

ENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS DE *ALLIUM SATIVUM* L. PARA USO COMO FUNGICIDA E SANITIZANTE AMBIENTAL

GENOILSON DE BRITO ALVES; EDNA APARECIDA FARIA DE ALMEIDA; ANA CAROLINA DA SILVA OLIVEIRA; LARISSA LIMA DE ALMEIDA; VITOR GERALDI GOMES

RESUMO

A candidíase é uma doença infecciosa causada por fungos oportunistas do gênero *Candida*. Dessa forma, apesar de comumente estarem presentes na microbiota do intestino humano, as quedas na imunidade podem acarretar na colonização desordenada das mucosas e a invasão de órgãos por esses fungos. A maceração do *Allium sativum* L., *in natura* para extração de agente ativo, proporciona uma metodologia viável e econômica. Os testes antimicrobianos *in vitro* demonstraram que o extrato é eficaz no controle de cândidas, resultando na redução de 72% da população de *Candida parapsilosis*; 57% para *Candida glabrata* e 47% para *Candida krusei*. A técnica de encapsulamento com alginato de cálcio é uma alternativa viável como veículo, com boa permeabilidade de membrana e passagem do extrato. Os testes *in vivo* com extrato em diferentes concentrações, reduziu a motilidade das artêmias o que sugere seu uso como sanitizante ambiental.

Palavras-chave: Cândida; Alicina; Fitoterápico; Antibiógrama; Alginato.

1. INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção causada por diferentes espécies de fungos do gênero *Candida*, podendo afetar diversos sistemas do corpo humano, incluindo mucosas, órgãos internos e o sistema imunológico (Vallabhaneni S., et al., 2020). Compreender a relação entre a proliferação de fungos da candidíase e a saúde humana e veterinária é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficientes de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento (Pappas PG, et al., 2016).

O aproveitamento do *Allium sativum* L. na elaboração de fármacos é conhecido desde a antiguidade e consta nos manuscritos de diversas civilizações (TORRES, Elizabeth; 2017). As leveduras do gênero *Candida* ocupam a quarta posição entre os principais causadores de septicemia, representando cerca de 9% dessas infecções (SILVA, D.V., et al.; 2017). Dentre 1000 admissões em hospitais brasileiros, de 1 a 6 casos são de candidemia e desses, 50% levam o paciente a óbito (COLOMBO, A. et al.; 2007). Portanto, a extração da alicina, e seu encapsulamento para uso como fitoterápico ou sanitizante, é relevante para controle da proliferação

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Extração da alicina e confecção do extrato

Os bulbos de alho utilizados foram adquiridos na rede varejista da cidade de Santo André, Estado de São Paulo, que é abastecida pela indústria agrícola dos estados de Minas Gerais e Goiás. A princípio, descascou-se e pesou-se os bulbilhos de alho, depositando em um almofariz e adição de 20 ml de água. solvente, aquecidos a 40°C. A maceração ocorreu até a formação de uma massa pastosa e homogênea.

2.2 Cultivo das cepas

Cepas ATCC® de *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, foram cultivadas em Difco™ Sabouraud Ágar e incubadas à 28°C.

2.3 Testes microbiológicos com o extrato (antibiograma)

Após cultivo em ágar Sabouraud, as cepas de *Candida* foram repicadas em ágar Mueller Hinton, onde adicionamos os discos embebidos com diferentes concentrações do extrato. Com a obtenção dos valores de halos, os dados foram transformados em área pela equação de área da circunferência ($\pi \times r^2$).

2.4 Encapsulamento com alginato de cálcio

Para o encapsulamento com alginato de cálcio ($C_6H_7O_6Ca$), foram misturados 10 ml de uma solução de alginato de sódio 0,75% (m/v) em 8 ml do extrato aquoso de alho. Para que ocorresse o encapsulamento, gotejou-se a mistura de 10 ml de alginato de sódio e 8 ml de extrato sob uma solução de $CaCl_2$ (cloreto de cálcio) de concentração 0,5 mol/L. A mistura formou o hidrocolóide alginato de cálcio, complexando o extrato (Fig. 2).

