

Estudo do potencial antifúngico do composto D-Limoneno sobre cepas do gênero *Candida* e o desenvolvimento e avaliação de um sabonete contendo o produto

Study of antifungal potential of D-limonene compound on *Candida* genus strains and the development and evaluation of a soap containing the product

RESUMO

Gustavo da Silva Matos
gmatos@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Cleverson Busso
cleversonbusso@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Fungos do gênero *Candida* constituem parte da microbiota natural presente nas mucosas e pele de seres humanos, entretanto, por falhas no sistema imunológico estes podem vir a acarretar a candidíase. O tratamento é feito via antifúngicos, porém, uma crescente resistência a estes medicamentos vem preocupando a população devido aos riscos gerados pela doença. A busca por novos medicamentos eficientes no controle destes microrganismos torna-se necessária, logo, o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência de D-limoneno, um monoterpene de fácil obtenção e baixo custo no controle de fungos do gênero *Candida*. Para isso foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do composto sobre os isolados segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Com base na CIM obtida, um sabonete higiênico foi confeccionado e posteriormente submetido ao teste de controle perante os padrões do CLSI. Os resultados mostraram que o D-limoneno empregado diretamente sobre as *Candidas* foi eficiente em concentrações superiores a 36 mg/mL, já na composição do sabonete as CIM foram de 0,6 a 1,2 mg/mL. O presente estudo revelou que o D-limoneno possui atividade fungistática significativa, apresentando maior eficiência no sabonete higiênico, podendo esse ser um possível produto de higiene íntima, visando o controle destes patógenos.

PALAVRAS-CHAVE: Fungistática. CIM. Candidíase.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Fungi of the genus *Candida* are part of the natural microflora present in the mucous membranes and skin of humans, however due to failures in the immune system, these may cause candidiasis. The treatment is done via antifungal, but a growing resistance to these drugs is worrying the population due to the risks generated by the disease. The search for new drugs effective in the control of these microorganisms becomes necessary, therefore, the objective of this work was to verify the efficiency of D-limonene, a monoterpene easy to obtain and low cost in the control of fungi of the genus *Candida*. For it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound on the isolates according to standards established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Based on the MIC obtained, a hygienic soap was prepared and subsequently submitted to the test of control before the CLSI standards. The results showed that the d-limonene employed

directly on The Final Enigma was efficient in concentrations exceeding 36 mg/mL, already in the composition of the soap the CIM were 0.6 to 1.2 mg/mL. The present study revealed that the d-limonene has significant fungistatic activity, presenting greater efficiency in hygienic soap, which may be a possible intimate hygiene product, aiming at control these pathogens.

KEYWORDS: Fungistatic. CIM. Candidiasis.

INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Candida* são hospedeiros oportunistas da mucosa e pele de seres humanos, quando fatores fisiológicos, patológicos e mecânicos modificam o relacionamento entre hospedeiro e a microbiota, a doença denominada candidíase se manifesta (ROSSI et al., 2011), atingindo superfícies cutâneas e membranas mucosas resultando em infecções como a candidíase oral, vaginal, peniana e cutânea em suma (HARTMANN et al., 2017).

A maioria dos estudos acerca dessa problemática mostram que o principal agente das candidíases é a *Candida albicans*, correspondendo a cerca de 60% dos isolados clínicos (BARBEDO, 2010). Porém alguns outros agentes também vêm tomando proporção dentre os isolados clínicos, são eles: *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

O tratamento para candidíase normalmente consiste no uso de pomadas antifúngicas ou medicamentos antimicóticos de uso oral a base de azóis, como o clotrimazol e o fluconazol. Azóis são compostos heterocíclicos aromáticos que atuam como inibidores da biossíntese do ergosterol, sendo esse o componente da membrana celular de fungos, e o principal regulador da integridade da mesma (GIUSIANO et al., 2006).

Observando a crescente insuficiência dos antifúngico tradicionais no controle de patógenos como os do gênero *Candida*, a busca por novos compostos com amplo espectro de ação, baixo custo, e alta eficiência no tratamento tornam-se necessárias. Uma alternativa viável é o uso de agentes orgânicos, como o D-Limoneno, o monoterpeno mais abundante na natureza (BAUER et al., 2001).

Estudos acerca do efeito antimicrobiano e antifúngico de diversos monoterpenos obtidos através de óleos essenciais como é o caso do citral, citronelal e isopulegol (GARCIA, 2008), vem obtendo resultados positivos quanto a inibição e controle de certos patógenos, tornando o D-Limoneno um potencial agente antifúngico eficiente, de baixo custo e de grande abundância no Brasil. Devido a escassez na literatura sobre o uso isolado do D-Limoneno contra fungos patogênicos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do composto majoritário isolado e presente em óleos essenciais contra fungos do gênero *Candida*.

