

As propriedades antimicrobianas do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* Sw. em biofilme monotípico de cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*

The antimicrobial properties of the glycolic extract of *Casearia sylvestris* Sw. in monotypic biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata*

Las propiedades antimicrobianas del extracto glicólico de *Casearia sylvestris* Sw. en biofilme monotípico de cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata*

Recebido: 29/12/2021 | Revisado: 03/01/2022 | Aceito: 11/01/2022 | Publicado: 13/01/2022

Thalles Rodrigues Teixeira de Assis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2681-418X>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: thalles.rta@gmail.com

Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9600-9058>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: pamela_beatriz79@hotmail.com

Adriano Moraes da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5626-1440>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: adriano.silva@docente.unip.br

Luciane Dias de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5465-9551>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: luciane.oliveira@unesp.br

Ana Luiza do Rosário Palma

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9478-8123>

Universidade Anhembi Morumbi, Brasil

E-mail: ana.luiza.rp@hotmail.com

Resumo

Objetivos: A resistência dos microrganismos perante o uso indevido dos fármacos é atualmente um dos problemas de saúde pública, tornando-se necessárias pesquisas sobre compostos naturais com atividade antimicrobiana, como a *Casearia sylvestris*. Este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* sobre cepas-padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (ATCC 9030) em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM) e também sua ação sobre biofilmes. **Metodologia:** O extrato glicólico de *C. sylvestris*, de origem comercial, foi obtido na concentração de 200 mg/ml (20%) eluídos em 80% de propilenoglicol. Os valores da CIM e CMM foram determinados pelo método de microdiluição em caldo, segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), normas M27-A2, com modificações. Logo, foram iniciados os testes em biofilmes monotípicos de 48h, com troca de caldo a cada 24h, destes micro-organismos. Após submetido aos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste metabólico de MTT. **Resultados:** *Candida albicans* apresentou CMM em 50 mg/mL, em *Candida glabrata* não observou-se CIM e CMM. No teste de MTT os resultados mostraram efetividade da concentração de 25 mg/mL sobre *Candida glabrata*, com redução de $\geq 29\%$, em *Candida albicans* não observou-se resultados significativos nas concentrações analisadas. **Conclusão:** O extrato apresentou efeito antimicrobiano contra os gêneros testados. Salienta-se também a importância de testes in vitro e in vivo que corroborem os resultados apresentados, com finalidade de aumentar o embasamento da aplicação do extrato.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Biofilme; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Casearia sylvestris* Sw.

Abstract

Objectives: The resistance of microorganisms to the misuse of drugs is currently one of the public health problems, making research on natural compounds with antimicrobial activity, such as *Casearia sylvestris*, necessary. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the glycolic extract of *Casearia sylvestris* on standard strains of *Candida albicans* (ATCC 18804) and *Candida glabrata* (ATCC 9030) in planktonic cultures, verifying the minimum inhibitory concentration and minimum microbicide concentration (MIC and CMM) and also its action on biofilms. **Methodology:** The glycolic extract of *C. sylvestris*, of commercial origin, was obtained at a concentration of 200 mg/ml (20%) eluted in 80% of propylene glycol. The MIC and CMM values were determined by the broth

microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standards M27-A2, with modifications. Then, tests were started on 48h monotypic biofilms, with broth change every 24h, of these microorganisms. After undergoing treatments, the biofilm was prepared for the MTT metabolic test. Results: *Candida albicans* presented MMC at 50 mg/mL, in *Candida glabrata* there was no MIC and MMC. In the MTT test the results showed effectiveness of the concentration of 25 mg/mL on *Candida glabrata*, with a reduction of $\geq 29\%$, in *Candida albicans* there were no significant results in the analyzed concentrations. Conclusion: The extract showed an antimicrobial effect against the tested genre. We also emphasize the importance of in vitro and in vivo tests that corroborate the results presented, in order to increase the basis for the application of the extract.

Keywords: Antimicrobial; Biofilm; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Casearia sylvestris* Sw.

Resumen

Objetivos: La resistencia de los microorganismos al uso indebido de medicamentos es actualmente uno de los problemas de salud pública, por lo que es necesaria la investigación de compuestos naturales con actividad antimicrobiana, como *Casearia sylvestris*. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto glicólico de *Casearia sylvestris* sobre cepas estándar de *Candida albicans* (ATCC 18804) y *Candida glabrata* (ATCC 9030) en cultivos planctónicos, verificando la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima de microbicida (MIC y CMM) y también su acción sobre biopelículas. Metodología: El extracto glicólico de *C. sylvestris*, de origen comercial, se obtuvo a una concentración de 200 mg / ml (20%) eluido en 80% de propilenglicol. Los valores de MIC y CMM se determinaron por el método de microdilución en caldo, según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), estándares M27-A2, con modificaciones. A continuación, se iniciaron las pruebas en biofilms monotípicos de 48 h, con cambio de caldo cada 24 h, de estos microorganismos. Después de someterse a tratamientos, la biopelícula se preparó para la prueba metabólica MTT. Resultados: *Candida albicans* presentó MMC a 50 mg / mL, en *Candida glabrata* no hubo MIC y MMC. En la prueba MTT los resultados mostraron efectividad de la concentración de 25 mg / mL en *Candida glabrata*, con una reducción de $\geq 29\%$, en *Candida albicans* no hubo resultados significativos en las concentraciones analizadas. Conclusión: El extracto tuvo un efecto antimicrobiano contra el género probado. Destacamos también la importancia de las pruebas in vitro e in vivo que corroboren los resultados presentados, con el fin de incrementar la base para la aplicación del extracto.

