



Avaliação antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em leveduras de ambiente hospitalar

Antifungal action of a solution based on the glucoprotamine and the essential oil from *Cymbopogon citratus* on the yeasts from the hospital environment

RIALA6/1780

Carolina Lambrecht GONÇALVES^{1*}, Cristina Hallal de FREITAS¹, Pedro Rassier dos SANTOS¹, Evandro Carlos PEREIRA², Camila LOPES¹, Ivandra SANTI³, Rogério Antônio FREITAG³, Patrícia da Silva NASCENTE¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Micologia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n – Campus Universitário Capão do Leão, RS. Tel: 53 3275 9103. E-mail: carolina_lamg@yahoo.com.br

²Laboratório de Micologia, Universidade Federal de Pelotas

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas

Recebido: 18.02.2019 - Aceito para publicação: 27.10.2019.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de avaliar a atividade antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina (GLU) e de óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus*. *Candida tropicalis*, *Claviceps lusitaniae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* e *Candida parapsilosis* foram isoladas das superfícies de um hospital público de Pelotas, RS. A atividade antifúngica da GLU foi analisada nas concentrações de 0,25% a 0,0005%, e para o OE, obtido por Clevenger, foi utilizado nas concentrações de 17.500 µg/mL a 0,034 µg/mL. A análise cromatográfica foi efetuada por meio de CG/MS. A atividade anti-*Candida* foi analisada pela técnica de Microdiluição em Caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM). A inibição pela GLU ocorreu em todas as concentrações testadas, enquanto o OE apresentou resultado de CIM que oscilou de 2846 a 5450 µg/mL, e CFM de 2853 a 5330 µg/mL. Alfa-citral (37,10%), beta-citral (32,77% e beta-mirceno (18,75%) foram considerados como os compostos majoritários do OE. Os dados obtidos neste trabalho destacam a atividade antifúngica da solução à base de GLU e do OE de *C. citratus* na eliminação dos isolados de *Candida spp* ambientais.

Palavras-chave. *glucoprotamina*, *Candida*, contaminação ambiental, Hospital, óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the antifungal activity of glucoprotamine solution (GLU) and the essential oil from *Cymbopogon citratus* (EO). *Candida tropicalis*, *Claviceps lusitaniae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* and *Candida parapsilosis* were isolated from the samples, which were collected from the surfaces of a public hospital located in Pelotas, RS. The antifungal activity of GLU was detected at the concentrations from 0.25% to 0.0005%, while the EO, by Clevenger, was used at concentrations from 17.500 µg mL to 0.034 µg/mL. Chemical analysis was determined by GC/MS. The anti-*Candida* activity was performed by using Broth Microdilution technique to determine the Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The inhibition by GLU occurred at all of the tested concentrations, whereas the EO showed MIC ranging from 2.846 to 5.450 µ/mL and the CFM from 2.853 to 5.330 µg/mL. Alfa-citral (37.10%), beta-citral (32.77%) and beta-mirceno (18.75%) were the majority compounds in the EO. The data obtained in the present study highlight the effectiveness of the solution based on GLU and EO for eliminating the environmental isolates of *Candida spp*.

Keywords. *glucoprotamine*, *Candida*, environmental contamination, Hospital, essential oil from *Cymbopogon citrates*.

INTRODUÇÃO

O ambiente hospitalar configura-se como uma fonte exógena de infecção por selecionar agentes infecciosos resistentes e reunir indivíduos com diferentes níveis de vulnerabilidade¹, deste modo, as superfícies hospitalares são constantemente contaminadas por bioaerossóis emitidos pelos pacientes internados, os quais podem entrar em contato com indivíduos sensíveis², bem como, serem transferidos às mãos dos profissionais de saúde que realizarão atendimento e procedimentos nos pacientes hospitalizados³.

