

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO AROMATIZANTE -HEXALACTONA

Bruna Machado Escobar ¹

Daiane Dalla Lana ²

Alexandre Meneghello Fuentefria ³

Luís Flávio Souza de Oliveira ⁴

Luísa Zuravski ⁵

Vanusa Manfredini ⁶

Resumo:

Espécies de *Candida* são frequentemente responsáveis pelo aparecimento de infecções fúngicas nosocomiais e comunitárias. A candidíase é considerada a mais usual entre as infecções fúngicas e geralmente é de difícil tratamento, fato este intrinsecamente relacionado aos fatores de virulência das espécies de *Candida* e à resistência à antifúngicos convencionais. Assim, a investigação de moléculas que representem uma alternativa ao uso dos antifúngicos tradicionais é de grande relevância. Neste sentido, este estudo objetivou avaliar o efeito antifúngico do aromatizante -hexalactona frente a espécies de *Candida*. O aromatizante, -hexalactona, foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), diluído no meio de cultura RPMI e testado na faixa de concentrações de 0,05 - 500 g/mL. O inóculo leveduriforme da cepa-referência de *Candida albicans* ATCC 18804 e demais *Candida* não-*albicans* (*C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*), foi preparado e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes e normas da CLSI. As microplacas foram incubadas a 35 °C e a leitura, após 2 dias (48 h) de incubação, foi realizada visualmente, considerando-se para determinação da CIM, 100% de inibição do crescimento fúngico, sempre em comparação com o crescimento do controle positivo. Assim, considerou-se como CIM a menor concentração do composto capaz de inibir totalmente o crescimento das espécies fúngicas utilizadas no ensaio. O teste foi realizado em triplicata e o resultado dos valores de CIM expresso em g/mL. O aromatizante, -hexalactona não demonstrou atividade antifúngica *in vitro* contra as espécies fúngicas utilizadas neste ensaio, nas concentrações avaliadas (0,05 - 500 g/mL). Testes adicionais devem ser realizados para avaliação do potencial antifúngico frente a outros gêneros.

Palavras-chave: Aromatizante, atividade antifúngica, *Candida* spp., *in vitro*.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO AROMATIZANTE -HEXALACTONA

¹ Aluno de graduação. cleescobar@yahoo.com.br. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. alexmf77@gmail.com. Co-autor

³ Docente. alexandre.fuentefria@ufrgs.br. Co-autor

⁴ Docente. tcheluisoliveira@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de pós-graduação. luisazuravski@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Docente. vanusa_manfredini@yahoo.com.br. Co-orientador



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO AROMATIZANTE γ -HEXALACTONA

1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* são frequentemente responsáveis pelo aparecimento de infecções micóticas nosocomiais e comunitárias. A candidíase é considerada a mais usual entre as infecções fúngicas e geralmente é de difícil tratamento, fato este intrinsecamente relacionado aos fatores de virulência das espécies de *Candida* e à resistência à antifúngicos convencionais (Da Silva *et al.*, 2014). Assim, a investigação de moléculas que representem uma alternativa ao uso dos antifúngicos tradicionais, é de grande relevância.

Moléculas químicas com anel lactônico vem sendo investigadas quanto ao seu potencial antifúngico (Sabitha *et al.*, 2014). Entre as moléculas pertencentes a esta classe química, destaca-se o γ -hexalactona (Figura 1), amplamente utilizado como aromatizante de bebidas alcoólicas, chás, pães, laticínios, cafés, produtos amanteigados entre outros, porém carente de estudos científicos que mensurem os seus potenciais efeitos biológicos.

Neste sentido, este estudo se propôs a avaliar o efeito antifúngico do aromatizante γ -hexalactona sobre espécies de *Candida*.

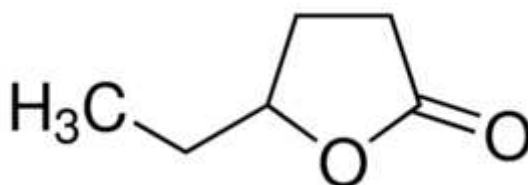


Figura 1 – Estrutura química do γ -Hexalactona.

Fonte: disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure0/165/mfcd00005401.eps/jcr_content/renditions/mfcd00005401-medium.png>, acesso em 14/09/2017.

2. METODOLOGIA

O aromatizante, γ -hexalactona, foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), diluído no meio de cultura RPMI e testado na faixa de concentrações de 0,05 - 500 $\mu\text{g/mL}$.

O inóculo leveduriforme da cepa-referência de *Candida albicans* ATCC 18804 e demais *Candida* não-*albicans* (*C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*), foi preparado conforme o protocolo da CLSI (Wayne, 2008). As leveduras foram subcultivadas em ágar sabouraud dextrose – ASD (Pronadisa, Madrid, Espanha), com incubação por 24 horas, a 35 °C. Cinco colônias de cada cultura foram adicionadas em um tubo de vidro estéril com salina 0.85% também estéril, seguindo agitação em vórtex por 15 segundos. A turbidez da suspensão fúngica foi ajustada espectrofotometricamente (Biospectro SP-220) a 530 nm, comparando-se com a densidade celular da suspensão padrão 0.5 MacFarland. A partir dessa suspensão com turbidez devidamente padronizada, fez-se uma diluição 1:50 e posteriormente, 1:20 em meio RPMI 1640 (contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich), obtendo-se o inóculo leveduriforme com

concentração final de 1.0×10^3 a 5.0×10^3 UFC.mL⁻¹ (concentração 2 x maior que a preconizada para o teste de suscetibilidade, já que ocorre diluição 1:2 no momento da inoculação na microplaca do referido ensaio).

