

ATIVIDADE BIOLÓGICA “*IN VITRO*” DO FITOCONSTITUINTE TIMOL SOBRE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA*

Elias Figueiredo da Silva, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG),
eliasfigueiredo98@gmail.com

Thales José Nunes Vieira, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG),
thalesjnvieira@gmail.com

Giliara Carol Diniz de Luna Gurgel, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG),
giliara.carol@ufcg.edu.br

RESUMO

Muitas das infecções oportunistas ocorrem diante de situações de imunossupressão ou alterações sistêmicas que provoquem mudanças nas características físico-químicas do hospedeiro. Alguns microrganismos assumem o comportamento de patógenos, causando manifestações infecciosas, como ocorre com as leveduras do gênero *Candida*. Atualmente, o tratamento empregado baseia-se no uso de azólicos e poliênicos, no entanto o incremento da resistência microbiana e a necessidade da descoberta de novas propostas terapêuticas impulsiona os estudos sobre atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal. O fitoconstituente timol é um composto fenólico monoterpênico, isômero do carvacrol, de fórmula $C_{10}H_{13}OH$ e denominação química 5-metil-2-(1-metiletil)fenol. Está presente nos óleos essenciais de espécies como *Origanum vulgare* Linn e *Lippia sidoides* Cham. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica “*in vitro*” do timol sobre espécies de *Candida*, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), para os quais foram utilizadas 04 cepas de referência ATCC 13803, ATCC 6258, ATCC 90028, ATCC 76615, e 18 amostras de isolados de cavidade bucal. A partir dos ensaios realizados, constatou-se que a CIM 90 determinada para o fitoconstituente timol foi de 1,25µg/ml, e a CFM variou entre 5µg/ml e 0,62 µg/ml. Os resultados obtidos levam à conclusão de que o timol a uma concentração de 5µg/ml possui atividade antimicrobiana satisfatória contra todas as cepas de *Candida* analisadas, podendo representar uma boa possibilidade terapêutica para as candidoses .

PALAVRAS-CHAVE: *Candida sp*, antifúngico, timol.

ABSTRACT

Many of the opportunistic infections occur in situations of immunosuppression or systemic changes that cause changes in the physical-chemical characteristics of the host. Some microorganisms assume the behavior of pathogens, causing infectious manifestations, as occurs with the yeasts of the genus *Candida*. Currently, the treatment used is based on the use of azole and polyene, however the increase of microbial resistance and the need to discover new therapeutic proposals boosts the studies on antimicrobial activity of products of plant origin. The phytoconstituent thymol is a monoterpene phenolic compound, isomer of carvacrol, of the formula $C_{10}H_{13}OH$ and chemical denomination 5-methyl-2-(1-methylethyl) phenol. It is present in the essential oils of species such as *Origanum vulgare* Linn and *Lippia sidoides* Cham. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* biological activity of thymol on *Candida* species by determining minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM), for which four ATCC

reference strains 13803, ATCC 6258, ATCC 90028, ATCC 76615, and 18 samples of buccal cavity isolates. From the tests performed, it was found that the MIC 90 determined for the thymol phytoconstituent was 1.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, and the CFM ranged from 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 0.62 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The results obtained lead to the conclusion that thymol at a concentration of 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ has satisfactory antimicrobial activity against all strains of *Candida* analyzed, and may represent a good therapeutic possibility for candidoses.

