

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DE *Punica granatum* NA DESARTICULAÇÃO DE BIOFILMES SOBRE CEPAS DE *Candida* spp.

Myleny Goularte Moreira, Nicolly Soares Ferreira, Talita de Jesus Cattem
Moreno, Carlos Eduardo de Souza Duarte, Juliana Aparecida Severi, Mariana
Drummond Costa Ignacchiti, Juliana Alves Resende

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

Resumo

As infecções por espécies de *Candida albicans* e não-*albicans* estão aumentando e enfrentam desafios devido à falta de medicamentos disponíveis e à dificuldade de tratamento imposta pela capacidade de formação de biofilmes que esses microrganismos possuem. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a formação de biofilme por espécies de *Candida* e a capacidade de desarticulação destes pelo extrato etanólico de casca de *Punica granatum*. Os resultados apontam o extrato de romã como uma alternativa terapêutica para o tratamento da candidíase, tendo os valores de CIM variando de 10 mg/mL (1%) a 25 mg/mL (2,5%). O extrato de romã se mostrou eficaz na desarticulação dos biofilmes maduros formado pelas cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida Krusei* e *Candida parapsilosis*. Essas descobertas ressaltam o papel promissor do extrato de romã como uma alternativa terapêutica eficaz e direcionada para o tratamento das infecções causadas por espécies de *Candida*.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Candidíase. Fitoterapia. Levedura. Romã.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde

Introdução

O gênero *Candida* abrange diversas espécies, incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, que podem causar infecções denominadas candidíase (SANTOS, 2019). Infecções causadas por *Candida* representam um desafio significativo no tratamento clínico devido a diversos fatores. Um dos principais obstáculos é a resistência desenvolvida pelas leveduras aos antifúngicos convencionais, como azóis e equinocandinas (REIS-COSTA *et al.*, 2020). Além disso, a capacidade de formação de biofilmes pelas espécies de *Candida*, contribuem para a resistência e aumento das doses terapêuticas aos antifúngicos, bem como dificulta a erradicação do fungo (SILVA *et al.*, 2021). A heterogeneidade das espécies também desempenha um papel importante, pois cada espécie pode apresentar diferentes fatores de virulência e resistência (ROCHA *et al.*, 2021). Esses desafios destacam a necessidade contínua de pesquisas para o desenvolvimento de novos antifúngicos com mecanismos de ação distintos.

Biofilmes microbianos são estruturas tridimensionais que consistem em uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e DNA, onde as células microbianas se agrupam sobre as superfícies bióticas e abióticas, e interagem de maneira sinérgica (ROQUE *et al.*, 2020). A prevenção e tratamento de biofilmes representam um desafio clínico significativo, pois essas estruturas resistem às defesas impostas pelo sistema imunológico do hospedeiro, bem como às influências extrínsecas do ambiente (TRINDADE *et al.*, 2022). Desse modo, com o número de antifúngicos comerciais limitados, a possibilidade de estabelecimento de biofilme e o aumento da resistência fúngica faz com que novos agentes terapêuticos sejam essenciais para o tratamento clínico dessas infecções.

Neste sentido, o extrato de *Punica granatum*, conhecido como romã, é uma alternativa terapêutica que tem sido estudada para o tratamento de *Candida*. A *P. granatum* é uma planta pertencente à família Lythraceae, amplamente cultivada em climas subtropicais e tropicais (SANTOS, 2021). A romã contém

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

compostos bioativos, como polifenóis, flavonoides e ácido elágico, que conferem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas (SOUSA *et al.*, 2018). Esses compostos presentes na romã interferem nas interações entre as proteínas microbianas e os receptores presentes nas células do hospedeiro, reduzindo a colonização microbiana e a capacidade de formação de biofilmes. Além disso, esses compostos têm a capacidade de degradar a matriz extracelular dos biofilmes existentes, enfraquecendo sua estrutura e dispersando as células microbianas (SOUSA *et al.*, 2022). A investigação sobre o potencial antibiofilme da *P. granatum* na formação de biofilmes é de grande interesse científico.

Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico antifúngico e antibiofilme do extrato de *Punica granatum* sobre linhagens padrão de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*.

Metodologia

As linhagens-padrão testadas foram *C. albicans* (ATCC 24433), *C. krusei* (ATCC20298), *C. parapsilosis* (ATCC22019) e *C. glabrata* (ATCC2001). As linhagens foram reativadas em Caldo Sabouraud-Dextrose (CSD), por 24h a 48h, em uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, e então transferidas para o meio de cultura ágar infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por adicionais 24 horas. As linhagens foram rotineiramente cultivadas em Chromagar para garantir a pureza das mesmas.

O extrato hidroalcoólico total de cascas de *Punica granatum* (romã) foi preparado por percolação, seguidas de evaporação rotativa e liofilização. O extrato foi armazenado na temperatura de 4°C em frasco de vidro âmbar envolto por um papel alumínio a fim de evitar com que o produto entre em contato com a luz.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição de caldo, seguindo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) com modificações. Utilizou-se microplacas de poliestireno 96 poços estéreis com fundo chato, onde foram testadas diferentes concentrações do extrato de romã (1%, 2,5%, 3,75% e 5%). O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller Hinton (CMH). As leveduras foram descongeladas, repicadas em placas contendo agar Sabouraud-dextrose (ASD) e incubadas em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e ajustados para atingir uma turbidez de 0,5 Mc Farland. Para preenchimento dos poços, foram adicionados 100 μL das diferentes concentrações do extrato em cada poço, acrescido de 100 μL de inóculo fúngico ajustado. Para cada linhagem fúngica foi realizado um controle de crescimento (inóculo + meio de cultura) e controle de esterilidade (somente CMH). As placas foram tampadas, homogeneizadas e incubadas em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24-48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato que resultou na completa inibição do crescimento fúngico, sem a formação de precipitado ou turvação no meio de cultura, após o período de incubação. Após a microdiluição, os poços contendo a CIM do extrato foram plaqueados em placas contendo ASD e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. O resultado foi determinado pela presença ou ausência de formação de colônias, classificando a ação como fungicida ou fungistática, respectivamente.

A avaliação da capacidade de formação e biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Dias *et al.* (2017) com modificações. Inicialmente, a partir de um de cultivo de 24 horas de cada linhagem, um inóculo foi padronizado 1×10^6 UFC/mL e aplicado em poços acrescido de mais 100 μL de CSD. As placas foram tampadas e incubadas em estufa por 24-48 h, a 35°C . O controle negativo foi realizado apenas com CSD (sem inóculo). Após o período de crescimento, os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Em seguida uma solução de cristal violeta (0,1%) foi adicionada e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente. Após esse período lavou-se a placa com solução salina para retirar o excesso do corante não incorporado nas células. O corante incorporado foi extraído pela adição de etanol 95%. Em seguida foi feita a leitura em leitor de microplacas no comprimento de onda de 596nm. Os resultados foram registrados como uma média de três réplicas.

O biofilme foi classificado de acordo com a comparação entre a leitura de absorbância do biofilme e a leitura de absorbância do controle negativo, como previamente proposto por Stepanovic *et al.* (2000). Quando a absorbância do biofilme apresentou-se inferior à absorbância do controle negativo

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(Abs biofilme $\leq$ Abs controle negativo), o biofilme foi considerado não aderente; quando a absorbância do biofilme foi maior em até duas vezes a absorbância do controle negativo (Abs biofilme $\leq 2 \times$ Abs controle negativo), o biofilme é considerado pouco aderente; quando a absorbância do biofilme formado for entre 2 a 4 vezes da absorbância do controle negativo ($2 \times$ Abs controle negativo $<$ Abs biofilme $\leq 4 \times$ Abs controle negativo), o biofilme foi considerado de aderência moderada e quando a absorbância do biofilme for superior a 4 vezes absorbância do controle negativo (Abs biofilme $> 4 \times$ Abs controle negativo), o biofilme foi considerado muito aderente.

Os resultados foram avaliados através da fórmula estatística da análise de variância (ANOVA) no software GraphPad 8.0. A variação nos resultados dos testes foi considerada estatisticamente significativo $p < 0,05$ (95%).