MATERIAL E MÉTODOS

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi realizada segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). Para a determinação da mesma, células viáveis de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* foram retiradas de placas de ágar Sabouraud e semeadas em erlenmeyers contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI), seguidas de incubação durante 36 horas a 30°C. Após o crescimento, os inóculos foram preparados seguindo a escala 0,5 McFarland, isto é, densidade óptica de 0,12 a 530 nm, correspondendo a cerca de $2,5 \times 10^5$ unidade formadoras de colônia (UFC) por mL ajustadas em espectrofotômetro. Para preparação do D-Limoneno foram usados 0,35 mL do mesmo, 0,02 mL de emulsificante Tween 80, e 0,63 mL de caldo BHI, a solução foi homogeneizada em vortex, e 200 µL da solução foram adicionados aos quatro primeiros poços da primeira coluna da microplaca. Posteriormente 0,1 mL de caldo BHI foram dispostos aos demais poços da placa seguidos pela diluição realizada a proporção de 1:1. Em seguida com a concentração celular já conhecida, 0,02 mL da suspensão celular foram inseridas em cada um dos 96 poços. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 30°C. Para a revelação da CIM foram adicionados 0,02 mL do corante de viabilidade celular cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e as microplacas incubadas novamente a 30°C por mais 24 horas. A determinação da CIM é uma correlação entre o aparecimento de uma coloração avermelhada nos poços e a sedimentação de células na parte inferior dos mesmos.

FABRICAÇÃO DO SABONETE

Para a fabricação do sabonete foram utilizadas 0,85 g de base glicerina, 0,1 mL de Lauril sulfato de sódio, 0,05 mL de Tween 80, 1 gota de corante alimentício e 0,6 mL de D-Limoneno, cerca de 0,5 g. A concentração base do composto usada foi a antecessora ao poço da CIM, sendo ajustada a 3,3 % m/v e posteriormente aumentada em 10 vezes para confecção do sabonete. Em um béquer foram adicionadas a base glicerina e o Lauril, o recipiente foi então levado ao banho maria a temperatura de 60 °C até a liquefação total da solução, em seguida adicionou-se o D-Limoneno emulsionado com Tween 80 e o corante. Após a mistura, a solução foi depositada em formas de plástico para a solidificação e posterior embalagem.

O mesmo procedimento foi empregado na confecção de um sabonete controle, sem a adição de D-Limoneno, sendo este substituído por água destilada.

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE D-LIMONENO EMPREGADO EM SABONETE CASEIRO

Para tal o mesmo método empregado na CIM foi usado, alterando somente a preparação do composto a ser analisado. 1 g do sabonete sólido foi diluído em 10 mL de água destilada com auxílio de agitador magnético. Essa nova solução agora com a concentração de 3,9 % v/v foi adicionada aos 6 primeiros poços da primeira coluna da microplaca, seguido dos procedimentos padrões da CIM.

AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DO SABONETE ATRAVÉS DO MÉTODO DE *spot-test*

O *spot-test* consiste em um teste posterior ao da CIM, podendo este revelar uma possível atividade fungicida ou fungistática do composto frente a uma determinada espécie de *Candida* neste caso, através do crescimento ou ausência do mesmo. Para isso, após o período de incubação das microplacas, verificou-se a presença de células nos poços através da diferença de turbidez, qualitativamente definindo assim a CIM. Com a concentração definida foram retirados e inoculados em placas de petri contendo ágar Sabouraud alíquotas de 0,005 mL de cada poço adjacente ao da CIM de todas as repetições, em sequência, mantendo cerca de 1 cm de cada ponto inoculado. Após o inóculo, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 24 horas. O resultado é evidenciado frente ao crescimento ou ausência de células em cada um dos pontos da placa inoculados.

RESULTADOS

A Tabela 1 é o resultado do teste da concentração inibitória mínima de D-Limoneno, revelando assim a menor concentração do monoterpene capaz de impedir o metabolismo das *Candidas*, nesse caso. O *score* para a CIM é dado com a presença do composto cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) que quando reduzido pelo metabolismo de microrganismos a formazano, apresenta coloração avermelhada, logo a presença de uma coloração avermelhada nas microplacas indica a atividade metabólica, evidenciando assim o crescimento ou não do fungo nas mais diferentes concentrações de D-Limoneno.