2.5 Teste de toxicidade aguda em *Artemia leach*

Afim de avaliar as dosagens tóxicas do extrato aquoso de alho na concentração de 500 mg/ml, executou-se um teste de toxicidade em duplicata com 15 artêmias em cada tubo Falcon, cada tubo contendo diferentes volumes de extrato aquoso de alho: 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml e 2,5 ml. Cada tubo foi ajustado para 10mL utilizando água salina e iniciamos a contagem do tempo através de cronômetro.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi obtida por meio do Teste one-way ANOVA, seguido por análise do Teste Bonferroni. Todas as análises estatísticas relacionadas aos testes microbiológicos foram realizadas através do Software GraphPad Prism 5. Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Nos resultados de toxicidade, as análises estatísticas foram realizadas através do Software Programa R (software de análise estatística via linguagem

de programação).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Antibiógrama para determinação da concentração

Para avaliarmos a ação antifúngica do extrato, efetuamos maceração em água e preparamos diferentes concentrações: 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml e 500 mg/ml. Os resultados dos antibiógramas revelaram melhor inibição das cepas na concentração de 500 mg/ml. Das extrações obtidas, verificamos que duas faixas de temperatura eram as mais interessantes para uso 25°C e 40°C. Na extração feita a 25°C obtivemos halos com diâmetro médio de 3,5 mm para *C. glabrata*, de 3 mm para *C. krusei* e de 7,2 mm para *C. parapsilosis*, como demonstrado na **Figura 1A**.

Os maiores halos de inibição foram registrados com a maceração realizada a 40°C, como ilustrado na **Figura 1B**, com média dos halos de inibição de 9,1 mm para *C. glabrata*, de 7 mm para *C. krusei* e de 11 mm para *C. parapsilosis*. Feita a comparação das médias dos halos obtidos com os dois extratos, aferirmos um aumento de 4 vezes da sensibilidade da *C. glabrata* ao extrato a 40°C, seguido pelos aumentos médio de 2 vezes para *C. krusei* e de 2,5 para *C. parapsilosis*. O comparativo entre as duas extrações está expresso na **Figura 1C**.

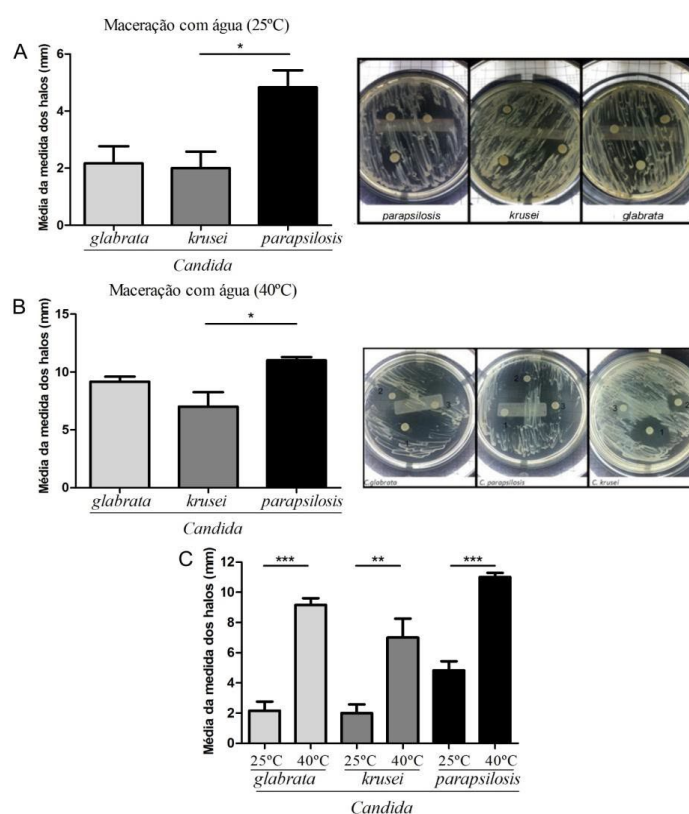


FIGURA 1 - Halos de inibição e comparação de extratos

Análise do crescimento da população de Cândidas in vitro, na presença do extrato de maceração realizado em temperaturas de 25°C e 40°C. Foram pipetados 30 µL do extrato