Palabras clave: Antimicrobiano; Biopelícula; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Casearia sylvestris* Sw.

1. Introdução

Nos últimos tempos as infecções fúngicas têm se expandido em uma larga escala. O recente surgimento de fungos resistentes a mais de uma classe de antifúngicos é uma preocupação séria (Berman & Krysan, 2020). A *Candida albicans* é originalmente um fungo que possui uma grande capacidade de causar doenças na espécie humana (Lara *et al.*, 2018).

Atualmente, apenas três classes primárias de agentes são usadas para tratar infecções fúngicas invasivas (sendo eles os polienos, azóis e as equinocandinas), deste modo se uma classe de antifúngicos que se torna ineficaz no tratamento de uma infecção fúngica devido à resistência reduz as opções terapêuticas em pelo menos 33% e, frequentemente, em 50% porque os azóis e as equinocandinas não são ativos contra todos os fungos. Assim, a perda de um antifúngico por resistência tem um grande impacto no atendimento ao paciente (Berman & Krysan, 2020).

Um dos relevantes fatores que são importantes para a contribuição da patogenia da candidíase provem da sua capacidade em formar o biofilme (Lara *et al.*, 2018). A capacidade das espécies de *Candida* de formar biofilmes não é apenas relevante por sua capacidade de causar doenças, mas também tem um enorme efeito sobre interação fúngica com drogas (Berman & Krysan, 2020).

Os biofilmes de *Candida* são envoltos por uma substância exopolimérica ou matriz polimérica extracelular que protege o patógeno da exposição adversa (Lara *et al.*, 2018) tal como acontece com os biofilmes bacterianos, os fungos dentro dos biofilmes são muito menos suscetíveis a drogas antifúngicas, a condições ambientais e a defesa imunológica dos hospedeiros (Lara *et al.*, 2018; Desai *et al.*, 2014).

Segundo Donlan e Costerton (2002), podemos admitir que a nova definição de biofilme é baseada em uma comunidade microbiana sésil caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, interface ou entre si, sendo incorporadas a uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas e que exibem um fenótipo alterado em relação à sua taxa de crescimento e transcrição gênica. Os microorganismos desse tipo de comunidade apresentam menores taxas de

crescimento e maior resistência ao tratamento antimicrobiano, comportando-se de maneira muito diferente das células planctônicas (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Donlan & Costerton, 2002). Uma única espécie microbiana é capaz de formar biofilme, embora seja uma mistura de bactérias e espécies de fungos geralmente baseada na formação de biofilme in vivo (Douglas, 2003). Como 80% de todos os microrganismos vivem nesta forma, a formação de biofilme torna-se um campo irrevogável a ser explorado (Cavalheiro & Teixeira, 2018).

Apesar de a *Candida albicans* ser a espécie isolada com uma maior frequência, outras espécies como as não *albicans* tem vindo a propagar-se com uma maior agilidade. A *Candida glabrata* é uma das espécies emergentes como patógeno oportunista humano, e sendo responsável, na grande maioria das vezes, pelas candidoses invasivas em pacientes imunocomprometidos (Matilde, 2014). O percentual de resistência aos antifúngicos nesta espécie tem sido superior às outras do gênero *Candida*, por isso torna-se necessário um melhor conhecimento sobre seus mecanismos de virulência (Matilde, 2014).

Tendo em vista a crescente demanda da população em busca de melhor qualidade de vida e também diante do fato sobre o uso indevido destes fármacos ter proporcionado o desenvolvimento de microrganismos mais resistentes a sua atuação, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e pesquisas sobre novos medicamentos ou outros meios de atuação de forma eficaz e de maneira não tão invasiva na ação de combate no organismo destes indivíduos. Diante destes fatos o uso de extratos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos vem se apresentando como uma alternativa viável para a problemática em questão.

Plantas ricas em metabólitos secundários naturais são um dos reservatórios indispensáveis para a descoberta de recursos potenciais para amenizar esse problema (Mahizan *et al.*, 2019). Possuem uma ampla gama de atividades e funções, além de terem uma rica história de uso na medicina tradicional (Mahizan *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2019). As investigações sobre compostos extraídos de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas e antibiofilme é uma estratégia com relevância para muitas áreas (Ribeiro *et al.*, 2019).

Os mecanismos inibitórios dos compostos naturais em fungos são importantes para o desenvolvimento de novos produtos antifúngicos eficientes e sustentáveis (Bento *et al.*, 2014). Os agentes antimicrobianos podem compreender compostos de ocorrência natural, como os fitoquímicos e os óleos essenciais (Moo *et al.*, 2020), podem também ser semisintéticos ou sintéticos na natureza (Rudramurthy *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais são produzidos naturalmente a partir de plantas aromáticas, como as ervas, através de metabólitos secundários, podendo ser extraídos de várias partes do órgão da planta, como flores, botões, folhas, cascas, galhos, caule, madeira, semente ou de sua raiz (Mahizan *et al.*, 2019). Os óleos essenciais foram relatados como um agente antimicrobiano, antioxidante e inseticida proeminente, inibindo significativamente a produção de biofilme microbiano e o crescimento de bactérias, leveduras e fungos (Liu *et al.*, 2015).

A flora tropical é rica em diversas espécies e que podem servir como fonte de novos compostos antifúngicos. Dentre estas espécies as pertencentes ao gênero vegetal *Casearia* (*Salicaceae*) possuem várias propriedades medicinais descritas na literatura (Ferreira *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010).

