

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE *Punica granatum* E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS SOBRE *Candida albicans*

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

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

Resumo

Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento significativo no número de doenças fúngicas causadas especialmente por *Candida albicans*. O tratamento deste tipo de infecções é longo, de alto custo e limitado quando comparado ao tratamento de infecções bacterianas, visto o reduzido número de antifúngicos comerciais disponíveis. Diante desse problema, a busca por novos antifúngicos se torna essencial, justificando a necessidade de prospecção de novos agentes terapêuticos. Esse estudo tem como objetivo determinar o potencial antifúngico do extrato da casca de *Punica granatum* (romã) frente à linhagem de *Candida albicans* (ATCC 24433) e explorar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo extrato. Os resultados do estudo revelam que o extrato teve ação fungicida sobre *C. albicans* apresentando valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 1% e concentração fungicida mínima (CFM) de 2,5%. O tratamento com as concentrações 1x e 2x CIM foi capaz de reduzir o tamanho celular e o número de células, bem como promoveu o desenvolvimento de pseudo-hifas, alterando a micromorfologia da levedura.

Palavras-chave: Levedura. Micromorfologia. Romã.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde.

Introdução

Nos últimos anos, tem sido observado um aumento significativo nas infecções fúngicas causadas por diferentes espécies de *Candida*, com maior índice de ocorrência por *Candida albicans* (FAKHIM *et al.*, 2018; MONTES *et al.*, 2019). Algumas dessas espécies são naturalmente encontradas na microbiota residente da pele e mucosas. No entanto, em situações de desequilíbrio na microbiota, essas leveduras oportunistas podem se proliferar e causar candidíase, uma infecção superficial ou uma infecção mais grave, como a candidemia (candidíase sistêmica) (MONTES *et al.* 2019). Embora a maioria dos casos de candidíase sejam leves e de fácil tratamento, a grande preocupação é a ocorrência da infecção em pacientes imunocomprometidos, uma vez que a instabilidade do sistema imunológico os torna mais propensos ao agravamento da infecção (GUNTHER *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2019).

A ocorrência de casos de candidíase resistentes aos antifúngicos tradicionais é preocupante por estar desencadeando um cenário clínico desafiador, pela escassez de opções terapêuticas adequada (FAKHIM *et al.*, 2018). Com o aumento de infecções fúngicas e as possibilidades de tratamento limitadas, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para tratamento antifúngico (FU-JUAN *et al.*, 2021; TOLEDO, 2020). O uso de produtos naturais extraídos de plantas medicinais apresenta-se como uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de medicamentos, dada a vasta diversidade de plantas medicinais encontradas no Brasil, cuja exploração também é economicamente viável (HASENCLEVER *et al.*, 2017; MATTOS *et al.*, 2018).

Dentre esses compostos naturais, o extrato de *Punica granatum* (romã) tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades medicinais e atividade biológica, incluindo atividade antifúngica. A romã é uma fruta rica em compostos bioativos, tais como polifenóis, flavonoides e ácidos fenólicos, que têm demonstrado atividade antimicrobiana em diferentes estudos (SILVA,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

2020). Popularmente, o vegetal é utilizado para o tratamento de infecções da mucosa por sua ação antiinflamatória, a partir de preparações caseiras (BRASIL, 2019; WU; TIAN, 2017; SILVA, 2022).

Estudos também relatam a utilização da romã no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Esses achados indicam que a romã pode ser considerada uma opção viável como matéria-prima na produção de novos antimicrobianos (MELO; LUI; SILVA, 2021). Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo principal avaliar a atividade antifúngica do extrato de *Punica granatum* frente a *Candida albicans* e descrever as mudanças morfológicas da linhagem após o tratamento com o extrato.

Metodologia

O extrato etanólico 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 até a sua utilização