KEYWORDS: *Candida sp*, antifungic, timol

RESUMEN

Muchas de las infecciones oportunistas ocurren ante situaciones de inmunosupresión o alteraciones sistémicas que provoquen cambios en las características físico-químicas del huésped. Algunos microorganismos asumen el comportamiento de patógenos, causando manifestaciones infecciosas, como ocurre con las levaduras del género *Candida*. Actualmente, el tratamiento empleado se basa en el uso de azólicos y poliésicos, sin embargo el incremento de la resistencia microbiana y la necesidad del descubrimiento de nuevas propuestas terapéuticas impulsa los estudios sobre actividad antimicrobiana de productos de origen vegetal. El fitoconstituidor timol es un compuesto fenólico monoterpénico, isómero del carvacrol, de fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{OH}$ y denominación química 5-metil-2-(1-metiletil) fenol. Está presente en los aceites esenciales de especies como *Origanum vulgare Linn* y *Lippia serides*. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad biológica in vitro del timol sobre especies de *Candida*, a través de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración fungicida mínima (CFM), para los cuales se utilizaron 4 cepas de referencia ATCC 13803, ATCC 6258, ATCC 90028, ATCC 76615, y 18 muestras aisladas de la cavidad bucal. A partir de los ensayos realizados, se constató que la CIM 90 determinada para el fitoconstituyente timol fue de 1,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, y la CFM varía entre 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y 0,62 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Los resultados obtenidos conducen a la conclusión de que el timol a una concentración de 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ tiene actividad antimicrobiana satisfactoria contra todas las cepas de *Candida* analizadas, pudiendo representar una buena posibilidad terapéutica para las candidaes.

INTRODUÇÃO

A microbiota comensal tem importante papel tanto na homeostasia quanto no desenvolvimento de doenças decorrentes da alteração desse ecossistema. Ela contribui para o desenvolvimento do sistema imune, permitindo a colonização equilibrada de grande variedade microbiológica, e pode constituir reservatório de microrganismo potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro. (KELLY, BENJAMIN, SMITH, 2015; PINHAT, BORBA, FERREIRA, 2012).

Sendo a microbiota comensal diversificada e em equilíbrio ecológico, mantidas as condições físico-químicas e imunes normais, os microrganismos comportam-se de forma não patogênica. Diante de situações de imunossupressão ou alterações sistêmicas, alguns

microrganismos assumem o comportamento de patógenos, causando manifestações infecciosas (BUDTZ-JORGENSEN, 1990; BLYTH, CHEN, SLAVIN, 2009).

A maioria das pesquisas sobre a bioatividade dos produtos naturais têm avaliado o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, extratos e suas frações (HELANDER et al., 1998), sendo escassas as que abordam estudos com fitoconstituintes, que são pequenas moléculas orgânicas consideradas como antimicrobianos naturais (BRUL, COOTE, 1999). Estes compostos são geralmente hidrofóbicos e podem exercer sua ação antimicrobiana através de vários mecanismos, dentre os quais, perturbações ou ruptura de membrana (HELANDER et al., 1998). Alguns fitoconstituintes tiveram seu potencial antifúngico e antibacteriano estudados (ANTUNES et al., 2006; HELANDER et al., 1998; LIMA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2000), porém, ainda é considerado pequeno o número de estudos científicos abordando sua atividade antimicrobiana.

O timol é um composto fenólico monoterpênico, isômero do carvacrol, de fórmula $C_{10}H_{13}OH$ e denominação química 5-metil-2-(1-metiletil)fenol, cuja atividade antimicrobiana é referida em diversos estudos (NOSTRO et al., 2007; CARVALHO et al. 2003; COSTA et al. 2001)

Neste contexto, os fitoconstituintes assumem um significado importante na construção de opções terapêuticas econômica e industrialmente acessíveis, eficazes, menos tóxicas, e cujo mecanismo de ação represente uma alternativa no combate à crescente resistência microbiana (SANGUINETTI, POSTERARO, LASS-FLORL, 2015).

Diante da necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas antifúngicas efetivas no controle de patógenos humanos, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a atividade biológica “*in vitro*” do fitoconstituente timol sobre espécies de *Candida* através de ensaios de determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).

METODOLOGIA

O fitoconstituente timol (Sigma-Aldrich) e as soluções apresentando diferentes concentrações deste, cuja densidade é de $0,96g/cm^3$, foram obtidas a partir da adaptação do protocolo preconizado por Alegrinni et al. (1973). Obteve-se uma solução com concentração

final de 80 μ L/mL, a partir da qual foi realizada a diluição seriada diretamente na placa de 96 poços (GAYOSO et al., 2004).

