

Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares[#]

Terpenoids with antifungal activity for *Candida* Berkhout species, causing hospital infections

Aírton Viriato*

40

O Mundo da Saúde, São Paulo - 2014;38(1):40-50
Artigo Original • Original Paper

Resumo

O aumento da incidência de fungos causadores de infecções hospitalares está associado, em geral, ao emprego e utilização da antibioticoterapia de largo-espectro, na prematuridade, no tempo de exposição e permanência nas unidades de internação. Os terpenoides constituem um vasto grupo de substâncias químicas biossintetizadas a partir da via do mevalonato, extraídas de produtos naturais. Possuem diversas atividades biológicas bem definidas, dentre as quais a antifúngica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de terpenoides frente a espécies de *Candida* causadoras de infecções hospitalares. Foram realizados testes de atividade antifúngica para a determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em placa de 15 terpenoides frente a 11 espécies do gênero *Candida*. Das 15 substâncias – terpenoides – testadas pela técnica da microdiluição em placa com a determinação da Concentração Inibitória Mínima, 9 (60%) apresentaram atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* e 6 (40%) não apresentaram atividade. Dessas 9 substâncias, 2 (22,2%) apresentaram boa atividade antifúngica e 7 (77,8%) apresentaram atividade antifúngica de moderada a fraca. Os resultados mais promissores foram obtidos com os terpenoides (+) Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii* e com o terpenoide (-) Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei*.

Palavras-chave: *Candida*. Terpenos. Infecção Hospitalar.

Abstract

The increased incidence of fungi causing nosocomial infections is associated, in general, to employment and use of broad-spectrum antibiotic therapy in preterm in exposure time and stay in inpatient units. Terpenoids are a large group of chemicals biosynthesized from mevalonate pathway, extracted from natural products. They have several biological activities well defined among which antifungal ones. This study aimed to evaluate the antifungal activity of terpenoids against *Candida* species causing nosocomial infections. Tests were performed to determine antifungal minimum inhibitory concentration by microdilution plate 15 terpenoids against 11 species of the genus *Candida*. Of the 15 substances – terpenoids – tested by the broth microdilution with the determination of Minimum Inhibitory Concentration, 9 (60%) showed antifungal activity against *Candida* species and 6 (40%) showed no activity. These two substances 9 (22.2%) showed good antifungal activity and 7 (77,8%) showed antifungal activity of moderate to weak. The most promising results were obtained with the terpenoids (+) limonene with MIC of 46.87 µg/mL for *C. krusei* and *C. guilliermondii* and the terpenoid (-) limonene with MIC of 46.87 µg/mL for *C. krusei*.

Keywords: *Candida*. Terpene. Cross Infection.

DOI: 10.15343/0104-7809.20143801040050

[#] Baseado na tese de doutorado “Viriato A. Prospecção de terpenoides com atividade antifúngica para espécies do gênero *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. Franca (SP): Universidade de Franca; 2012”. Orientador: Sérgio Ricardo Ambrósio.

* Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, São Paulo-SP, Brasil; Centro Universitário São Camilo, São Paulo-SP, Brasil. E-mail: airton.viriato@emilioribas.sp.gov.br

O autor declara não haver conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares constituem agravo à saúde pública, associadas a três fatores intrínsecos: a sua grande extensão, aos seus efeitos iatrogênicos e aos elevados custos de ordem econômica. Por séculos, os hospitais são considerados locais de risco, suscetíveis a diversos tipos de infecções. Os estudos históricos mais relevantes para o entendimento e a compreensão dos fatores envolvidos na transmissão de infecções em ambientes hospitalares são representados pelas observações de Oliver Wendell Holmes e de Ignacio Felipe Semmelweis, que verificaram haver relação entre a ocorrência de infecção puerperal e a inadequada lavagem das mãos do pessoal que assistia as parturientes¹.

O conhecimento acumulado sobre a incidência, os fatores associados, as repercussões e a prevenção das infecções adquiridas durante a internação ou até 72 horas após a alta hospitalar permitem a identificação, a vigilância e o seu controle. Essas infecções hospitalares são mais frequentes e, geralmente, mais graves nos recém-nascidos do que em adultos².

Os avanços tecnológicos relacionados aos procedimentos invasivos de apoio diagnóstico e terapêutico, somados ao aparecimento de micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos usados rotineiramente na prática hospitalar, contribuíram para expressivo aumento nas taxas das infecções hospitalares e, na maioria das vezes, são causadas por bactérias gram-positivas associadas às gram-negativas, evoluindo para a septicemia fulminante. Já a septicemia causada por fungos acomete frequentemente crianças com baixo peso internadas na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN)³.

Espécies de *Candida* são os patógenos responsáveis pela maioria das infecções ocorridas nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo que, ultimamente, vêm apresentando resistência aos antifúngicos tradicionalmente mais utilizados; concomitantemente, as taxas de infecções hospitalares continuam crescendo, tornando-se objeto de preocupação por parte das autoridades sanitárias devido ao aumento da morbidade, da mortalidade e dos altos custos decorrentes do extenso período de internação^{4,5,6}.