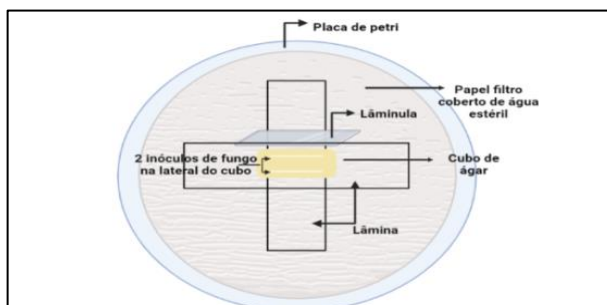
Foi utilizada a linhagem controle: *C. albicans* (ATCC 24433). A linhagem foi reativada em Caldo Sabouraud-Dextrose (CSD), a 35±2° C por 24h ou 48h, transferida para o meio de cultura ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubada a 35±2° C por 24h. Após está última incubação a cultura foi estocada a 4°C. Periodicamente a linhagem foi cultivada em Chromagar para garantir a pureza.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo o método de microdiluição de caldo, seguindo as especificações pré-estabelecidas pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI (2008). As leveduras foram descongeladas em temperatura ambiente e repicadas em agar Sabouraud-Dextrose (ASD). Em seguida foi realizado a incubação em estufa a 35±2° C por 24 horas. Os isolados foram ressuspensos em solução salina (0,9%) e ajustados para uma turbidez de 0,5 na escala de Mac Farland, o que equivale a 1,5 x 10⁶ UFC/mL. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços de fundo redondo, em triplicata. A mistura de reação final teve um volume de 200 µL, o meio de cultura utilizado foi caldo Sabouraud-Dextrose (CSD). As concentrações testadas do extrato de romã foram 1%; 2,5%; 3,75%; 5%. Após a montagem, as microplacas foram incubadas a 35±2° C por 24-48h. Em seguida foi realizada a inspeção visual do crescimento fúngico. Cada microplaca teve um controle de esterilidade (sem inóculo), controle de crescimento (inóculo + meio de cultura) e um controle positivo (inóculo + meio de cultura + anfotericina B), todos submetidos às mesmas condições de cultivo. Após o teste de microdiluição em meio líquido foi feito o plaqueamento dos poços da CIM do extrato e do controle positivo, em placas de Petri contendo 25 mL de ASD . As placas foram incubadas a 35±2° C por 24 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 extrato que foi capaz de impedir o crescimento visível do subcultivo.

Para observação de alterações na morfologia das leveduras foi empregada a técnica do microcultivo utilizando o meio sólido ágar-fubá em câmara úmida (CASTRO, 2010). Alíquotas de 3mL de ágar fubá, contendo 1x e 2x CIM de extrato e sem extrato (controle negativo, CN) foram depositadas isoladamente em lâminas estéreis apoiadas sobre um suporte contido no interior da placa de Petri. Após solidificação do meio, o inóculo da cultura de *C. albicans* foram semeados, com auxílio de uma agulha estéril, em duas estrias paralelas (Figura 1). Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro estéreis e para evitar o ressecamento do meio, as lâminas foram mantidas em câmara úmida. Após 72h de incubação, as preparações foram examinadas em microscópio óptico no aumento de 400X (lente objetiva de 40) para observação de ocorrência de alterações de estruturas morfológicas das leveduras.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1. Desenho esquemático do microcultivo em lâmina para avaliação das alterações morfológicas da levedura.



Fonte: o autor

Resultados

O extrato de *P. granatum* promoveu a inibição do crescimento da *C. albicans*. A CIM foi definida pela menor concentração de extrato capaz de inibir completamente o crescimento fúngico após o período de incubação. A CIM foi de 1% (10 mg/mL), nesta concentração o extrato de romã teve ação fungistática. A CFM do extrato foi de 2,5%.

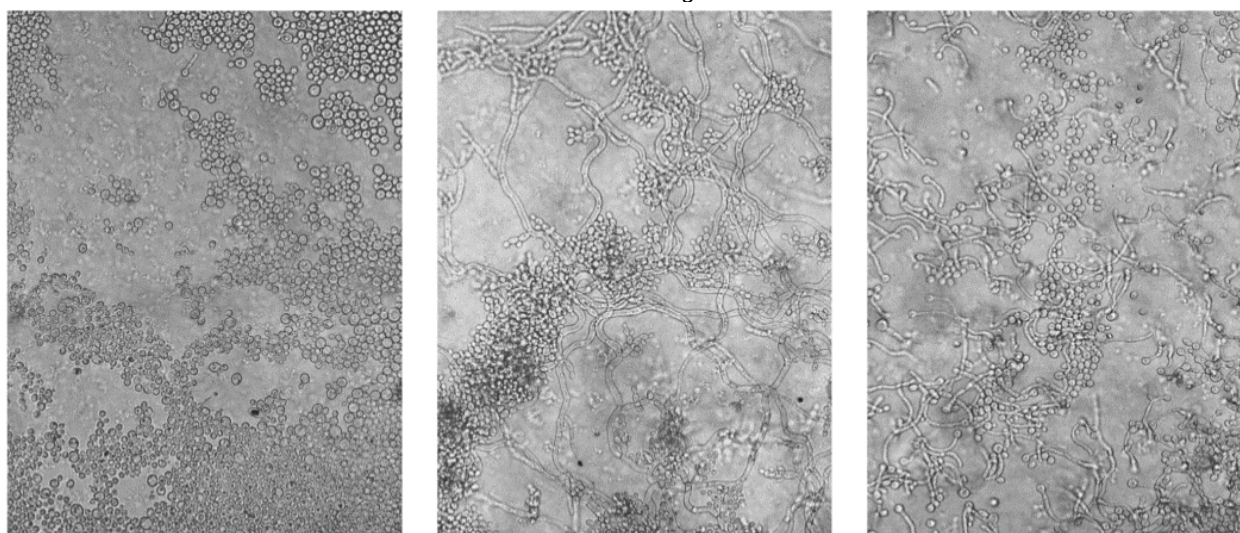
Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) do extrato de romã frente linhagem de *Candida albicans*

