

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL *Citrus sinensis* (L.) Osbeck CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*

Maria Alyce Albuquerque Fernandes¹; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar²; Elnatan Bezerra de Souza³; Tigressa Helena Soares Rodrigues⁴; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle⁵.

¹ Graduada em Ciências Biológicas, UVA. E-mail: alycealbuquerque55@gmail.com; ² Pós doutoranda - Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, UVA, Sobral CE; ³ Professor do Curso de Ciências Biológicas, UVA, Sobral CE; ⁴ Professora do Curso de Química, UVA, Sobral CE; ⁵ Orientadora/Professora do Curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA. E-mail: raquelbios@yahoo.com.br.

Resumo: O gênero *Citrus* é usado na medicina popular há muitos anos, sendo a espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck uma das mais importantes do gênero e para a bioprospecção. O presente trabalho teve como objetivos extrair, caracterizar e testar o óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck contra isolados clínicos de *Candida albicans*, além de testar o seu composto majoritário contra as cepas e fazer um comparativo da atividade antifúngica. Na caracterização química foi identificado o limoneno como composto majoritário. Os compostos foram testados pelo método de microdiluição em caldo, onde o óleo essencial apresentou CIM de 0,078 mg/mL e CFM variando de 0,156-0,078 mg/mL e o limoneno, com CIM entre 1,25-0,625 mg/mL e CFM entre 2,5-1,25 mg/mL. Os resultados obtidos neste trabalho foram promissores e oferecem oportunidades de estudos adicionais dos mecanismos de ação dos compostos contra *Candida albicans*.

Palavras-chave: Bioprospecção; Microdiluição; Limoneno.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A *Candida albicans* é uma espécie de levedura que pertence ao gênero *Candida*, que coloniza a microbiota humana, mas devido a fatores externos que enfraquecem o sistema imunológico ela pode se tornar patogênica e causar infecções oportunistas (GOULART *et al.*, 2018; LOPES, 2022). A resistência antifúngica às drogas de uso padrão é um problema recorrente e casos de resistência de *C. albicans* a compostos azólicos que são os fármacos mais usados para tratar infecções fúngicas, têm sido relatados (GOULART *et al.*, 2018; Leite *et al.*, 2014). Em decorrência dessa farmacoresistência, estudos com produtos naturais como métodos alternativos de tratamento tem se destacado e dentre esses produtos, os óleos essenciais têm apresentado resultados promissores.

Óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, sendo essas misturas diferentes e com variabilidade química significativa (CARSON, 2011), e a quantidade e atividade dos OEs depende de inúmeros fatores físicos e químicos. As plantas cítricas são uma das principais fontes de óleo essencial e seu uso é estudado devido ao seu potencial na indústria alimentícia (MUSTAFA, 2015). *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, popularmente chamado de laranja doce, é uma das espécies mais importantes do gênero *Citrus*, sendo usada na medicina popular por ser uma fonte rica de vitamina C, além de ter propriedades antioxidantes (ETEBU, 2014).

Diante dos fatos apresentados, o presente trabalho teve como objetivos extrair, caracterizar e testar o óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck contra isolados clínicos



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAU

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



CEARÁ
GOVERNO DO ESTADO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

de *Candida albicans*, além de testar o seu composto majoritário contra as cepas e fazer um comparativo de atividade antifúngica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta botânica

O material foi recolhido no período da manhã em uma propriedade na cidade de Sobral-CE, latitude 3°39'32.1"S e longitude 40°22'58.1"W, que cultivava as plantas para o seu próprio consumo, em seguida foi levado até o Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos - HUVA da Universidade Estadual Vale do Acaraú, onde foram identificadas.

Óleo essencial

A extração ocorreu por meio do processo de extração por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Foi picado 349g de folhas de *Citrus sinensis*, depois foram colocadas em um balão de fundo redondo de 2000 mL. O balão foi colocado na manta de aquecimento com água aquecida a 100°C dentro e fora com temperatura acima de 100°C conectado a um sistema de resfriamento. O rendimento (p/p) foi determinado pela razão da quantidade final de óleo obtida e a massa das folhas frescas utilizadas na extração (SANTOS *et al.*, 2014).

Análise dos componentes químicos do óleo essencial

A análise por CG-EM foi realizada em um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A (quadropolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo de 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 150°C e fonte de íons 230°C, temperatura da linha de transferência 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70°C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250°C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos), e de dados da literatura (ADAMS, 2017).