A *Casearia sylvestris* Swartz é uma planta que possui distribuições nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil e também em outros países da América do Sul e Ásia (Ferreira *et al.*, 2011). Conhecida popularmente como “Guaçatonga” ela está presente no uso popular e tradicional no Brasil (Ferreira *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2011). Esta planta compõe uma das 71 espécies que podem tratar as doenças com alta incidência no Brasil estando ela descrita na “Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS” (RENISUS).

Segundo dados da literatura o extrato apresenta atividade contra bactérias resistentes do tipo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, porém inatividade contra outras bactérias comuns como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli*

(Mardegan, 2007), atividade antifúngica, inclusive em relação à *Candida albicans* (Arantes *et al.*, 2004), pronunciada atividade contra *Trypanosoma cruzi* (Espindola *et al.*, 2004), larvas de *Aedes aegypti* (Rodrigues *et al.*, 2006) e atividade antiplasmodial, inclusive contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, este que é o agente causador da malária (Mesquita *et al.*, 2007) também já foram relatadas. Segundo dados da literatura não se conhecem nenhuma contra indicação em relação ao seu uso e nenhuma interação medicamentosa (Mardegan, 2007).

Decorrente ao exposto e diante dos relatos bibliográficos a cerca das propriedades existentes no extrato natural da planta, este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* sobre cepas-padrão (ATCC – American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (ATCC 9030) em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM) e também sua ação sobre biofilmes.

2. Metodologia

A presente pesquisa aplicada foi baseada na metodologia segundo Santos *et al.* (2020) com modificações.

2.1 Composto

O extrato glicólico de Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) foi adquirido da empresa Flora Ervas® com os devidos laudos e especificações. O extrato foi obtido na concentração de 200 mg/ml (20%) eluídos em 80% de propilenoglicol.

2.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do composto foi realizada sobre cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (ATCC 9030). As cepas foram provenientes de doação do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT/UNESP).

2.3 Teste de microdiluição em caldo

Para a determinação da CIM (Concentração inibitória mínima) e CMM (Concentração microbicida mínima) foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) normas M27-A2, com modificações.

Para a realização do teste primeiramente as cepas de micro-organismos foram semeadas em meio sólido, Brain Heart Infusion (BHI – Himédia) e encubadas em estufa bacteriológica (37°C) por 24h para reativação. Passado o período de incubação foram alçadas algumas colônias das cepas reativadas, para que fossem diluídas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) formando uma suspensão microbiana, após a suspensão foram padronizadas em espectrofotômetro na concentração de 10⁶ células/mL, de acordo com as recomendações da (CLSI).

Após o preparo da suspensão de micro-organismos, foi iniciado o preparo das diluições dos extratos. Para isso foram distribuídas, nos poços da microplaca, 100 µL de meio de caldo RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pH 7,0 ± 0, para leveduras, utilizando 10 poços para cada grupo experimental de microrganismo. Passada esta etapa, 100 µL dos extratos, na concentração de 200 mg/mL, foram adicionados apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde partiu-se uma série de 10 diluições.

Após o preparo das diversas concentrações dos extratos foram adicionados 100 µL/poço dos inóculos padronizados, nos poços dos seus respectivos grupos. Após os procedimentos, as placas foram incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24h. Os testes foram realizados em duplicata.

A CIM, concentração capaz de inibir o desenvolvimento do micro-organismo, foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação após incubação.

Para determinar a CMM dos extratos, ou seja, concentração capaz de promover a morte do micro-organismo foi necessário inocular em ágar BHI, 10 µL dos poços da microplaca que não apresentaram turvação. Após incubação de 48h foi avaliado se as placas possuíam o crescimento de colônias, determinando assim a CMM de cada extrato, no rastro no qual não houve o desenvolvimento de colônias.

2.4 Biofilme Monotípico de *Candida albicans* e *Candida glabrata* e seu tratamento

Foram adicionados em placas de microtitulação de 96 poços (TPP) 200 µL/poço de suspensões microbianas padronizadas em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) a 107 UFC/mL em Caldo Yeast Nitrogen Base (YNB – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para *C. albicans* e *C. glabrata*.

Inicialmente foram inoculados 100 µL da suspensão de cada uma das espécies de *Candida* (107 céls/mL) padronizada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) (BD, Sparks, USA) e mais 100 µL do mesmo caldo puro. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 48 horas, para promover adesão do fungo com troca do meio em 24 horas.

Passado o período de formação de cada biofilme, estes foram colocados em contato com o extrato separadamente, pelos períodos de 5 min e 24h, na concentração efetiva pré-determinada (CMM) e superiores. Como controles foram utilizados soluções antimicrobianas conhecidas como a nistatina (para levedura).

Solução salina estéril foi utilizada como controle negativo. Posteriormente a aplicação do extrato os biofilmes foram lavados e encaminhados para os testes de mensuração ou avaliação da expressão gênica. Na mensuração foi avaliada a biomassa do biofilme através do teste de MTT. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental.

2.5 Atividades metabólicas dos micro-organismos pelo teste de MTT

Depois de submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste de MTT, para isso foram adicionados 200 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) a placa e esta foi incubada ao abrigo da luz por 1 hora em estufa a 37°C, passado o período de incubação foi retirada a solução de MTT e adicionado 200 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sobe agitação constante por 10 minutos. Após, a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm, as densidades ópticas obtidas foram convertidas, através da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

2.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como valores médios (\pm desvio padrão (DP)). As comparações entre as amostras de tratamento e controle foram realizadas por análise de variância unilateral (ANOVA) com testes post hoc de Tukey, Kruskal-Wallis ou Dunn usando o software Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Sabemos pela literatura que quando as células estão na fase planctônica, elas têm um fator de virulência associado menor do que no biofilme. Porém, em nosso trabalho achamos importante que ambas as situações fossem verificadas. Portanto,

para a análise planctônica, foi avaliado o teste para determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Microbicida Mínima.

