

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO $\alpha$ -PINENO FRENTE A CEPAS CLÍNICAS DE *Penicillium citrinum* ISOLADAS DA PELE

Sávio Benvindo Ferreira<sup>1</sup>; Tassiana Barbosa Dantas<sup>2</sup>; Daniele de Figueredo Silva<sup>3</sup>; Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>4</sup>

1-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: [saviobenvindo@gmail.com](mailto:saviobenvindo@gmail.com)

2-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: [tassianadantas@hotmail.com](mailto:tassianadantas@hotmail.com)

3- Universidade Federal da Paraíba. E-mail: [danielefigueredo31@gmail.com](mailto:danielefigueredo31@gmail.com)

4-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: [edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br)

**RESUMO:** O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados substratos, podendo causar infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista. Devido esta problemática, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do (+)- $\alpha$ -pineno frente à cepas de *Penicillium citrinum* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O (+) –  $\alpha$  – pineno foi adquirido da Sigma – Aldrich (Brasil). Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 3 cepas de *P. citrinum* isoladas de infecções cutâneas e uma cepa padrão INCQS 40.011. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo. Como controle, foram testado os solventes, DMSO e Tween 80, a esterilidade do meio, o controle de micro-organismo e o antifúngico padrão, o variconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura. O (+)- $\alpha$ -pineno inibiu o crescimento das cepas de *P. citrinum* INCQS 40.011 na concentração de 256  $\mu$ g/ml; já as cepas clínicas, LM-161 e LM-171, a concentração do composto capaz de inibir o crescimento foi de 1024  $\mu$ g/ml e 128  $\mu$ g/ml, respectivamente, enquanto a CIM para a cepa LM 30 foi maior que 1.024  $\mu$ g/ml. Já a CIM<sub>50</sub> do composto para a espécie foi de 512  $\mu$ g/ml. O variconazol, inibiu as cepas testadas, o meio de cultura apresentou-se estéril e funcional e os solventes, DMSO e Tween 80, não interferiram no seu crescimento das cepas.

**Palavras-chave:** Monoterpenos, *Penicillium citrinum*, Atividade antifúngica, (+) –  $\alpha$  – pineno.

### INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, devido ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, observa-se, hoje, o

desenvolvimento de microrganismos cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais, o que pode ser um fator relevante para o surgimento de doenças infecciosas de difícil controle (Akinpelu, 2001). Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas teve um

grande impulso (Coelho et al., 2004). A utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas (Mesa-Arango et al. 2009). O gênero *Penicillium* é um dos gêneros fúngicos que possui a maior quantidade de espécies, podendo ser encontrado nos mais variados substratos (Pitt & Hocking, 1997). Severas micotoxicoses, alergias e contaminações do ar são atribuídas a ele, comprometendo, assim, a saúde de humanos e animais (Samson & Frisvad, 2004). Pode também ser causador de infecções hospitalares, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo, portanto, oportunista (Brasil, 2009). Desta forma, a busca de opções terapêuticas para o tratamentos de infecções causadas por este micro-organismo torna-se cada vez mais importante e necessária, sendo as plantas naturais importantes fontes destes compostos.

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferente classe de metabólitos secundários, tais como, cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (Cowan, 1999). Os

compostos antimicrobianos isolados das plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando direta ou indiretamente uma síntese proteica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (Singh e Shukla, 1984). Os componentes de diferentes óleos essenciais têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Dentre os monoterpenos, temos o  $\alpha$ -pineno que possui dois isômeros ativos constitucionais:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno. Ambos têm enantiômeros conhecidos na natureza como (-)- $\alpha$ -pineno (mais comum em pinheiros europeus), (+)- $\alpha$ -pineno (mais comum na América do Norte), (-)- $\beta$ -pineno e (+)- $\beta$ -pineno. A mistura racêmica está presente em alguns óleos essenciais, tais como óleo de eucalipto (Tabanca et al., 2007; Solomons e Fryhle, 2009; Yang et al., 2011). Alguns autores atribuíam à atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais a este monoterpeno (Aligiannis et al, 2001; Couladis et al, 2003; Leite et al 2007). Por outro lado, outros autores relataram que o  $\alpha$ -pineno não apresenta atividade antimicrobiana (Angioni et al, 2003; Koutsoudaki; Krsek e Rodger, 2005; Yang et al, 2011). Para entender esses resultados controversos sobre o atividade

antimicrobiana do  $\alpha$ -pineno, Silva et al (2012) avaliaram os efeitos antimicrobianos dos diferentes enantiômeros do  $\alpha$ -pineno contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *Rhizopus oryzae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Esse estudo mostrou que apenas o enantiômero positivo desse monoterpene possui atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, e que essa ação a foi ainda mais promissora contra a formação de biofilme, o que torna  $\alpha$ -pineno útil na formulação de estratégias para limitar *C. albicans* formação de biofilme.