Tabela 1 – CIM de D-Limoneno frente aos fungos do gênero *Cândida*

Microrganismo	CIM (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	18,4
<i>Candida krusei</i>	4,6
<i>Candida glabrata</i>	36,8
<i>Candida parapsilosis</i>	18,4

Fonte: Autoria própria (2019).

Neste experimento evidenciamos também a resistência das quatro cepas frente a dois dos mais comuns antifúngicos comerciais, o fluconazol, e o clotrimazol. Os fungos foram resistentes a concentrações de até 100 mg para ambos.

Com base na CIM obtida no primeiro ensaio (Tabela 1), determinou-se a concentração de D-Limoneno a ser usada na fabricação do sabonete, suficiente para inibição dos patógenos, entretanto, o valor de 36,8 mg/ml correspondente a CIM do composto puro que garantisse a inibição total de todos os fungos não foi usada, a mesma serviu como base para que fosse determinada uma concentração mais elevada, garantindo assim a eficácia do monoterpene quando misturado aos componentes usados na fabricação do sabonete.

Como a ação dos componentes usados na fabricação do sabonete sobre o crescimento do patógeno era desconhecida, um controle foi desenvolvido, substituindo o D-Limoneno por água em sua composição. O controle mostrou que os microrganismos são resistentes a composição química do sabonete, exceto onde não há a presença de nutrientes.

A Tabela 2 mostra o resultado da CIM do sabonete contendo D-Limoneno. Observa-se uma considerável diminuição da concentração do monoterpene quando disposto na formulação do sabonete necessária para a inibição do crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

Para *C. krusei* a concentração do sabonete foi de fato eficiente, porém não muito diferente do composto puro. Tal fato pode ter ocorrido devido a uma resistência já adquirida, desenvolvendo assim mutações após a exposição ao composto, havendo a seleção e sobrevivência destes mutantes (KANAFANI et al., 2008).

Tabela 2 – CIM do sabonete a base de D-Limoneno

Microrganismo	CIM (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	1,2
<i>Candida krusei</i>	1,2
<i>Candida glabrata</i>	0,6
<i>Candida parapsilosis</i>	0,6

Fonte: Autoria própria (2019).

O método do *spot-test* revelou que para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* o sabonete teve ação fungistática, não provocando a morte celular, mas sim a inibição do crescimento. Já para *C. glabrata* o mesmo agiu como fungicida, provocando a morte celular em todas as concentrações iguais ou superiores a de 0,6 mg/ml.

DISCUSSÃO

Os resultados sugerem uma maior efetividade do composto quando em conjunto com a formulação do sabonete, o que pode ser causado devido aos componentes do mesmo, entretanto tal possibilidade é descartada no experimento correspondente ao grupo controle, uma vez que não há a presença do monoterpene. Uma possível hipótese seria a de uma reação sinérgica entre o D-Limoneno e os componentes do sabonete, que por fim tornaram esse novo produto de fato mais efetivo no controle das *Candidas*.

CONCLUSÃO

Há um grande potencial fungistático de D-Limoneno sobre os fungos do gênero *Candida*, mostrando-se mais eficiente quando disposto na composição de sabonetes higiênicos, podendo esse ser um possível produto de higiene íntima e

de uso cutâneo em geral visando o controle destes patógenos. Para isso, testes de sensibilização do produto a pele devem ser realizados.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo fomento à bolsa de pesquisa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). Ao meu orientador Prof. Dr. Cleverson Busso, pelo empenho dedicado à orientação deste trabalho. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Campus Dois Vizinhos pela disponibilização do espaço físico laboratorial para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARBEDO, Leonardo S. Candidíase. *Review*. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials**. Preparation, Properties and Uses. 4th ed. Wiley VCH, Weinheim: Wiley - VHC, 2001. 293 p.
- GARCIA, Roxana et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian journal of microbiology : Brazilian Society for Microbiology*. v. 39, n. 1, p. 163–8, 2008.
- GIUSIANO, G; EZKURRA, P A; QUINDÓS, G. Review Antifungal agents : Mode of action in yeast cells. *Sociedad Española de Quimioterapia*, v. 19, n. June, p. 130–139, 2006.
- HARTMANN, Andreia et al. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i3.6556%09>>.
- KANAFANI, Zeina A; PERFECT, John R. **Resistance to Antifungal Agents : Mechanisms and Clinical Impact**. *Antimicrobial resistance*. v. 46, 2008.
- NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. [S.l.: s.n.], 2005. v. 23.
- ROSSI, Tatiane et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro, p. 15–28, 2011.. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367;2011v32n1p15>>.



IX SEMINÁRIO DE EXTENSÃO E INOVAÇÃO
XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA
11 a 13 de Novembro | Pato Branco - PR