Uma tendência multidisciplinar para o desenvolvimento de novos fármacos teve início pelo conhecimento de substâncias naturais bioativas, associadas à obtenção de análogos estruturais por metodologias sintéticas, biotecnológicas ou isolamento de novas fontes naturais⁷.

A avaliação de atividades farmacológicas tem demonstrado grandes perspectivas na descoberta de moléculas – os terpenoides – de grande interesse terapêutico. Os terpenoides constituem um vasto grupo de substâncias químicas biossintetizadas a partir da via do mevalonato, extraídas de produtos naturais. Possuem diversas atividades biológicas bem definidas, dentre as quais a antifúngica^{8,9,10}.

No entanto, ao longo de todos os tempos, independentemente da evolução científico-tecnológica nas ações dos serviços de saúde, a principal e mais eficaz medida de prevenção das infecções hospitalares continua e continuará sendo a atenção e a contínua aplicação da técnica de lavagem de mãos. Dessa forma, a prevenção das infecções hospitalares deve constituir um dos principais objetivos dos profissionais de saúde.

Fatores de risco para infecções fúngicas hospitalares

As infecções fúngicas invasivas ou disseminadas, na maioria das vezes, apresentam importantes complicações em indivíduos imunocomprometidos. Os fatores de risco para que ocorram as infecções fúngicas hospitalares estão relacionados diretamente às características do setor de internação e aos tipos de procedimentos realizados.

Na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e na Unidade Semi-Intensiva (USI), encontram-se os doentes mais vulneráveis, pois são submetidos constantemente a processos terapêuticos cujo manejo é feito a partir de cateteres intravasculares, sondas vesicais, ventilação mecânica, entre outros métodos invasivos, fatores que potencializam o risco de infecções oportunistas. Essas áreas de internação recebem os pacientes mais graves, que requerem terapias múltiplas e agressivas, cenário propício para os patógenos mais resistentes, que são selecionados pelo uso de terapia antimicrobiana prolongada¹¹.

Outro fator de risco associado às infecções fúngicas são os transplantes. O transplante de

órgãos tem se tornado importante opção terapêutica para muitas patologias humanas, sendo que, por meio de modernas técnicas cirúrgicas, podem ser transplantados diversos órgãos, tais como rins, fígado, pâncreas, pulmão, coração e coração-pulmão. No entanto, a rejeição ao transplante e os processos infecciosos são as principais causas de morbidade e mortalidade¹².

Leveduras causadoras de infecções hospitalares

As leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, desencadeando um grande número de infecções oportunistas fatais principalmente em doentes imunocomprometidos.

Os fatores reconhecidos de risco para infecção invasiva por *Candida* são: a) permanência > 4 dias em UTI; b) antibioticoterapia de largo espectro; c) cirurgia abdominal; d) cateterização venosa central; e) nutrição parenteral total; f) imunodepressão; g) ventilação mecânica > 48 h; h) neutropenia; i) quimioterapia citotóxica. Frente a essas condições, recomenda-se monitoração com exames micológicos de sangue de amostras biológicas dos pacientes, tais como, sangue, escarro, pontas de cateteres intravasculares, líquido peritoneal e urina. Culturas positivas para leveduras podem significar apenas colonização, mas podem conduzir à doença invasiva subsequente. Estudo prospectivo, em pacientes cirúrgicos de UTI, mostrou que 38% de 29 pacientes desenvolveram infecção após colonização¹³.

A colonização pode ser demonstrada por análise de três ou mais amostras, coletadas do mesmo local ou de sítios diferentes, do mesmo paciente, em dias consecutivos. Há mais de duas décadas trabalhos mostraram que diferentes espécies de *Candida* podem causar quadros de fungemia, tais como: *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliemondii*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. catenulata*, e *C. norvergensis*. Na década de 90 um grupo europeu realizou um estudo multicêntrico e, por análise univariada, concluíram

ser *C. glabrata* a espécie associada à maior taxa de mortalidade e que o óbito estava relacionado com maior idade e severidade da doença de base do paciente. Ao longo dos anos, as leveduras do gênero *Candida* foram os maiores agentes de infecção hospitalar e sempre representaram um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e àqueles em período pós-operatório. O gênero *Candida* é, sem dúvida, o mais importante, no entanto, existem outras leveduras no ambiente hospitalar, no ar atmosférico e na água, que, quando na pele ou no trato gastrointestinal dos pacientes e dos profissionais da saúde, também são capazes de causar quadros infecciosos¹⁴.