Posteriormente ao preparo dos inóculos, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes e normas da CLSI (Wayne, 2008). Para o ensaio utilizou-se microplacas de poliestireno de 96 poços, com fundo em forma de “U” (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). Inicialmente, pipetou-se 100 µL do meio de cultura - meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich) nos poços da microplaca, da 2ª coluna até a 11ª e 200 µL nos poços da 12ª coluna. Uma alíquota de 200 µL composto teste foi adicionada na 1ª coluna da microplaca, procedendo-se a microdiluição seriada, pela transferência de 100 µL da 1ª coluna para a 2ª; da 2ª para a 3ª e assim sucessivamente até a 10ª coluna, desprezando-se 100 µL. Em decorrência desse processo, em cada coluna ocorre uma diluição 1:2 com o meio de cultura, de modo que a concentração das soluções-teste, a cada microdiluição, reduz pela metade. Por fim, adicionou-se 100 µL do inóculo, ficando cada poço da microplaca com um volume final de 200 µL. Desse modo, no ensaio, há a microdiluição para determinação da CIM, da 1ª até a 10ª coluna, há o controle de viabilidade do crescimento fúngico (controle positivo, 11ª coluna, meio de cultura e inóculo) e o controle de esterilidade do meio de cultura (controle negativo, 12ª coluna, somente meio RPMI 1640).

As microplacas foram incubadas a 35 °C e a leitura, após 2 dias (48 h) de incubação, foi realizada visualmente, considerando-se para determinação da CIM, 100% de inibição do crescimento fúngico, sempre em comparação com o crescimento do controle positivo. Assim, considerou-se como CIM a menor concentração do composto capaz de inibir totalmente o crescimento das espécies fúngicas utilizadas no ensaio. O teste foi realizado em triplicata e o resultado dos valores de CIM expresso em µg/mL.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O aromatizante, γ-hexalactona não demonstrou atividade antifúngica *in vitro* contra as espécies analisadas, *Candida albicans* e *Candida não-albicans*, na faixa de concentrações avaliada (0,05 - 500 µg/mL), conforme Tabela 1.

Tabela 1: Atividade antifúngica *in vitro* do aromatizante γ-hexalactona (valores de CIM em µg/mL).

Substância Teste	Leveduras - <i>Candida</i> spp.			
	CA ATCC 18804	CK 02*	CG 09*	CT 72A*
γ-Hexalactona	> 500	> 500	> 500	> 500

*Isolados clínicos multirresistentes; CIM, concentração inibitória mínima; CA, *Candida albicans*; CK, *Candida krusei*; CG, *Candida glabrata*; CT, *Candida tropicalis*

Apesar dos testes *in vitro* para determinação da atividade antifúngica serem amplamente utilizados, os mesmos carecem de padronização para a interpretação dos resultados. Algumas propostas são utilizadas como base para esta avaliação. Cos et al. (2006) propõem que uma substância isolada seja considerada biologicamente ativa quando se mostrar efetiva em concentrações inferiores a 25 µg/mL (Cos et al., 2006). Entretanto, uma classificação mais branda é proposta por Ayres et al. (2008) em que substâncias com bom potencial inibitório demonstram atividade em concentrações de até 100 µg/mL, atividade inibitória moderada de 100 - 500 µg/mL, atividade fraca de 500 - 1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL (Ayres et al.,

2008). Os resultados observados em nosso estudo não permitem classificar o aromatizante γ -hexalactona com potencial antifúngico frente a cepas de *Candida* spp. na faixa de concentrações testadas Kishimoto et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de lactonas análogas e observaram valores de CIM variando de 40,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Candida albicans* e frente a outros gêneros fúngicos, algumas lactonas se mostraram mais promissoras (Kishimoto et al., 2005).

Portanto, testes adicionais devem ser realizados para a definição da CIM do γ -hexalactona frente a outros gêneros fúngicos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aromatizante γ -hexalactona não demonstrou atividade antifúngica *in vitro* contra as espécies fúngicas utilizadas neste ensaio, nas concentrações avaliadas (0,05 - 500 $\mu\text{g/mL}$). Testes adicionais devem ser realizados para a definição da CIM do γ -hexalactona frente a outros gêneros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYRES, M. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DA SILVA, A. K. F. et al. Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *Candida*: uma revisão. Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde UNIT ALAGOAS, v. 2, n. 1, p. 45-57, 2014.

KISHIMOTO, N. et al. *In vitro* antifungal and antiviral activities of γ - and δ -lactone analogs utilized as food flavoring. Biocontrol Science, v. 10, n. 1-2, p. 31-36, 2005.

SABITHA, G. et al. Total synthesis of antifungal gamahonolide A. Tetrahedron Letters, v. 55, n. 21, p. 3227-3228, 2014.

WAYNE, P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard; CLSI document M27-A3. CLSI 2008a, v. 28, p. 6-12, 2008.