

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E HEMOLÍTICA DO ISOTIOCIONATO DE BENZILA (BITC)

FABIOLA DA SILVA RODRIGUES¹; CARLA MARCELINO TRASSANTE²,
MATHEUS PEREIRA DE ALBUQUERQUE³, MIKAELE VALÉRIO
TAVARES⁴, JANICE LUEHRING GIONGO⁵, RODRIGO DE ALMEIDA
VAUCHER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nutri.fabiolarodrigues@gmail.com 1

²Universidade Federal do Rio Grande – carla.farmaceutica@outlook.com 2

³Universidade Federal de Pelotas – matheusalbuquerque813@gmail.com 3

⁴Universidade Federal do Rio Grande – mikaelevalerio14@gmail.com 4

⁵Universidade Federal do Rio Grande – janicegiongo@hotmail.com 5

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com 6

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas sistêmicas apresentam alta taxa de mortalidade, podendo atingir 50%, sendo as espécies do gênero *Candida* as principais causadoras. Dentre elas, *Candida albicans* é a mais prevalente, responsável por grande parte das infecções da corrente sanguínea, com mortalidade em torno de 40% (D'ENFERT et al., 2021; LEE et al., 2021). A resistência aos antifúngicos clássicos está fortemente associada à exposição contínua a esses agentes e à formação de biofilmes, importante fator de virulência que dificulta o tratamento e limita as opções terapêuticas (GULATI; NOBILE, 2016).

Nesse contexto, o mamão (*Carica papaya*), cujas sementes podem representar até 20% da massa do fruto, destaca-se como uma fonte promissora de compostos bioativos. O óleo extraído dessas sementes demonstrou atividade antifúngica contra diversas espécies do gênero *Candida*, incluindo cepas resistentes ao fluconazol (HAMEED, 2009; HE et al., 2017; SINGH; ALI, 2011). Esse efeito tem sido atribuído ao isotiocianato de benzila (BITC), principal constituinte do óleo (~99%), que apresentou ação potente contra *C. albicans*, inibindo o crescimento, reduzindo o tamanho celular e comprometendo a formação de tubos germinativos (PEREIRA; CALADO; SAMPAIO, 2020).

Apesar do reconhecido potencial antifúngico, o isotiocianato de benzila (BITC) pode apresentar efeitos tóxicos, incluindo hepatotoxicidade, toxicidade reprodutiva e atividade sobre células tumorais, o que torna necessária a avaliação de sua segurança (TISSERAND; YOUNG, 2014). Diante disso, este estudo teve como objetivo investigar o potencial antifúngico do BITC frente a *Candida* spp., bem como sua toxicidade, utilizando o ensaio de hemólise como modelo de avaliação citotóxica.

2. METODOLOGIA

A atividade antifúngica do BITC foi avaliada por meio do método de difusão em disco. Discos de papel filtro estéreis foram impregnados com 10 µL da solução

de BITC e aplicados sobre placas de ágar previamente inoculadas com diferentes espécies de *Candida*. Como controle positivo, utilizou-se itraconazol, e como controle negativo, DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas, sendo a atividade antifúngica determinada pela presença ou ausência de halos de inibição ao redor dos discos.

A citotoxicidade do BITC foi avaliada por meio do ensaio de hemólise em hemácias, amplamente utilizado como teste preliminar de segurança (SÆBE et al., 2023). Para a análise, foi utilizado sangue desfibrinado de carneiro. Após a separação dos eritrócitos, estes foram ressuspensos em PBS a 4% e incubados com diferentes concentrações de BITC a 37 °C por 1 hora. Triton X-100 e PBS foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A absorbância do sobrenadante foi mensurada em leitor de microplacas nos comprimentos de onda entre 405 e 425 nm, sendo a porcentagem de hemólise calculada em relação aos controles.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de difusão em disco, o BITC demonstrou notável potencial antifúngico. O disco contendo 10 µL do composto apresentou um halo de inibição tão acentuado que impossibilitou medição precisa de seu diâmetro, indicando forte ação contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida kefir*. Em contraste, o itraconazol exibiu apenas halos de inibição parciais, com crescimento fúngico visível ao redor dos discos, evidenciando a maior eficácia do BITC frente às cepas avaliadas. Esses resultados corroboram com estudos anteriores já descritos na literatura que destacam a atividade antifúngica do BITC, inclusive contra cepas resistentes, sugerindo que este composto apresenta potencial promissor como agente antifúngico alternativo.

No ensaio de hemólise (figura 1), o BITC apresentou baixa citotoxicidade frente a hemácias de carneiro. O controle positivo (CP – Triton X-100) resultou em 100% de hemólise, enquanto o controle negativo (CN – PBS) não apresentou atividade hemolítica, garantindo que não houve interferência externa no teste. As concentrações testadas (25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL) induziram índices de hemólise muito baixos, com discreto aumento observado apenas na maior concentração avaliada (25 µg/mL) com média de 6,71%. Entretanto, à medida que as concentrações foram reduzidas, notou-se uma diminuição expressiva da atividade hemolítica: em 12,5 µg/mL a média foi de 1,89%, em 6,25 µg/mL foi de 1,75%, e partir da concentração de 3,12 µg/mL não foi detectada hemólise, uma vez que os valores se mantiveram negativos. Esses dados indicam que o BITC, nas concentrações testadas, não compromete significativamente a integridade da membrana eritrocitária, sugerindo um perfil de segurança compatível com aplicações biológicas preliminares.

