

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO DIMETILSULFÓXIDO NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Candida* spp.

Monique Vargas de Gouvêa¹, Nicolly Soares Ferreira¹, Myleny Goularte
Moreira², Talita de Jesus Catten Moreno², Carlos Eduardo de Souza Duarte²,
Mariana Drummond Costa Ignacchiti², Juliana Alves Resende¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCA), Av.
Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 – Alegre – ES, Brasil,
monique.gouvea@edu.ufes.br, ni.colly_ferreira@hotmail.com, juliana.resende@ufes.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Av.
Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 – Alegre – ES, Brasil,
mylenygoulartemoreira@outlook.com, morenotalitajesus@gmail.com, caduarte2018@hotmail.com,
mariana.ignacchiti@ufes.br.

Resumo

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente e um dos principais agentes etiológicos causadores são as leveduras do gênero *Candida* spp. Na microbiologia, o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) é muito utilizado devido à sua característica anfipática. O DMSO tem uma capacidade maior do que a da água de dissolver certos antibióticos ou futuros candidatos a antimicrobianos, além de potencializar a ação destes. Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do DMSO sobre o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Foram realizados testes para verificar o impacto do DMSO nas concentrações de 2,5%, 5%, 10%, 15% e 25% sobre o crescimento das leveduras. Concentrações de 15% e 25% promoveram uma inibição do crescimento, mantendo-se na linha de base. O DMSO a 10% promoveu uma diminuição do crescimento e prolongamento da fase lag e concentrações menores que 5% não interferiram na viabilidade celular. O presente estudo demonstra que o DMSO em baixas concentrações (< 5%) pode ser usado como solvente no preparo de suspensões para cultivo e ensaio biológico de *Candida* spp.

Palavras-chave: DMSO. Viabilidade celular. *Candida*.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

Introdução

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente e um dos principais agentes etiológicos causadores dessas infecções são as leveduras do gênero *Candida* spp. A *Candida* é uma levedura comensal que habita diversas partes do nosso organismo como o trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal. É uma levedura considerada oportunista, podendo causar patologias no hospedeiro em situações de desequilíbrio do sistema imunológico (LEÓN-GARCÍA *et al.* 2017). Este fungo causa a candidíase uma doença infecciosa que tem se destacado no contexto mundial (CORDEIRO; MATOS; MAYNARD, 2022). Este tipo de infecção pode se apresentar superficial, forma mais comum, além da forma invasiva, que juntamente com a candidemia (infecção sistêmica) detêm elevadas taxas de mortalidade variando entre 36% a 63% (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022; VASILEIOU *et al.*, 2018).

A terapêutica antifúngica enfrenta um grande desafio frente ao crescente relato de resistência aos antifúngicos e o reduzido número de antifúngicos disponíveis comercialmente, fatores que impulsionam a busca por novos agentes antifúngicos (ABRANTES, 2013; SILVA *et al.*, 2021). Na microbiologia o DMSO é bastante utilizado como solvente em ensaios para avaliação de novos fármacos com atividade antimicrobiana. Industrialmente, o DMSO é obtido através de várias etapas de síntese química e a partir de várias fontes, sendo o lignossulfonato (subproduto da fabricação de papel a partir de madeira) a principal fonte industrial (CARDOSO, 2011).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

O DMSO é um composto orgânico que possui caráter anfipático, apresentando uma capacidade maior do que a da água de dissolver certos compostos ou futuros candidatos a antimicrobianos, além de potencializar a ação destes. Esta característica possibilita ao DMSO uma facilidade para carrear compostos através de membranas biológicas, fazendo com que o composto com atividade biológica alcance mais facilmente seu alvo. Além de sua propriedade solvente, o DMSO também é utilizado como crioprotetor em suspensões bacterianas e de esporos de fungos, usado também no preparo de soluções de drogas em ensaios de controle de fungos patogênicos (LEÓN-GARCÍA *et al.*, 2017).

