LA, Manzoor N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *J Mycol Med*. 2016 ; 26(3):244–54.
 39. Shweta S, · Zeeshan F, · Saif H. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol* (2016) 198:459–472.
 40. Bard M, AlbrechtMR, Gupta N, Guynn CJ, Stlllwell W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* 1988; 23 (6): 534–538.
 41. Zore GB, Thakre AD, Rathod V, Karuppayil SM. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses* 2011b; 54(4): 99–109.
 42. Hafidh RR, Abdulamir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, Sekawi Z. 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J* 5: 96 – 106.
 43. Monk BC, Goffeau A. 2008. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* 321: 367 - 9.
 44. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res Microbiol* 161: 816 - 23.

5.5 Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* essential oil, citronellal and geraniol on *Candida* non-albicans isolated of pediatric clinical importance

Artigo a ser submetido na *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*.

ISSN: 0719-4250, Qualis CAPES na área de Farmácia B5

Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* essential oil, citronellal and geraniol on *Candida* non-albicans isolated of pediatric clinical importance

[Actividad antifúngica del aceite esencial de *Cymbopogon winterianus*, citronellal y geraniol sobre *Candida* no albicans aislado de importancia clínica pediátrica]

Ana Luísa de Araújo Lima^{1*}, Abrahão Alves de Oliveira Filho², Ana Luíza Alves de Lima Pérez⁴, Janiere Pereira de Sousa³, Lilian Sousa Pinheiro¹, José Pinto de Siqueira Júnior¹ and Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

²Academic Unit Biological Sciences, Federal University of Campina Grande, Paraíba, Brazil.

³Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil.

⁴Posgraduate Program in Dentistry School of Dentistry, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

*Email: analuisalima2@hotmail.com

Abstract

Context: Although *Candida* spp. is considered a commensal microorganism in the human body, it can cause infections, including blood stream infections (BSI) in immunosuppressed children. BSI are among the most important causes of death in hospitalized pediatric patients and *Candida* species represent a major problem in hospitals worldwide. *Cymbopogon winterianus* oil essential as well their majority phytoconstituents citronellal and geraniol have pharmacological properties, including antimicrobial activity.

Aims: The aim of this work was to evaluate these substances for antifungal activity against hospital strains of *Candida* non-albicans isolated from candidemias of childrens.

Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the broth microdilution techniques.

Results: The MIC₅₀ values of *C. winterianus* oil essential, citronellal and geraniol for isolates tested were 128, 128 and 32 µg/mL, respectively. Already the MFC₅₀ of *C. winterianus* oil essential, citronellal and geraniol for isolates tested were 128, 128 and 64 µg/mL, respectively.

Conclusions: Thus, these substances showed *in vitro* antifungal potential against strains of *Candida* non-albicans isolated from pediatric clinical importance. Further study is needed to describe their mechanism of action.

Keywords: antifungal activity, *Candida* non-albicans, *Cymbopogon winterianus*, essential oil, citronellal, geraniol, pediatric.

Resumen

Contexto: Aunque *Candida* spp. se considera un microorganismo comensal en el cuerpo humano, puede causar infecciones, incluyendo infecciones de flujo sanguíneo (BSI) en niños inmunosuprimidos. BSI se encuentran entre las causas más importantes de muerte en pacientes pediátricos hospitalizados y las especies de *Candida* representan un problema importante en los hospitales de todo el mundo. *Cymbopogon winterianus* óleo esesial así como su mayoría fitoconstituintes citronellal y geraniol tienen propiedades farmacológicas, incluyendo actividad antimicrobiana.

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue evaluar estas sustancias para la actividad antifúngica contra cepas hospitalarias de *Candida* no albicans aisladas de cadidemias de niños.

Métodos: Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (MFC) mediante las técnicas de microdilución en caldo.

Resultados: Los valores de MIC₅₀ de aceite de *C. winterianus* esesial, citronellal y geraniol para aislados fueron 128, 128 y 32 µg / mL, respectivamente. Ya el MFC₅₀ de aceite de *C. winterianus* esesial, citronellal y geraniol para aislados ensayados fueron 128, 128 y 64 µg / mL, respectivamente.

Conclusiones: Por lo tanto, estas sustancias mostraron potencial antifúngico in vitro contra cepas de *Candida* no albicans aisladas de importancia clínica pediátrica. Es necesario seguir estudiando para describir su mecanismo de acción.

Palabras clave: actividad antifúngica, *Candida* no albicans, *Cymbopogon winterianus*, aceite esencial, citronelal, geraniol, pediátrico.

INTRODUCTION

Candidemia is an important concern in the clinical medicine related to the public health, mainly because of the high mortality rates in hospitalized and immunocompromised children. Worldwide, *Candida* species represents the third most common cause of healthcare-acquired blood stream infections (BSI) and the mortality associated with pediatric candidiasis can exceeds 30% (Steinbach, 2016). Studies about candidemia in the pediatric population in Brazil showed that *C. albicans* remains the most frequent species of yeast isolated from bloodstream infections in hospitalized children, but candidemias caused by non-albicans species has been increasing. The isolates of *C. non-albicans* species includes *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. pararugosa* (Ruiz et al., 2013; Oliveira et al., 2014a).

Considering that BSI caused by non-albicans species are more difficult to be treated due to its innate or acquired resistance to antifungal agents with consequent increase in therapeutic failure (Morace et al., 2011). Moreover, the amount of antifungal agents available for systemic therapy is reduced and has a high toxicity (Khan et al., 2012), it highlights the importance of research of new antifungals compounds which could constitute alternatives to the existing drugs (Svetaz et al., 2007).

In this context, our attention has been focused on the antifungal activities of aromatic plants because of their potential biological properties. *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor belongs to the Poaceae family, is an aromatic medicinal grass, and is popularly known as “citronella” and has various uses, such as anti-tumoral (Ganjewala et al., 2009), antibacterial (Scazzocchio et al., 2016), anticonvulsant, antioxidant (Silva et al., 2010), insecticide (Silva et al., 2016) and antimycotic activities, including against *Candida* spp., (Oliveira et al., 2011). The majority constituents of this essential oil are citronellal and geraniol (Quintans-Júnior et al 2008; Aguiar et al., 2014) that are monoterpenes and have been proposed to play beneficial roles in diverse physiological systems, including antifungal activity against fungi from adult clinical importance (Wu et al., 2016).