Os microrganismos submetidos aos ensaio foram as cepas *C. albicans* ATCC 76615, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* LM 17, *C. albicans* LM V42, *C. albicans* LM 16, *C. albicans* LM12, *C. albicans* LM 15, *C. albicans* LM V08, *C. albicans* LM CB07, *C. tropicallis* ATCC 13803, *C. tropicallis* LM CB05, *C. tropicallis* LM 28, *C. tropicallis* LM 04, *C. tropicallis* LM 13V, *C. tropicallis* LM 13, *C. guillermondii* LM 30, *C. guillermondii* LM V02, *C. guillermondii* LM 70, *C. guillermondii* LMV 01, *C. krusei* ATCC 6258, *C. krusei* LM 11, *C. krusei* LM CB12. O inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 01mm, de culturas de 24 horas (*overnight*), a 35°C, que foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl). A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex (FANEM) durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada, com espectrofotômetro até obter-se a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala 0,5 de McFarland em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. A temperatura de incubação permaneceu em 35°C (CLEELAND, SQUIRES, 1991; NCCLS, 2002). Para o controle com antifúngico sintético, foi selecionado o miconazol, numa concentração de 50 μ g/mL (DROUHET et al., 1981; PAPPAS, KAUFFMAN, ANDES, 2016; KIMBERLIN, 2015) .

A determinação da CIM do timol foi realizada através da técnica da Microdiluição (NCCLS, 2002). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis, de fundo chato e com tampa. Os ensaios foram realizados em duplicata e incubados a 35°C durante 24-48 horas. Após o tempo de incubação adequado, realizou-se a leitura e interpretação dos resultados. Os dados obtidos através das leituras foram registrados, sendo considerado como resultado do ensaio a média aritmética dos resultados parciais do experimento e de sua repetição.

A leitura para determinação da CIM sobre as cepas de leveduras foi feita através do método visual. Levou-se em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Desta forma, considerou-se como CIM, a menor concentração do produto em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas de leveduras utilizadas nos ensaios microbiológicos. (NCCLS, 2002).

Para a confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foi utilizado o corante TTC (2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio - Sigma-Aldrich), no volume de 10µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Pela hidrogenação do 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifenil formazan. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor (DESWAL,CHAND, 1997).

Após a determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos foram subcultivados em placas de ágar Sabouraud dextrose – ASD (Difco Co.), devidamente identificados. Após 24 horas de incubação a 35°C, as leituras das CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração do produto que impediu crescimento visível do subcultivo.

DESCRIÇÕES, RESULTADOS, INTERPRETAÇÕES

Observou-se que todas as cepas ensaiadas apresentaram sensibilidade à ação do fitoconstituente timol à concentração de 2,5 µL/mL. As cepas *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* LM 17 comportaram-se como menos sensíveis a ação diante da ação do timol, sendo a CIM para estas determinada em 2,5 µL/mL, enquanto que a cepa mais sensível foi *C. krusei* ATCC 6258, sendo a CIM para a mesma estabelecida em 0,31 µL/mL.

Nenhuma das cepas testadas apresentou sensibilidade ao TWEEN 80, sendo capazes de crescer em caldo Sabouraud adicionado deste, sem a adição do produto testado, caracterizando sua viabilidade.

Para avaliar a propriedade de concentrações inibitórias impedirem o aparecimento de células viáveis em subcultivo, realizou-se o ensaio de determinação da concentração fungicida mínima (CFM), no qual foram submetidas a teste, além da CIM, as duas concentrações imediatamente superiores a esta. A CFM do timol variou entre 5 µL/mL e 0,62 µL/mL e as

cepas que apresentaram menor CFM foram *C. guilliermondii* LM V02 e *C. krusei* ATCC 6258.