Dentre as opções utilizadas para a higienização de superfícies hospitalares, soluções a base de glucoprotamina apresentam, na literatura, atividade frente a vírus e bactérias em superfícies médicas e odontológicas^{4,5} e em fungos obtidos de amostras biológicas de origem humana⁶. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária³ (ANVISA), a glucoprotamina possui atividade biocida e apresenta-se como um composto biodegradável com constituintes provenientes do óleo de coco. De forma semelhante, o trabalho de Sá Silva et al⁷ traz o uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como alternativa anti-*Candida*, obtendo resultados satisfatórios frente a isolados oriundos de infecções hospitalares.

Tendo-se em vista os índices de infecções de origem hospitalar, estudos que buscam verificar e aprimorar os métodos utilizados nas instituições de saúde tornam-se de grande relevância em saúde pública¹. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina utilizada rotineiramente na higienização de um hospital público situado no município de Pelotas e do óleo essencial de *C. citratus* como alternativa anti-*Candida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Glucoprotamina (GLU)

O desinfetante, com o princípio ativo glucoprotamina, foi obtido no hospital de estudo já nas condições de uso pelos profissionais da instituição, os quais, utilizam o desinfetante na proporção de 1:100. A atividade antifúngica da solução foi testada em concentrações que variaram de 0,25 a 0,0005%.

Cymbopogon citratus

A espécie vegetal estudada foi adquirida por meio do distribuidor comercial (Luar Sul[®]) com certificação de qualidade e origem. Para a obtenção do óleo essencial (OE) as folhas de *C. citratus* foram submetidas à extração com arraste de vapor através do aparelho Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Brasileira⁸. Após a obtenção, o óleo foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e mantido a -18°C até a utilização. O processo de extração foi realizado no Departamento de Química Orgânica, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel).

Análise Cromatográfica

A análise dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel), por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, em um equipamento GC/MS Shimadzu QP2010, equipado com injetor split/splitless com coluna capilar Rtx-5MS RESTEK, nas seguintes condições cromatográficas: gás carreador Hélio, fragmentos obtidos por impacto de elétrons na energia de 70eV, vazão de 1.27mL/min, fluxo dividido de 1:50 e volume injetado de amostra 1µL. Temperatura programada do forno: a temperatura inicial foi de 40°C, com rampa de aquecimento em 5°C/min até 280°C, estabilizando nessa temperatura por 10 minutos, com tempo de corrida de 58 minutos, com uma temperatura do injetor e de interface 280°C. Os compostos foram analisados com base na biblioteca NIST08 do GC/MS e o óleo diluído em hexano (grau analítico, ultra puro).

Micro-organismos

Foram identificados quatro espécies de leveduras no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital público na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul: *Candida tropicalis* (n=1), *Claviceps lusitaniae* (n=16), *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* (n=18) e *Candida parapsilosis* (n=29). Foram identificadas e caracterizadas geneticamente por sequenciamento do espaçador transcrito interno (ITS) usando os *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT

TAT TGA TAT GC)⁹ por meio de análise do banco de dados NCBI BLASTn.

Atividade antimicrobiana

A atividade antifúngica da glucoprotamina GLU e do OE deteve-se nos isolados ambientais e foram analisadas de acordo com o teste de Microdiluição em Caldo, adaptada aos fitofármacos, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) baseado no documento M27-S4¹⁰. Foram utilizadas dez diferentes concentrações de glucoprotamina, entre 0,25 e 0,0005%, e 17500 e 0,0347 ug/mL do OE, em meio *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI-1640, com inóculo preparado em concentração equivalente à 10⁶ufc/mL. As placas foram incubadas a 36°C em estufa por 24 a 48 horas. O teste foi realizado em duplicata.