Due the antifungal properties of these plant-derived products, the aim of our study was to evaluate the essential oil of *Cymbopogon winterianus* as well their majority phytochemicals citronellal and geraniol for antifungal activity against hospital strains of *Candida non-albicans* from BSI of pediatric patient.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Geraniol, citronellal, amphotericin B and fluconazole were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil), whereas dimethylsulfoxide (DMSO) and Tween 80

were purchased from Labsynth products for Laboratories Ltd. (Diadema, SP, Brazil). The emulsion used in the antifungal assays was prepared at the time of the execution of the tests. The drugs were dissolved in DMSO, Tween 80 and sterile distilled water was used to obtain an initial concentration of 1024 µg/mL. The mixture was kept under stirring for 3 minutes, in a Vortex apparatus (Fanem® Ltd., Guarulhos, SP, Brazil). The essential oil of *C. winterianus* Jowitt ex Bor was obtained from hydrodistillation by Dr. Paulo Alves Wanderley at Universidade Federal da Paraíba (UFPB). The plant identification was performed by Dr. Rita Baltazar de Lima at Botany Laboratory of the UFPB. The code of voucher specimen is JPB 41387 and it was placed in the Herbarium Professor Lauro Pires Xavier at UFPB.

Growth media

To test the biological activity of the products, Sabouraud glucose agar (SGA) were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), agar-cornmeal from HiMédia Laboratories (Mumbai, MH, India), and RPMI-1640, with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) culture media were used. They were prepared and used according to the manufacturers' instruction. The media were solubilized in distilled water and sterilized by autoclaving at 121°C, 1.0 atm. for 15 min.

Fungal sample

The assays were performed with six hospital strains of *Candida* isolated from BSI of pediatric patients and two strains ATCCs used as standard. Two clinical strains of *Candida tropicalis* (AM-01 and AM-12); two strains of *Candida parapsilosis* (AM-05 and AM-14) and two strains of *Candida pelliculosa* (AM-03 and AM-11). The strains used as standard were *C. tropicalis* ATCC 13803 and *C. parapsilosis* ATCC 22019. These strains belong to the collection of the Mycological Laboratory of the UFPB and were maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) at 4°C until used in tests.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC was determined by the microdilution method (Eloff, 1998). Cultures of *Candida* spp. were placed on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated for 24-48 hours at temperature 37°C. Colonies of this culture were suspended in sterile 0.85% NaCl and the inoculum was standardized according to the scale of 0.5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL). In a 96-well plate was added liquid medium RPMI-1640 and the essential oil of *Cymbopogon winterianus*, citronellal or geraniol concentrations of 1024 to 0.5 µg/mL. The MIC determination was conducted with approximately $1-5 \times 10^5$ CFU/mL of the microorganism in each well. The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. In 24-48 hours there was a visual observation of fungal growth. The MIC was defined as the lowest oil concentration that inhibited visible growth of the yeast (Hadacek and Greger, 2000; CLSI, 2008). There were three independent experiments in duplicate on different occasions and the results were expressed as the arithmetic mean of the MIC.

Determination of minimum fungicidal concentration (MFC)

To determine the MFC, 10 µl of each of the wells without fungal growth was seeded on a plate containing SDA, the SDA plating were incubated at 37°C for 24-48 hours. The MFC was considered as the lowest concentration cultivated in plate with SDA in which growth was less than 3 CFU (Espinel-Ingroff et al., 2002). A negative control (without drugs) was performed to confirm cell viability (Eloff, 1998). A sensitivity

control to Tween 80 and DMSO was performed at the same concentrations used to dissolve the products. The results were expressed as the arithmetic mean of three experiments.

RESULTS

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the essential oil of *Cymbopogon winterianus*

As seen in Table 1, the MIC of the essential oil tested ranged between 64 and 256 µg/mL. The concentration of 256 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 128 µg/mL was able to inhibit more than 50% of the strains tested. MFC of microorganisms ranged between 128 and 512 µg/mL, being the latter fungicidal for all strains tested. The MFC₅₀ (minimum fungicidal concentration able to inhibit 50% of the fungal strains) of *C. winterianus* oil essential was 128 µg/mL. The ratio between MFC/MIC showed a bactericidal effect for almost strains tested, except for *Candida parapsilosis* (AM-05) strain that showed bacteriostatic effect. The MIC of the amphotericin B ranged between 0.5 and 1 µg/mL. Concerning fluconazole, the MIC ranged between 0.5 and 8 µg/mL. The results for the control showed no fungal growth inhibition.

Table 1: MIC, MFC, MFC:MIC and effect of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* and the MIC of amphotericin B and fluconazole in *Candida non albicans* strains.

Yeasts	<i>C. winterianus</i> essential oil (µg/mL)				AmB (µg/mL)	Fluc (µg/mL)	Control strains ^a
	MIC	MFC	MFC: MIC	Effect	MIC	MIC	
<i>C. tropicalis</i>							
ATCC 13803	128	128	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-01	128	128	1:1	cide	1	1	+
AM-12	128	256	2:1	cide	0.5	0.5	+
<i>C. parapsilosis</i>							
ATCC 22019	128	128	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-05	128	512	4:1	tatic	1	1	+
AM-14	256	512	2:1	cide	0.5	4	+
<i>C. pelliculosa</i>							
AM-03	256	256	1:1	cide	1	8	+
AM-11	64	128	2:1	cide	1	8	+

Legend: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; AmB, amphotericin B; Fluc, fluconazole; cide, fungicide; tatic, fungistatic; ^a yeast growth in RPMI-1640, DMSO (5%) and Tween 80 (2%), without antifungal or drug tested.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the essential oil of citronellal

As shown in table 2, the MIC of citronellal tested ranged between 64 and 256 µg/mL. The concentration of 256 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 128

µg/mL was able to inhibit 70% of the strains tested. MFC of the substance ranged between 128 and 512 µg/mL; being 128 µg/mL able to inhibit 80% of the fungal strains. The ratio between MCF/MIC showed a bactericidal effect for all strains tested, except for *Candida parapsilosis* (AM-05) and *Candida tropicalis* (AM-01) strains that showed bacteriostatic effect. The MIC of the amphotericin B ranged between 0.5 and 1 µg/mL. Concerning fluconazole, the MIC ranged between 0.5 and 8 µg/mL. The results for the control showed no fungal growth inhibition.

Table 2: MIC, MFC, MFC:CIM and effect of the citronellal and the MIC of amphotericin B and fluconazole in *Candida non albicans* strains.

