

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BLENDAS COM EXTRATO DE *Punica granatum* NO CONTROLE DA CANDIDÍASE CAUSADA POR *Candida albicans*

Nicolly Soares Ferreira, Carlos Eduardo de Souza Duarte, Talita de Jesus
Catten Moreno, Myleny Goularte Moreira, Rita Cristina Gonçalves de Melo,
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,
ni.colly_ferreira@hotmail.com, caduduarte2018@hotmail.com, morenotalitajesus@gmail.com,
mylenygoulartemoreira@outlook.com, rita07melo@gmail.com, mariana.ignacchiti@ufes.br,
juliana.resende@ufes.br

Resumo

A candidíase é uma infecção fúngica frequente em humanos, que pode ocorrer de modo superficial ou sistêmico. É especialmente observada em pessoas com sistemas imunológicos comprometidos. O aumento na incidência de infecções causadas por *Candida* e a resistência aos antifúngicos tradicionais tem se tornado um desafio clínico significativo, reforçando a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A romã tem sido estudada por suas propriedades medicinais. Filmes poliméricos baseados em blendas oferecem uma abordagem inovadora ao combinar múltiplos componentes terapêuticos para otimizar o tratamento. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é investigar o potencial de blendas contendo extrato de *Punica granatum* (romã) como uma abordagem terapêutica inovadora e eficaz no controle da candidíase causada por *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana *in vitro* das blendas poliméricas foi avaliada pelo método de difusão por poço no qual demonstrou formação de halos de inibição para todas as concentrações de extrato de romã testadas, tendo assim uma ação antimicrobiana promissora frente à *Candida albicans*.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Difusão em ágar; Levedura; Romã.

Área do Conhecimento: Ciências em Saúde

Introdução

A candidíase é uma infecção fúngica causada principalmente pelo patógeno *Candida albicans* e representa uma das mais comuns e relevantes condições micóticas que afetam os seres humanos. Esta infecção pode manifestar-se de forma superficial, como candidíase oral ou vaginal, ou sistêmica, com potencial para agravar-se e causar complicações sérias, especialmente em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos. Além disso, o crescente aumento de casos de resistência aos antifúngicos tradicionais impõe um desafio significativo no manejo clínico da candidíase (PAPPAS *et al.*, 2018).

A terapêutica antifúngica desafia os profissionais da saúde, uma vez que as opções disponíveis são limitadas e muitas vezes associadas a efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos existentes tem se tornado cada vez mais comum, complicando ainda mais o quadro terapêutico e enfatizando a necessidade de novas abordagens (BEN-AMI, 2018). *Punica granatum*, mais conhecida como romãzeira, é uma planta cuja fruta é amplamente cultivada e consumida em diversas regiões do mundo, além de ser valorizada por suas propriedades medicinais há séculos. Dentre as várias atividades biológicas atribuídas, seu efeito antifúngico tem despertado interesse crescente na comunidade científica (PAULA *et al.*, 2023).

Blendas poliméricas consistem em misturas de dois ou mais polímeros, naturais e/ou sintéticos, às quais podem ser incorporados outros excipientes com finalidades diversas, visando a obtenção de filmes poliméricos ou de soluções formadoras de filmes poliméricos *in situ* para uso como sistemas de liberação de fármacos (SILVA *et al.*, 2016). Nas blendas, as vantagens dos polímeros isolados são combinadas, originando um material com propriedades únicas e superiores quando comparadas aos dos materiais de partida, eliminando a necessidade de desenvolver um novo material. Essa

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

abordagem permite o desenvolvimento de materiais para inclusão em sistemas de liberação que atuarão em diferentes alvos biológicos, otimizando o tratamento de doenças complexas e multifatoriais (SILVA *et al.*, 2016).

Assim o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antifúngico das blendas contendo extrato total seco das cascas de romã visando o preparo de filmes *in situ* como estratégia terapêutica inovadora e eficaz no controle da candidíase causada por *Candida albicans*.

Metodologia

O extrato hidroalcoólico seco total de cascas de romã (ECR) foi preparado por percolação, seguida de evaporação rotativa e secagem liofilização. O ECR mesmo foi acondicionado em frasco âmbar, protegido da luz e, armazenado a 4° C. A blenda contendo o ECR nas concentrações de 1,25%; 2,5%, 3,75% e 5% foi preparada no Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos (LDPF) e foi mantida em local fresco e seco, protegida da luz solar direta e da umidade. A formulação foi definida a partir de trabalhos anteriores e sua composição qualitativa e quantitativa da formulação é dada na Tabela 1.