Composto majoritário

O limoneno usado foi o (R)-(+)-Limonene (97%) ((+)-p-Mentha-1,8-diene, (+)-Carvene, (R)-4-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexene) da @Sigma-Aldrich.

Microrganismos

Foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, LABMIC 0102, LABMIC 0104 e LABMIC 0105 do Laboratório de Microbiologia da UVA - LABMIC. As cepas foram provenientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral e foram previamente identificadas por vitek e meio cromogênico, e a cepa ATCC 90028 (American Type Culture Collection) de Iowa, Estados Unidos.

Método de microdiluição em caldo

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com a norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). As cepas de *Candida albicans* foram cultivadas em tubos de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubadas por 24h a 37°C. O inóculo foi preparado utilizando a escala McFarland 0.5 (10⁶ UFC/mL), seguido de uma diluição em RPMI de 1:2000 (2x10² UFC/mL). Os compostos foram diluídos em uma concentração de 10 mg/mL com RPMI e



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



CEARÁ
GOVERNO DO ESTADO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

DMSO 5%. Em placas de 96 poços de fundo U foram distribuídos 100 μ L de RPMI em todos os poços. Em seguida, 100 μ L dos compostos foram adicionados na primeira coluna e realizadas diluições seriadas no intervalo de concentração de 10-0,004 mg/ml. Foi utilizado anfotericina B como controle no intervalo de concentrações de 16-0,25 μ g/ml. As placas foram incubadas por 24h a 37°C. Depois foi feita a leitura das placas na leitora de ELISA a 620nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração onde foi observado crescimento visual na placa.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar o CFM do óleo essencial e Anfotericina B, foram retiradas alíquotas de 50 μ L do meio presente nas cavidades da placa de 96 poços que não apresentaram crescimento fúngico e semeadas em placas de petri com meio de cultivo sabouraud dextrose agar (SDA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 1,8 ml do OE, onde o rendimento foi de 0,51% (V/M). O OE obtido foi límpido, levemente amarelado e com cheiro forte bem característico da espécie, e a sua densidade de 0,795 g/mL. A análise dos componentes químicos do óleo essencial identificou 16 tipos de compostos tendo 93,97% de composição total, sendo os mais abundantes o Citronellal com 12,29%, β -Pinene com 16,49% e como composto majoritário, o Limonene com 36,69% (Tabela 1).

Na literatura o limoneno já é conhecido como composto majoritário das espécies do gênero *Citrus*, contudo, a quantidade (%) de limoneno presente no OE foi inferior em comparação aos trabalhos de Gomes *et al.* (2020) e Assunção *et al.* (2013), onde nos OEs a quantidade (%) de limoneno foi de 81,50% e 89,55% respectivamente.

Essa diferença de quantidade (%) pode ser explicada pelo fato de na literatura os dados serem de OE extraídos de cascas da fruta e nesse trabalho ser das folhas, o que pode ser devido a variação da concentração do composto nas partes anatômicas vegetais. Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos publicados com resultados de OE extraídos das folhas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Tabela 1. Composição química do OE de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Composto	¹ IR _{calc}	² IR _{lit}	Área (%)
α -Pinene	936	932	1,28
Sabinene	975	969	5,85
β -Pinene	981	974	14,61
Myrcene	992	988	0,71
o-Cymene	1026	1022	0,73
Limonene	1030	1024	36,69
Eucalyptol	1033	1026	10,48
delta-2-Carene	1102	1001	1,15
cis-Limonene oxide	1135	1132	2,74
Limonene epoxide	1139	1137	1,36
Citronellal	1153	1148	8,88
Terpinen-4-ol	1180	1174	0,54
α -Terpineol	1193	1186	2,57



Myrtenol	1199	1194	0,5
Citronellol	1229	1223	0,53
Geranial	1272	1264	1,35
cis-Pinocarvyl acetate	1309	1311	1,37
Myrtenyl acetate	1324	1324	0,72
Citronellyl acetate	1354	1350	1,11
Caryophyllene oxide	1584	1582	0,8
Composição Total			93,97

¹Valores de IR calculado.

²Valores de IR da literatura (Adams, 2017).