Resultados

Nessa pesquisa foi verificado que o extrato de *P. granatum* promoveu a inibição do crescimento das *C. albicans* e não-albicans avaliadas na concentração de 1% (10 mg/mL) e 2,5% (25 ml/mL). Foi verificado efeito fungistático para as espécies de *C. albicans* e *C. krusei* na concentração de 1% (10 mg/mL) e fungicida para todas as linhagens na concentração de 2,5% (25 mg/mL).

A capacidade de aderência e formação de biofilmes das linhagens de *Candida sp.* foram avaliadas de acordo com Stepanovic *et al.* (2000). Nesse contexto o controle negativo (apenas CSD) apresentou valor de absorbância de 0,077. O valor encontrado no controle negativo foi parâmetro para classificação fenotípica dos biofilmes formados. Todas as linhagens foram capazes de formar biofilme e estes foram classificados fenotipicamente como muito aderente em todas as linhagens (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização fenotípica da formação de biofilme por linhagens de *Candida spp.* e habilidade de desarticulação de biofilme maduro pelo extrato de *P. granatum*.

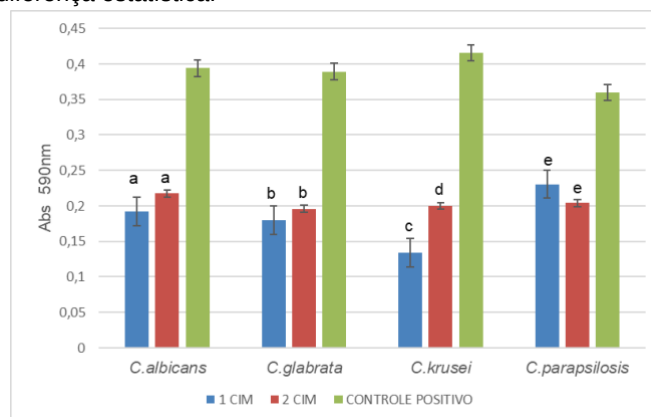
Espécies testadas	Efeito de desarticulação do extrato de <i>Punica granatum</i>			Valor de <i>p</i>
	Antes do tratamento	1 CIM (Após do tratamento)	2 CIM (Após o tratamento)	
<i>C. albicans</i>	Muito aderente (Abs 0,369)	Aderência moderada (Abs 0,213; redução = 42,27%)	Aderência moderada (Abs 0,191; redução = 48,24%)	0,0008
<i>C. glabrata</i>	Muito aderente (Abs 0,389)	Aderência moderada (Abs 0,179; redução = 53,98%)	Aderência moderada (Abs 0,225; redução = 42,16%)	$< 0,0001$
<i>C. krusei</i>	Muito aderente (Abs 0,415)	Pouco aderente (Abs 0,153; redução = 63,13%)	Aderência moderada (Abs 0,184; redução = 55,66%)	0,0001
<i>C. parapsilosis</i>	Muito aderente (Abs 0,360)	Aderência moderada (Abs 0,230; redução = 36,11%)	Aderência moderada (Abs 0,204; redução = 43,33%)	0,0063

Fonte: o autor

A concentração do extrato de *P. granatum* utilizada para a avaliação da desarticulação dos biofilmes foi determinada a partir dos valores de CIM. O extrato de romã foi adicionado sobre os biofilmes já estabelecidos e em seguida cultivados por adicionais quatro horas. Os resultados da desarticulação do biofilme maduro estão apresentados no gráfico abaixo (Gráfico 1).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Gráfico 1: Desarticulação dos biofilmes maduros de *Candida* spp. exercida pelo extrato de *P. granatum*. Letras diferentes indicam diferença estatística.



Fonte: o autor.

A análise do efeito do extrato de romã na desarticulação dos biofilmes formados pelas *Candida* spp. está apresentada na tabela 1. O extrato de romã, nas duas concentrações testadas, causou a desarticulação e redução do biofilme para todas as espécies de *Candida* avaliadas (Gráfico 1), bem como promoveu a reclassificação fenotípica destes biofilmes (Tabela 1).

