



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016017456-2 A2

(22) Data do Depósito: 27/07/2016

(43) Data da Publicação: 27/02/2018



* B R 1 0 2 0 1 6 0 1 7 4 5 6 A

(54) Título: EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE LIMONENO E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO AGENTE ANTIFÚNGICO FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES

(51) Int. Cl.: A61K 36/752; A61K 129/00; A61P 31/10; B01D 3/14

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE, ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR E TÉCNICO - ASCES

(72) Inventor(es): HENRIQUE JOHN PEREIRA NEVES; MELYNIA CHAVES LEITE; REJANE PEREIRA NEVES; REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO; DELSON LARANJEIRA; LETÍCIA DE MELO FERREIRA DA SILVA; EMÍLIA JULIANA FERREIRA DA SILVA; DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO; ANA MARIA RABELO DE CARVALHO PARAHYM; HUMBERTO GONÇALVES BERTÃO; FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS; CAROLINA MARIA DA SILVA; MICHELLANGELO NUNES DA SILVA; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO

(57) Resumo: EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE LIMONENO E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO AGENTE ANTIFÚNGICO FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES A presente patente aborda um método de extração otimizada do limoneno a partir de casca de laranja e sua posterior aplicação como antifúngico frente células planctônicas e biofilmes de leveduras clínicas emergentes. A extração de base cítrica foi obtida por vapor de arraste através de destilação fracionada. A determinação in vitro da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato contra linhagens emergentes do gênero Candida (Candida guilliermondii, C. haemulonii, C. lusitaniae, C. pelliculosa, C. famata e C. ciferri) foi realizada com base no método de microdiluição em caldo seguindo o Clinical Laboratory Standard Institute-CL51. O rendimento da extração foi de 1-2 mL a cada 50-60g de casca. O limoneno apresentou valores de CIM de 4- 16µg.ml-lfrente células planctônicas e biofilme. Os resultados foram superiores aos antifúngicos de referência anfotericina B e fluconazol que apresentaram concentrações inibitórias maiores (>1b µg.ml-1). Estes resultados permitem vislumbrar a possibilidade de uma extraç(...)

RELATÓRIO DESCRITIVO

EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE LIMONENO E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO AGENTE ANTIFÚNGICO FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES

1. A presente patente aborda a extração otimizada de limoneno e sua aplicação como agente antifúngico.

2. Esta patente objetiva evidenciar que a extração de limoneno de base cítrica, obtida a partir de cascas de laranja, por vapor de arraste através de destilação fracionada apresenta rendimento maior em relação ao método de extração convencional utilizando destilador de Clevenger.

3. A matéria-prima é posta sobre vidro de relógio e 250 g são pesadas em uma balança para posterior tituração com 500 mL de água destilada em liquidificador. O mosto é inserido em um balão de fundo redondo de 500 mL e será aquecido com manta regulada à temperatura de 150 °C, que ao atingir a temperatura de 90 °C, entrará em ebulição e permitirá evaporação da água e arrastará as moléculas do D-Limoneno, passando pelo primeiro condensador, resfriado à ar, cuja função é condensar parte do vapor de água e em seguida passando pelo segundo condensador, resfriado com água, cuja função é condensar o D-Limoneno e outra parte do vapor de água. A fase condensada será composta de água e óleo, os quais serão separados por um suporte universal e decantador devido a diferença de densidade. Para produzir 10mL de óleo D-Limoneno, utiliza-se 500g de casca de laranja.

4. Todos os procedimentos de extração evidenciaram uma obtenção em funil de separação de 1-2 mL de Limoneno a partir de 50-60g de cascas de laranja triturada, após destilação fracionada em duas colunas de separação, sendo a primeira coluna promovendo condensação a ar e a segunda a água.

5. Esta patente objetiva ainda avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de limoneno extraído a fim de comparar a sua eficiência em relação a anfotericina B e fluconazol, determinando a concentração inibitória mínima (CIM), contra espécies de leveduras clínicas emergentes do gênero *Candida*.

6. Estudos demonstraram que o método de extração obteve excelente rendimento e que o limoneno extraído apresentou atividade fungicida contra isolados clínicos de *Candida*, exibindo melhor perfil antifúngico contra células planctônicas que biofilmes.

7. O potencial antifúngico de Limoneno foi avaliado frente a isolados clínicos de *Candida* pertencente as espécies de *Candida guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, *C. famata* e *C. ciferri* obtidos de pacientes com candidemia e o padrão de referência *C. albicans* ATCC 90028.

8. As amostras clínicas foram processadas para diagnóstico micológico usando métodos padrão (exame direto e isolamento em cultura), no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. O exame direto foi realizado sem adicionar coloração ou clareamento de amostras de sangue. As culturas foram preparadas utilizando Sabouraud Dextrose Agar - SDA (Difco) suplementado com cloranfenicol (50 mg.mL^{-1}) e incubadas a 25 e 37°C numa atmosfera aeróbica, por até 15 dias. Culturas puras foram transferidas para a superfície de SDA para identificação por meio de taxonomia clássica, automação e espectrometria de massa MALDI-TOF MS. As culturas foram preservadas em óleo mineral (Sherf, 1943) e mantidas na Coleção de Culturas Micoteca URM (reconhecida internacionalmente e registrada na Word World Directory of Collections of Culture of Microorganisms (WFCC) sob o Nº 604.

