

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EFEITO ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE *Punica granatum* CONTRA *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*: ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Carlos Eduardo de Souza Duarte, Nicolly Soares Ferreira, Talita de Jesus Catten Moreno, Myleny Goularte Moreira, Janaina Cecilia Oliveira Villanova, Mariana Drummond Costa Ignacchiti, Juliana Alves Resende

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil, caduaduarte2018@hotmail.com, morenotalitajesus@gmail.com, mylenygoulartemoreira@outlook.com, ni.colly_ferreira@hotmail.com, farmacotecnica@yahoo.com.br, mariana.ignacchiti@ufes.br, juliana.resende@ufes.br

Resumo: Recentemente, tem sido observado um aumento significativo de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* não-albicans (CNA), bem como o surgimento de espécies de *Candida* que apresentam resistência aos antifúngicos de uso clínico, eventos que representam um grande risco a saúde pública. Este estudo tem como objetivo caracterizar o perfil de inibição do crescimento fúngico promovido pelo extrato de casca de *Punica granatum* (romã) – ECR – sobre duas espécies de CNA, sendo elas a *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 20298). O ECR apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1% (10 mg/mL) para ambas linhagens testadas, onde a ação para *C. krusei* foi fungicida, e fungistática sobre *C. parapsilosis*. O tratamento das *Candida* com 1x e 2x CIM do extrato por 72h promoveu uma diminuição da carga microbiana, bem como causou uma alternância no fenótipo das linhagens, sendo capaz de modificar micromorfologia e interferindo no desenvolvimento de hifas e pseudo-hifas.

Palavras-chave: Antifúngico; Levedura; Infecção; Romã.

Área do Conhecimento: Farmácia.

Introdução

Os fungos leveduriformes do gênero *Candida* são de grande interesse clínico, este gênero possui representantes que são os principais responsáveis por causar infecções oportunistas nos seres humanos (ESPINHEIRO *et al.*, 2022). Espécies de *Candida* podem habitar diferentes partes do corpo como integrante da microbiota natural, sem causar nenhum dano ao seu hospedeiro, podendo ser encontrada no trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele e mucosas do trato respiratório. No entanto, em situação de desequilíbrio da microbiota natural e em indivíduos imunocomprometidos pode haver uma proliferação exacerbada deste microrganismo, sendo a manifestação clínica mais comum chamada de candidíase (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Nos últimos anos, alguns estudos apresentaram um aumento significativo de infecções fúngicas causadas por espécies de *C. albicans* e não-albicans (FAKHIM *et al.*, 2018). As espécies de *Candida* não albicans (CNA), como *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, desempenham um papel significativo nas infecções fúngicas humanas e têm despertado crescente interesse devido a sua crescente prevalência em pacientes imunocomprometidos, sua tendência à resistência antifúngica e suas características biológicas distintas. O estudo dessas espécies é fundamental para melhorar a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das infecções fúngicas, visando proporcionar uma abordagem mais eficaz e personalizada aos pacientes afetados (GÓMEZ-GAVIRIA; RAMÍREZ-SOTELO; MORA-MONTES, 2022).

Os produtos naturais têm despertado interesse considerável como fonte potencial de novos agentes antifúngicos. O extrato obtido da *Punica granatum*, conhecida como romã, tem sido objeto de estudos recentes devido às suas propriedades medicinais. Diversas pesquisas têm demonstrado sua atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, incluindo fungos, indicando que pode ser uma alternativa viável aos antifúngicos convencionais (ANIBAL, 2010).

Nesse cenário, o objetivo deste estudo é investigar o potencial antifúngico do extrato de *Punica granatum* contra *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, além de explorar possíveis alterações morfológicas que ocorrem na presença desse extrato. Compreender as propriedades antifúngicas

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

específicas do extrato de romã pode fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra infecções causadas por espécies de *Candida* não-albicans.

Metodologia

O extrato hidroalcoólico total de cascas de *Punica granatum* (romã) – ECR - foi preparado por percolação, seguidas de evaporação rotativa e liofilização. O mesmo foi acondicionado em frasco âmbar, embrulhado em papel alumínio e armazenado a 4°C, para evitar oxidação pela luz.