Linhagem	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	1% (10mg/mL)	2,5% (25mg/mL)

Fonte: o autor

Na figura 2 é possível observar a diferença morfológica das leveduras tratadas com diferentes concentrações do extrato de *P. granatum* (1x CIM e 2x CIM) e sem o tratamento com o extrato. Ao analisar as estruturas morfológicas, após 72h de incubação, é possível observar diferenças estruturais nas células ao comparar o crescimento fúngico na ausência e presença do extrato.

Figura 2. Alterações morfológicas na linhagem de *Candida albicans* após o microcultivo na presença e na ausência do extrato de *P. granatum*.



**Controle de Crescimento
Sem extrato**

**1 x CIM do extrato
1%**

**2 x CIM do extrato
2%**

Fonte: o autor

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

No tratamento com 1 x CIM as células apresentam uma nítida redução numérica e no volume celular, a morfologia celular está oval, sendo observado a formação de blastoconídios, hifas hialinas e pseudo-hifas. Na presença de 2 x CIM, é possível observar uma redução numérica de células, formação de pseudo-hifas e inúmeros clamidoconídios, a levedura apresentou uma morfologia irregular, além de uma redução no volume celular quando comparado ao controle sem extrato. No controle de crescimento (sem extrato) não foi observada a formação de pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios; as células se apresentam com formato mais arredondado, citoplasma com presença de vesículas, mais volumoso e refringente.

Discussão

O extrato de romã testado apresentou ação fungicida na concentração de 2,5% (25 mg/mL) e fungistática na concentração de 1% (10 mg/mL). Bernardo, Alavarce e Porto (2015) descreveram a CIM de 25 mg/mL para o do extrato de romã contra *C. albicans*, no entanto, o extrato apresentou ação fungistática nesta concentração. No estudo realizado por ANIBAL *et al.* (2013), que avaliaram extratos do pericarpo, casca e fruto da romã, os valores de CIM variaram de 0,125 a 0,250 mg/mL, e o extrato apresentou apenas feito fungistático contra *C. albicans*. SOUSA *et al.* (2022), descrevem a CIM de 0,0625 mg/mL e CFM de 4 mg/mL para o extrato de romã sobre *C. albicans*. Uma das possíveis hipóteses para a disparidade nos valores de CIM e CFM relatados neste trabalho e nos estudos mencionados anteriormente é que a menor concentração testada neste estudo foi de 1%. Isso significa que concentrações mais baixas, as quais poderiam inibir o crescimento de *C. albicans*, não foram avaliados. Essa diferença na concentração pode ter influenciado os resultados e levado a valores de CIM e CFM divergentes entre os estudos.

Ao analisar a estrutura morfológica da *C. albicans* tratada com 1x CIM e 2x CIM do extrato (Figura 2), observou-se uma redução no número de células em comparação ao grupo controle, além de um tamanho diminuído das células e morfologia irregular das mesmas. No entanto, após o tratamento com as diferentes concentrações do extrato houve a formação de hifas e pseudohifas, estruturas relevantes para a virulência da levedura. É possível que o cultivo prolongado (72 horas) das células com o extrato tenha desencadeado estresse celular, resultando na formação dessas estruturas de resistência, devido às condições desfavoráveis para sua proliferação natural. A capacidade da *C. albicans* de alternar entre a forma de levedura e as formas filamentosas, como hifas e pseudohifas, é considerada um importante fator de virulência, conferindo ao fungo maior flexibilidade e adaptabilidade durante a infecção. No entanto, é importante ressaltar que apenas a produção de pseudohifas não é um indicador definitivo da virulência da levedura (GUCWA *et al.*, 2018).

