

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CARVACROL FRENTE A ISOLADOS SUPERFICIAIS E SISTÊMICOS DE *ASPERGILLUS FLAVUS*

César Augusto Costa de Medeiros ¹

RESUMO

Os fungos compreendem em todo mundo um grupo de microrganismos que podem causar sérios danos à saúde humana, animal e vegetal. Dentre os diversos gêneros fúngicos, *Aspergillus* apresenta-se com mais de 250 espécies, sendo estas amplamente distribuídas no meio ambiente. A inalação de conídios desta mesma espécie por ser humano é constante, e podem causar uma série de danos à saúde, que vão desde infecções sistêmicas agudas e crônicas, principalmente quando nos tratamos de pacientes imunocomprometidos. Muitas substâncias compuseram um amplo arsenal terapêutico contra este tipo de infecção, mas frente ao enorme crescimento de resistência microbiana, os pesquisadores mudaram os rumos das pesquisas para os produtos naturais, onde o carvacrol se apresenta como uma substância oriunda do óleo essencial de Cravo, e pode possivelmente apresentar atividade antifúngica para tal infecção. Dessa forma, avaliou-se a atividade antifúngica de cepas *Aspergillus flavus* isolados de infecções superficiais e sistêmicas. Para o desenvolvimento da pesquisa, preparou-se um inóculo fúngico de cada cepa fúngica previamente preparada, e após isto, uma série de diluições do produto natural e do antifúngico padrão foi realizada, de forma que as concentrações fossem de 1024 µg/mL até 4 µg/mL, caindo sempre pela metade. Após isto, foi realizado o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima, podendo observar valores de eficácia antifúngica para o carvacrol em 16 µg/mL e para a anfotericina B de 32 µg/mL, demonstrando assim seu potencial protetor contra espécies de *Aspergillus flavus*.

Palavras-chave: Fungos, Aspergilose, Antifúngico, Produtos Naturais.

INTRODUÇÃO

Os fungos são um crescente problema de saúde pública que acometem a população de todo o mundo, representando um grande impacto na saúde humana. A exposição a conídios pode causar graves efeitos adversos no bem-estar do indivíduo, como efeito tóxico-irritante em consequência da exposição (ODEBODE e NIMAWANYA, 2020; VIEGAS et al., 2019).

O gênero *Aspergillus* abrange mais de 250 espécies, amplamente distribuídos no meio ambiente, crescendo em plantas, materiais orgânicos, solos, ar, organismos vivos e em habitats de água doce e marinha. Considerado um molde conidial soprofitico, é um fungo filamentosos que apresenta hifas septadas que brotam em padrões lineares e ramificadas, descritos pela primeira vez em 1729 e nomeados desta forma por causa da sua semelhança com “cabeça

¹ Mestre pelo PgPNSB da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, cesaracmcosta@gmail.com;

áspera²² (SHETH et al., 2020; PAULUSSEN et al., 2017; SUGUI et al., 2014; DEMUYSER, DE COCK e SERMIJN, 2019).

Embora existam uma grande diversidade dentro do gênero *Aspergillus*, existem algumas espécies causadoras de maiores impactos na saúde humana, animal e vegetal. Entre estas, destacam-se *Aspergillus flavus*. Apresentando alta capacidade de sobrevivência em condições climáticas quentes e áridas, estas espécies estão entre as células microbianas com maior longevidade, tolerâncias mais altas ao calor, pressão e capacidade de germinar na menor atividade de água (PAULUSSEN et al., 2017; RUDRAMURTHY et al., 2019).

A inalação de conídios por seres humanos é diária e contínua não apresentando riscos significativos para aqueles que apresentam saúde íntegra. No entanto, aqueles que são imunocomprometidos, quando expostos a este patógeno, passam a correr sérios riscos. Tratando-se de ambientes hospitalares, onde se encontram os mais diferentes tipos de espécies e cepas resistentes de patógenos importantes do ponto de vista médico, passam a ser um grande desafio para a terapêutica quando entram em contato com pacientes ali presente (WIRMANN et al., 2018; ODEBODE e NIMAWANYA, 2020).

Podemos observar que um número significativo de pacientes apresenta infecções invasivas com risco de vida frente a este patógeno em questão. A aspergilose afeta mais de 14 milhões de pessoas em todo o mundo, representada por aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA, > 4 milhões), aspergilose pulmonar crônica (CPA, ~3 milhões) e a aspergilose invasiva (IA, > 300.000). Vários estudos apontam resultados alarmantes para aspergilose invasiva, com taxas de mortalidade de até 90% (SCHWEER et al., 2016; GARCIA-VIDAL et al., 2015; GAGO, DENNING e BOWYER, 2019).