A candidíase é uma micose oportunista primária ou secundária, endógena ou exógena, também reconhecida como Doença Sexualmente Transmissível (DST), causada por leveduras do gênero *Candida*. As lesões podem variar de superficiais a profundas; brandas, agudas ou crônicas; envolvendo diversos sítios, tais como boca, garganta, língua, pele, couro cabeludo, genitálias, dedos, unhas e por vezes órgãos internos. Espécies desse gênero residem como comensais fazendo parte da microbiota normal do trato digestório de 80% dos indivíduos saudáveis. A epidemiologia da candidíase depende da predisposição do hospedeiro (imunodepressão), carga parasitária e virulência fúngica; logo, quando esses três fatores estão presentes, as espécies do gênero *Candida* tornam-se agressivas, portanto, patogênicas. Análises sobre a etiologia das candidíases, a distribuição das diferentes espécies, a resposta ao tratamento, a resistência aos antifúngicos e a mortalidade associada às enfermidades infecciosas permitem o desenvolvimento de procedimentos diagnósticos e terapêuticos mais eficazes, diminuindo a mortalidade e os custos sanitários.

Devido ao prolongamento da hospitalização em decorrência da prevalência da infecção fúngica, estima-se um incremento médio de custo por paciente de aproximadamente 45.000 dólares, com um gasto anual alcançando a cifra de 1,7 bilhão de dólares^{15,16}.

A eleição do antifúngico para o tratamento inicial dependerá dos seguintes fatores: o estado clínico do doente, a distribuição das diferentes espécies de *Candida* em cada área geográfica e

a prevalência da resistência aos azólicos, sendo que em alguns casos graves o tratamento alternativo deveria ser com o uso de equinocandinas. Quanto à duração do tratamento com antifúngicos, os estudos clínicos controlados preconizam 14 dias para se obter uma resolução no quadro de candidemia, podendo chegar a 30 dias para candidíases, sendo que, para infecções invasivas por *Candida* causando meningite, a terapia recomendada é a anfotericina B combinada com flucitosina¹⁷.

Estudo recente demonstra que, das quase 200 espécies de *Candida*, aproximadamente 10% delas são consideradas agentes etiológicos, sendo que as principais de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, porém casos de espécies emergentes, como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. viswanathii*, entre outras, estão sendo relatadas devido à alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano¹⁸.

Antifúngicos e resistência microbiana

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados da seguinte forma: fungicidas – causam a morte de fungos; bactericidas – causam a morte de bactérias; fungistáticos – promovem a inibição do crescimento de fungos; e bacteriostáticos – promovem a inibição do crescimento bacteriano¹⁹.

Os agentes antifúngicos convencionais são geralmente fungistáticos – impedem o crescimento do fungo –, cuja ação não promove a erradicação completa do microrganismo. Dessa forma, somente a inibição do crescimento do agente etiológico poderá não ser suficiente para prevenir a disseminação do microrganismo em pacientes com sistema imunológico prejudicado. Os antifúngicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química e os mecanismos de ação. Os poliênicos, como a anfotericina B, o imidazólico cetoconazol, os triazólicos fluconazol e itraconazol; os novos triazólicos voriconazol, posaconazol e ravuconazol; e as equinocandinas, como a caspofungina, são utilizados para o tratamento de micoses sistêmicas.

No mecanismo de ação interagem com o ergosterol presente na membrana citoplasmática do fungo, danificando suas funções de barreira. Os azólicos são inibidores da biossíntese do ergosterol. Essa inibição impede a formação do ergosterol, alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. A anfotericina B e os derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol, são as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves. Anfotericina é a droga que apresenta os melhores resultados, mas, ainda assim, com sucesso terapêutico limitado, e, entre os novos *in vivo* triazólicos, somente o voriconazol está disponível na clínica e é administrado ao paciente após falha terapêutica com uso de anfotericina B, para o tratamento de candidíase esofaríngea e em aspergilose invasiva^{20,21}.

As falhas no tratamento dessas infecções podem ser atribuídas à resistência clínica ou microbiológica. A determinação da correlação entre ambas as resistências ainda é bastante limitada, o que aumenta a importância de estudos para conhecer o perfil de sensibilidade de cepas clínicas e o espectro de ação dos antifúngicos. Além disso, com a disponibilidade de novos antifúngicos e estratégias terapêuticas, a detecção de resistência poderia ser vital no momento de eleger uma alternativa terapêutica^{20,21}.

O acetato de caspofungina, pertencente à classe das equinocandinas, atua na parede do fungo, causando efeito fungicida para todas as espécies de *Candida*, eliminando mais lentamente as espécies de *Aspergillus*. É disponível somente para administração intravenosa, com efeitos colaterais mínimos e baixa interação medicamentosa. Micafungina é um antifúngico semissintético que bloqueia a síntese de β -1,3-D-glucano, componente essencial da parede fúngica. Dependendo da dose é candidacida com boa eficácia *in vitro* para a grande maioria das espécies de *Candida*, incluindo as resistentes a anfotericina B, com CIM < 0,25 μ g/mL para *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. fermentati*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. norvegensis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*; de 0,25-2 μ g/mL para *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* e *C. parapsilosis*²².