Anibal *et al.* (2013) avaliaram, a partir de estudo de microscopia eletrônica de varredura, as alterações morfológicas promovidas pelo extrato de romã sobre *C. albicans*. As linhagens tratadas com o extrato de romã apresentaram células agregadas, com superfície espessa e irregular e paredes deformadas. Os autores descrevem o aparecimento de hifas com descamação e ruptura na célula. Em contrapartida, linhagens de *C. albicans* não tratadas com extrato apresentaram hifas normais (sem alteração ou descamação), células regulares e membrana citoplasmática sem alterações (ANIBAL *et al.* 2013).

O extrato de *P. granatum* contém punicalagina, molécula precursora da punicalina. Esses compostos inibem o crescimento de *C. albicans*, devido à sua capacidade de inibir as enzimas topoisomerase I e II, presentes na levedura. No entanto, o mecanismo exato dessa ação ainda não está totalmente esclarecido (BRIGHENTI *et al.*, 2021). Os resultados deste estudo destacam o potencial antifúngico do extrato de romã sobre *C. albicans*, faz-se necessário a realização de estudos adicionais para elucidar o exato mecanismo de ação e determinar a toxicidade seletiva deste, tendo em vista perspectivas para uso futuro em formulação para desinfecção de ambientes hospitalares ou tratamento de infecções fúngicas.

Conclusão

O presente estudo avaliou o potencial antifúngico do extrato de *P. granatum* contra *C. albicans*. Foi descrita a CIM de 1% e CFM de 2,5% para o extrato. Embora o mecanismo da ação antifúngica

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

não tenha sido esclarecido, o extrato promoveu alteração no desenvolvimento de estruturas morfológicas ligadas à patogenicidade das leveduras, alterando a micromorfologia das leveduras e causando uma redução numérica na cultura. Os resultados demonstram potencial antifúngico do extrato estudado, despertando interesse de uso farmacêutico.

Referências

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, n. 3, 839-848, 2013.

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.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Plantas Medicinais e Fitoterápicos./Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. – São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019. 4ª edição

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.

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

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.

FU-JUAN, S. U. N. *et al.* Recent progress on anti-*Candida* natural products. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 19, n. 8, p. 561-579, 2021

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.

GUNTHER, L. S. A. *et al.* Prevalência de *candida albicans* e não albicans isoladas de secreção vaginal: Avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 116–120, 2014.

HASENCLEVER, L. *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559–2569, 2017.

KUMAR, K. *et al.* *Candida glabrata*: A lot more than meets the eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 1–22, 2019.

MATTOS, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735–3744, 2018.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MELO, F. J. S., LUI, C.L.C., SILVA, V. A., Propriedades farmacológicas da droga vegetal *Punica granatum* L. revista Ibero-Americana de Humanidades, **Ciências e Educação**, v. 7, n. 6, 2021.

MONTES, K. *et al.* Identification of candida species from clinical samples in a honduran tertiary hospital. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2019.

SILVA, L. K. C. *et al.* Capítulo 2 - a utilização do extrato da romã (*punica granatum*) e o seu impacto a nível vasculoprotetor: uma revisão. In: **Nutrição: tecnologia a serviço da saúde**. João Pessoa – PB: IMEA, 2020. p.36-53.

SILVA, I. K. R. O. *et al.*, Avaliação da atividade antimicrobiana de *punica granatum* L. Frente microrganismos da mucosa oral, **Contemporânea –Revista de Ética e Filosofia Política**, v. 2, n. 6, 2022.

SOUSA, M. N. *et al.* Hydroalcoholic leaf extract of *punica granatum*, alone and in combination with calcium hydroxide, is effective against mono- and polymicrobial biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Antibiotics**, v. 11, n. 5: 584, 2022.

TOLEDO, L. G. de. ***Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela): prospecção química-biológica do óleo essencial com destaque no estudo de biofilme e controle da candidíase vulvovaginal.** 2020. Tese(Doutora em Ciências Farmacêuticas.) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2020.f.17-20.

WU, S.;TIAN, L. Diversos fitoquímicos e bioatividades na antiga fruta e moderno alimento funcional romã (*Punica granatum*). **Moléculas**, v. 22, n.10, p. 1606, 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.