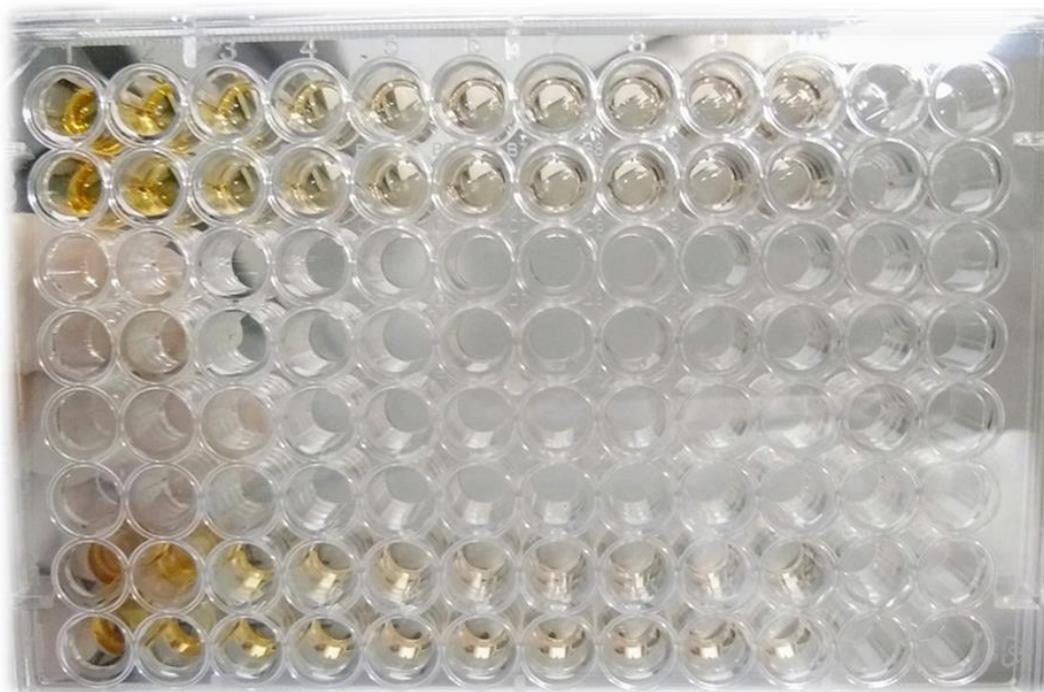
Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado o teste de microdiluição em caldo onde foram analisadas várias concentrações (Tabela I) do extrato de *Casearia sylvestris* em microplacas de 96 poços, os testes foram realizados em duplicata para cada micro-organismo analisado (Figura 1).

Tabela I - Diluições do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* adicionadas aos poços da microplaca.

Micro-organismos	Diluições do extrato (mg/mL)									
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
<i>Candida albicans</i>	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
<i>Candida glabrata</i>	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39

Fonte: Autores.

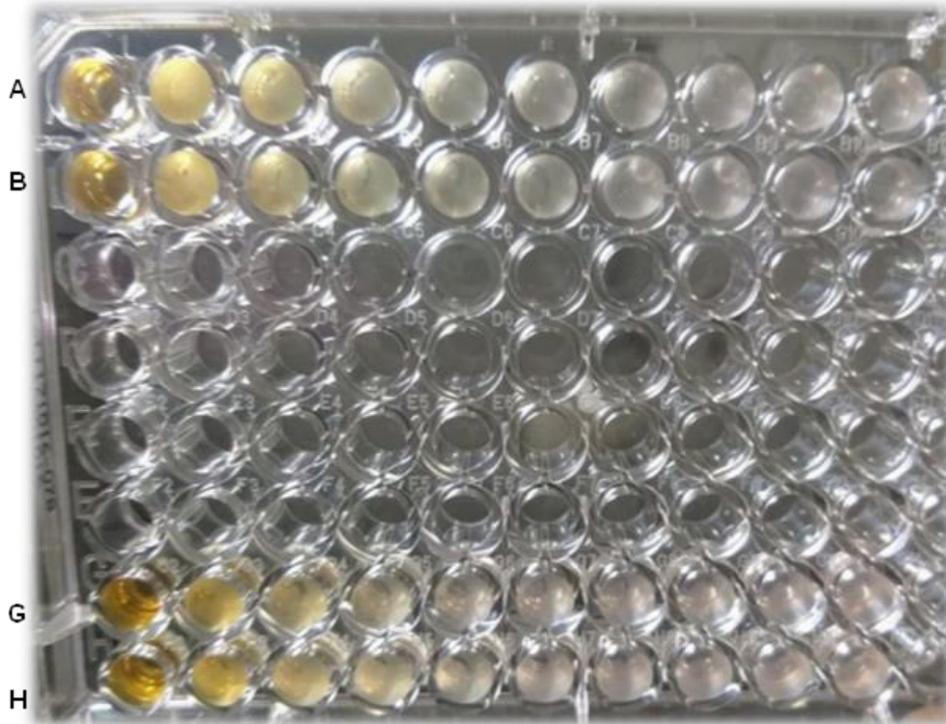
Figura 1 – Microplaca com as diferentes concentrações do extrato glicólico de *Casearia sylvestris*.



Fonte: Autores.