A CIM foi determinada por comparação visual do crescimento do micro-organismo ocorrido nos poços referentes às concentrações utilizadas com o seu crescimento no poço-controle positivo, sendo considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo. A CFM foi determinada a partir da transferência de 5µl de cada poço negativo em Ágar Sabouraud dextrose. Para tal, as placas foram incubadas a 36°C por 48 horas, sendo a CFM definida como a menor concentração onde não foi observado crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução à base de glucoprotamina apresentou atividade antifúngica a todas as concentrações testadas, enquanto que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade antifúngica em CIM que oscilou de 2846 ug/mL, para *C. parapsilosis*, a 5450 ug/mL, para *C. tropicalis*. As mesmas espécies também apresentaram as maiores variações quanto a CFM a qual foi de 2853 ug/mL, em *C. parapsilosis*, a 5330 ug/mL em *C. tropicalis* (**Tabela**).

Com relação aos componentes químicos do OE obteve-se como resultados, o alfa-citral (37,10%), beta-citral (32,77%), e beta-mirceno (18,75%) como os compostos majoritários do OE (**Figura**).

A glucoprotamina é um desinfetante de uso hospitalar recomendado pela ANVISA³ por

apresentar atividade antimicrobiana ao promover a destruição da parede e membrana celular de micro-organismos. Por não apresentar volatilidade, ser facilmente dissolvida em água, não apresentar características teratogênicas e mutagênicas, é indicada na desinfecção de superfícies fixas hospitalares. Widmer e Frei¹¹ constataram efetividade antimicrobiana da glucoprotamina na concentração de 1,5% ao descontaminarem dispositivos médicos. Em superfícies de consultórios odontológicos, a solução a base deste composto, apresentou 100% de eficácia na eliminação microbiana⁵. Segundo Zeiter e Rapp⁴, a ação desinfetante da glucoprotamina está associada ao tempo de exposição do produto na superfície a ser higienizada, nas concentrações de 0,25% e 5%.

Sabe-se da necessidade de uma adequada descontaminação das superfícies hospitalares, as quais são constantemente contaminadas por bioaerossóis emitidos pelos pacientes internados. Os fluidos corporais contendo micro-organismos podem ser gerados durante a tosse, espirro, fala, aspiração e broncoscopia, os quais são impulsionados a uma curta distância antes de se fixarem rapidamente em uma superfície, podendo causar complicações ao serem depositadas diretamente na superfície da mucosa de uma pessoa sensível ou em superfícies próximas, que podem ser tocadas por uma pessoa sensível², bem como, os micro-organismos pode ser transferidos às mãos dos profissionais de saúde que realizarão atendimento e procedimentos nos indivíduos hospitalizados quando não equipados corretamente.

Os óleos essenciais são considerados fontes promissoras de compostos bioativos, os quais, muitas vezes, apresentam propriedades terapêuticas, dentre estas, atividade antimicrobiana¹². O óleo essencial de *C. citratus*, tem sido avaliado como antifúngico e desinfetante em estudos, com inibição de *C. albicans* na concentração de 1 µg/mL¹³, concentração inferior ao observado no presente estudo. De acordo com os resultados obtidos por Mathew et al¹⁴, o uso de óleo de *C. citratus* é uma alternativa natural segura aos antimicrobianos químicos, sendo considerado eficaz no controle de micro-organismos patogênicos podendo ser utilizado de forma não diluída para desinfecção de áreas altamente contaminadas, enquanto que as diluições de 1:2 ou 1:4 são suficientes em áreas de baixa densidade de patógenos, concentrações que se enquadram em nossos resultados obtidos com o OE de *C. citratus*.