Produtos naturais, substâncias bioativas e potencial antimicrobiano de terpenoides

Nos últimos 10 anos, os pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química. Ampla diversidade de organismos tem sido explorada nos mais diversos habitats, especialmente em locais de condições ambientais extremas (ambientes que possuem alterações drásticas de temperatura, pH, umidade e luminosidade). Dessa forma, plantas, insetos, fungos, bactérias e organismos marinhos são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos medicamentos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam várias estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma dessas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada¹⁹.

Muitos metabólitos secundários ou também denominados *especiais* se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é estratégica para a descoberta de fármacos inovadores. No entanto, várias substâncias sintetizadas pelas plantas, principalmente os metabólitos especiais, têm atraído cada vez mais a atenção das indústrias farmacêuticas¹⁹.

Atualmente, uma tendência multidisciplinar vem contribuindo cada vez mais para o desenvolvimento de novas drogas. Tal estratégia inicia-se pela bioprospecção de substâncias naturais bioativas, extraídas principalmente de plantas ou de microrganismos, seguida pela tentativa de obtenção de seus análogos estruturais, o que pode ser realizado por métodos sintéticos ou biotecnológicos, que culminam com a avaliação de suas atividades farmacológicas, toxicológicas e determinação do mecanismo de ação^{9,10}.

A bioprospecção dessas substâncias tem por principal objetivo descobrir novas entidades químicas que sejam biologicamente ativas, bem

como investigar a possibilidade de usá-las como protótipos para sintetizar análogos estruturais com propriedades farmacológicas mais eficientes. A descoberta de produtos naturais bioativos é importante não apenas pela necessidade de caracterização das propriedades farmacológicas das moléculas em questão, mas também pelo conhecimento de novas substâncias que possam servir de modelos (protótipos) para originar análogos estruturais com propriedades farmacológicas mais promissoras²³.

O desenvolvimento de novos fármacos de origem natural envolve um longo, caro e multidisciplinar processo, sendo necessários investimentos variando entre 100 e 360 milhões de dólares e mínimo de 10 anos de trabalho¹⁰.

Os terpenoides possuem estrutura típica e podem ser classificados de acordo com o número de carbonos da seguinte forma: hemiterpenos (C5); monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); sesterpenos (C25); triterpenos (C30); tetraterpenos (C40) e acima os polímeros. Possuem atividades biológicas bem definidas, tais como antiparasitária, hipotensora, anti-inflamatória, relaxante da musculatura lisa vascular, anticariogênica e antifúngica^{10,23}. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as atividades antifúngicas dos terpenoides frente a espécies de *Candida* causadoras de infecções hospitalares.

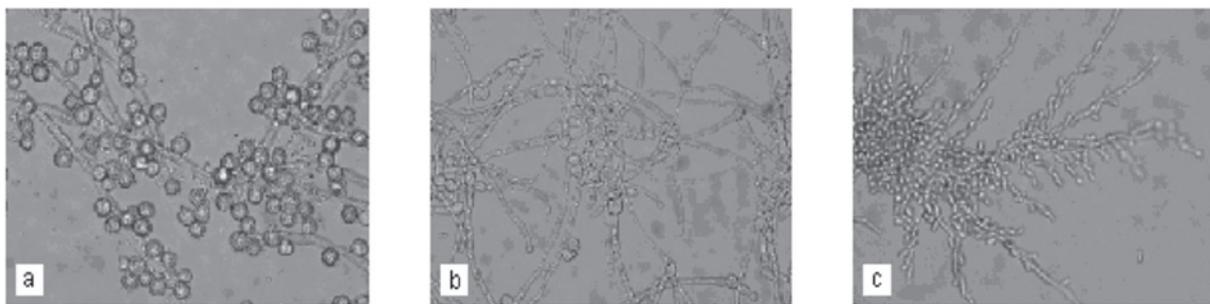
MÉTODO

O presente trabalho foi desenvolvido no período de junho de 2010 a dezembro de 2011, nas dependências dos seguintes Laboratórios da Universidade de Franca: Laboratórios do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais (GPNUF) – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMa) da Universidade de Franca.

Cepas fúngicas de referência e isolados clínicos

Foram utilizadas 8 cepas fúngicas da *American Type Culture Collection* (ATCC) adquiridas comercialmente pelo Laboratório de Pesquisa de Microbiologia Aplicada e 3 cepas isoladas de casos clínicos. A Figura 1 mostra três dessas cepas fotomicrografadas a partir de microcultivo em lâmina.