de 500 mg/ml em um disco de papel filtro. Os discos foram depositados sobre as Cândidas após repique. As placas ficaram em incubadora a 28°C e os halos foram mensurados após 24h de cultura. Os dados expressos nos gráficos são representativos de 3 experimentos ($n \geq 3$). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Com base nos resultados das medidas dos halos de inibição, formulamos um gráfico para demonstrar a eficiência do extrato na redução das populações das cepas das *Cândidas* analisadas. Para isso, os halos obtidos foram convertidos em área pela equação de área da circunferência ($\pi \times R^2$). Em seguida, calculou-se a média de área de inibição em cada espécie e, assim, o valor obtido foi subtraído da área controle equivalente a 30 mm. Os dados estão ilustrados na **Figura 2**.

Mediante a análise gráfica, vemos uma queda significativa do crescimento fúngico nas três espécies testadas, com uma redução de 72% na *C. parapsilosis*; 57% na *C. glabrata* e 47% na *C. krusei*. Assim, mesmo na Cândida mais resistente, o extrato aquoso de alho com 500 mg/ml reduziu pela metade a proliferação da cepa com apenas 30µL pipetados, evidenciando assim, a relevante eficácia do extrato contra estas leveduras do gênero *Cândida*.

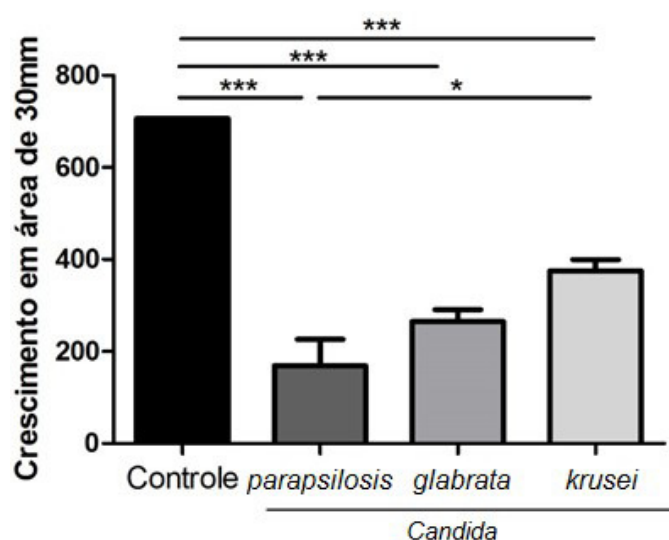


Figura 2: Redução da população de *Cândida* através do extrato

Análise do crescimento da população de Cândia in vitro, na ausência e na presença do extrato. Foram pipetados 30 µL do extrato de 500 mg/ml em um disco de papel filtro. Os discos foram depositados sobre as Cândia após repique. As placas ficaram em incubadora a 28°C e os halos foram mensurados após 24h de cultura. Os dados expressos nos gráficos são representativos de 3 experimentos ($n \geq 3$). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

3.2 Teste microbiológico com as cápsulas

Para averiguarmos se as cápsulas de alginato de sódio e CaCl_2 teriam permeabilidade adequada para passagem do composto aquoso, realizamos um antibiograma, em duplicata por placa, com duas placas para cada microrganismo, analisando no intervalo de 24 horas, a média dos resultados estão apresentados na Figura 3.