Discussão

O estabelecimento de biofilme microbiano representa um desafio para o sucesso terapêutico das infecções fúngicas, pois este fornece um ambiente seguro para que as leveduras possam se dispersar e proliferar em um novo local de infecção (WALL *et al.*, 2019). O controle da formação de biofilme por espécies de *Candida* spp. bem como a eliminação deste é complexa, fato que impõe dificuldade na eliminação da infecção fúngica (OLSON; JAYARAMAN; KAO, 2018). Tal fato se deve à capacidade destas espécies de invadir e evadir as defesas do sistema imune do hospedeiro. Além disso, a ocorrência de biofilmes impõe uma elevada resistência aos agentes antimicrobianos usados na prática clínica, sendo necessário um aumento na dose terapêutica (100 a 1000 vezes maior) (LOCK, 2015).

Os resultados apresentados neste estudo são promissores para o tratamento da candidíase, uma vez que o extrato de *P. granatum* apresentou-se como uma alternativa terapêutica *in vitro*, por exercer efeitos antifúngico sobre células planctônica e sobre o biofilme maduro em todas as espécies de *Candida* testadas, independentemente da concentração utilizada.

Bernardo *et al.* (2015), avaliou o efeito de diferentes concentrações de *P. granatum* (4-25 mg/mL) sobre *C. albicans* e determinaram a CIM de 25 mg/mL (2,5%), resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Já o estudo realizado por Michellin *et al.* (2005) contrapõe os resultados desse trabalho, uma vez que os autores relatam que o crescimento de *C. albicans* não foi inibido pelo extrato de romã. Essa discrepância pode ser atribuída a fatores externos, tais como o método de obtenção do extrato, o armazenamento e a manipulação do mesmo. De acordo com Barbosa *et al.* (2016), fatores sazonais podem interferir na composição fitoquímica das plantas, bem como a época de coleta, a qual se caracteriza com um dos fatores que mais influenciam na atividade farmacológica de drogas vegetais.

De acordo com Mendonça *et al.* (2022) grandes partes das pesquisas referentes aos efeitos antifúngicos de *P. granatum* refere-se a extratos obtidos a partir do fruto ou casaca. Huerta-Reyes *et al.* (2022) descrevem que os compostos como a punicalagina e ácido elágico são os principais responsáveis por conferir atividades antimicrobianas ao extrato de romã.

No presente estudo pode-se observar que o efeito antibiofilme promovido pelo extrato de romã foi dose-dependente apenas sobre *C. krusei*, para as demais espécies não houve diferença estatística na redução do biofilme quando foi utilizada uma maior concentração do extrato (Tabela 1). Estes resultados são promissores, pois com 1 x CIM já é observado o efeito desarticulador, ou seja, uma menor dose está intrinsecamente ligada a uma menor citotoxicidade.

O extrato de *P. granatum* promoveu uma desarticulação de mais de 36% dos biofilmes formados por todas as espécies de *Candida* sp. Após quatro horas de tratamento dos biofilmes maduros com o

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

extrato de romã, estes foram reclassificados para aderência moderada (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) e pouco aderente (*C. krusei*). Nas condições testadas, a espécie *C. krusei* se mostrou mais susceptível aos efeitos do extrato, apresentando os maiores índices de desarticulação (63,13% na 1x CIM e 55,66% 2x CIM). Ainda para esta espécie o efeito do extrato foi dose dependente.

Para Sousa *et al.* (2022) o extrato de *P. granatum* é uma alternativa promissora no controle dos biofilmes. Segundo os autores, a atividade antibiofilme do extrato pode ser atribuída a princípios ativos encontrados na romã, os quais promovem alterações morfológicas e irregularidades nas hifas e na membrana celular, além de influenciar na agregação celular e inibição no crescimento das leveduras. Adicionalmente, estudos apontam que o extrato de *P. granatum*, além de desarticular biofilmes maduros, também inibe a formação do tubo germinativo, característica marcante de virulência de *C. albicans* (BAKKIYARAJ *et al.*, 2013)

Neste cenário, os resultados observados nesse estudo são promissores para o tratamento das candidíases, uma vez que o extrato de romã apresentou efeito antibiofilme, promovendo a desarticulação dos biofilmes maduros, bem como age sobre as células planctônicas; propriedades desejáveis em abordagens terapêuticas das infecções fúngicas.