Alguns pesquisadores têm considerado que um composto deve ser reconhecido como possuidor de forte efeito fungicida quando capaz de causar uma diminuição de 1000 vezes do inóculo inicial (ESPINEL-INGROFF et al, 1998). Diante da total inibição do crescimento e inviabilidade do inóculo, e consoante com os parâmetros propostos por Espinel-Ingroff *et al.*, 1998, pode-se considerar o fitoconstituente timol como detentor de grande poder fungicida, havendo neste ensaio, destaque para a maior sensibilidade da cepa de espécie *C. albicans*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade do fitoconstituente timol, conclui-se que a concentração inibitória mínima para 90% das cepas ensaiadas, submetidas à ação do fitoconstituente timol apresentou-se como boa preditora de atividade fungistática e fungicida, sendo o mesmo capaz de ocasionar alterações semelhantes ao produto sintético (miconazol) no microrganismo testado.

A atividade antibacteriana do fitoconstituente timol nesse trabalho pode abrir perspectivas no que concerne à pesquisa e ao desenvolvimento de fitofármacos eficazes e de baixo custo, podendo ser empregados no tratamento das candidoses.

REFERÊNCIAS

ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M.S.; MAILOLS, H. **Émulsion d'huiles essentielles frabricaton et applications en microbiologie**. Soc. Pharm. Montpellier, Montpellier, v. 33, p. 73-86, 1973.

ANTUNES, R. M. P. In vitro antimicrobial activity and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of natural and synthetic compounds against bacteria and leveduriform fungi. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v.16, n.4, 2006 .

BLYTH, C.C; CHEN, S.C; SLAVIN, M.A. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients.

Pediatrics. V.123, 1360-8, 2009.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.**, Copenhagen, v. 50, p. 1-17, 1999.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol.Scand**. v.48, p.61-9, 1990.

CARVALHO, A.F.; MELO, V.M.; CRAVEIRO, A.A; MACHADO, M.I.; BANTIM, M.B; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.98, p.569-571, 2003.

CLEELAND R.; SQUIRES E., Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: Lorian V., **Antibiotics in laboratory medicine**. 3^aEd. New York. 1991.

COSTA, S.M.; LEMOS, T.L.; PESSOA, O.D; PESSOA, C; MONTENEGRO, R.C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity.. **J Nat Prod**. v.64, p. 792-795, 2001.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, p. 409-417, 1997.

DROUHET, E. Standardization of the antifungal sensitivity tests. Report of the study group of the French society for medical mycology, **Bull.Soc.Fr.Mycol.Med**. v.10, n.1, p.131-134, 1981.

ESPINEL-INGROFF, A. In vitro activity of new triazole voriconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **J Clin Microbiol**, v.36, p.198-202, 1998.

GAYOSO, C.W. Efeito inibitório do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, alfa-pineno e beta-pineno sobre fungos isolados de onicomicoses. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.4, 25-29, 2004.

HELANDER, L.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-positive bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 46, p.3590- 3595, 1998.

KELLY, M.S; BENJAMIN, D.K.; SMITH, P.B. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. **Clin Perinatol.** v.42, p 105-17, 2015.

KIMBERLIN, D.W. **Red Book - Report of the Committee on Infectious Diseases.** 2015.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn** v.16, p 197- 201, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 31, p. 65-72, 2000.

NCCLS, 2002 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard.** Villanova, NCCLS, v. 17, No. 9. (Document M27-A2), 2002.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R.. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology** v.56, p. 519-523, 2007.

PAPPAS, PG; KAUFFMAN, C.A; ANDES, D.R. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** v.62, p.1-50, 2016.

PINHAT, E.C.; BORBA, M.G.; FERREIRA, M.L. Fungal colonization in newborn babies of very low birth weight: a cohort study. **J Pediatr.** v.88, p 211-6, 2012.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v.58, n.S2, p.2-13, 2015.