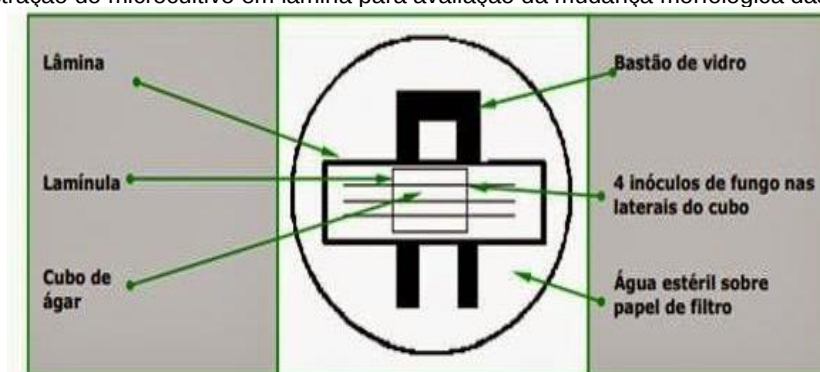
Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens padrão: *C. krusei* (ATCC 20298) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Ambas foram reativadas em caldo Sabouraud-Dextrose (CSD) a 35±2°C, no intervalo de 24 a 48 horas, sendo transferidas para Ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas novamente a 35±2°C por 24 horas. Por fim, as linhagens foram estocadas a 4°C. Rotineiramente, as linhagens foram cultivadas em Chromagar para garantir a pureza das mesmas.

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *P. granatum* foi realizado utilizando o método de microdiluição em caldo, seguindo as especificações estabelecidas pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI (2008), com modificações. Os testes antimicrobianos foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços estéreis, em uma capela de fluxo laminar. Diferentes concentrações do extrato (1%; 2,5%; 3,75% e 5%) foram testadas. O meio de cultura utilizado foi o CSD. Os inóculos foram preparados a partir de colônias isoladas, cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (ASD), em seguida colônias isoladas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e ajustadas para uma turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). A mistura de reação final possui um volume de 200 µL em cada poço: 100 µL das concentrações dos ECR (2%; 5%; 7,5%; 10%) e 100 µL de inóculo fúngico. Para cada linhagem fúngica foi feito um controle de crescimento (inóculo + meio de cultura), controle de esterilidade (somente CMH). Em seguida, as placas foram tampadas, agitadas e incubadas por 24h a 35 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do ECR capaz de inibir completamente o crescimento fúngico após o período de incubação. Em seguida foi realizado o plaqueamento dos poços da CIM que não apresentaram crescimento e do controle positivo, em placas de Petri contendo ASD. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24-48 horas. O resultado foi definido pela presença ou ausência da formação de colônias, sendo a ação classificada como fungistático ou fungicida, respectivamente. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do ECR em estudo capaz de causar a morte do inóculo.

Para a avaliação da possível mudança morfológica das espécies de *Candida* frente ao ECR foi empregada a técnica do microcultivo em ágar fubá (CASTRO *et al.*, 2010). Nesta etapa, 3 mL de ágar fubá contendo 1x e 2x CIM do extrato de romã foram depositadas em lâminas de microscopia estéreis apoiadas sobre um suporte em placa de Petri e incubadas em estufa por 72 horas (Figura 1), em seguida foi realizada a visualização das lâminas no microscópio óptico utilizando a lente objetiva de 40X (aumento final de 400x). Foram avaliadas, pelo menos, 15 campos de cada lâmina.

Figura 1 - Ilustração do microcultivo em lâmina para avaliação da mudança morfológica das leveduras.



Fonte: Brasil (2004).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

Foram avaliadas quatro concentrações diferentes (1%; 2,5%; 3,75% e 5%) do ECR. Todas as concentrações testadas inibiram o crescimento fúngico. A CIM foi de 1% para ambas as linhagens e a CFM foi de 1% apenas para *C. parapsilosis* (Tabela 1).