Após 24h de incubação da microplaca, com as respectivas cepas padronizadas, em estufa bacteriológica a 37°C foram analisadas visualmente as turvações em cada poço para determinação da CIM. Observou-se que em todos os poços havia turvações ao fundo em cada concentração analisada (Figura 2).

Figura 2 – Microplaca com as inoculações das cepas padronizadas de *Candida albicans* (A e B) e *Candida glabrata* (G e H) sobre as diferentes concentrações do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* após 24h de incubação.

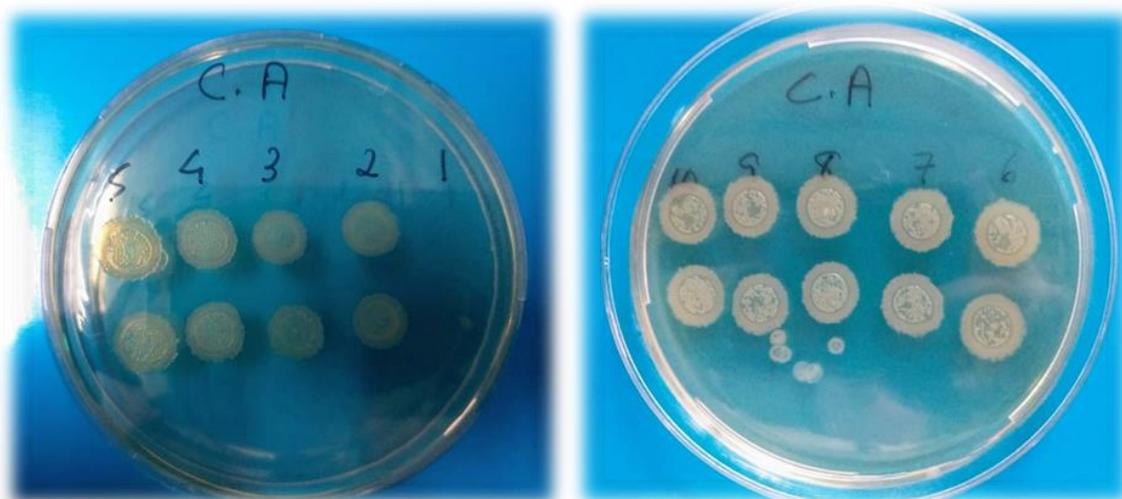


Fonte: Autores.

Para determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) 10µl da concentração de cada poço da microplaca foram semeados em placas de Petri contendo o meio de cultura adequado (ágar BHI) para o crescimento das leveduras que foi posteriormente incubado por 48h a 37°C.

Na avaliação das placas observou-se que *Candida albicans* não obteve um crescimento no primeiro poço, sendo o de maior concentração (50 mg/mL), nos demais poços avaliados pôde-se observar que o micro-organismo desenvolveu-se normalmente (Figura 3).

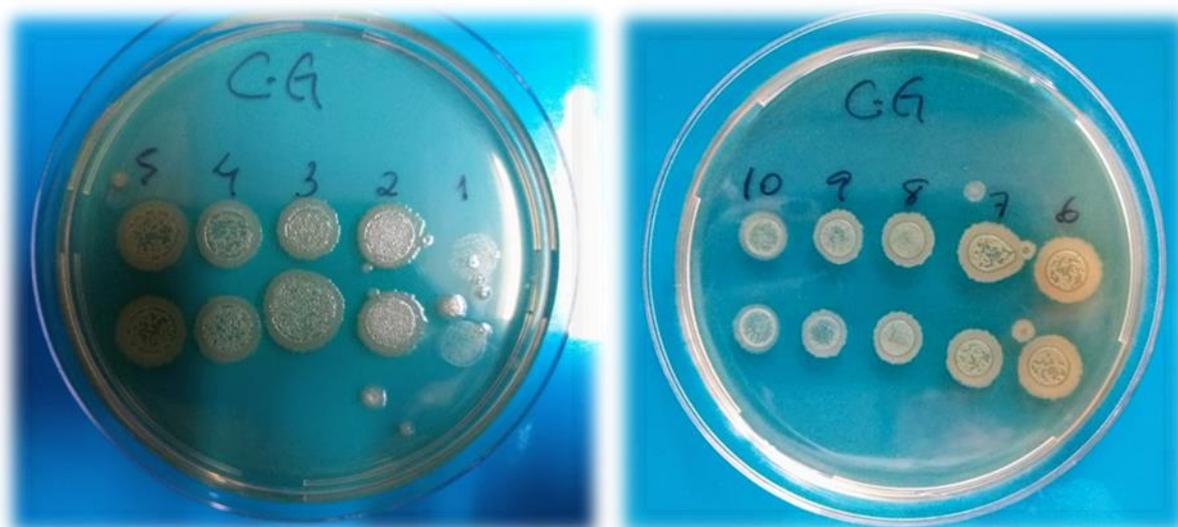
Figura 3 – Placas de Petri com a inoculação em ágar BHI de 10 µL de cada um dos poços da microplaca para determinar a CMM do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* em *Candida albicans*.



Fonte: Autores.

As placas contendo as avaliações sobre *Candida glabrata* demonstraram a resistência do micro-organismo sobre as diferentes concentrações do extrato (Figura 4).

Figura 4 – Placas de Petri com a inoculação em ágar BHI de 10 µL de cada um dos poços da microplaca para determinar a CMM do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* em *Candida glabrata*.