Devido a sua propriedade de facilitar a penetração transmembranar e de carrear compostos, o DMSO pode apresentar um efeito sinérgico com as drogas testadas contra fungos, quando utilizado em baixas concentrações, bem como um efeito inibitório de crescimento microbiano quando utilizado em concentração superior a 10%, devido sua toxicidade (RANDHAWA, 2008). Ainda como um solvente, o DMSO também pode ser utilizado na solubilização de óleos essenciais e extratos vegetais em ensaios de atividade antimicrobiana de produtos naturais (PAPICH, 2016).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do DMSO sobre o crescimento da *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, determinando a faixa de concentração de DMSO que exerce um efeito mínimo de inibição sobre o crescimento das leveduras, além de identificar concentrações que causam um impacto adverso no crescimento celular.

Metodologia

Foram utilizadas quatro linhagens controles: *C. albicans* (ATCC 24433), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 20298) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Todas as linhagens foram reativadas em caldo Sabouraud-Dextrose (CSD) a 35±2°C, no intervalo de 24 a 48 horas, em seguida foram transferidas para ágar Sabouraud-dextrose (ASD) e incubadas novamente a 35±2°C por 24 horas. As linhagens foram rotineiramente cultivadas em Chromagar para garantir a pureza das mesmas.

Para avaliar a interferência do DMSO no crescimento fúngico foi determinada a curva de crescimento para cada uma das linhagens avaliadas. Primeiramente, foi realizado o preparo do pré-inóculo. O pré-inóculo foi preparado a partir de colônias isoladas de ASD. Esta etapa foi necessária para obtenção de biomassa significativa para dar início ao experimento. Foi realizado um cultivo *overnight* em CSD a 30°C por 16 horas com ciclo de agitação de 150 RPM em agitador orbital.

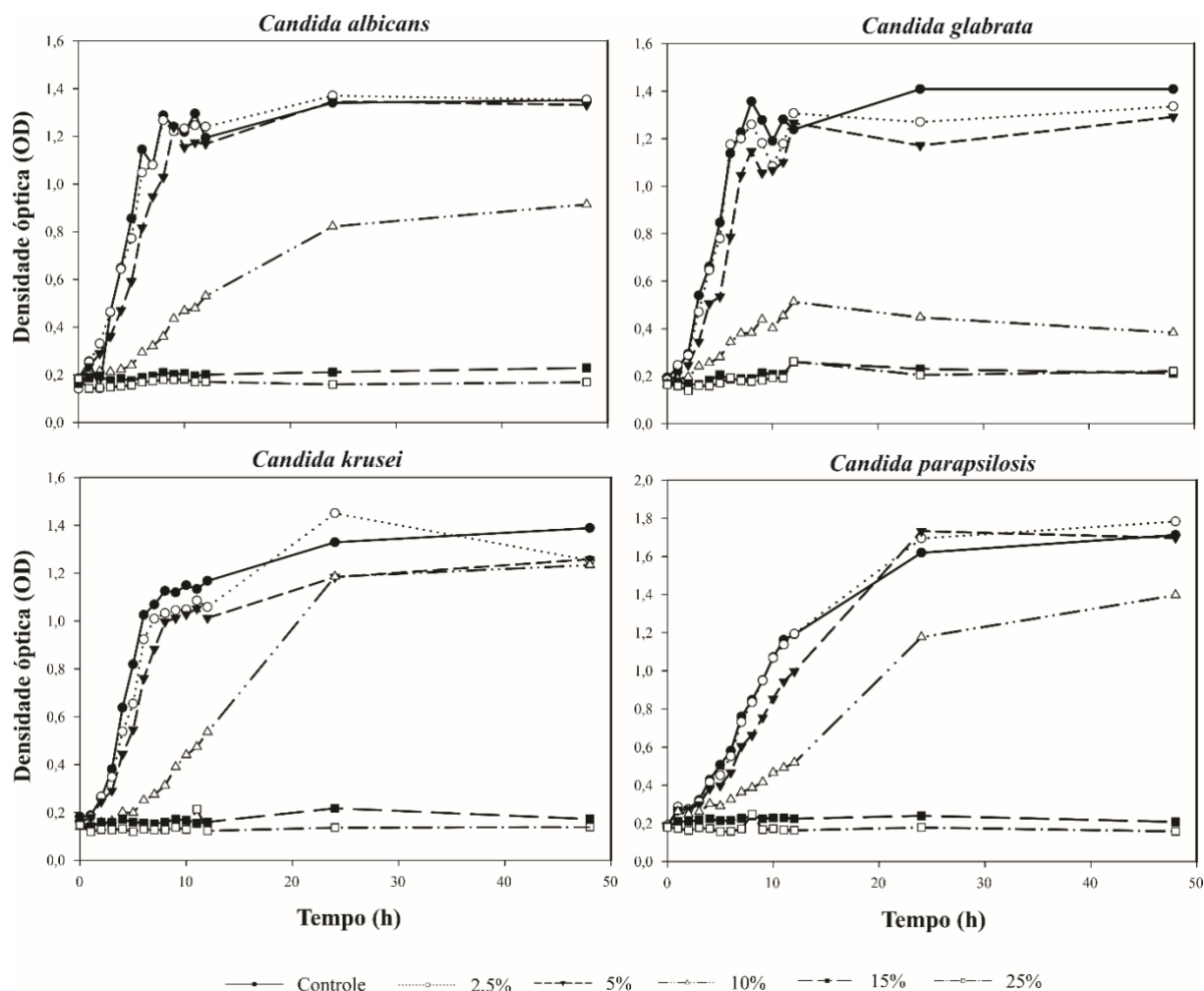
Antes de iniciar o ensaio, foi avaliada a densidade óptica (DO) do pré-inóculo. Para isso, 200 µL da cultura foram retirados de forma asséptica, as leituras de DO_{600 nm} foram realizadas em uma microplaca de poliestireno e a concentração da cultura foi ajustada para 0,1 (Tempo 0). Um volume do pré-inóculo foi transferido assepticamente para novo Erlenmeyer contendo 150 mL de CSD e em seguida, foram realizadas a incubação a 30°C em agitador orbital com ciclo de agitação de 150 RPM totalizando 48 horas de cultivo. Em intervalos de tempo estabelecido foram realizadas as leituras de DO_{600 nm} a cada hora até completar 12 horas iniciais, e posteriormente, a cada 12 horas. As leituras foram realizadas até a fase estacionária ser alcançada, em intervalos de tempo específicos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T24 e T48).