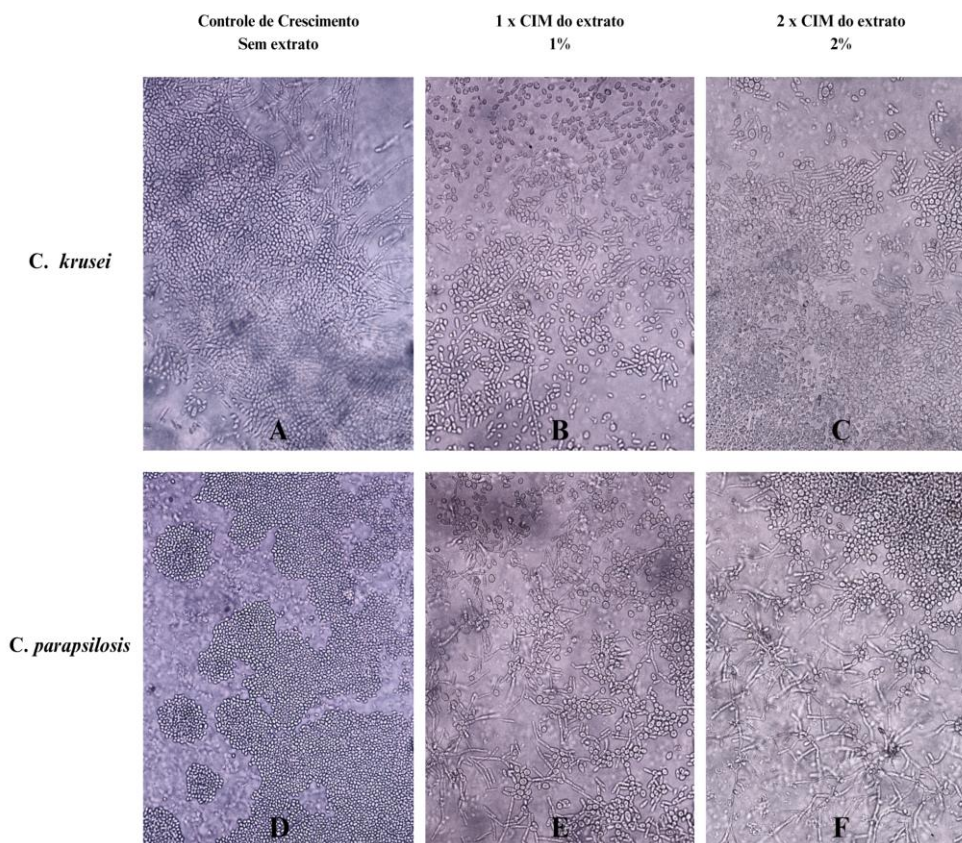
Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato da casca de romã frente às linhagens de *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Linhagens	CIM (% e mg/mL)	CFM (% e mg/mL)
<i>C. krusei</i>	1% (10 mg/mL)	-
<i>C. parapsilosis</i>	1% (10 mg/mL)	1% (10 mg/mL)

Fonte: o autor (2023).

Após a determinação da CIM, foi realizado o microcultivo das linhagens na presença e ausência do ECR nas concentrações 1x e 2x CIM. É possível observar que o tratamento das leveduras com o ECR promoveu uma redução da carga microbiana, sendo mais expressiva em 2 x CIM, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Alterações morfológicas observadas nas linhagens de *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* após o microcultivo na presença e na ausência do extrato da casca de romã.



Fonte: do autor (2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Para *C. krusei*, a Figura 2^a, demonstra o crescimento microbiano, sem a presença do extrato. Após 72h de cultivo com 1 x CIM, observa-se uma redução no desenvolvimento de pseudo-hifas (Figura 2B) as células estão mais isoladas, alongadas e tendendo para o formato ovalado, além de uma redução no crescimento numérico de células. Na presença de 2 x CIM, a levedura apresentou morfologia mais arredondada, um maior volume celular, citoplasma menos refringente e com aspecto mais homogêneo, sendo observado a formação de pseudo-hifas (Figura 2C).

Para *C. parapsilosis*, no controle de crescimento (Figura 2D), não foi observada a formação de pseudo-hifas, as células se apresentam aglomeradas, com citoplasma refringente, tamanho reduzido e morfologia ovalada. Ao adicionar 1 x CIM (Figura 2E) e 2 x CIM (Figura 2F) do ECR, é notável uma redução numérica das células, um aumento no tamanho celular, bem como morfologia irregular das células e formação de pseudohifas. No tratamento com 1 x CIM, as células apresentam um aumento no volume celular, citoplasma heterogêneo e vesiculoso, morfologia celular arredondada, sendo observado a formação de blastoconídios e pseudo-hifas. Na presença de 2 x CIM também é possível observar uma redução numérica de células, aumento no volume celular, leveduras apresentando uma morfologia irregular, com células arredondadas, ovaladas e alongadas bem como é possível notar a formação de hifas hialinas e pseudo-hifas.

Discussão

Os resultados dos ensaios antifúngicos revelaram que o ECR foi capaz de inibir o crescimento de *C. krusei* com CIM e CFM de 1%, e CIM de 1% para *C. parapsilosis* e CFM de 1%. Da Silva *et al.* (2018) descreveram que uma lectina ligadora de quitina presente em *P. granatum*, foi capaz de inibir o crescimento de *C. krusei* com uma concentração de 12,5 µg/mL.