Tabela. Médias da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da Glucoprotamina

Micro-organismos	Número de Amostras	Óleo Essencial Médias: CIM / CFM (ug/mL)	Glucoprotamina (%) CIM / CFM
<i>C. parapsilosis</i>	29	2846 / 2853	<0.0005 / <0.0005
<i>C. tropicalis</i>	1	5450 / 5330	<0.0005 / <0.0005
<i>M.guilliermondii</i>	18	2868 / 4238	<0.0005 / <0.0005
<i>C. lusitaniae</i>	16	2978 / 3451	<0.0005 / <0.0005

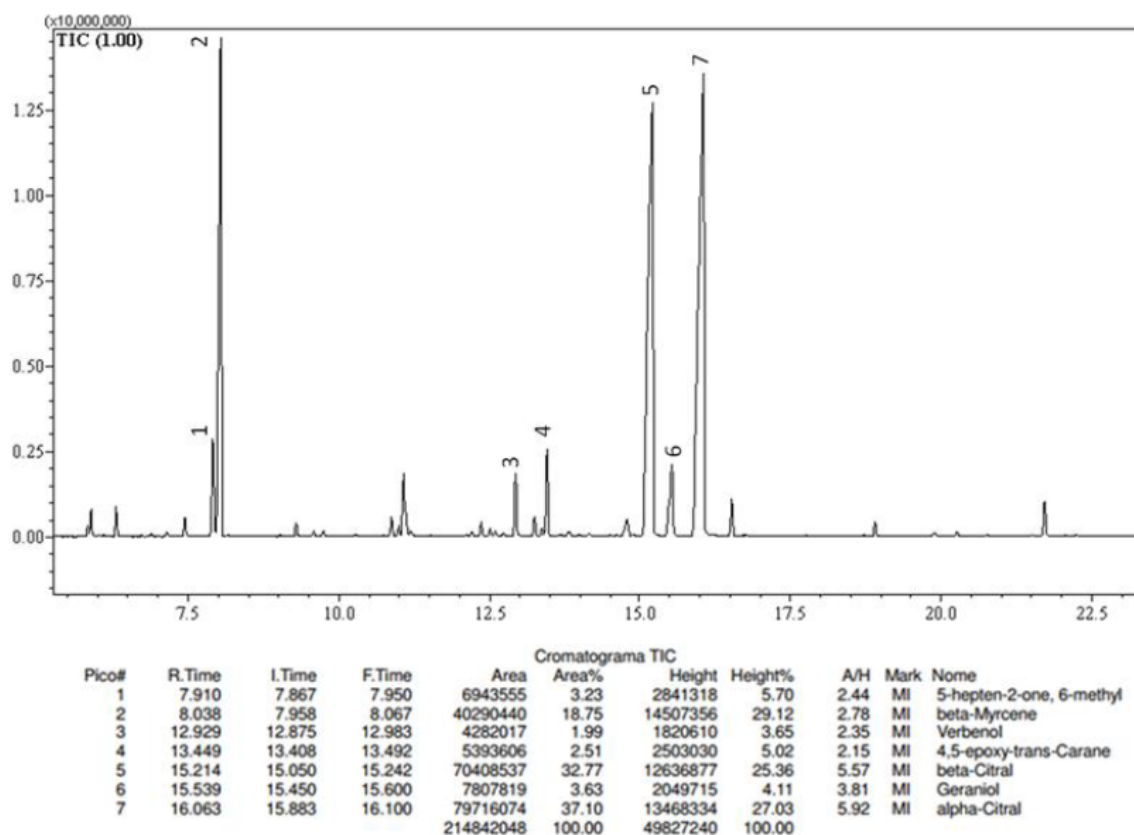


Figura. Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* obtidos por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de Massa

O óleo essencial *C. citratus* é constituído por alfa e beta-citral, o citral é considerado por diversos autores como o constituinte majoritário desse óleo essencial¹⁵⁻¹⁷, estando as propriedades antimicrobianas desta espécie vegetal relacionadas com a presença deste composto. A literatura demonstra que o percentual do citral é variável, podendo ser encontrados dados que oscilam entre 40.05% e 80%^{17,16}. Em nosso estudo, o α -citral,

compreendeu 37,10% da totalidade do óleo essencial, percentual que se enquadra nos valores observados nos demais estudos^{17,16}.