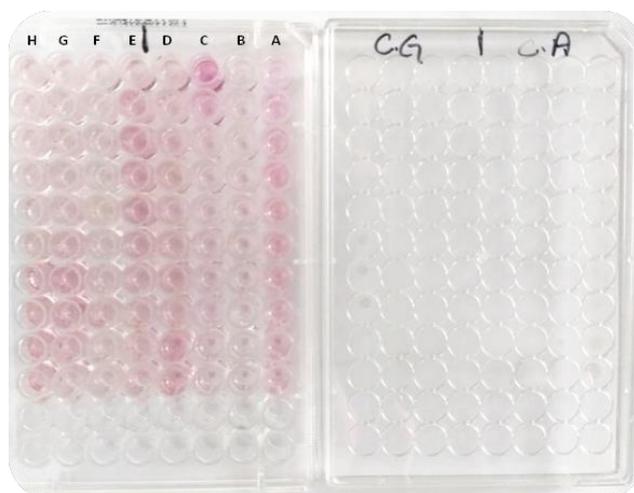


Fonte: Autores.

Diante dos resultados observados pode-se concluir que o extrato apresentou Concentração Microbiciada Mínima (CMM) apenas contra *C. albicans* na maior concentração de 50 mg/mL, já contra *C. glabrata* o mesmo não apresentou CIM nem CMM.

Após a obtenção dos dados referentes à CIM e CMM do extrato sobre os micro-organismos analisados foram realizado os procedimentos para formação do biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* e o seu respectivo tratamento para que fossem posteriormente preparados para análise do teste de MTT (Figura 5 e Figura 6) onde buscou determinar a susceptibilidade das células sésseis, ou seja, avaliar a viabilidade da biomassa da comunidade de células do biofilme formado.

Figura 5 – Microplaca de 96 poços após realização do teste de MTT. As siglas C.G e C.A na microplaca da esquerda correspondem a *Candida glabrata* e *Candida albicans* respectivamente, correspondendo aos micro-organismos presentes nos poços em tons de roxo à direita (A – D *Candida albicans* e E – H *Candida glabrata*).



Fonte: Autores.

Figura 6 – Microplaca de 96 poços após realização do teste de MTT com os micro-organismos de *Candida albicans* (CA) e *Candida glabrata* (CG).

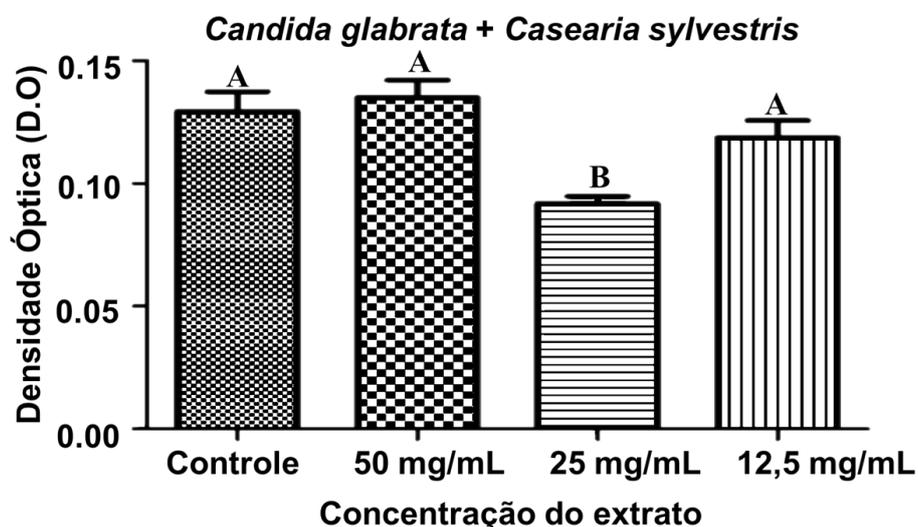


Fonte: Autores.

Após a realização das etapas do teste de MTT a microplaca contendo os respectivos biofilmes foi lida em leitora de microplaca em um comprimento de onda de 570 nm e as densidades ópticas obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo.

Os resultados obtidos de acordo com as densidades ópticas (D.O) de cada concentração analisada em relação ao controle foi possível observar que a concentração de 25 mg/mL do extrato analisada sobre os biofilmes formados por *C. glabrata* foram estatisticamente efetivos representando uma redução de $\geq 29\%$ das contagens viáveis da população microbiana, as demais concentrações avaliadas não demonstraram diferenças estatísticas entre os demais grupos (Figura 7).

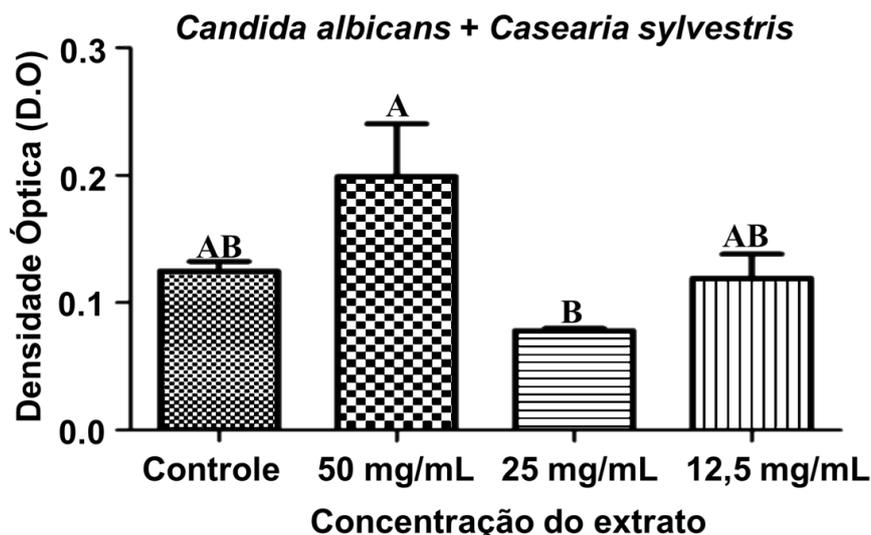
Figura 7 – Densidades ópticas das concentrações do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* sobre *Candida glabrata*.