Yeasts	Citronellal (µg/mL)				AmB (µg/mL)	Fluc (µg/mL)	Control strains ^a
	MIC	MFC	MFC: MIC	Effect	MIC	MIC	
<i>C. tropicalis</i>							
ATCC 13803	128	128	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-01	128	512	4:1	tatic	1	1	+
AM-12	128	128	1:1	cide	0.5	0.5	+
<i>C. parapsilosis</i>							
ATCC 22019	128	128	1:1	cide	0.5	0.5	+
AM-05	128	512	4:1	tatic	1	1	+
AM-14	256	512	2:1	cide	0.5	4	+
<i>C. pelliculosa</i>							
AM-03	64	128	2:1	cide	1	8	+
AM-11	64	128	2:1	cide	1	8	+

Legend: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; AmB, amphotericin B; Fluc, fluconazole; cide, fungicide; tatic, fungistatic; ^a yeast growth in RPMI-1640, DMSO (5%), and Tween 80 (2%), without antifungal or drug tested.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the essential oil of geraniol

Concerning geraniol, the MIC ranged between 32 and 128 µg/mL. The concentration of 128 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 32 µg/mL was able to inhibit more than 50% of the strains tested. MFC of the geraniol ranged between 32 and 256 µg/mL; being 64 µg/mL able to inhibit 50% of the fungal strains. The ratio between MCF/MIC showed a bactericidal effect for all strains tested, except for *Candida parapsilosis* (AM-05) and *Candida tropicalis* (AM-01) strains that showed bacteriostatic effect. The MIC of the amphotericin B ranged between 0.5 and 1 µg/mL. Concerning fluconazole, the MIC ranged between 0.5 and 8 µg/mL. The results for the control showed no fungal growth inhibition (Table 3).

Table 3: MIC, MFC, MFC:CIM and effect of the geraniol and the MIC of amphotericin B and fluconazole in *Candida non albicans* strains.

Yeasts	Geraniol ($\mu\text{g/mL}$)				AmB ($\mu\text{g/mL}$)	Fluc ($\mu\text{g/mL}$)	Control strains ^a
	MIC	MFC	MFC: MIC	Effect	MIC	MIC	
<i>C. tropicalis</i>							
ATCC 13803	32	64	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-01	64	256	4:1	tatic	1	1	+
AM-12	32	32	1:1	cide	0.5	0.5	+
<i>C. parapsilosis</i>							
ATCC 22019	32	64	2:1	cide	0.5	0.5	+
AM-05	32	256	8:1	tatic	1	1	+
AM-14	128	256	2:1	cide	0.5	4	+
<i>C. pelliculosa</i>							
AM-03	128	256	2:1	cide	1	8	+
AM-11	32	64	2:1	cide	1	8	+

Legend: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; AmB, amphotericin B; Fluc, fluconazole; cide, fungicide; tatic, fungistatic; ^a yeast growth in RPMI-1640, DMSO (5%), and Tween 80 (2%), without antifungal or drug tested.

DISCUSSION

BSI caused by *Candida* species represents a important cause of death in hospitalized pediatric patients and represent a major problem in hospitals worldwide (Falagas, 2010). *C. albicans* remains the most frequent species of yeast isolated from BSI. However, other species with more reduced susceptibility to antifungal agents, such as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. guilliermondii* are steadily increasing their isolation frequency (Nucci 2013).

The natural products, particularly medicinal plants and their phytochemicals, persist as an important source of new therapeutic agents against diseases (Simões et al., 2015). The essential oil which is rich in mono- and sesquiterpenes represents another source of potential commercial value because their several pharmacological activities including anti-fungal, antibacterial, antiparasitic, others (Bilia et al., 2014). The monoterpenes alcohols citronellal and geraniol are constituting about 24 and 20% as a main component of *C. winterianus* essential oil and are important due to their various pharmacological activities including antifungal and antibacterial effects (Quintans-Júnior et al., 2008; Leite et al., 2015). So, the aim of our study was to evaluate the essential oil of *Cymbopogon winterianus* as well their majority phytochemicals citronellal and geraniol for antifungal activity against hospital strains of *Candida non-albicans* from BSI of pediatric patient.

As seen in Table 1, the MIC₅₀ and MFC₅₀ of the essential oil tested was 128 $\mu\text{g/mL}$. This results are in accordance to our previous study that reported similar MIC₅₀ and MFC₅₀ values against *Candida albicans* from BSI of pediatric patient (ARTIGO 2). However, antifungal activity of *C. winterianus* essential oil against *Candida albicans* isolated from adult clinical importance was demonstrated by Duarte (2005) and Oliveira et al. (2011) with high MIC values (MIC 600-1250 $\mu\text{g/mL}$), in contrast to our results.

This could be explained by the difference of the origin of microorganisms in the mentioned works.

The MIC of citronellal tested ranged between 64 and 256 $\mu\text{g/mL}$. The concentration of 128 $\mu\text{g/mL}$ was able to inhibit 70% of the strains tested. MFC of the substance ranged between 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$; being 128 $\mu\text{g/mL}$ able to inhibit 80% of the fungal strains (Table 2). In the present study, citronellal showed potential antifungal activity against *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa* confirming the results obtained in our previous studies against *C. albicans* also isolated from BSI of pediatric patient that reported for 90% of isolates, the MIC and MFC of the phytochemical was 128 $\mu\text{g/mL}$ (Lima et al. 2017a).

The antimicrobial activity of the products was interpreted (considered active or not), according to the criteria proposed by Sartoratto et al. (2004): strong/good activity (MIC $<500 \mu\text{g/mL}$) and Morales et al. (2008): strong/good activity (MIC $<100 \mu\text{g/mL}$); moderate activity (MIC 100–500 $\mu\text{g/mL}$); weak activity (MIC 500–1000 $\mu\text{g/mL}$); and inactive product/no antimicrobial effect (MIC $>1000 \mu\text{g/mL}$). According to the criteria proposed by Satoratto et al. (2004), the *C. winterianus* essential oil and citronellal exhibited a strong antifungal activity against *Candida* non-albicans because their MIC values were lower than 500 $\mu\text{g/mL}$. In the literature, *C. winterianus* essential oil and citronellal proved to be active against bacteria and fungi (Aguiar et al., 2014; Lopez-Romero et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Singh et al., 2016), including against *Candida albicans* and non-albicans, in accordance to our results (Duarte (2005) and Oliveira et al. (2011) and Singh et al. (2016).