9. Placas de microdiluição com 96 poços, contendo diluições seriadas do Limoneno foram preparadas com base no protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Foram utilizadas concentrações de $0,03\text{-}16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dissolvidos em $0,8\text{-}1,2 \text{ mL}$ de dimetilsulfóxido (DMSO), e diluídos em $8,0\text{-}10 \text{ mL}$ de meio de cultura padrão RPMI 1640, tamponado a pH $6,0\text{-}8,0$ com $0,16\text{-}0,17\text{M}$ de ácido morfolinopropanosulfônico. Foram usadas como drogas de referência anfotericina B e fluconazol nas concentrações de $0,02\text{-}0,04$ a $15\text{-}17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,012\text{-}0,013$ a $63\text{-}65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

10. A fim de se obter um inóculo de levedura contendo $1,0$ a $5,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$, cada estirpe foi cultivado em um tubo contendo $15\text{-}25 \text{ mL}$ de Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco) adicionado de de $3\text{-}5\%$ extrato de levedura, a $30\text{-}40^{\circ}\text{C}$ durante dois dias. As suspensões de leveduras foram preparadas em solução fisiológica estéril ($0,80\text{-}0,90\%$), mantidas a $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$, e, em seguida, ajustadas para $88\text{-}92\%$ de transmitância em

espectrofotometro ajustado a 528-532 nm. Duas diluições em série entre 1:100-1:20 foram feitas para se obter um inóculo final contendo 1,0 a $5,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

11. Para os testes de sensibilidade, foram adicionados 100 µL do Limoneno aos poços da primeira coluna da placa de microdiluição, e em seguida, foram realizadas 10 diluições seriadas em poços de microdiluição contendo 80-120 µL de meio padrão RPMI 1640 tamponado a pH 6,0-8,0 com 0,16-0,17 M de MOPS. Em seguida, os poços foram inoculadas com 80-120 µL do inóculo previamente obtido. As microplacas foram incubadas a 34-36°C em uma incubadora livre de CO₂. Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados visualmente após 24-72 horas de incubação para isolados de *Candida* e através de leitor de ELISA. As CIMs corresponderam à menor diluição que mostrou inibição de crescimento em comparação com leveduras não tratadas. Todos os testes foram realizados em duplicata e valores de CIM foram expressos como média aritmética.

12. Para cada experiência *in vitro*, os controles de inóculo mostraram crescimento claramente detectável após o período de incubação, indicando que todos os isolados eram viáveis e que as condições utilizadas foram adequados para o crescimento dos fungos. A CIM da estirpe de referência foi 0,4-0,6 µg.mL⁻¹ para anfotericina B e fluconazol, confirmando a reprodutibilidade do ensaio.

13. As Tabelas 1 e 2 mostram os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da avaliação antifúngica *in vitro* de Limoneno comparado com anfotericina B e fluconazol contra células planctônicas e biofilmes, respectivamente, de isolados clínicos de *Candida haemulonii*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa* e *C. ciferri*, incluindo a estirpe de referência *C. albicans* ATCC 90028.

14. O Limoneno foi capaz de inibir o crescimento de células planctônicas de *Candida haemulonii*, *C. famata*, *C. pelliculosa* e *C. ciferri* entre os seis isolados clínicos de *Candida* avaliados apresentando valores de CIM variando entre 4,0-16,0 µg.mL⁻¹. A cepa de *Candida haemulonii* apresentou valores de CIM para o Limoneno menor que os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.

15. O Limoneno foi capaz de inibir a formação do biofilme da cepa de *Candida haemulonii*, apresentando valores de CIM variando de 8,0 µg.mL⁻¹, o qual foi menor que

os antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Vale ressaltar que *Candida haemulonii* tem se mostrado *in vitro* e clinicamente bastante resistente, sobretudo a anfotericina B.

16. Este estudo confirmou o potencial de Limoneno como agente antifúngico.

17. O Limoneno apresentou solubilidade aquosa, o que permitiu a necessidade de uma menor quantidade de droga para assegurar a atividade antifúngica, que certamente minimiza a possibilidade de ocorrência de efeitos secundários quando forem executados os estudos *in vivo*.

18. Esses resultados associados a significativa na atividade anti-*Candida* tanto em células planctônicas e biofilme, expressados em valores de CIM inferiores aos medicamentos de referência anfotericina B e fluconazol (pelo menos duas vezes mais ativo), leva-nos a crer que, após a realização de estudos para garantir a eficácia, o modo de ação ao nível molecular e a segurança, que Limoneno possa ser utilizado na medicina clínica como um tratamento alternativo contra candidíase, principalmente invasiva e disseminada.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade antifúngica de células planctônicas de leveduras emergentes frente aos antifúngicos comerciais e limoneno como nova proposta terapêutica.