Legenda: letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes (testes não paramétricos).
Fonte: dados analisados pelo GraphPad Prism.

Em relação aos dados das densidades ópticas das concentrações do extrato sobre *C. albicans* pôde-se observar que não houve resultados estatisticamente significativos das concentrações quando comparadas com o grupo controle, mas a concentração de 25 mg/mL quando estatisticamente analisada com a concentração de 50 mg/mL nota-se uma diferença entre essas concentrações em relação aos demais grupos (Figura 8). Apesar de não apresentar diferenças estatísticas da D.O com o controle a média da concentração de 25 mg/mL representou uma redução de $\geq 37\%$ das contagens viáveis desta população microbiana.

Figura 8 – Densidades ópticas das concentrações do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* sobre *Candida albicans*.



Legenda: letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes (testes não paramétricos).
Fonte: dados analisados pelo GraphPad Prism.

4. Discussão

A disponibilidade de agentes antifúngicos para o tratamento de infecções quando comparada com agentes antibacterianos são significativamente menores (Tsui, Kong & Jabra-Rizk, 2016; Nobile & Johnson, 2015). Isso se deve principalmente ao fato de que os fungos são eucarióticos e, portanto, a identificação de alvos para as drogas atuarem seletivamente nos patógenos fúngicos sem toxicidade para o hospedeiro torna-se complexa (Tsui, Kong & Jabra-Rizk, 2016).

Há uma diversidade de trabalhos realizados sobre a análise da atividade antimicrobiana dos extratos de *Casearia sylvestris* a cerca de diversos micro-organismos, com relação aos estudos sobre a formação de biofilme a *C. albicans* é provavelmente o melhor exemplo no sentido de poder formar biofilmes relativamente espessos sob muitas condições ambientais diferentes além de ser o mais amplamente estudado (Nobile & Johnson, 2015), contribuindo assim para a análise dos dados deste trabalho com outras publicações.

Tendo em vista que outras espécies como as não *albicans* têm vindo a se propagar com uma maior agilidade (Matilde, 2014), apenas poucas espécies de *Candida*, por exemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*, são colonizadores bem sucedidos de um hospedeiro humano (Polke et al., 2015). Diante disto, novas pesquisas com investigações de controle a estas espécies tornaram-se necessárias para a sua compreensão e controle. Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiu realizar uma análise comparativa com os demais estudos em relação ao uso do extrato de *Casearia sylvestris* sobre *Candida* spp.

Em estudos direcionados por Mardegan (2007) foram realizados experimentos usando a técnica de microdiluição em caldo para determinar a atividade do extrato em diversas cepas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C.*

parapsilosis, *C. tropicalis*) onde suas análises demonstram resultados sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato diclorometânico nas cepas de *C. albicans* e *C. krusei* em uma concentração de 1000 µg/mL sendo considerado como um extrato de moderada atividade em relação a essas cepas, nos demais micro-organismos que foram analisados o extrato não obteve uma resposta significativamente relevante.

Ribeiro *et al.* (2019), utilizou o extrato sobre *C. albicans* e *Streptococcus mutans*, sua análise foi realizada com extratos de várias plantas de *Casearia sylvestris*, sendo de três variedades distintas (*lingua*, intermediária e *sylvestris*), que foram coletados em diferentes biomas brasileiros, seus resultados demonstraram que estas variedades apresentaram uma distribuição interessante com relação aos compostos químicos presentes (diterpenos e flavonóides) de acordo com seus ecossistemas originais. Além das diferenças morfológicas inerentes, também foi possível a observação de diferenças na composição do metabólito secundário em cada grupo, dependendo do local em que as amostras foram coletadas (Ribeiro *et al.*, 2019; Bueno *et al.*, 2015). Como resultado, os dados obtidos no ensaio antimicrobiano do estudo de Ribeiro *et al.* (2019) mostraram que a concentração de 0,50 mg/mL de extratos específicos inibiram $\geq 50\%$ das contagens viáveis da população microbiana.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstrou que o extrato de *Casearia sylvestris* apresentou uma Concentração Microbicida Mínima (CMM) apenas contra *C. albicans* em sua maior concentração analisada neste teste (50 mg/mL). Este resultado obtido quando em comparação aos citados anteriormente difere-se sobre a sua atividade fungicida quando avaliado os resultados sobre a CMM dos mesmos.

Em relação à *C. glabrata*, analisada neste estudo, o mesmo resultado observado em *C. albicans* não foi encontrado ao avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM) demonstrando uma resistência do patógeno em exposição às concentrações do extrato da planta realizado neste experimento.

Este resultado é semelhante ao encontrado por Güntzel (2008) que analisou os efeitos do extrato etanólico (EE) e do extrato aquoso (EA) das folhas de *Casearia sylvestris*. Os resultados encontrados sobre o EA em *C. albicans* e *C. glabrata* não demonstraram uma CIM nem CFM (Concentração Fungicida Mínima) já o EE teve como resultado para a CIM em 5,0 mg/mL em ambos os micro-organismos mas não demonstrou uma CFM sobre os mesmos (Güntzel, 2009).