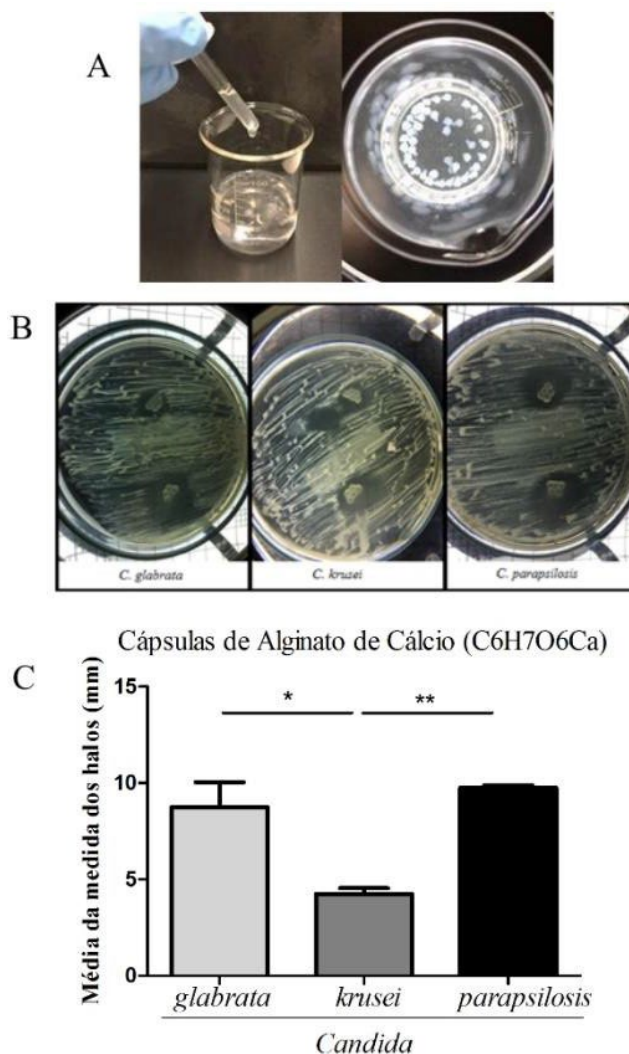


Figura 3: Antibiograma com o extrato encapsulado

Foram adicionadas em cada placa cinco cápsulas unidas, agrupadas de maneira superior e inferior na placa. O teste foi realizado em duplicata para a obtenção de resultados com $n=4$.

A partir dos halos obtidos, nota-se uma queda na inibição das cápsulas de 5% na *C. glabrata*, 40% na *C. krusei* e 11% na *C. parapsilosis*, quando comparadas aos testes realizados somente com extrato. Entretanto, essa baixa é justificada pela não ocorrência da violação das cápsulas, estando elas ainda intactas. É possível que através de uma metodologia capaz de verificar a liberação em caldo nutriente os resultados se aproximem dos obtidos com o extrato direto.

3.3 Teste de toxicidade aguda em *Artemia leach*

Para determinar a toxicidade do extrato aquoso do alho, realizou-se um teste de toxicidade cujo bioindicador foi a *Artemia leach*. Os volumes de água salina e extrato divergiam em cada tubo, assim, foi necessário realizar um cálculo de diluição para determinar as novas

concentrações, como pode ser observado na **Tabela 1**:

Tabela 1 - Diluição do extrato nos tubos.

TUBOS	Água salina (ml)	Extrato (ml)	Concentração (mg/ml)
1	9,5	0,5	25
2	8,5	1,5	75
3	8,0	2,0	100
4	7,5	2,5	125
5	7,0	3,0	150

Utilizando-se os valores obtidos de tempo de declínio na motilidade das artêmias relacionando com as concentrações, foi formulado um gráfico de morte por tubo, sendo o tempo contabilizado em minutos. O tubo 1, de volume equivalente a 0,5 ml de extrato (25 mg/ml) foi descartado dos resultados, uma vez que nenhuma morte foi registrada no período de 24 horas. O gráfico de barra demonstra a influência das concentrações no intervalo de morte das artêmias. Com os resultados, foi possível a verificação do efeito do extrato aquoso de alho de concentração de 500 mg/ml como sanitizante. Ambos os gráficos podem ser observados na **Figura 4**.