Isolados Clínicos	Anfotericina B (16 – 0,03µg/mL)	Fluconazol (64 – 0,125µg/mL)	Limoneno (16 – 0,03µg/mL)
<i>Candida guilliermondii</i> MM* 0129	8 µg/mL	16µg/mL	R††
<i>C. haemulonii</i> MM 0347	8µg/mL	8µg/mL	4µg/mL
<i>C. lusitaniae</i> URM** 1812	4µg/mL	2µg/mL	R
<i>C. pelliculosa</i> URM 6346	0,125µg/mL	4µg/mL	4µg/mL
<i>C. famata</i> MM 0005	0,5µg/mL	0,125µg/mL	16µg/mL
<i>C. ciferri</i> MM 0002	4µg/mL	2µg/mL	16µg/mL
<i>C. albicans</i> ATCC† 90028	0,5µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL

* URM - Coleção de Cultura URM

** MM - Laboratório de Micologia Médica/UFPE

† ATCC - American Typical Culture Collection

†† R - apresentou crescimento na mais alta concentração testada

Tabela 2. Perfil de sensibilidade antifúngica de biofilmes formados por isolados de leveduras emergentes frente aos antifúngicos comerciais e limoneno como nova proposta terapêutica.

Isolados Clínicos	Anfotericina B (16 – 0,03µg/mL)	Fluconazol (64 – 0,125µg/mL)	Limoneno (16 – 0,03µg/mL)
<i>Candida guilliermondii</i> MM* 0129	> 16µg/mL	32µg/mL	R††
<i>C. haemulonii</i> MM 0347	> 16µg/mL	16µg/mL	8µg/mL
<i>C. lusitaniae</i> URM** 1812	8µg/mL	4µg/mL	R
<i>C. pelliculosa</i> URM 6346	4µg/mL	4µg/mL	R
<i>C. famata</i> MM 0005	8µg/mL	4µg/mL	R
<i>C. ciferri</i> MM 0002	> 16µg/mL	R	R
<i>C. albicans</i> ATCC† 90028	4µg/mL	R	R

* URM - Coleção de Cultura URM

** MM - Laboratório de Micologia Médica/UFPE

† ATCC - American Typical Culture Collection

†† R - apresentou crescimento na mais alta concentração testada

REIVINDICAÇÕES

1. **EXTRAÇÃO DO LIMONENO DE BASE CÍTRICA A PARTIR DE CASCAS DE LARANJA POR VAPOR DE ARRASTE ATRAVÉS DE DESTILAÇÃO FRACIONADA**, caracterizada por apresentar maior rendimento que o método de extração convencional.
2. **APLICAÇÃO DE LIMONENO EXTRAÍDO POR DESTILAÇÃO FRACIONADA COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conservar suas propriedades antifúngicas contra espécies refratárias de leveduras de *Candida não-Candida albicans* a terapia convencional.
3. **APLICAÇÃO DE LIMONENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES**, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por possibilitar a execução de testes antifúngicos *in vivo*, através da administração tópica, intravenosa, intraperitoneal, oral, etc, permitindo, por exemplo, o tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas.
4. **APLICAÇÃO DE LIMONENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizado por utilizar moléculas estáveis e solúveis, a qual permitiu que uma menor quantidade de fármaco seja suficiente para resultar numa atividade biológica satisfatória, além de facilitar a execução dos ensaios biológicos e demais análises químicas.
5. **APLICAÇÃO DE LIMONENO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizado por permitir que uma menor quantidade de fármaco fosse suficiente para resultar numa atividade biológica satisfatória, promovendo uma exacerbação da atividade em especial frente a leveduras emergentes do gênero *Candida*, demonstrado *in vitro*, onde pode ser constatada menor Concentração Inibitória Mínima (CIM) em comparação com antifúngicos de referência como a anfotericina B e fluconazol.

RESUMO

EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE LIMONENO E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO AGENTE ANTIFÚNGICO FRENTE A LEVEDURAS EMERGENTES

A presente patente aborda um método de extração otimizada do limoneno a partir de casca de laranja e sua posterior aplicação como antifúngico frente células planctônicas e biofilmes de leveduras clínicas emergentes. A extração de base cítrica foi obtida por vapor de arraste através de destilação fracionada. A determinação *in vitro* da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato contra linhagens emergentes do gênero *Candida* (*Candida guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitanae*, *C. pelliculosa*, *C. famata* e *C. ciferri*) foi realizada com base no método de microdiluição em caldo seguindo o Clinical Laboratory Standard Institute-CLSI. O rendimento da extração foi de 1-2 mL a cada 50-60g de casca. O limoneno apresentou valores de CIM de 4-16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente células planctônicas e biofilme. Os resultados foram superiores aos antifúngicos de referência anfotericina B e fluconazol que apresentaram concentrações inibitórias maiores ($\geq 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes resultados permitem vislumbrar a possibilidade de uma extração mais eficiente do limoneno, além do produto se tornar uma futura alternativa para o tratamento da candidíase invasiva.