Diante do aumento do número de pacientes imunocomprometidos nas populações pediátricas e adultas, a epidemiologia das micoses invasivas se mostra cada vez mais alarmante. Os triazóis são prescritos como terapia de primeira linha contra uma infinidade de casos de aspergiloses invasivas e não invasivas, no entanto, entre os últimos anos, diversas evidências mostram a ocorrência de falhas frente a esta forma de tratamento em questão (ZAINI et al., 2020).

É a partir daí que os rumos das pesquisas mudaram, e os pesquisadores passaram a buscar por novas fontes e alternativas terapêuticas que venham a surtir o efeito necessário, combatendo o patógeno fúngico sem gerar danos maiores ao paciente. Sendo assim, os produtos naturais apresentam-se como uma excelente alternativa na descoberta de novos insumos que venham a combater estas patologias causadas por estes fungos, como o *Aspergillus flavus*.

O Carvacrol, um monoterpênóide fenólico encontrado em óleos de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), pimenta (*Lepidium flavum*), bergamota selvagem (*Citrus aurantium bergamia*) e outras plantas, vem atraindo a atenção destes pesquisadores devido suas vastas propriedades biológicas, com um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo esta maior do que a de outros compostos voláteis presentes nos óleos essenciais devido a presença do grupo hidroxila livre. Além disso, propriedades associadas ao grupo OH fenólico mais propriedades hidrofóbicas associadas ao anel aromático substituído, vem demonstrando outra ampla gama de atividades como antiinflamatória, antiprotzoária, anticarcinogênica, antidiabética e antinociceptiva, tornando-a uma substância de alto potencial para avaliação de atividades antimicrobiana frente a outras espécies ainda inéditas na literatura (SHARIFI-RAD et al., 2018; FRIEDMAN, 2014).

O presente trabalho tem como intuito avaliar o potencial antifúngico do carvacrol frente às amostras de *Aspergillus flavus* oriundos de infecções superficiais e sistêmica registrando dados não só apenas para mais um achado descrito na literatura, mas também contribuindo para o aumento de alternativas terapêuticas viáveis para o tratamento de aspergilose, principalmente, quando causada por espécies de *Aspergillus* resistentes aos fármacos disponíveis na farmacoterapia.

METODOLOGIA

Os ensaios de atividade antifúngica para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados no Laboratório de pesquisa da atividade antimicrobiana e antifúngica de produtos naturais e sintéticos bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As cepas de *Aspergillus flavus* foram adquiridas no LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA – HEMATO. As cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Inclinado (Difco®) sob refrigeração (8° C) até o momento da realização do ensaio.

As linhagens de *A. flavus* que foram utilizadas no desenvolvimento da pesquisa foram registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGEN) sob o número A359BED.

Os meios de cultura utilizados para realização dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica foram os meios de cultivo sólidos Ágar Sabouraud dextrose- ASD e o meio de cultivo líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (HIMEDIA®), que foram

preparados de acordo com informações do fabricante. Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos. O produto utilizado como controle na execução das metodologias será a Anfotericina B (Sigma Aldrich®), testado nas mesmas concentrações dos óleos essenciais e fitoconstituente majoritário.

Para a preparação do inóculo, foi realizado repique das cepas em ASD e incubação a 28- 30° C por 7- 14 dias, para atingirem um bom crescimento. As suspensões dos repiques foram preparadas cobrindo-as com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v- Labsynth®). As misturas resultantes de conídios e fragmentos de hifas foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão apresentou turbidez que foi comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFM) / mL. A quantificação dos inóculos foi confirmada por meio da contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões ajustadas no espectrofotômetro (Leitz- Photometer 340- 800), para conter aproximadamente 1×10^6 UFC/ mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; CLSI, 2008).

Paralelamente, foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram colocados 200 µL do CSD em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos e um controle de crescimento das cepas, com 100 µL do CSD e 10 µL da suspensão dos fungos. Para verificar a ausência da interferência dos solventes utilizados na preparação das emulsões (DMSO – 5% e Tween 80- 2%), foi feito um controle no qual serão adicionados 100 µL de CSD duplamente concentrado, DMSO ou Tween 80 e 10 µL da suspensão fúngica. Todas as placas foram assepticamente seladas e incubadas a 28° C por 72 horas, e após esse período foi realizada a leitura dos resultados.

A confirmação da atividade antifúngica foi evidenciada pela inibição visual do crescimento das cepas testadas em relação aos seus respectivos controles de crescimento positivo.

Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em quantidade de cepas que cada emulsão de óleo essencial será capaz de inibir o crescimento.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleenland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços

com fundo em "U". Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI 1640 duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL das moléculas solubilizadas foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa, e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismo (RPMI + leveduras), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI), para comprovação da esterilidade e controle com anfotericina B para inibição dos fungos. As placas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 +/- 2° C por 72 horas.