Figura 1. Microcultivo em lâmina (a) *Candida albicans* (ATCC 10231); (b) *Candida guilliermondii* (ATCC 6260); (c) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)



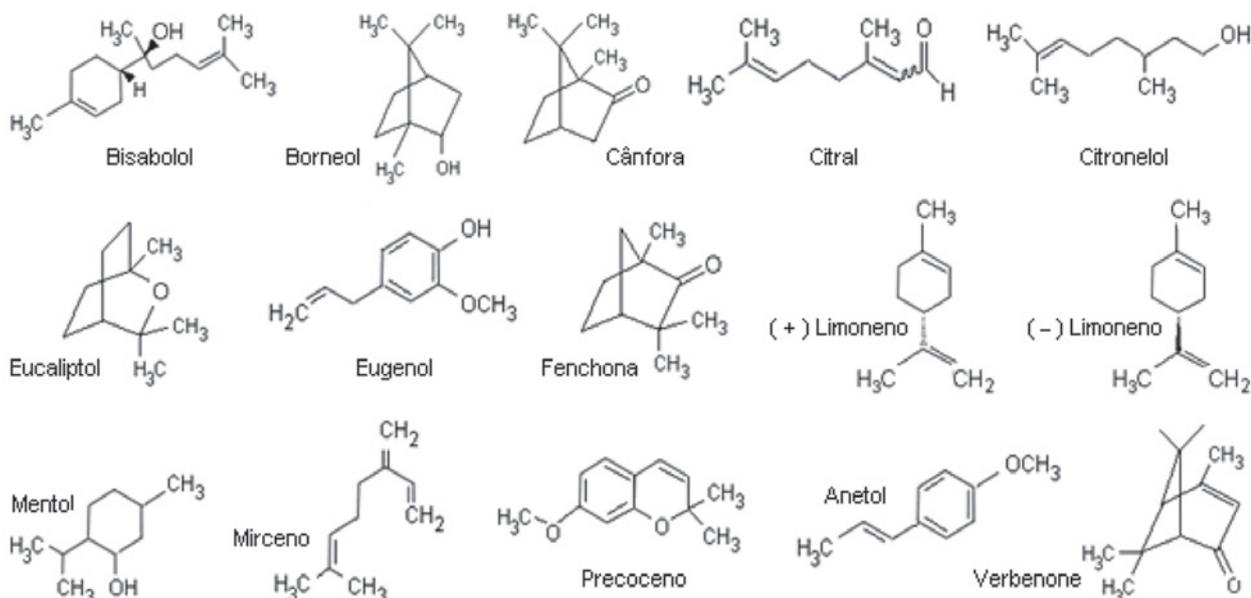
Todas as cepas foram catalogadas, armazenadas e monitoradas, submetidas periodicamente aos testes de Controle Interno de Qualidade (CIQ), que avaliam os parâmetros críticos para a detecção da resistência de acordo com as diretrizes do Termo de Cooperação n. 37 da Organização Pan-Americana da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Secretaria de Vigilância em Saúde²⁴.

Terpenoides – substâncias puras fornecidas pelos fabricantes

A Figura 2 mostra a estrutura química das 15 substâncias adquiridas pelo Laboratório de

Pesquisas de Produtos Naturais. Os terpenoides, de acordo com as respectivas denominações das substâncias – fabricante – lote foram os seguintes: Bisabolol – Sigma-Aldrich – 1368613; Borneol – Fluka – 144073; Cânfora – Fluka – BC83735; Citral – Sigma-Aldrich – S28189; Citronelol – Fluka – 1431215; Eucaliptol – Fluka – BCBB2449; Eugenol – Fluka – SZE7257X; Fenchona – Fluka – 1393466; (+) Limoneno – Fluka – 1360549; (-) Limoneno – Fluka – 1384170; Mentol – Sigma-Aldrich – 828705; Mirceno – Sigma-Aldrich – 12608223; Precoceno – Sigma-Aldrich – 7918; Anetol – Sigma-Aldrich – 1412559; Verbenone – Fluka – 1443128.

Figura 2. Estrutura química dos Terpenoides adquiridos pelo Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais



Microdiluição em caldo – Protocolo CLSI/ M27-A2

Os testes de microdiluição em caldo foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, segundo o Protocolo CLSI/ M27-A2. Toda infraestrutura necessária para o desenvolvimento da metodologia foi disponibilizada, bem como o protocolo interno do Procedimento Operacional Padrão (POP) destinado para a realização dessa técnica. O Controle Interno de Qualidade (CIQ) dessa unidade laboratorial avaliou os parâmetros críticos para a detecção de resistência e demais testes de rotina voltados ao controle de qualidade com o objetivo de monitorar os aspectos da precisão (repetitividade), de acurácia (exatidão) dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade e o desempenho dos reagentes utilizados nos testes.

Preparo dos meios de cultivo e das diluições

Para a avaliação da susceptibilidade, foi empregado o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico (MOPS) e pH 7,0. O filtrado foi processado no conjunto frasco de kitassato utilizando membrana de Milipore 0,22 μ em câmara de fluxo laminar com bomba de vácuo. Após a filtragem, o frasco contendo RPMI foi colocado em estufa bacteriológica por 24 horas para teste de esterilidade. O armazenamento do meio foi feito em frascos de 1 litro sob refrigeração de 4 °C por no máximo 3 semanas até a realização dos testes. Para os antifúngicos, o diluente utilizado foi o Dimetilsulfóxido (DMSO) para análise, marca Merck, lote: K38436852. A partir da solução estoque dessas drogas (1600 μ g/mL), preparouse, inicialmente, as 10 diluições seriadas em DMSO a uma concentração 100 vezes superior à concentração final do ensaio. Em seguida, realizou-se uma diluição a 1:50 em RPMI, produzindo uma concentração de antifúngico duas vezes a concentração final. Consecutivamente, uma diluição a 1:5 foi realizada acrescentando RPMI-1640 às 10 diluições seriadas, o que produziu uma concentração 2 vezes superior à concentração do ensaio.