As cepas de *Candida albicans* testadas foram sensíveis ao OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, apresentando CIM de 0,078 mg/mL para todas as cepas testadas e CFM variando de 0,156-0,078 mg/mL (Tabela 2). Já o Limoneno apresentou CIM entre 1,25-0,625 mg/mL e CFM entre 2,5-1,25 mg/mL (Tabela 2), apresentando uma atividade muito menor que a do OE. Nas cepas LABMIC 0102 e LABMIC 0104 o OE apresentou ação fungicida, ou seja, a concentração que inibiu o crescimento também matou, já as cepas LABMIC ATCC 90028 e LABMIC 0105 foi de ação fungistática, onde apresentou inibição em uma concentração, mas matou em outra. E o limoneno nas cepas LABMIC ATCC 90028 e LABMIC 0105, teve ação fungicida e nas cepas LABMIC 0102 e LABMIC 0104, fungistática.

No estudo de Thakre *et al.* (2018), o limoneno apresentou atividade variando de 20 mM-5mM (3,44 mg/mL-0,681 mg/mL), tendo ação fungicida já que matou 99,9% do inóculo das cepas de *C. albicans* testadas, apresentando uma atividade melhor que os resultados obtidos neste trabalho. Já no trabalho de Ribeiro (2023), o limoneno apresentou CIM de 656,25 µg/mL (0,656 mg/mL) e CFM 5250 µg/ml (5,25 mg/mL) na cepa ATCC 10231 de *C. albicans* apresentando ação fungistática, semelhante a atividade nas cepas LABMIC 0102 e LABMIC 0104 (Tabela 2), e CIM variando entre 2625-1312,5 µg/ml (2,62-1,31 mg/mL) e CFM entre 2625-1312,5 µg/ml (2,62-1,31 mg/mL) em duas cepas, apresentando ação fungicida, semelhante as cepas LABMIC ATCC 90028 e LABMIC 0105 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da atividade do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e do Limoneno contra isolados clínicos de *Candida albicans* e da droga padrão, a Anfotericina B.

CEPAS	<i>Citrus sinensis</i>		R+ Limonene		Anfotericina B	
	CIM (mg/ml)	CFM (mg/ml)	CIM (mg/ml)	CFM (mg/ml)	CIM (µg/ml)	CFM (µg/ml)
LABMIC ATCC 90028	0,078	0,156	1,25	1,25	0,25	0,25
LABMIC 0102	0,078	0,078	0,625	2,5	0,25	0,25
LABMIC 0104	0,078	0,078	1,25	2,5	0,25	1

LABMIC 0105	0,078	0,156	1,25	1,25	0,25	1
-------------	-------	-------	------	------	------	---

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e o Limoneno terem apresentado resultados promissores contra as cepas de *Candida albicans*, ainda não foram totalmente explorados. Os resultados obtidos neste trabalho oferecem oportunidades de estudos adicionais dos mecanismos de ação dos compostos, como a toxicidade, avaliar o efeito modulatório dos compostos com drogas de uso padrão, como a Anfotericina B, além de investigar o efeito sobre a formação do biofilme e sobre o biofilme maduro de *C. albicans*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Vale do Acaraú, ao Laboratório de Microbiologia da UVA - LABMIC e ao CNPq por tornarem possível a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**. 4.1th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2017.

ASSUNÇÃO, G. V. de *et al.* **Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes Aegypt* do óleo essencial da espécie *Citrus Sinensis* L. Osbeck (Laranja Doce)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. **Chemistry and bioactivity of essential oils**. Lipids and essential oils as antimicrobial agents, p. 203-238, 2011.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition**. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A. B. **A review on sweet orange (*Citrus Sinensis* Osbeck): Health, diseases, and management**. Am. J. Res. v. 2, n. 2, p. 33-70, 2014.

GOULART, L. S. *et al.* **Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study**. Einstein (São Paulo), v. 16, n. 3, p. 1–6, 2018.

GOMES, P. R. B. *et al.* **Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, v. 49, n. 1, p. 28-43, 2020.

LEITE, G.M.L.; BAEZA, L.C.; RAMOS, R.T.; YAMADA. S.S.; MAGON, T.F.S.; KIMURA, E. *et al.* **Lack of effect of cell-wall targeted antibacterials on biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* species**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 50, p. 467-472, 2014.



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARÁ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



CEARÁ
GOVERNO DO ESTADO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. **Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. Virulence**, v. 13, n. 1, pág. 89-121, 2022.

RIBEIRO, A. D. **Desenvolvimento de emulgel à base de R-(+)-limoneno para tratamento de úlceras traumáticas da cavidade oral**. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, 2023.

SANTOS, G. K.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S.; NAVARRO, D. M. **Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity**. *Molecules*, v. 19, n.10, p. 16573-16587, 2014.

THAKRE, A. *et al.* **Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis**. *Medical Mycology*, v. 56, n. 5, p. 565-578, 2018.