Tabela 1. Composições da blenda polimérica.

Componentes SSF	Quantidade (% p/p)
Poli(álcool vinílico (PVA)	25,0
Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA)	0,1
Propilenoglicol (PPG)	6,0
Metilparabeno	0,15
Água purificada QSP	100,0

Fonte: Os autores

A linhagem padrão utilizada no estudo foi *Candida albicans* (ATCC24433). Essa linhagem foi reativada em meio líquido de Caldo Sabouraud-Dextrose (CSD), sendo mantida a uma temperatura de 35±2° C por um período de 24 a 48 horas. Posteriormente, as células foram transferidas para o meio de cultura ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 35±2° C por 24 horas. Após essa última incubação, as culturas foram armazenadas a uma temperatura de 4°C.

A atividade antimicrobiana *in vitro* das blendas poliméricas foi avaliada pelo método de difusão por poço, o teste foi realizado conforme recomendação do CLSI (2019) com modificações. O microrganismo foi previamente cultivados em placas de BHI a 35±2 °C, por 24 horas, e a concentração da suspensão microbiana foi ajustada pela escala 0,5 McFarland para 1,5 x 10⁶ UFC/mL, utilizando solução salina estéril (0,85 % de NaCl). Meio ágar Mueller-Hinton (MHA) recentemente preparado foi transferido para as placas, e as linhagens foram semeadas pela técnica de semeadura por espalhamento com o auxílio de swab.

Poços com 6 mm de diâmetros foram perfurados no MHA e aproximadamente 0,135 mL (±113 mg) das blendas poliméricas contendo as diferentes concentrações de ECR foram adicionados. As blendas com e sem conservante (sorbato de potássio), ambas sem extrato, foram utilizadas como controle negativo. Para controle positivo, discos contendo o antifúngico anfotericina B (5 µg) foi utilizado como padrão para comparação entre as réplicas e o CLSI. As placas foram incubadas a 35±2° C, durante 24 horas. O ensaio foi realizado em triplica. O diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetros (mm) com auxílio de um paquímetro.

Os dados obtidos nas avaliações foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey para comparações múltiplas, ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa Excel.

Resultados

Foi observada a formação de zonas de inibição de crescimento para o controle positivo (anfotericina B), conforme os padrões recomendados pelo protocolo CLSI (2019), para a linhagem estudada. Não foi observada nenhuma inibição do crescimento fúngico para o filme sem extrato

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(controle negativo), o que reforça a adequação dos ensaios conduzidos (Figura 1). A atividade antifúngica do filme contendo extrato de cascas de romã foi confirmada pela formação de zonas de inibição para *C. albicans* nas concentrações de 1,25%; 2,5%, 3,75% e 5% (tabela 1).

Tabela 2. Atividade antifúngica das blendas contendo ECR frente a *C. albicans*.

Formulação	Halo de inibição (mm)*					Anfotericina B
	Sem extrato	1,25% (mg/mL)	2,5% (mg/mL)	3,75% (mg/mL)	5% (mg/mL)	
Blenda	0 (±0)	26,5 ^c (±0,7)	28,5 ^{b,c} (±0,7)	30,0 ^b (±0)	33,0 ^a (±1,41)	19,0 (±0,9)

Resultados são apresentados como média dos halos de inibição (± desvio padrão das médias). Letras diferentes mostram diferença estatística (p<0,05).

Discussão

Devido ao aumento da ocorrência de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp., relatos de resistência aos antifúngicos comerciais e a limitação de drogas sintéticas antifúngicas disponíveis comercialmente, torna-se necessário a pesquisa por alternativas farmacológicas para tratamento da candidíase. Neste contexto, a plantas medicinais e seus fitoconstituintes se destacam (TOLEDO *et al.*, 2016). Dados disponíveis na literatura sugerem que extratos de casca de romã têm um efeito inibitório significativo frente a fungos leveduriformes (ANTUNES *et al.*, 2006; SANTOS, PEREIRA, NÓBREGA, 2014).