Concerning geraniol, the MIC ranged between 32 and 128 $\mu\text{g/mL}$. The concentration of 128 $\mu\text{g/mL}$ inhibited the growth of all strains, while 32 $\mu\text{g/mL}$ was able to inhibit more than 50% of the strains tested. MFC of the geraniol ranged between 32 and 256 $\mu\text{g/mL}$; being 64 $\mu\text{g/mL}$ able to inhibit 50% of the fungal strains (Table 3). These results are in agreement with our previous study evaluating the antifungal activity of geraniol against strains of *Candida albicans* isolated from pediatric patient bloodstream infections and demonstrated that for 90% of isolates, the MIC and MFC of the geraniol was 64 $\mu\text{g/mL}$ (Lima et al., 2017b). Similar results with *C. albicans* and non-albicans were found by Tampieri et al. (2005), Leite et al. (2015) and Sharma (2016) reporting MIC values between 16–130 $\mu\text{g/mL}$, who considered geraniol to be a good anti-*Candida* agent.

Amphotericin B and fluconazole were used as positive controls because they are the most commonly used antifungal drugs for the treatment of candidemia in pediatrics (Tragiannidis et al., 2015). The MIC of the amphotericin B and fluconazole ranged between 0.5–1 and 0.5–8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results for the control showed no fungal growth inhibition (Table 1, 2 and 3). According to the above results and to the criteria proposed by Morales et al. (2008), the geraniol, amphotericin B and fluconazole exhibited a strong antifungal activity against *Candida* non-albicans because their MIC values were lower than 100 $\mu\text{g/mL}$.

In addition, according Hafidh et al. (2011) the MFC/MIC ratio is used to specify the nature of the antimicrobial effect against a particular pathogen. When the MFC/MIC ratio is between 1:1 and 2:1, the chemical is considered fungicidal. On the other hand, if the ratio is $> 2:1$, it is more likely to be fungistatic. In the present study, the the MFC/MIC ratios of *C. wintwrianus* oil essential showed a bactericidal effect for almost strains tested, except for *Candida parapsilosis* (AM-05) strain that showed bacteriostatic effect (Table 1). The MFC/MIC ratios of citronellal and geraniol were 1 or 2, this suggests that pytochemicals have a fungicidal effect against the strains tested, except for *Candida parapsilosis* (AM-05) and *Candida tropicalis* (AM-01) strains that

showed bacteriostatic effect (Table 2 and 3). This result is similar with previous studies of our group that reported *C. wintwrianus* oil essential, citronellal and geraniol as fungicidal against strains of *C. albicans* (ARTIGO 2, Lima et al., 2017a and b, Leite et al., 2015). Fungicidal activity is clinically more important than fungistatic activity. The prophylactic use of fungistatic drugs has been associated with an increased frequency of innate or acquired resistance in clinical isolates (Monk, 2008).

The findings of this work are interesting, but mechanisms of action for *C. wintwrianus* oil essential, citronellal and geraniol against *Candida* non-albicans isolates from pediatric clinical importance need to be better investigated in order to justify and validate the possible later clinical application.

CONCLUSIONS

The present study demonstrated that *Cymbopogon winterianus* essential oil, citronellal and geraniol has significant antifungal activity against *Candida* non-albicans isolates from pediatric clinical importance, i. e., blood stream infections. Therefore, the test product is presented as a relevant and thus contributing to the existing arsenal of products with proven antifungal activity against *Candida* spp. However, more studies are needed to investigate the mechanism of action of these natural products.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Federal University of Paraíba (UFPB).

REFERENCES

- Aguiar RWS, Ootani MA, Ascencio SD, Ferreira TPS, Santos MM, dos Santos GR (2014) Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. The Scientific World Journal 2014: 1-8
- Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R (2014) Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. Evid Based Complement Alternat Med. 2014:159819.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3ed. Wayne, PA, USA. 2008.
- Duarte MCT, Figueira G M, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C (2005) Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J. Ethnopharmacol 97: 305-311.
- Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 64:711 –713.
- Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A and Rinaldi MG (2002) Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. Journal of Clinical Microbiology 40:3776– 3781.
- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ (2010) Relative frequency of 3 albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from

- inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 14:e954 – 966.
- Frost DJ, Brandt KD, Cugier D and Goldman R (1995) A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *Journal of Antibiotics* 48:306–310.
- Ganjewala D, Silviya S and Khan HK (2009) Biochemical composition and antibacterial activities of *Lantana Camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *Eur Asia Journal Bioscience* 3, 69–77.
- Hadacek F, Greger H (2000) Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 11(3): 137–147.
- Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, Sekawi Z (2011) Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J* 5: 96 – 106.
- Khan SMA, Malik A, Ahmad I (2012) 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* 50:33–42.
- Leite MC, de Brito BAP, Sousa JP, Oliveira EL (2015) Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol* 53: 275 - 84.
- Lima ALA, Pérez ALAL, Sousa JP, Pinheiro LS, Oliveira-filho AA, Siqueira-júnior JP, Lima EO (2017a) Antifungal Activity of Citronellal on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance. *Latin American Journal of Pharmacy* 36 (4): 2042-2047.
- Lima ALA, Pérez ALAL, Sousa JP, Pinheiro LS, Oliveira-filho AA, Siqueira-júnior JP, Lima EO (2017b) Antifungal Activity of Geraniol on *Candida albicans* Isolates of Pediatric Clinical Importance. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9 (4): 581-586.
- Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M (2015) Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 795435.
- Monk BC, Goffeau A (2008) Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Sci* 321: 367-9.
- Morace G, Borghi E, Iatta R, Amato G, Andreoni S, Brigante G, et al (2011) Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. *BMC Infect Dis* 11:130
- Morales G, Paredes A, Sierra P and Loyola LA (2008) Antimicrobial activity of three *baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules* 13: 790– 794.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Corte J, Zurita J, et al (2013) Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *Plos One* 8:e59373.
- Oliveira WA, Arrua JMM, Wanderley PA, Lima RB and Lima EO (2015) Effects of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. *Rev Pan-Amaz Saude* 6:21-26.
- Oliveira WA, Pereira FO, Luna GCDG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, et al. (2011) Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. *Braz J Microbiol* 42:433-41.
- Oliveira VKP, Ruiz LS, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo ASA, Nishikaku AS, and Paula CR (2014a) Fungemia caused by candida species in a Children's Public

- Hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56:301-5.
- Quintans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NMN, Bonjardim LR, Santos MRV, Alves PB, Blank AF, Antonioli AR (2008) Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* 15:619–624.
- Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, et al. (2013) Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia* 175:231-9
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 35:275-280.
- Scazzocchio F, Garzoli S, Conti C, Leone C, Renaioli C, Pepi F, Angiolella L (2016) Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. *Nat Prod Res* 30:1909-18.
- Sharma Y, Khan LA, Manzoor N (2016) Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *J Mycol Med* 26:244-54.
- Silva CT, Wanderley-Teixeira V, Cunha FM, Oliveira JV, Dutra Kde A, Navarro DM, Teixeira ÁA (2016) Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118:347-52.
- Silva MR, Ximenes RM, da Costa JG, Leal LK, de Lopes AA, Viana GS (2010) Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 381(5):415-26
- Simões ER, Santos EA, de Abreu MC, Silva Jdo N, Nunes NM, da Costa MP, Pessoa OD, Pessoa C, Ferreira PM (2015) Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J Intercult Ethnopharmacol* 4:256-63.
- Singh S., Zeeshan F. and Hameed S (2016) Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Rev Soc Bras Med Trop* 49: 465-472.
- Steinbach WJ (2016) Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. *J Fungi* 2:5.
- Svetaz L, Aguero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, et al. (2007) Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med* 73(10):1074-80.
- Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F et al. (2005) The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 159: 339–345.
- Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH (2015) Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses* 58:10-21.
- Wu Y, Qiuli OY, Nengguo T (2016) Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. *J Food Sci Technol* 53: 3853–3858.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que:

- ✓ *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada de infecções de corrente sanguínea em crianças internadas no hospital público pediátrico da cidade de João Pessoa – PB; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. pelliculosa* tiveram a mesma frequência de isolamento. O perfil de susceptibilidade das cepas não foram resistentes aos agentes antifúngicos fluconazol, voriconazol, anfotericina B, flucitosina, micafugina e caspofugina. Destaca-se que este estudo é o primeiro a expor dados epidemiológicos, como prevalência e perfil de susceptibilidade de espécies de *Candida*, sobre candidemia na população pediátrica em João Pessoa - PB, Brasil.
- ✓ Confirmaram-se os potenciais antifúngicos do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, citronelal e geraniol, especialmente contra cepas de *Candida albicans* e não-albicans.
- ✓ A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus*, citronelal e geraniol não envolve interação com a parede celular nem com ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica.
- ✓ O óleo essencial de *C. winterianus*, citronelal e geraniol podem ser considerados como potenciais produtos com propriedades antifúngicas, especialmente contra *Candida* spp. de importância clínica pediátrica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. W. S.; OOTANI, M. A.; ASCENCIO, S. D.; FERREIRA, T. P. S.; SANTOS, M. M.; DOSSANTOS, G. R. Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

ALEXANDER, B.; JOHNSON, M.; PFEIFFER, C.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, p. 1724–1732, 2013.

ARENDRUP, M.C. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. 46-98, 2013.

ASAD, A. S.; CHONGLONG, W.; YOUNG-RYUN, C.; JAE-YEAN, K.; EUI-SUNG, C.; SEON-WON, K. Enhancement of geraniol resistance of *Escherichia coli* by MarA overexpression. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 253–258, 2013.

ASCHER, S. B.; SMITH, P. B.; WATT, K.; BENJAMIN, D. K.; COHEN-WOLKOWIEZ, M.; CLARK, R. H.; BENJAMIN, J. R.; MORAN C. Antifungal Therapy and Outcomes in Infants with Invasive *Candida* Infections. **Pediatric Infection Disease Journal**, v. 31, n. 5, p. 439–443, 2012.

AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438-53, 2015.

AYENI, O.; RIEDERER, K. M.; WILSON, F. M.; KHATH, R. Clinicians reactions to positive urine culture for *Candida* organisms. **Mycoses**, v. 42, p. 285-289, 1999.

BACHEWICH, C.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. Depletion of a polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 2163–2180, 2003.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVEBERCK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-75, 2008.

BALEY, J.E. Fungal colonization in the very low birth weight infant. **Pediatrics**, v. 78, p. 225–232, 1986.

BENDEL, CM. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. **Seminars Perinatology**, v. 27, p. 357–364, 2003.

BERROUANE, Y. F.; HERWALDT, I. A.; PFALLER, M. A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 531-537, 1999.

BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7-8, p. 1086-96, 2012.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI, BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECO, R.; EHLERT, P. A. D.; SOUSA, I. F. Influence of season harvest time and drying on Java citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.

BOWYER, P.; MOORE, C. B.; RAUTEMAA, R.; DENNING, D. W.; RICHARDSON, M. D. Azole Antifungal Resistance Today: Focus on *Aspergillus*. **Current Infection Disease Report**, p. 1-7, 2011.

BRASIL, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Modulo 3: Principais Síndromes Infecciosas. 2013a.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Modulo 8: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. 2013b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/2012. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. 12p. 2012.

BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), 2006. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug Discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 413-418, 2014.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-35, 2001.

CANT'ON, E.; PEM'NA, J.; SASTRE, M.; ROMERO, M.; ESPINEL-INGROFF, A., Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2829-2832, 2006.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 550-563, 2002.

CARMO, E. S.; PEREIRA, F. O.; MOREIRA, A. C. P.; BRITO, L. L.; GAYOSO, C. W.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O. Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC)

Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo; v. 71, n. 2, p. 386-91, 2012.

CARNESECCHI, S.; BRADAIA, A.; FISCHER, B.; COELHO, D.; SCHOLLER-GUINARD, M.; GOSSE, F.; RAUL, F. Perturbation by Geraniol of Cell Membrane Permeability and Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer Cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 303, n. 2, 2002.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457-465, 2011.

CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M.; CHEN, Y. L. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2016.

CHENG, S. C.; VAN DE VEERDONK, F. L.; LENARDON, M.; STOFFELS, M.; PLANTINGA, T.; SMEEKENS, S.; RIZZETTO, L.; MUKAREMERA, L.; PREECHASUTH, K.; CAVALIERI, D.; KANNEGANTI, T. D.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN L. A.; GOW, N.A.; NETEA, M. G. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, p. 357-366, 2011.

CHIRUMBOLO, S.; BJØRKLUND, G. The Antinociceptive Activity of Geraniol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 105-107, 2017.

CHO, M.; SO, I.; CHUN, J.N.; JEON, J.H. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). **Internatinal Journal of Oncology**, v. 48, n.5, p. 1772-82, 2016.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infection. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams & Wilkins, p. 739-787, 1991.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F. D.; SALLES, M. J.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**; v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Jounal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-23, 2006.

CRESPO, R.; WEI, K.; RODENAK-KLADNIEW, B.; MERCOLA, M.; RUIZ-LOZANO, P.; HURTADO, C. Effect of geraniol on rat cardiomyocytes and its potential use as a cardioprotective natural compound. **Life Sciences**, 2017; [Epub ahead of print].

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA J.R.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409-412, 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 54-9, 2014.