Figura 1: Ensaio de hemólise para BITC

Hemólise

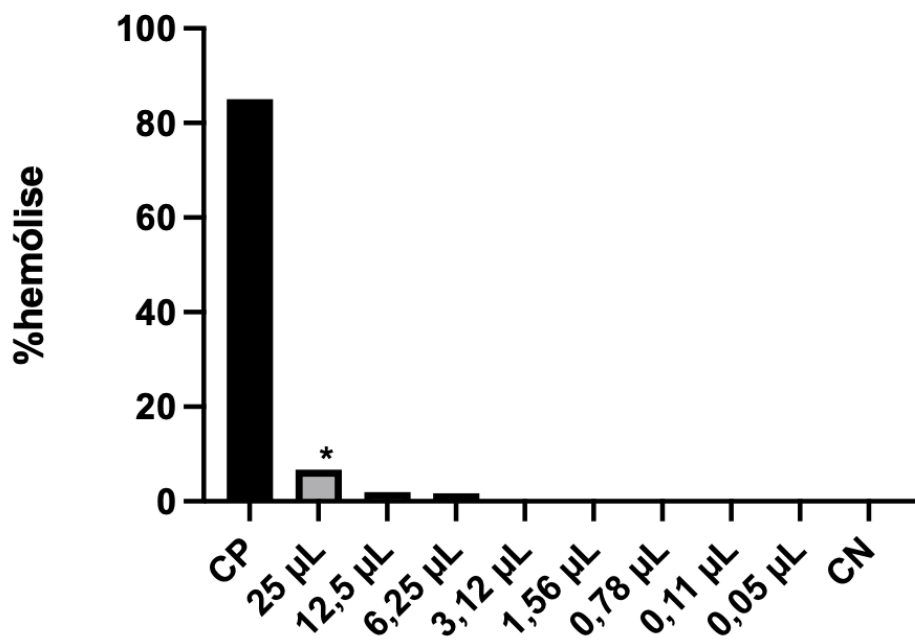


Figura X. Porcentagem de hemólise induzida pelo BITC em diferentes concentrações (25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,11 e 0,05 µg/mL), em comparação ao controle positivo (CP) e controle negativo (CN). Os dados são apresentados como média de duplicatas. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student, indicando diferença significativa apenas entre o CP e a concentração de 25 µg/mL ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre as demais concentrações avaliadas.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o isotiocianato de benzila (BITC), composto majoritário avaliado, apresentou baixa citotoxicidade hemolítica, com efeito mais evidente apenas na concentração de 25 µg/mL (6,71%). Em concentrações intermediárias (12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL), a hemólise foi mínima (1,89% e 1,75%, respectivamente), enquanto em 3,12 µg/mL não foi observada atividade hemolítica, indicando um perfil de segurança biológica nessas faixas de concentração. Adicionalmente, o BITC demonstrou potente atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*, com inibição completa do crescimento no ensaio de difusão em disco, superando o itraconazol. Esses achados reforçam o potencial do BITC como agente antifúngico promissor, com baixa toxicidade e ampla eficácia frente a cepas relevantes clinicamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D'ENFERT, C.; KAUNE, A. K.; ALABAN, L. R.; CHAKRABORTY, S. *et al.* The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev**, 45, n. 3, May 05, 2021.
- GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect**, 18, n. 5, p. 310-321, May 2016.
- HAMEED, B. H. Evaluation of papaya seeds as a novel non-conventional low-cost adsorbent for removal of methylene blue. **J Hazard Mater**, 162, n. 2-3, p. 939-944, Mar 15 2009.
- HE, X.; MA, Y.; YI, G.; WU, J. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya* Linn. seed essential oil against *Candida* spp. **Lett Appl Microbiol**, 64, n. 5, p. 350-354, May 2017.
- LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in. **Chem Rev**, 121, n. 6, p. 3390-3411, Mar 24 2021.
- PEREIRA, C.; CALADO, A. M.; SAMPAIO, A. C. The effect of benzyl isothiocyanate on *Candida albicans* growth, cell size, morphogenesis, and ultrastructure. **World J Microbiol Biotechnol**, 36, n. 10, p. 153, Sep 17 2020.
- SÆBØ, I. P.; BJØRÅS, M.; FRANYZK, H.; HELGESEN, E.; BOOTH, J. A. *Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 3, p. 2914, 02 fev. 2023.
- SINGH, O.; ALI, M. Phytochemical and antifungal profiles of the seeds of *Carica papaya* L. **Indian J Pharm Sci**, 73, n. 4, p. 447-451, Jul 2011.
- TISSERAND, R.; YOUNG, R. Constituent profiles. In: *Essential oil safety, a guide for health care professionals*. **Churchill Livingstone**, n. 2, p. 483-647, 2014.