O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% dos micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade biológica (CLEELAND E SQUIRES, 1991; HAFIDH et al., 2011). E a Concentração Inibitória Mínima / CIM, foi considerada e interpretada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 µg/mL = forte atividade; 600 – 1500 µg/mL = moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da vasta possibilidade de variabilidade genética relacionada a ampla gama de gêneros fúngicos mais a recorrente resistência de tais micro-organismos, novas substâncias derivadas de produtos naturais surgem como alternativas que venham a controlar tal problema. O método de microdiluição apresenta-se como um ensaio preliminar na avaliação do potencial antimicrobiano de um composto bioativo, uma vez que trata-se de um método barato, sensível e de alta reprodutibilidade, necessitando de pequenas quantidades de reagente, o que o torna ainda mais acessível. (BONA et al., 2014).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) representa um parâmetro essencial na análise de susceptibilidade de um micro-organismo a determinadas substâncias, onde o método de diluição em caldo torna-se um dos mais adequados para determinar tal concentração, de forma quantitativa e qualitativa, validada pela ausência de crescimento fúngico no controle de esterilidade e presença de crescimento no controle de crescimento (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os ensaios para avaliar o potencial antifúngico do fitoconstituente Carvacrol sob linhagens de *A. flavus* estão expressos na tabela 1, juntamente com os resultados frente a atividade do antifúngico licenciado Anfotericina B, utilizado como padrão.

O Carvacrol na concentração de 16 µg/mL apresentou atividade biológica sobre o crescimento de *A. flavus*, inibindo o crescimento de 7 (58,3%) das 12 linhagens do fungo. Já na concentração de 32 µg/mL, produziu inibição sobre o crescimento das 12 (100%) linhagens de *A. flavus*. Estes resultados podem ser comparados com os achados de ABBASZADEH et al., 2014, onde foi observado a atividade do carvacrol frente a algumas espécies fúngicas, e dentre estas, a melhor atividade encontrada para a molécula em questão está relacionada a inibição do crescimento de *Aspergillus*, com CIM que variou de 50 a 100 µg/mL, já para as demais espécies fúngicas testadas, a CIM do carvacrol variou de 100 a 350 µg/mL. Em outros estudos de SCHLEMMER et al., 2019, o carvacrol foi testado frente a 30 cepas de *Malassezia pachydermatise*, onde podemos observar uma média de CIM de 64 µg/mL para o carvacrol frente as mesmas.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de Carvacrol e Anfotericina B frente a linhagens do gênero *Aspergillus*.

Micro-organismo	Moléculas		Controles			
	Carvacrol	Anfotericina B	Microbiológico	Caldo		
<i>A. flavus</i>	CIM	CIM ₅₀	CIM	CIM ₅₀		
ATCC – 13013	32		4		+	-
LM – 02	16		8		+	-
LM – 18	32		32		+	-
LM – 19	16		32		+	-
LM – 26	16		32		+	-
LM – 55	16	16	32	32	+	-
LM – 171	16		64		+	-
LM – 206	16		32		+	-
LM – 225	32		32		+	-
LM – 248	16		64		+	-
LM – 256	32		64		+	-
LM – 298	32		64		+	-

Quanto aos resultados relacionados a Anfotericina B, observamos que a molécula na concentração de 32 µg/mL produziu inibição do crescimento fúngico sobre oito (67%) das 12 linhagens de *A. flavus*, referindo-se então a uma molécula promissora no controle do crescimento de *A. flavus*, como antifúngico padrão.

Estes achados corroboram com estudos que apontam para o amplo espectro da Anfotericina B, sendo um dos antifúngicos considerados padrão ouro no tratamento de infecções invasivas com risco de vida, devido a sua alta permeabilidade na membrana e grande avidéz pelo ergosterol (FAUSTINO e PINHEIRO, 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos observar que os fungos representam uma grande ameaça a saúde pública quando se trata de infecções superficiais e sistêmicas, e devido uma série de situações, as terapias convencionais que tratam patologias comuns causadas por *Aspergillus* vem se tornando cada vez menos eficientes.

Dessa forma, derivados de produtos naturais vêm cada vez ganhando mais espaço em meio as terapias para tratamento de doenças fúngicas, como exemplo do Carvacrol, onde, a partir do ensaio de CIM, podemos observar que o mesmo apresenta-se potencialmente eficiente contra esa classe fúngica, podendo no futuro compor o leque de alternativas terapêuticas para doenças como aspergiloses.

REFERÊNCIAS

BALOUIRI, MOUNYR; SADIKI, MOULAY; IBNSOUDA, SAAD KORAICHI. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana: Uma revisão. **Jornal de análise farmacêutica**, v. 6, n. 2, pág. 71-79, 2016.