DALLE, F.; WÄCHTLER, B.; L'OLLIVIER, C.; HOLLAND, G.; BANNERT, N.; WILSON, D.; LABRUÈRE, C.; BONNIN, A.; HUBE, B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cell Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248-71, 2010.

de SANTANA, M. T.; DE OLIVEIRA, M. G.; SANTANA, M. F.; DE SOUSA, D. P.; SANTANA, D. G.; CAMARGO, E. A.; DE OLIVEIRA, A. P.; ALMEIDA, J. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. , p. 1144-9, 2013.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233-52, 2011.

DEVEAU, A.; PIISPANEN, A. E.; JACKSON, A. A.; HOGAN, D. A. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. **Eukaryotic Cell**, v. 9, p. 569–577, 2010.

DOUGLAS, J. L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 30-6, 2004.

DREW, R. H.; TOWNSEND, M. L.; POUND, M. W.; JOHNSON, S. W.; PERFECT, J. R. Recent advances in the treatment of life-threatening, invasive fungal infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 17, p. 2361-74, 2013.

DUARTE, M C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology**, v. 15, p. 155-66, 2003.

ECE, G. Distribution of Yeast-Like Fungi at a University Hospital in Turkey. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 12, p. e13141, 2014.

EGGIMAN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685-702, 2003.

EKPENYONG, C. E.; AKPA, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extract [J]. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p. 321-337, 2015.

EMRI, T.; MAJOROS, L.; TÓTH, V.; PÓCSI, I. Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3267-84, 2013.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M. G. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3776-3781, 2002.

FARINA, C.; MANSO, E.; ANDREONI, S.; CONTE, M.; FAZIL, P.; LOMBARDI, G.; SANNA, S.; RUSSELLO, G. Interlaboratory evaluation of VITEK2 system and Sensititre YeastOne® for antifungal susceptibility testing of yeasts isolated from blood cultures against four antifungal agents. **New Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 195-201, 2011.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M.; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O.; RAMÍREZ-CABRERA, M.A.; ESQUIVEL-FERRIÑO, P. C.; CAMACHO-CORONA, M. D. E. L. R. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 24, 2016.

FORTÚN, J. Antifungal therapy update: new drugs and medical uses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 38-44, 2011.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 306-309, 1995.

FURLANETO-MAIA, L. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-17, 2008.

GANJEWALA, D.; SILVIYA, S.; KHAN, K. Biochemical composition and antibacterial activities of Lantana Camera plants with yellow, lavender, red and white flowers. **EurAsia Journal of Bioscience**, v. 3, p. 69-77, 2009.

GARCIA-EFFRON, G.; KATIYAR, S. K.; PARK, S.; EDLIND, T. D.; PERLIN, D. S. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2305–2312, 2008.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; ALVAREZ, M.; EZPELETA, G.; GÓMEZ-NIETO, A.; IGLESIAS, I.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; RAMÍREZ-DE-OCARIZ, I.; REZUSTA, A.; ROYO-GARCÍA, G. Incidencia etaria y geográfica y patrón de sensibilidad a los antifúngicos de las especies de *Candida* causantes de candidemia en la población pediátrica española. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, p. 363-8, 2013.

GIANNATTASIO, A.; VEROPALUMBO, C.; MARI, L.; MARRA, V.; ANDREUCCI, M. V.; CAPASSO, L.; RAIMONDI, F. Treatment of fungal infections: an update. **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, v. 3, n. 2, p. e030242, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnostico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOLIA, S. K.; REDDY, K. M.; KARJIGI, S.; HITTINAHALLI, V. Speciation of *Candida* using chromogenic and corn meal agar with determination of fluconazole sensitivity. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 6, p. 163–166, 2013.

GOW, N. A. R., VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G.. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 112-122, 2012.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 6, p. 5-10, 2014.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agentes. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choise. **Phytochemistry Anal**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R.; ABDULAMIR, A. S.; VERN, L. S.; BAKAR, F. A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96 – 106, 2011.

HAJJEB, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, I.H. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519–1527, 2004.

HALL, R. A. CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. e1001193, 2010.

HEDDERWICK S. A. Epidemiology of yeast colonization. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, p. 663– 670, 2000.

HIERRO, I. Action of diferente monoterpenic compounds against simplex s. I. L3 larve. **Phytomedicine**, v. 11, p. 77-82, 2004.

HINRICHSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses oh *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

IBRAHIM, S. M.; EL-DENSHARY, E. S.; ABDALLAH, D. M. Geraniol, alone and in combination with pioglitazone, ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats via the modulation of both inflammatory and oxidative stress status. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117516, 2015.

JEON, J. H.; LEE, C. H.; LEE, H. S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1468-1471, 2009.

KALLAAYONE, K.; BIRON, J. M.; CHAOUI, A.; DUVALLET, G. Efficacy of 1% geraniol (Fulltec) as a tic repellent. **Parasite**, v. 16, p. 223-226, 2009.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e clínica**. 13^a ed., McGraw-Hill- AMGH, Porto Alegre, 2017.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A. A.; ALI, S. M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A. U. Antimicrobial activity os five herbal extracts against multidrug resistant (MRD) strains of bactéria and fungus of clinical origin. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 586-597, 2009.

KIRKPATRICK, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.31, p.S14–S17, 1994.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cell Microbiology**, v. 7, p. 1546-54, 2005.

KUMAR, G.; KUMAR, S. J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, p. 213-8, 2006.

LAPCZYNSKI, A.; BHATIA, S. P.; FOXENBERG, R. J.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11-S1, p. S160-S170, 2008.

LE BOURVELLEC, C.; BUREAU, S.; RENARD, C. M.; PLENET, D.; GAUTIER, H.; TOULOUMET, L.; GIRARD, T.; SIMON, S. Cultivar and Year Rather than Agricultural Practices Affect Primary and Secondary Metabolites in Apple Fruit. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141916, 2015.

LEE, S.; PARK, Y. R.; KIM, S. H.; PARK, E. J.; KANG, M. J.; SO, I.; CHUN, J. N.; JEON, J. H. Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 2899-2908, 2016.

LEITE, M. C.; DE BRITO, B. A. P.; SOUSA, J. P.; OLIVEIRA, E. L. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, p. 275 – 84, 2015.

LENG, P.; SUDBERY, P. E.; BROWN, A. J. Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 1264–1275, 2000.

LIU, W.; XU, X.; ZHANG, R.; CHENG, T.; CAO, Y. LI, X.; GUO, J.; LIU, H.; XIAN, M. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 58, 2016.

LONGHI-WAGNER, H. M. *Poaceae*: an overview with reference to Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, Rio de Janeiro, 2012.

LOPEZ-ROMERO, J. C.; GONZÁLEZ-RÍOS, H.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 795435, 2015.