Placas de microtitulação plásticas de fundo chato esterilizadas, contendo 8 linhas (identificadas de A à H) com 12 poços cada uma (96 poços no total) e 12 colunas (numeradas 01 a 12) foram utilizadas para os testes de susceptibilidade. As placas foram preenchidas com as 10 séries de diluições de antifúngicos com concentrações 2 vezes mais elevadas do que a concentração de ensaio. Alíquotas de 100 μ L dessas diluições foram dispensadas dentro dos poços entre as colunas 02 e 11 das placas de microtitulação. Os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200 μ L de RPMI para Controle de Esterilidade (CE), e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 μ L de RPMI para Controle de Crescimento (CC).

Preparo do inóculo

As oito cepas ATTC das espécies de *Candida* e as três cepas de casos clínicos, acondicionadas e estocadas em freezer, foram reativadas e repicadas utilizando-se o Meio *Sabouraud Dextrose Agar* da marca DIFCO, lote n. 9272274. A partir de cultivos em placas de ágar Sabouraud dextrosado, incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas, foram transferidas e suspensas 5 colônias com diâmetro de 1 mm em um tubo contendo 3 mL de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão foi padronizada com o tubo 0,5 da escala nefelométrica de Mc Farland, com diluições sucessivas em solução salina de modo a fornecer um inóculo de 5×10^2 UFC. Dessa suspensão, 50 μ L foram transferidos para um tubo contendo 4,95 mL de caldo RPMI.

Preparo das substâncias

As amostras de terpenoides foram utilizadas a partir dos frascos provenientes dos fabricantes. Os terpenoides foram avaliados em diferentes concentrações, permitindo determinar a concentração necessária para inibir o crescimento das leveduras testadas. A Anfotericina B (AMB – Bristol – Myers Squibb, Woerden, Holanda) foi usada como antifúngico controle. Após a inoculação, as placas fechadas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas.

Leitura dos resultados

Após 24 horas de incubação, foram introduzidos em cada orifício da placa 30 μ L de uma solução aquosa 0,02% de resazurina, reincubando

todas as placas por mais 3 horas. A resazurina é um reagente capaz de revelar uma reação de oxidação-redução, usada na determinação do perfil de sensibilidade de fungos em relação aos diferentes quimioterápicos atualmente utilizados. Essa substância possui um princípio ativo que age como indicador de oxidação-redução em que são reduzidos (pelo ganho de hidrogênios) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular. Dessa forma, quando o reagente não está em contato com células vivas (na ausência de crescimento fúngico), a resazurina apresenta-se na sua forma oxidada – coloração azulada, caso contrário, se estiver em contato com células viáveis, esse composto adquire a sua forma reduzida – coloração rósea. Adotada nessa pesquisa, constitui-se em uma boa alternativa para melhor visualização na leitura das microplacas.

Nos resultados obtidos com base na leitura das microplacas, a menor concentração capaz de induzir proeminente inibição do crescimento da levedura testada em relação ao poço-controle foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antifúngico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas de substâncias puras adquiridas dos fabricantes frente às 11 espécies de *Candida* utilizadas neste trabalho. Foram testados 15 terpenoides: Bisabolol, Borneol, Cânfora, Citral, Citronelol, Eucaliptol, Eugenol, Fenchona, (+) Limoneno, (-) Limoneno, Mentol, Mirceno, Precoceno, Anetol e Verbenone.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de terpenoides frente a espécies de *Candida*

Microrganismo Substância	Concentração inibitória mínima (CIM) de terpenoides										
	Atividade antifúngica CIM (µg/mL)										
	<i>Candida albicans*</i>	<i>Candida parapsilosis*</i>	<i>Candida krusei*</i>	<i>Candida metapsilosis*</i>	<i>Candida orthopsilosis*</i>	<i>Candida dubliniensis*</i>	<i>Candida guilliermondii*</i>	<i>Candida tropicalis*</i>	<i>Candida albicans**</i>	<i>Candida parapsilosis**</i>	<i>Candida orthopsilosis**</i>
Bisabolol	3000	187,5	3000	3000	1500	1500	1500	3000	> 3000	> 3000	1500
Borneol	3000	1500	1500	3000	3000	3000	1500	3000	> 3000	> 3000	> 3000
Cânfora	750	1500	375	3000	1500	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Citral	750	1500	375	1500	750	1500	1500	3000	3000	1500	3000
Citronelol	3000	1500	750	1500	1500	1500	1500	1500	3000	1500	1500
Eucaliptol	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000
Eugenol	750	3000	1500	750	750	1500	1500	1500	1500	750	375
Fenchona	3000	1500	1500	3000	3000	3000	1500	3000	> 3000	3000	1500
(+) Limoneno	375	93,75	46,87	93,75	93,75	375	46,87	375	375	375	93,75
(-) Limoneno	750	1500	46,87	93,75	187,5	750	187,5	750	750	750	93,75
Mentol	750	750	750	1500	750	1500	750	1500	1500	750	375
Mirceno	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000
Precoceno	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000	> 3000
Anetol	1500	3000	1500	3000	3000	3000	3000	3000	3000	1500	3000
Verbenone	1500	750	3000	3000	1500	3000	3000	> 3000	> 3000	3000	3000
Anfotericina B	–	0,25	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–