Diante de indícios positivos da ação antimicrobiana do (+)- $\alpha$ -pineno, este trabalho teve como objeto de avaliar a atividade antifúngica do (+)- $\alpha$ -pineno frente à linhagens clínica isoladas de infecções cutâneas e cepa padrão IHCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) de *Penicillium citrinum*, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

## METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O monoterpene, (+) –  $\alpha$  – pineno, foi adquirido da Sigma – Aldrich (Brasil) e dissolvido de

acordo com as recomendações do fabricante e as concentrações utilizadas nos respectivos experimentos foram obtidas após diluição. Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 3 cepas de fungos do gênero *Penicillium*, obtidas da coleção do Laboratório de Micologia e uma cepa padrão do IHCQS 40.011, as quais foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado (DIFCO Laboratories Ltda.), a temperatura ambiente (28° a 30°C) e a 4°C. As cepas fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura ASD, por 10-14 dias, a temperatura de 28 a 30°C, com a finalidade de atingirem o crescimento satisfatório. Para o preparo da suspensão das cepas, as colônias fúngicas recentes foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) e, por meio de suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em “L”, as suspensões foram obtidas. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (Cleeland & Squires, 1991; Eloff, 1998; Hadacek & Greger, 2000). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100  $\mu$ L do meio líquido Caldo Sabouraud dextrose (CSD) duplamente concentrado. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução dos fitoconstituintes na concentração inicial de 1024  $\mu$ g/mL (também duplamente

concentrados), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E, por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , de modo que na primeira linha da placa encontre-se a maior concentração e, na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados nas cavidades 10  $\mu\text{L}$  do inóculo, de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL, das cepas fúngicas, correspondendo cada coluna da placa a uma cepa. Para verificar a ausência de interferência dos solventes DMSO e Tween 80, que foram utilizados na preparação da solução dos monoterpenos, sobre os resultados, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100  $\mu\text{L}$  do CSD duplamente concentrado, DMSO (até 10%), Tween 80 (2%) e 10  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica. Além disso, um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100  $\mu\text{L}$  do CSD duplamente concentrado, 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo de cada cepa. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do CSD em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos. Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado para o antifúngico padrão Variconazol. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 7 dias, para realização da leitura. As CIMs

para o (+)- $\alpha$ -pineno e o variconazol foram definidas como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios e da CIM50, sendo considerado a CIM para o (+)- $\alpha$ -pineno e para variconazol como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle e CIM50 correspondente a concentração em que inibiu 50% das cepas ensaiadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios, observou-se que o (+)- $\alpha$ -pineno apresentou atividade frente as cepas testadas. O monoterpeno inibiu o crescimento da cepa ATCC IHCQS 40.011 na concentração de 256  $\mu\text{g/ml}$  e nas cepas clínicas LM-161 e LM-171 nas concentrações de 1024  $\mu\text{g/ml}$  e 128  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Para a cepa LM-30 a CIM > 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Desta forma, podemos dizer que a CIM do (+)- $\alpha$ -pineno foi  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$  e sua CIM50 foi de 512  $\mu\text{g/ml}$ . O antifúngico padrão, variconazol, inibiu as cepas ATCC IHCQS 40.011, LM-30, LM-161 e LM-171 nas concentrações 256, 4, 2 e 2  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. O meio de cultura

apresentou-se estéril durante o experimento e positivo quando inoculado com o inóculo fúngico, comprovando as condições de esterilidade e eficiência do meio em manter viáveis as cepas. Nos poços onde foram incubados o meio de cultura com os solventes DMSO e Tween 80 e o inóculo fúngico, observou-se crescimento normal do fungo constatando que os solventes não interferem no seu crescimento nas concentrações utilizadas de 10% e 2%, respectivamente.

Nóbrega (2013) realizou pesquisa a atividade antifúngica do alfa-pineno, mistura racêmica, e não conseguiu determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente frente a cepas de *Rhizopus oryzae*, pois mesmo na maior concentração preconizada pelos estudos in vitro, houve crescimento fúngico. O maior valor da CIM detectado pela metodologia utilizada é de 1024 µg/mL.

Silva e colaboradores (2012) avaliaram a atividade do alfa-pineno e do betapineno sobre cepas de *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae* e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), porém, os mesmos avaliaram os enantiômeros separadamente, ou seja, avaliaram a ação do (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno, (+)- $\beta$ -pineno e o (-)- $\beta$ -pineno e concluíram que apenas os enantiômeros positivos do alfa-pineno e beta-pineno possuíam atividade antimicrobiana e os

enantiômeros negativos não mostraram atividade até o valor de 20mg/mL.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que o (+)- $\alpha$ -pineno possui atividade contra as cepas de *Penicillium citrinum*, tornando-o um candidato a pesquisas mais profundas a respeito do seu mecanismo de ação e atividade contra outras espécies de micro-organismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Bark. **Fitoterapia**, Milano, 72 (3), 2001, 286-287.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. **J. Agric. Food Chem.**, 49, 2001, 811–815.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; RUSSO, M.T.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition of the essential oils of Juniperus from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 3073–3078, 2003.

BRASIL (2009) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de fungos de

importância médica. Módulo VII. Brasília, DF.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: Lorian, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, pp. 739-787, 1991.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143. 2004.

COULADIS, M. CHINO, I.B.; TZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). **Phytother. Res.**, 17, 152–154, 2003.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, 64 (8), 711-713, 1998.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, 11 (3), 137-147, 2000.

KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 7681–85, 2005.

LEITE, A. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online]. 2007, vol.43, n.1 [cited 2016-05-10], pp.121-126. Available from:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000100015&lng=en&nrm=iso)

93322007000100015&lng=en&nrm=iso>.

ISSN 1516-9332.

[http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000100015)

93322007000100015.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (6): 878-884, 2009.

NÓBREGA, F.M. **Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae***. 2013. 65f. Monografia (Graduação em Farmácia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2a Ed. Cambridge: Chapman & Hall, 593 p, 1997.

SAMSON, R.A; FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Utrecht, **Netherlands:Centraalbureau voor Schimmelcultures** 49, 2004. p.201-241.

SILVA, A.C.R. et al. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, 17, 2012, 6305-6316.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315, 1984.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica** – volume 2. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 518p.

TABANCA, N. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 2007, 8430–8435.

YANG, Z. et al. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: Effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, 2011, 16, 1044–1054.