MACHADO, B. F. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, p. 105-127, 2011.

MAIDAN, M. M. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Gα protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 1971–1986, 2005.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E., MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 119, 2011.

MAßBERG, D.; SIMON, A.; HÄUSSINGER, D.; KEITEL, V.; GISSELMANN, G.; CONRAD, H.; HATT, H. Monoterpene (–)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 566, p. 100 – 109, 2015.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, p. 251–264, 2013.

MELO, M. S.; SANTANA, M. T.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, R. S.; SOUSA, D. P.; SANTOS, R. V.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S.; ONOFRE, A. S. C.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 697–703, 2011b.

MELO, S. M.; GUIMARÃES, A. G.; SANTANA, M. F.; SIQUEIRA, R. S.; DE LIMA, A. C. B.; DIAS, A. S.; SANTOS, M. R. V.; ONOFRE, A. S. C.; QUINTANS, J. S. S.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ESTEVAM, C. S.; ARAUJO, B. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. **Biological Research**, v. 44, p. 363-368, 2011a.

MICELI, M.H.; LEE, S.A. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. **Mycoses**, p. 1- 13, 2011.

MILADINOVIĆ, D. L.; ILIĆ, B. S.; KOCIĆ, B. D.; MILADINOVIĆ, M. D. An *in vitro* antibacterial study of savory essential oil and geraniol in combination with standard antimicrobials. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1629-32, 2014.

MORACE, G.; BORGHI, E.; IATTA, R.; AMATO, G.; ANDREONI, S.; BRIGANTE, G. Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 130-139, 2011.

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; LOYOLA, L. A. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 790– 794, 2008.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 28-33, 2010.

MUKHERJEE, D.; MUKHERJEE, A.; GHOSH, T. C. Evolutionary Rate Heterogeneity of Primary and Secondary Metabolic Pathway Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Biology Evolution**; v. 8, n. 1, p. 17-28, 2015.

NAKAHARA, K.; ALZOREKY, N. S.; YOSHIHASHI, T.; NGUYEN, H. T. T.; TRAKOONTIVAKORN, G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 37, p. 249–252, 2003.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assesment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1797-1806, 2008.

NOBILE, J. C. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v. 18, p. 1017-24, 2008.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTE, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **Plos One**, v. 8, p. 59373, 2013.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infection. **Journal American Academic Dermatology**, v. 31, p. 2-5, 1994.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; NETO, J. M. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, 2010.

OLIVEIRA, H. M. B. F.; FILHO, A. A. O.; LIMA, E. O.; JÚNIOR, J. P. S. Antifungal effect of synthetic isomer (R)-(+)-citronellal against *Candida* strains. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 36, p. 408-411, 2017.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de oleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OLIVEIRA, V. K.; RUIZ, L. D. A. S.; OLIVEIRA, N. A.; MOREIRA, D.; HAHN, R. C.; MELO, A. S.; NISHIKAKU, A. S.; PAULA, C. R. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 301-5, 2014.

OLIVEIRA, W. A. Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatos*. Doctoral thesis, Federal University of Paraíba, Brazil, p. 1 – 164, 2011a.

OLIVEIRA, W. A.; ARRUA, J. M. M.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. Effects of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, p 21 – 26, 2015a.

OLIVEIRA, W. A.; PEREIRA, F. O.; LUNA, G. C. D. G.; LIMA, I. O.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 433 – 41, 2011b.

OMBRELLA, A. M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales com distintos valores de pH. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 12-6, 2008.

OZKAYA, A.; SAHIN, Z.; GORGULU, A. O.; YUCE, A.; CELIK, S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 29-35, 2016.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; SILVA, B. M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; SALGUEIRO, L. Are plant extracts a potential therapeutic approach for genital infections? **Current Medicinal Chemistry**; v. 20, n. 23, p. 2914-28, 2013.

PAULA, C. R.; MONTELLI, A. C.; RUIZ, L. S.; BATISTA, G. C. M.; MATSUMOTO, F. E.; VOLPERARNONI, M. Infecção hospitalar fúngica: experiência em hospitais públicos de São Paulo. **Prática Hospitalar**, v. 52, p. 63-6, 2007.

PAULA, C.R.; KREBS, V. L. J.; AULER, M. E.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; SILVA, E.H.; DINIZ, E.M.; VAZ, F.A. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. **Medical Mycology**, v. 44, p. 479-84, 2006.

PEREIRA, F.O. Atividade Antifúngica Do Óleo Essencial De *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Paraíba, 2009.

PEREIRA, F.O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p. 233-242, 2011.

PERLIN, D.S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on antifungal drug resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 84-95, 2015.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 760–3, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2846–56, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; PROCOP, G. W.; RINALDI, M. G. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3522–8, 2007.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 42-8, 2014.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DA ROCHA, R. F.; CAREGNATO, F. F.; MOREIRA, J. C. F.; DA SILVA, F. A.; ARAÚJO, A. A.; DOS SANTOS, J. P. A.; MELO, M. S.; DE SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; GELAIN, D. P. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 630–639, 2011.

QUITANS-JÚNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M. N.; BONJARDIM, L. R.; SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in Rodents. **Phytomedicine**, v. 15, p. 619-624, 2008.

RAMAGE, G. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 163-70, 2001.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAYMOND, J.; AUJARD, Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, p. 260–263, 2000.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 5-11, 2005.

ROCHA, D.; VIEIRA, F.A.S. Levantamento Epidemiológico de Infecções Fúngicas de Pacientes Atendidos em um Laboratório da Região do Vale dos Sinos, RS. NewsLab - edição 12, p. 100-108, 2014.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 398-405, 2008.

RUIZ, L. S.; KHOURI, S.; HAHN, R. C.; DA SILVA, E. G.; DE OLIVEIRA, V. K.; GANDRA, R. F. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, p. 231-9, 2013.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2006.

SANGLARD D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, p. 1-10, 2016.

SANTOLAYA, M. E.; ALVARADO, T.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A. L.; ZURITA, J.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.A.; THOMPSON, L.; GUZMAN, M.; SIFUENTES, J.; ECHEVARRÍA, J. I.; NUCCI, M. Active Surveillance of Candidemia in Children from Latin America: A Key Requirement for Improving Disease Outcome. **The Pediatric Infection Disease Journal**, v. 33, p. e40–e44, 2014.

SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; QUINTANS, J. S. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, M. R. V.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R. S.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ARAÚJO, A. S. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v. 23, p. 948–957, 2016.