* Culturas com marca registrada da *American Type Culture Collection* (ATCC); ** Culturas de isolados clínicos; – atividade antifúngica não testada.

O terpenoide Bisabolol apresentou CIM de 187,5 µg/mL frente à *C. parapsilosis*; 1500 µg/mL para *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. orthopsilosis* (isolado clínico); 3000 µg/mL para *C. albicans*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. tropicalis*; e > 3000 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis* (cepas de isolado clínico).

A substância Borneol apresentou CIM de 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*; 3000 µg/mL para *C. albicans*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*; > 3000 µg/mL para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (isolados clínicos).

A Cânfora apontou CIM de 375 µg/mL para *C. krusei*; 750 µg/mL para *C. albicans*; 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*; 3000 µg/mL para *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, e para os isolados clínicos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

O Citral apresentou CIM de 375 µg/mL para *C. krusei*; 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. orthopsilosis*; 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e isolado clínico de *C. parapsilosis*; 3000 µg/mL para *C. tropicalis*, e para isolados clínicos de *C. albicans* e *C. orthopsilosis*.

O Citronelol mostrou CIM de 750 µg/mL para *C. krusei*; 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, e para isolados clínicos de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*; 3000 µg/mL para *C. albicans*, e isolado clínico de *C. albicans*.

O Eucaliptol apontou CIM > 3000 µg/mL para todas as espécies de *Candida*.

O terpenoide Eugenol apresentou CIM de 375 µg/mL para *C. orthopsilosis* (isolado clínico); 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e isolado clínico de *C. parapsilosis*; 1500 µg/mL para *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, e isolado clínico de *C. albicans*; 3000 µg/mL apenas para *C. parapsilosis*.

A Fenchona com CIM de 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, e isolado clínico de *C. orthopsilosis*; 3000 µg/mL para *C. albicans*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e isolado clínico de *C.*

parapsilosis; > 3000 µg/mL somente para isolado clínico de *C. albicans*.

O terpenoide (+) Limoneno apresentou atividade antifúngica em todas as espécies de *Candida*, com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii*; 93,75 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e isolado clínico de *C. orthopsilosis*; 375 µg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e para isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

O terpenoide (-) Limoneno apresentou CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei*; 93,75 µg/mL para *C. metapsilosis*, e isolado clínico de *C. orthopsilosis*; 187,5 µg/mL para *C. orthopsilosis* e *C. guilliermondii*; 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e para isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*; 1500 µg/mL para *C. parapsilosis*.

A substância Mentol apresentou CIM de 375 µg/mL para *C. orthopsilosis* (isolado clínico); 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*, e isolado clínico de *C. parapsilosis*; 1500 µg/mL para *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e para isolado clínico de *C. albicans*.

O Mirceno e o Precoceno mostraram-se inativos com CIM > 3000 µg/mL para todas as espécies de *Candida*.

O Anetol apresentou MIC de 1500 µg/mL para *C. albicans*, *C. krusei*, e para isolado clínico de *C. parapsilosis*; 3000 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, e para os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. orthopsilosis*.

Verbenone apresentou CIM de 750 µg/mL para *C. parapsilosis*; 1500 µg/mL para *C. albicans* e *C. orthopsilosis*; 3000 µg/mL para *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, e isolados clínicos de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*; > 3000 µg/mL para *C. tropicalis* e para isolado clínico de *C. albicans*.

Considerando a escala de Concentração Inibitória Mínima para atividade antimicrobiana proposta por Holetz, et al²⁵, as substâncias que tiveram boa atividade antifúngica foram: (+) Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii*; 93,75 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e *C. orthopsilosis* (isolado clínico).

A substância (-) Limoneno também apresentou boa atividade antifúngica com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei*; 93,75 µg/mL para *C. metapsilosis*, e isolado clínico de *C. orthopsilosis*.

As substâncias que apresentaram atividade antifúngica moderada foram: Bisabolol com CIM de 187,5 µg/mL frente a *C. parapsilosis*; Cânfora com CIM de 375 µg/mL para *C. krusei*; Citral com CIM de 375 µg/mL para *C. krusei*; Eugenol com CIM de 375 µg/mL para *C. orthopsilosis* (isolado clínico); (+) Limoneno com CIM de 375 µg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e para as cepas de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*; (-) Limoneno com CIM de 187,5 µg/mL para *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*; Mentol com CIM de 375 µg/mL para isolado clínico de *C. orthopsilosis*.