Resultados

Foi verificado que na concentração de 10% de DMSO houve diminuição significativa no crescimento e um prolongamento da fase lag para todas as *Candida* spp. Nas concentrações de 15% e 25% de DMSO houve completa inibição do crescimento de todas as espécies avaliadas. É possível observar que o DMSO nas concentrações de 2,5% e de 5% não interferiu no padrão de crescimento das linhagens analisadas (Figura 1).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - Curva de crescimento de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* em caldo Sabouroud-dextrose com diferentes concentrações de DMSO.



Fonte: O autor (2023).

Discussão

O DMSO é um composto considerado simples e adequado para solubilizar agentes terapêuticos, bem como compostos que não são solúveis em água pura. Além disso, o DMSO apresenta características consideradas particularmente importantes como penetração rápida e, consequentemente, facilita a penetração de substâncias nas membranas biológicas, atuando assim como carreador; eliminação de radicais livres e efeitos na coagulação (LEÓN-GARCÍA *et al.*, 2017). Estudos tem demonstrado que o DMSO pode influenciar o desenvolvimento da cultura de *Candida* spp., promovendo a inibição do seu crescimento e viabilidade celular (BASCH; GADEBUSCH, 1968). No presente estudo foi constatado que o DMSO na concentração de 10% provoca diminuição significativa no crescimento e um prolongamento da fase lag; nas concentrações de 15% e 25% o DMSO promoveu a total inibição do crescimento de todas as espécies. De acordo com Farias *et al.* (2018), esses efeitos podem ser atribuídos às propriedades do DMSO como um solvente orgânico polar e suas características físico-químicas únicas. O DMSO em altas concentrações pode ter efeitos tóxicos sobre as leveduras, podendo afetar a viabilidade celular e inibir o crescimento, prejudicando a reprodução. A capacidade do DMSO em atravessar as membranas celulares, pode resultar em

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

alterações na estrutura e função dessas membranas, interferindo nos processos celulares essenciais e afetando negativamente o crescimento das leveduras. As altas concentrações de DMSO podem alterar o equilíbrio osmótico das células, levando a variações nos gradientes de concentração dentro e fora das células, podendo resultar em estresse osmótico para as leveduras, prejudicando seu crescimento. O DMSO também pode interferir nos processos metabólicos celulares, afetando a produção de energia e outros processos bioquímicos, ocasionando uma diminuição no crescimento das leveduras.