Conclusão

O extrato de *Punica granatum* destaca-se como uma alternativa terapêutica para o tratamento das infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, uma vez que o mesmo é capaz de inibir o crescimento de células planctônicas e desarticular o biofilme maduro formado por *C. albicans* e espécies não-albicans.

Referências

BAKKIYARAJ, D., *et al.* O potencial anti-biofilme do extrato de romã (*Punica granatum* L.) contra patógenos bacterianos e fúngicos humanos. **Biofouling**, v. 29, n. 8, p. 929-937, 2013.

BARBOSA, C. S., *et al.* Atividade antifúngica preliminar dos extratos de *Punicca Granatum* (Linnaeus) e *Psidium guajava* (linnaeus) sobre *Candida albicans*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 1, p. 66-73, 2016

BERNARDO, L. P.; ALAVARCE, R. A. S.; PORTO, V. C. Efeito antimicrobiano in vitro da *Punica Granatum* sobre *Candida albicans*. 2015, Anais. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, 2015.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard-Third edition. **CLSI document M27-A3**. Wayne, PA: 2008

DIAS, V.C. *et al.* Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a Brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 7, p. 852-863, 2017.

HUERTA-REYES, M. *et al.* *Punica granatum* as anticandidal and anti-HIV agent: an HIV oral cavity potential drug. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2622, 2022.

LOCK, G. A. **Infecções bacterianas associadas a biofilmes em superfícies bióticas: Critérios diagnósticos, tratamentos e perspectivas**. 2015. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015

MENDONÇA, A. M. S. *et al.* Ethyl Acetate Fraction of *Punica granatum* and Its Galloyl-HHDP-Glucose Compound, Alone or in Combination with Fluconazole, Have Antifungal and Antivirulence Properties against *Candida* spp. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 265, 2022.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

OLSON, M. L.; JAYARAMAN, A.; KAO, K. C. Relative Abundances of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in In Vitro Coculture Biofilms Impact Biofilm Structure and Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, p. 1–14, 2018.

ROQUE, J. V. O. *et al.* Efeito do extrato da própolis e do digluconato de clorexidina sobre a formação de biofilme por *Candida albicans* em resina acrílica. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 25, n. 1, p. 74-80, 2020.

REIS-COSTA, E. G. *et al.* Terapias para o tratamento de candidíase vulvovaginal. **Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-RRS-FESGO**, v. 3, n. 2, 2020.

ROCHA, W. R. V da *et al.* Género *Candida* - Factores de Virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de Resistência. Investigação, **Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

SANTOS, J. M. B. dos. **Avaliação da atividade antifúngica do benzil 2, 3-didesoxi-aD-eritro-hex-2-enopiranosídeo contra *Candida* spp.** 2019. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité-PB, 2019.

SANTOS, J. M. **Óleo de semente de romã (*Punica granatum* L.): métodos de extração e perfil de ácidos graxos.** 2021. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2021.

SILVA, K. G. V., *et al.* Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas ciências da saúde.**, v. 7, p. 42, 2021.

SOUSA, M. N., *et al.* O extrato hidroalcoólico das folhas de *Punica granatum*, sozinho e em combinação com hidróxido de cálcio, é eficaz contra biofilmes mono e polimicrobianos de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. **Antibióticos**, v. 11, n. 5, p. 584, 2022.

SOUSA, N. C. F. *et al.* Propriedades farmacológicas de *Punica granatum* L (romã): uma revisão de literatura. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 31, n. 1, p. 57-67, 2018.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

TRINDADE, L. A. *et al.* Atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e citronelal em cepas clínicas de *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, p. 1-10, 2022.

WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p.1-6, 2019.

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), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem ainda os pesquisadores do Laboratório de de Produção Farmacêutica pela obtenção do extrato.