As substâncias consideradas com fraca atividade antifúngica foram: Cânfora com CIM de 750 µg/mL para *C. albicans*; Citral com CIM de 750 µg/mL para *C. albicans* e *C. orthopsilosis*. Citronelol com CIM de 750 µg/mL para *C. krusei*; Eugenol com CIM de 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e para isolado clínico de *C. parapsilosis*; (-) Limoneno com CIM de 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis*,

C. tropicalis, e para os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*; Mentol com CIM de 750 µg/mL para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*, e para a cepa de isolado clínico de *C. parapsilosis*; Verbenone com CIM de 750 µg/mL frente a *C. parapsilosis*.

As substâncias consideradas inativas foram o Borneol, o Eucaliptol, a Fenchona, o Mirceno, o Precoceno e o Anetol.

CONCLUSÃO

Das 15 substâncias – terpenoides – testadas pela técnica da microdiluição em placa com a determinação da Concentração Inibitória Mínima, 9 (60%) apresentaram atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* e 6 (40%) não apresentaram atividade.

Dessas 9 substâncias, 2 (22,2%) apresentaram boa atividade antifúngica, e 7 (77,8%) apresentaram atividade antifúngica de moderada a fraca. Os resultados mais promissores foram obtidos com os terpenoides (+) Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii* e com o terpenoide (-) Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei*.

REFERÊNCIAS

1. Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro NF. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu; 2000.
2. Dixon RE. Control of health-care associated infections, 1961-2011. MMWR Surveill Summ. 2011;60(4):58-63.
3. Cipolla D, Giuffrè M, Mammina C, Corsello G. Prevention of nosocomial infections and surveillance of emerging resistances in NICU. J Mater Fetal Neonatal Med. 2011;24(S1):23-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2011.607567>
4. Juneja D, Borah AK, Nasa P, Singh O, Javeri Y, Dang R. *Candida* sake candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: a case series. Crit Care Resusc. 2011;13(3):187-91.
5. Sahiner F, Ergünay K, Ozyurt M, Ardiç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):478-88.
6. Sydnor ERM, Perl TM. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. Clin Microbiol Rev. 2011;24(1):141-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00027-10>
7. Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed; 2001.
8. Vuorela P, Leinonen M, Saikku P, Tammela P, Rauha JP, Wennberg T, Vuorela H. Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. Curr Med Chem. 2004;11(11):1375-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365116>
9. Ambrósio SR, Tirapelli CR, Da Costa FB, Oliveira AM. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. Life Sci. 2006;79(10):925-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.05.015>
10. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Costa FB, Oliveira AM. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. Rec Pat Cardiovasc Drug Discov. 2008;3(1):1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/157489008783331689>
11. Holzheimer RG, Dralle H. Management of mycoses in surgical patients – review of the literature. Eur J Med Res. 2002;7(5):200-26.
12. Kalil AC, Dakroub H, Freifeld AG. Sepsis and Solid Organ Transplantation. Current Drug Targets. 2007;8(4):533-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945007780362746>
13. Kurtzman CP, Fell JW, coordinators. The Yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.

14. Minami PS. Micologia: métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. Barueri (SP): Manole; 2003. 199 p.
15. Rodríguez D, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Mensa J, Ayats J, Sanchez F, Pahissa A. Predictors of candidaemia caused by non-*albicans* *Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. Clin Microbiol Infect. 2010;16(11):1676-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03208.x>
16. Almirante B, Cuenca-Estrella M. Candidemia: impacto de los estudios epidemiológicos en la terapéutica y en el pronóstico de una infección grave. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(5):325-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.002>
17. Hacimustafaoglu M, Celebi S. *Candida* infections in non-neutropenic children after the neonatal period. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9(10):923-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/eri.11.104>
18. Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase: revisão. DST J Bras Doenças Sex Transm. 2010;22(1):22-38.
19. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quím Nova. 2010;33(3):667-79. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000300035>
20. Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of antifungal resistance. Infect Dis Clin North Am. 1997;11(4):929-44. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5520\(05\)70398-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70398-6)
21. Schreiber AZ. Antifungigrama: quando solicitar e como interpretar. Prática Hospitalar. 2007;9(49):87-91.
22. Montejo M, Quindós G. Evidencias científicas que respaldan el uso de micafungina en el tratamiento de la candidiasis invasora. Enf Infecc Microbiol Clin. 2011;29(2):15-22. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0213-005x\(11\)70004-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0213-005x(11)70004-0)
23. Montanari CA; Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Quím Nova. 2001;24(1):105-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422001000100018>
24. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organização Pan-Americana da Saúde – Organização Mundial da Saúde. Termo de cooperação n. 37 – Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos; 2006.
25. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762002000700017>