BONA, E. A. M. D., PINTO, F. G. D. S., FRUET, T. K., JORGE, T. C. M., & MOURA, A. C. D. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. 2014.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: LORRIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 739-788 p. 1991.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: LORRIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 739-788 p. 1991.

DEMUYSER, T., DE COCK, E., SERMIJN, E. Contaminação aerotransportada por *Aspergillus fumigatus* em unidade de terapia intensiva: detecção, gestão e controle. **Jornal de infecção e saúde pública**, v. 12, n. 6, pág. 904-906, 2019.

FAUSTINO, C.; PINHEIRO, L. Sistemas lipídicos para a administração de anfotericina B na terapia antifúngica. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, pág. 29, 2020.

GAGO, S., DENNING, D. W., BOWYER, P. Aspectos fisiopatológicos da colonização por *Aspergillus* na doença. **Micologia médica**, v. 57, n. Suplemento_2, pág. S219-S227, 2019.

GARCIA-VIDAL, C., PEGHIN, M., CERVERA, C., GUDIOL, C., RUIZ-CAMPS, I., MORENO, A., CARRATALÀ, J. Causes of death in a contemporary cohort of patients with invasive aspergillosis. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0120370, 2015.

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

ODEBODE, A., NIMAWANYA, G. Caracterização de fungos transportados pelo ar presentes em dois hospitais no distrito de Kabale - Uganda. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 392-393, 2020.

ODEBODE, A., NIMAWANYA, G. Caracterização de fungos transportados pelo ar presentes em dois hospitais no distrito de Kabale - Uganda. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 392-393, 2020.

PAULUSSEN, C., HALLSWORTH, J. E., ÁLVAREZ - PÉREZ, S., NIERMAN, W. C., HAMILL, P. G., BLAIN, D., & LIEVENS, B. Ecologia da aspergilose: insights sobre a potência patogênica de *Aspergillus fumigatus* e algumas outras espécies de *Aspergillus*. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, pág. 296-322, 2017.

RUDRAMURTHY, S. M., PAUL, R. A., CHAKRABARTI, A., MOUTON, J. W., MEIS, J. F. Aspergilose invasiva por *Aspergillus flavus*: epidemiologia, diagnóstico, resistência antifúngica e gestão. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, pág. 55, 2019.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SKMEN, A.; POLISSOU, M.; SOKMEN, M.; 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 plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275- 280, 2004.

SCHLEMMER, K. B., JESUS, F. P. K., TONDOLO, J. S. M., WEIBLEN, C., AZEVEDO, M. I., MACHADO, V. S., ... & SANTURIO, J. M. In vitro activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. **Journal de mycologie medicale**, v. 29, n. 4, p. 375-377, 2019.

SCHWEER, K. E., JAKOB, B., LISS, B., CHRIST, H., FISCHER, G., VEHRESCHILD, M. J. G. T., VEHRESCHILD, J. J. Exposição a fungos domésticos e aspergilose invasiva - Amostragem de ar de *aspergillus* spp. Esporos em casas de pacientes hematológicos, um estudo piloto. **Sabouraudia**, v. 54, n. 6, pág. 576-583, 2016.

SHETH, M. C., PAUL, R. R., MATHEWS, S. S., & ALBERT, R. R. Isolated *Aspergillus* Laryngitis: Spectrum, Management, and Review of Literature. **Journal of Voice**, 2020.



SUGUI, J. A., KWON-CHUNG, K. J., JUVVADI, P. R., LATGÉ, J. P., & STEINBACH, W. J. *Aspergillus fumigatus* e espécies relacionadas. **Perspectivas de Cold Spring Harbor na medicina**, v. 5, n. 2, pág. a019786, 2015.

VIEGAS, C., ALMEIDA, B., GOMES, A. Q., CAROLINO, E., CAETANO, L. A. *Aspergillus* spp. prevalence in Primary Health Care Centres: Assessment by a novel multi-approach sampling protocol. **Environmental research**, v. 175, p. 133-141, 2019.

WIRMANN, L., ROSS, B., REIMANN, O., STEINMANN, J., & RATH, P. M. Airborne *Aspergillus fumigatus* spore concentration during demolition of a building on a hospital site, and patient risk determination for invasive aspergillosis including azole resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. e91-e97, 2018.

ZAINI, F., LOTFALI, E., FATTAHI, A., SIDDIG, E., FARAHYAR, S., KOUHSARI, E., SAFFARI, M. Voriconazole resistance genes in *Aspergillus flavus* clinical isolates. **Journal de mycologie medicale**, v. 30, n. 2, p. 100953, 2020.