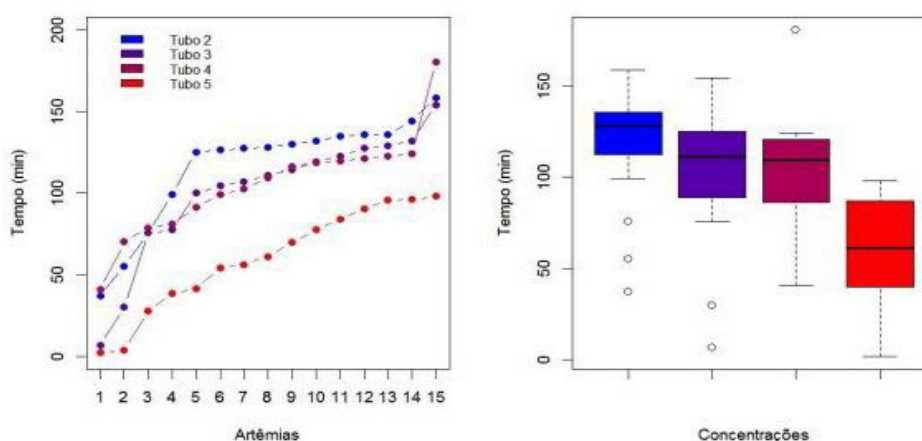


Figura 4: Ensaio de toxicidade

Gráfico de linhas: Esse gráfico mostra as curvas formadas pelos tempos de morte (em minutos) em cada um dos tubos, bem como a eficiência de cada quantidade de alho testada nos diferentes tubos. Os tubos 2, 3, 4 e 5 representam, respectivamente, os volumes de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml de extrato. Fonte: Software Programa R, 2017. *Gráfico de tubos:* É um modelo de gráfico denominado boxplot que expressa os valores mínimos e máximos e a mediana para cada tubo. Os círculos fora das caixas são os outliers (valores extremos, fora da normalidade do restante dos dados). Fonte: Software Programa R, 2017.

Com a análise do boxplot é notório o desvio entre a primeira e a última morte de cada tubo, destacando a média de tempo de morte. Percebemos uma relação direta entre a concentração e a ação sobre a natação das artêmias. A concentração de 150 mg/ml (tubo 5) foi mais eficiente como sanitizante.

4 CONCLUSÃO

O extrato aquoso de *Allium sativum* L., é eficiente como antibiótico natural para as cepas de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

O encapsulamento é uma alternativa viável para aplicação do extrato, também melhorando a aceitação pública pela inibição do odor característico.

O uso como sanitizante ambiental mostrou-se promissor, ainda mais por mostrar ação inibitória em concentrações mais baixas do que para as cepas de cândida.

REFERÊNCIAS

COLOMBO et al. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, 37 Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol** p.570-576, 2007.

Pappas PG, et al. "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America." **Clinical Infectious Diseases**, vol. 62, no. 4, 2016. doi: 10.1093/cid/civ933.

SILVA, Daiana Vieira, et al. “Avaliação da atividade antimicrobiana e anti- inflamatória do extrato Hidroalcólico do *Allium sativum*”. Universidade Tuiuti
Disponível em: <http://www.utp.br/tuiuticienciaecultura/ciclo_4/tcc43_FACBS/pdf/s/art_3.pdf>. Acesso em 21 de abril de 2022.

TORRES, Elizabeth. **Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo***. Pós graduação (Pós graduação em Nutrição em saúde pública) **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/abd/v79n6/a05v79n6.pdf>>. Acesso em 25 de julho de 2022.

Vallabhaneni S., et al. "Epidemiology and Risk Factors for Candidemia: A Nationwide Surveillance Study in the United States From 2008 to 2011." **Clinical Infectious Diseases**, vol. 65, no. 2, 2017. doi: 10.1093/cid/cix311.