O teste de difusão em ágar foi realizado para avaliar o potencial antifúngico da formulação estudada. Os resultados obtidos revelaram a formação de halos de inibição para todas as concentrações de extrato de romã testadas. As formulações com maiores concentrações do extrato (1,25%<2,5%<3,75%<5%) apresentaram halos de inibição mais pronunciados, sugerindo uma correlação entre a concentração do extrato e o efeito antimicrobiano observado. A utilização da metodologia de difusão em poço demonstrou-se adequada para a avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dessas formulações, fornecendo informações relevantes para futuros estudos e desenvolvimento de produtos com potencial terapêutico.

Almeida *et al.* (2012) conduziram um estudo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de tinturas de romã sobre *C. albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, revelando valores variando entre 9 e 18,75 mg/mL. Por sua vez, Anibal *et al.* (2013) investigaram a atividade antifúngica de extratos etanólicos brutos provenientes do pericarpo, sementes e cascas de romã contra diferentes cepas de *Candida* spp. no qual apresentaram atividade de 125 µg/mL. Em outra pesquisa, Lavaee *et al.* (2018) foi avaliado a atividade antifúngica de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos derivados da casca e raiz da romã contra cepas de *C. albicans* e *Candida glabrata*, isoladas de cavidades orais humanas, encontram um CIM de 0,05 mg/ml.

No estudo conduzido por Batista *et al.* (2018), o objetivo foi avaliar a atividade biológica de filmes contendo extrato de casca de romã na concentração de 1,25% (p/p). Esses filmes foram preparados utilizando a técnica de eletrofiliação, com o propósito de explorar sua utilização como cobertura bioativa. Os resultados obtidos indicaram que os filmes apresentaram atividade frente a *C. albicans* nesta concentração testada. Já Paula *et al.* (2023) demonstraram que os filmes poliméricos contendo extrato de casca de romã apresentaram propriedades mecânicas e atividade antifúngica adequadas contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* na concentração de 1,25%. Os autores demonstraram que os extratos de casca e raízes, obtidos com metanol e etanol, apresentaram maior eficácia quando comparados aos extratos aquosos.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram dados disponíveis na literatura, que mostram a existência de atividade antifúngica para diferentes tipos de extratos de romã sobre cepas de fungos e indicam que as formulações de blendas com extrato de romã possuem uma ação antimicrobiana promissora frente à *C. albicans*. No entanto, são necessárias investigações adicionais

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

para compreender os mecanismos de ação envolvidos na atividade antimicrobiana do extrato de casca de romã e sua eficácia em diferentes contextos clínicos, abrindo caminho para aplicações potenciais na área da saúde e bem-estar.

Conclusão

Este estudo investigou o potencial antimicrobiano das formulações de blendas formadoras de filmes poliméricos *in situ* contendo extrato de romã contra *Candida albicans* para o tratamento de candidíase cutânea e de mucosa. Os resultados mostraram a formação de halos de inibição em todas as concentrações testadas, com maior inibição nas formulações contendo maior concentração de extrato (5%). No entanto, são necessárias investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos de ação envolvidos na atividade antimicrobiana do extrato de romã e sua eficácia em diferentes contextos clínicos, visando sua utilização como cobertura ativa.

Referências

- ALMEIDA, L. F. D. *et al.* Antifungal effect of tinctures from propolis and pomegranate against species of *Candida*. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 49, n. 2, p. 99-106, 2012.
- ANTUNES, R. M. P. *et al.* Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.
- ANIBAL, P. C. *et al.* Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 839-848, 2013.
- BATISTA, S. V. *et al.* In vitro activity of pomegranate peel extract alone and in electrospun poly (vinyl alcohol)/sodium alginate matrix. **Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 17, p. 294-312, 2020.
- BEN-AMI, R. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 97, 2018.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29. ed. Pensilvânia: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- LAVAE, F. *et al.* Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* isolates. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 4, p. 20, 2018.
- PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.
- PAULA, G. A. *et al.* Polymeric film containing pomegranate peel extract as a promising tool for the treatment of candidiasis. **Natural Product Research**, v. 37, n. 4, p. 603-607, 2023.
- SANTOS, M. G. C.; PEREIRA, J. V.; NÓBREGA, D. R. M. Potencial antifúngico da *Punica granatum* Linn na odontologia. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 1, p. 517-524, 2014.
- SILVA, G. T. *et al.* **Blendas poliméricas de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose com aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**. Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Paraíba. 2016.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

TOLEDO, L. G. *et al.* Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1252, 2016.

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 - Edital 13/2021; Cooperação CAPES/FAPES – PDPG; TO137/2021), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).