Espécies de *Candida* estão entre os patógenos mais notificados dentre os agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados¹⁸, assim, estudos que busquem otimizar a higienização e a promoção de novos produtos com atividade antifúngica, tornam-se

imprescindíveis no controle da contaminação microbiana na tentativa de reduzir as taxas de infecção exógena por *Candida* spp.

A inserção de novos compostos antimicrobianos que se enquadrem como desinfetantes para uso hospitalar é complexa, pois, deve contemplar uma série de requisitos de modo a não comprometer a segurança dos pacientes e profissionais da saúde³. Assim, a proposta de estabelecer o OE de *C. citratus* como antifúngico deve-se as suas características de ser um produto natural, de fácil acesso e utilização.

CONCLUSÃO

O composto à base de glucoprotamina utilizado no hospital de estudo apresenta atividade anti-*Candida* nas concentrações testadas, do mesmo modo que o óleo essencial de *C. citratus*, que apresentou como compostos majoritários o alfa-citral, beta-citral e beta-mirceno, podendo ser utilizado na descontaminação de leveduras de superfícies hospitalares.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio. Baseada na tese da autora, Carolina Lambrecht Gonçalves, apresentada no ano de 2019 ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

REFERÊNCIAS

1. Nogueira PSF, Moura ERF, Costa MMF, Monteiro WMS, Brondi L. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. *Rev enferm UERJ*. 2009;17(1):96-101. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0104-3552/2009/v17n1/a017.pdf>
2. Collins AS. Preventing health care-associated infections. In: Hughes RG, editor. *Patient safety and quality: An evidence-based handbook for nurses*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008 Apr. Chapter 41.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies; 2012.120p.
4. Zeitler B, Rapp I. Surface-dried viruses can resist glucoprotamin-ased disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(23):7169-75. <https://doi.org/10.1128/AEM.02462-14>
5. Genz TB, Callai T, Schlesener VRF, Oliveira CF, Renner JDP. Eficácia antibacteriana de algentes de limpeza na desinfecção de superfícies de consultórios odontológicos. *RFO UPF (Online)*. 2017;22(2):162-6. <https://doi.org/10.5335/rfo.v22i2.6781>
6. Tyski S, Grzybowski W, Grzeszczuk S, Leszczynski P, Staniszewska M, Röhm-Rodowald E et al. Antimicrobial activity of Glucoprotamin-containing disinfectants. *Pol J Microbiol*. 2009; 58 (4): 347-53.
7. Sá Silva F, Ferreira TM, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Junior M et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68:434-41. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68_3_completa/1241.pdf
8. Brasil. Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5.ed. Brasília (DF): Anvisa; 2010. 546 p.
9. Irinyi L, Lackner M, De Hoog S, Meyer W. DNA barcoding of fungica using infections in humans and animals. *Fungal Biol*. 2016;125(2):125-36. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.007>
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
11. Widmer AE, Frei R. Antimicrobial activity of glucoprotamina: a clinical study of a new disinfectant for instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24(10):762-4. <https://doi.org/10.1086/502128>
12. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova*. 1998;21(1):99-105. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>

13. Singh BR, Singh V, Singh RK, Ebibeni N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *Int Res J Pharm Pharmacol*. 2011;1(9):228-36. Disponível em: <https://www.interesjournals.org/articles/antimicrobial-activity-of-lemongrass-cymbopogon-citratus-oil-against-microbes-of-environmental-clinical-and-food-origin.pdf>
14. Mathew TK, Aswathy PG, Surya NK, Honey M, Kuriakose J. Study on disinfectant potential of lemon grass oil against common pathogens. *Int J Adv Res*. 2016;4(7): 675-9. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/926>
15. Tyagi AK, Malik SA. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:65. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-65>
16. Khan MSA, Ahmad I. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon* species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*. 2011; 19 (1):48–55. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.07.005>
17. Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24(6):660-7. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Boletim Informativo. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14; 2015.