O DMSO em concentração superior a 1% não interferiu na viabilidade celular de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, entretanto este solvente afeta a expressão de proteínas da parede celular, bem como a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo; afetando indiretamente a capacidade de crescimento e desenvolvimento das *Candida* spp. (LEÓN-GARCÍA *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que para *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) e *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positiva), concentrações de DMSO menores que 10% foram capazes de interferir no crescimento bacteriano. Portanto, mesmo em concentrações baixas, o DMSO pode por si só potencializar a ação antibacteriana. No teste realizado, os autores demonstraram que na concentração de 10% não houve inibição total do crescimento, somente uma diminuição significativa na taxa de crescimento das espécies avaliadas (BRITO *et al.*, 2017).

Apesar da toxicidade sistêmica do DMSO ser considerada baixa, as combinações de DMSO com outros agentes tóxicos provavelmente constituem seu maior potencial tóxico. Além de ser um solvente importante, o DMSO também apresenta propriedades terapêuticas e é amplamente utilizado para tratar injúrias, desde manifestações cutâneas a infecções como as do trato urinário (MARTINS; VEIGA, 2002).

A avaliação do impacto do DMSO no crescimento das leveduras é importante para garantir que os efeitos observados sejam devidos ao composto em estudo e não ao próprio solvente, garantindo a precisão e a confiabilidade dos resultados de pesquisas científicas, bem como para garantir o sucesso de aplicações industriais e biotecnológicas envolvendo leveduras.

Conclusão

O DMSO na concentração de 10% demonstrou ter impacto na curva de crescimento das leveduras, ocasionando diminuição do crescimento e um prolongamento da fase lag de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Adicionalmente, concentrações maiores que 10% (15 e 25%) promoveram a inibição total do crescimento de todas as espécies avaliadas. Assim, o presente estudo demonstra que o uso de DMSO em concentrações menores que 5%, apresenta efeito insignificante sobre o crescimento de leveduras, podendo ser usado como solvente no preparo de suspensões para cultivo e ensaio biológico de *Candida* spp.

Referências

ABRANTES, M.R.D. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre *Candida* não *albicans* de origem clínica**. Tese (Doutorado – Área Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, NR, 2013. 116f.

BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 718, 2022.

BASCH H., GADEBUSCH, H. H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1953, 1968.

BRITO, R. C. *et al.* Standardization of the safety level of the use of DMSO in viability assays in bacterial cells. **MOL2NET**, 2017. Disponível em: <<https://sciforum.net/manuscripts/4980/slides.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CARDOSO, M. F. C. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p.1594-1601, 2011.

CORDEIRO, E. da S.; MATOS, L. S. C. de; MAYNARD, D. da C. Candidiasis: dietotherapy and the use of strains as adjuvants in treatment. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e24211931786, 2022.

FARIAS, C. de S. *et al.* Potencial antimicrobiano do dimetilsulfóxido (DMSO) frente a diversas cepas bacterianas. **Anais III CONBRACIS**. Campina Grande: Realize Editora, 2018.

LEÓN-GARCÍA, M. C. *et al.* Evaluation of cell wall damage by dimethyl sulfoxide in *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 168, n.8, 2017.

MARTINS, M. R. F. M., VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.

PAPICH, M. G. Dimethyl Sulfoxide (DMSO). **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, 4ª edição, 2016, p. 250-251.

RADHAWA, A. M. Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 49, n. 2, 2008.

SILVA, G. C. F. *et al.* Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de Morinda citrifolia -Noni e do óleo de Melaleuca em *Candida albicans*. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, v. 16, n. 45, p. 147–155, 2021.

VASILEIOU, E. *et al.* Invasive candidiasis and candidemia in pediatric and neonatal patients: A review of current guidelines. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 3, p. 28–33, 2018.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).