SARIGUZEL, F. M.; BERK, E.; KOC, A. N.; SAV, H.; AYDEMIR, G. Evaluation of CHROMagar *Candida*, VITEK2 YST and VITEK[®] MS for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Le Infezioni in Medicina**, v. 23, n. 4, p. 318-22, 2015.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 275-280, 2004.

SCAZZOCCHIO, F.; GARZOLI, S.; CONTI, C.; LEONE, C.; RENAIOLI, C.; PEPI, F.; ANGIOLELLA, L. Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. **Natural Product Research**, v. 30, p. 1909 – 18, 2016.

SHAPIRO, R. S. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. **Currents in Biology**, v. 19, p. 621–629, 2009.

SHARMA, Y.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal of Mycology Medicine**, v. 26, n. 3, p. 244-54, 2016.

SHASANY, A. K.; LAL, R. K.; PATRA, N. K.; DAROKAR, M. P.; GARG, A.; KUMAR, S. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 553-9, 2000.

SHI, Q. M.; WANG, Y. M.; ZHENG, X. D.; LEE, R. T.; WANG, Y. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 815–826, 2007.

SHWETA, S.; ZEESHAN, F.; SAIF, H. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. **Archives Microbiology**, v. 198, p. 459–472, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 2004.

SILVA, C. F.; MOURA, F. C.; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P. Extraction of Citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical co₂, experimental data and mathematical modelling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 28, p. 343 – 350, 2010b.

SILVA, C.T.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, J. V.; DUTRA, K. D. E.; NAVARRO, D. M.; TEIXEIRA, Á. A. Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. **Acta Histochemica**, n. 118, p. 347 – 52, 2016.

SILVA, M.R.; XIMENES, R.M.; DA COSTA, J.G.; LEAL, L.K.; DE LOPES, A. A.; VIANA, G. S. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. Naunyn Schmiedebergs **Archives of Pharmacology**, n. 381, p.415 – 26, 2010a.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 2014.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA, J. R. A.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F.L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.71, n.3, p.471-80, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 6ed, 2007.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. **Archives in Microbiology**, v. 198, n. 5, p. 459-72, 2016.

SINGH, S.; ZEESHAN, F.; HAMEED, S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 49, p. 465-472, 2016.

SINGHI, S.; DEEP, A. Invasive Candidiasis in Pediatric Intensive Care Units. **Indian Journal of Pediatrics**, v.76, n. 10, p. 1033-44, 2009.

SOLL, D. R. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology**, v. 18, p. 153-5, 2008.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 204-237, 2013.

SPILLIOPOULOU, A.; VAMVAKOPOULOU, S.; BARTZAVALI, C.; DIMITRACOPOULOS, G.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Eleven year retrospective survey of candidaemia in a university hospital in southwestern Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 1378–81, 2010.

STEINBACH, W. J. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. **Journal of Fungi**, v.2, n.1, p.5-13, 2016.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A. M.; LIBMAN, M.; LEMIEUX, C.; NOEL, G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 949-953, 2001.

STICHTERNOTH, C. Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 10, p. 502–511, 2011.

STICHTERNOTH, C.; ERNST, J. F. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3663–3672, 2009.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 737-748, 2011.

TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p.339–345, 2005.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Virulence factors for *Candida* spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, 2007.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-92, 2005.

TRINDADE, L. A.; DE ARAÚJO OLIVEIRA, J.; DE CASTRO, R. D.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-31, 2015.

VALGUS, J. M. What's new in antifungals? **Current Infection Disease Reports**, v. 5, p. 16-21, 2003.

van DE VEERDONK, F. L. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 2260–2268, 2011.

VIJAYA, D.; HARSA, T. R.; NAGAATNAMMA, T. *Candida* specification using chrom agar. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 5, p. 755–777, 2011.

WANG, J.; SU, B.; ZHU, H.; CHEN, C.; ZHAO, G. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 6, p. 3607-3613, 2016.

WISPLINGHOFF, H.; EBBERS, J.; GEURTZ, L.; STEFANIK, D.; MAJOR, Y.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P.; SEIFERT, H. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78-81, 2014.

WISPLINGHOFF, H.; SEIFERT, H.; TALLENT, S. M. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. **The Pediatric Infection Disease Journal**, n. 22, p. 686-91, 2003.

WU, Y.; OUYANG, Q.; TAO, N. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 3853–3858, 2016.

XU, X. L. Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. **Cell Host Microbe**, v. 4, p. 28–39, 2008.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001.

ZAOUTIS, T. Candidemia in children. **Current Medical Research & Opinion**, v. 26, n. 7, p.1761–1768, 2010.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. Á.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis. **Clinical Infection Disease**, v. 41, p. 1232–1239, 2005.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1181– 1190, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1



**GOVERNO
DA PARAÍBA**
AGORA É A VEZ DE IR MAIS LONGE



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

CENTRO FORMADOR DE RECURSOS HUMANOS – CEFOR-RH

TERMO DE ANUÊNCIA

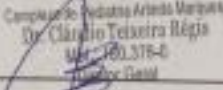
João Pessoa, 24 de agosto de 2016.

Declaramos para os devidos fins que a pesquisa intitulada: **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, citronelal e geraniol sobre o gênero *Candida* de origem hospitalar**, a ser desenvolvida sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Luisa de Araújo Lima, sob orientação do docente Prof^o Dr. José Pinto de Siqueira Júnior e coorientação da Prof^a Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, está autorizado para ser realizado junto a este Serviço.

Outrossim, informamos que para ter acesso a qualquer Serviço da Rede Estadual de Saúde da Paraíba, fica condicionada a apresentação da Certidão de Aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa, devidamente credenciado junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, ao Serviço que receberá a pesquisa.

Sem mais,

Atenciosamente,

Campeão Pedrito Ariado Marinho

Dr. Cláudio Teixeira Regis
CPF: 380.378-0
Diretor Geral

Dr. Cláudio Teixeira Regis
Diretor Geral do CPAM

Av. Alberto de Brito, s/n - Jaguaribe, João Pessoa - PB - CEP: 53.015-000
Telefone: 83

Scanned by CamScanner

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 1ª Reunião realizada no dia 09/02/2017, o Projeto de pesquisa intitulado: **“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CYMBOPODON WINTERIANUS JOWITT EX BOR, CITRONELAI E GERANIOL SOBRE O GÊNERO CANDIDA DE ORIGEM HOSPITALAR”**, da pesquisadora Ana Luisa de Araújo Lima. Protocolo nº 0721/16. CAAE: 61847516.5.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do relatório final do estudo proposto à apreciação do Comitê.

Andrea M. C. Lima
Andrea Mécia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP/CCS-UFPB