Variações entre os fenótipos morfológico de levedura, com desenvolvimento de pseudo-hifas e hifas, são considerados importantes fatores de virulência para *Candida*, pois permitem a evasão do sistema imunológico do hospedeiro e promovem a adesão aos tecidos epiteliais, facilitando assim o rápido estabelecimento da infecção. Portanto, alterações morfológicas podem estar relacionadas à patogenicidade do fungo (GUCWA *et al.*, 2018).

Durante o estudo, algumas alterações morfológicas foram observadas na linhagem de *C. krusei* exposta ao ECR. As células fúngicas assumiram uma forma atípica e irregular em resposta ao estresse causado pelo cultivo prolongado. Além disso, foi notado o desenvolvimento de pseudo-hifas, uma característica importante de virulência, entretanto foi observado uma diminuição no número de células presentes. Para *C. parapsilosis* foi possível observar um aumento na formação de pseudohifas e diversos blastoconídios no tratamento com 1 x CIM, hifas na concentração de 2x CIM, bem como um decréscimo no número de células. É possível sugerir que a manutenção destas linhagens por 72h em meio de cultura pobre em nutrientes (água fubá) e acrescido com o ECR induziu a formação destas estruturas de virulência, para conferir ao fungo uma maior flexibilidade e adaptabilidade frente às condições desfavoráveis à proliferação natural impostas pelas condições de cultivo. Essa resposta pode ser uma tentativa da levedura em se proteger e sobreviver às condições adversas. Para Anibal (2010), a ação antifúngica do ECR se deve pela presença de compostos fenólicos, de ácido gálico e concentrações baixas de cobre e ferro, que ajudam na inibição da proliferação microbiana. Ainda, trabalho de Brighenti *et al.* (2021) mostra que o extrato de *P. granatum* contém compostos (como a punicalagina) inibem o crescimento de *C. albicans*, devido à sua capacidade de inibir as enzimas topoisomerase I e II e esta interação pode ser responsável pelo efeito nas leveduras.

É reconhecido que o meio de cultura é um determinante de crescimento e esporulação fúngica. Caixeta *et al.* (2008) afirmaram que meios pobres em nutrientes estimulam a esporulação de fungos, fato concordante com os resultados obtidos neste trabalho. Dos Santos *et al.* (2018) demonstraram que o estresse fúngico, devido ao cultivo em meio depleto, promoveu alteração morfológica em *C. krusei*, possibilitando o desenvolvimento de hifas e pseudohifas.

É importante destacar que as respostas morfológicas podem variar dependendo da concentração do ECR utilizado, do tempo de exposição e da suscetibilidade da linhagem das *Candida* testadas. Alterações morfológicas são apenas um aspecto do estudo da atividade antifúngica do extrato de romã. Outros testes, como ensaios de viabilidade celular, curva de crescimento e estudos moleculares, são necessários para complementar os dados e fornecer uma visão mais abrangente dos efeitos do extrato.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que o ECR exibe atividade antifúngica, inibindo o crescimento de CNA. O cultivo das linhagens com o extrato promoveu alteração fenotípica nas leveduras, levando para o desenvolvimento de estruturas morfológicas ligadas à patogenicidade, bem como uma redução numérica na cultura. Testes complementares devem ser realizados para a determinação do mecanismo de ação do ECR.

Referências

- ANIBAL, P. C. **Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de *Punica granatum* L. (romã) sobre *Candida* spp.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba - SP, 2010.
- BRASIL. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica: Módulo VII.** ANVISA. 2004. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf
- BRASIL. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica: Módulo VII.** ANVISA. 2004. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf.
- BRIGHENTI, V. *et al.* Antifungal Activity and DNA Topoisomerase inhibition of hydrolysable tannins from *Punica granatum* L. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4175, 2021.
- CAIXETA, M.P. *et al.* Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p. 625-630, 2008.
- CASTRO, R.D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*.** 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.
- CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard-Third edition. **CLSI document M27-A3.** Wayne, PA: 2008.
- DA SILVA, P. M. *et al.* PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- DOS SANTOS, J. F. S. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233-239, 2018.
- ESPINHEIRO, R. de F. *et al.* Aspectos da Microbiota Vaginal e a Relação com a Candidíase em Mulheres Gestantes: Uma Revisão de Literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, 2022.
- FAKHIM, H. *et al.* Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 377–382, 2018.
- GÓMEZ-GAVIRIA, M.; RAMÍREZ-SOTELO, U.; MORA-MONTES, H. M. Non-albicans *Candida* Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative **Therapies**. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 11, 2022.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

GUCWA, K. *et al.* Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1116, 2018.

VIEIRA, A. J. H; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

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 Produção Farmacêutica pela obtenção do extrato.