Pereira *et al.* (2017) avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial puro e suas frações em *C. glabrata* e *C. albicans*, em seus resultados foi possível observar uma CIM em 125 µg/mL em *C. glabrata* e >250 µg/mL em *C. albicans*.

A presença de determinados compostos químicos presentes nos extratos de *Casearia sylvestris* são determinantes para sua ação antimicrobiana, dentre eles, os sesquiterpenos podem desempenhar um papel importante como agentes antifúngicos (Pereira *et al.*, 2017), eles podem atuar inibindo a formação de hifas de *C. albicans* (Xie *et al.*, 2015). Os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno podem ser absorvidos pela membrana celular dos fungos e atuar como agente antifúngico liberando drogas lipofílicas (Sarpietro *et al.*, 2015).

A presença destes compostos ou classes deles são descritas por alguns dos autores citados anteriormente neste trabalho onde realizaram a caracterização química do óleo essencial da *Casearia sylvestris*. Realizar uma avaliação comparativa dos resultados do presente trabalho com relação a estes componentes químicos relatados nos demais artigos sobre o efeito antimicrobiano não foi possível devido a não disponibilidade da descrição dos compostos químicos presentes no extrato utilizado durante os nossos estudos.

Após ter o conhecimento sobre as CIM e CMM do extrato de *Casearia sylvestris* em culturas planctônicas nosso trabalho buscou analisar também o efeito do extrato sobre os biofilmes, para esta análise a medição da atividade metabólica das células do biofilme foram avaliadas através do ensaio colorimétrico do teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

O teste colorimétrico de MTT tem como fundamento avaliar o crescimento celular com base na capacidade das

células vivas reduzirem o corante a um produto de tonalidade roxa/violeta (da Silva *et al.*, 2016). Os resultados obtidos nesta análise revelaram que a concentração de 25 mg/mL avaliada nos biofilmes formados por *C. glabrata* demonstrou ser estatisticamente eficaz contra o patógeno, representando uma redução de $\geq 29\%$ das contagens viáveis da população microbiana, as demais concentrações avaliadas neste microrganismo não demonstraram diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Os dados referentes aos biofilmes formados por *C. albicans* quando avaliados as suas densidades ópticas das concentrações do extrato pôde-se notar que não houve diferenças estatísticas significativas quando comparadas com o grupo controle, mas a concentração de 25 mg/mL quando estatisticamente analisada com a concentração de 50 mg/mL é possível observar-se uma diferença entre estas concentrações em relação aos demais grupos.

Ribeiro *et al.* (2019) descreve em seus estudos realizados com base na análise de várias plantas de *Casearia sylvestris* (das variedades *lingua*, intermediária e *sylvestris*) oriundas de diversos biomas brasileiros. Seus resultados sobre biofilmes formados por *Streptococcus mutans* e *C. albicans* nas concentrações de 0,50 mg/mL mostraram reduções significativas nas populações microbianas de *S. mutans* quando foram tratadas pelos extratos providos de FLO/SC (Florianópolis/SC) com uma redução de 53,84%, GUA/CE (Guaramiranga/CE) redução de 65,91% e PRE/SP (Presidente Venceslau/SP) com redução de 48,93% em comparação com o veículo de controle, já a redução da população microbiana de *C. albicans* foi observada quando tratada com os extratos vindos de PAC/CE (Pacoti/CE) com redução de 50,3% e PRE/SP com redução de 52,98% (Ribeiro *et al.*, 2019), estes resultados são pertencentes aos extratos da variedade *sylvestris* em que contemplam o bioma da Mata Atlântica.

Embora o teste MTT seja amplamente utilizado para avaliar as interações de vários compostos químicos em biofilmes (Santos *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2017; Paula-Ramos *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2013), as buscas realizadas nas bases de dados utilizadas neste trabalho (sendo as principais PubMed, Scielo e ScienceDirect) demonstram que ainda é necessário que mais estudos incorporem esta metodologia, por ser de fácil manuseio, relativamente mais barata quando comparada à técnicas como microscopia confocal e outras que visam visualizar o biofilme formado.

Os resultados obtidos apresentam um fator de análise difícil quando comparados a outros estudos devido a uma série de fatores como a variação natural da composição química do extrato analisado em cada estudo, como alguns trabalham com extratos glicólicos e outros aquosos, diferenças nos quimiotipos, épocas de colheita, métodos de extração dos componentes da planta além dos diferentes métodos de testes microbiológicos utilizados nos estudos e também as sensibilidades variáveis das cepas que foram analisadas em cada trabalho.

5. Conclusão

Apesar do desafio apresentado com o uso de nosso extrato, cujo microrganismo ainda precisa ser mais explorado, pudemos concluir que o extrato glicólico de *Casearia sylvestris* teve um efeito antimicrobiano significativo, contra os gêneros testados, que entre os fungos, se destaca hoje para caminhar em direção a um futuro de resistência. Muito se fala apenas em resistência bacteriana, porém atualmente o uso indiscriminado de medicamentos pode nos levar à era da resistência fúngica. Logicamente, ressaltamos a importância de outros testes *in vitro* e principalmente *in vivo* que corroborem os resultados apresentados, a fim de aumentar o uso do extrato de *C. sylvestris* e outros extratos naturais que se tornam uma alternativa no mundo da resistência microbiana.

Nós sugerimos que futuramente o extrato glicólico de *Casearia sylvestris* seja explorado em trabalhos posteriores com testes em cultura celular para a verificação de sua citotoxicidade e seu perfil anti-inflamatório.

Agradecimentos

Ao Banco Santander pela concessão da bolsa no Concurso de Iniciação Científica e Tecnológica 2019/2020 UNIP.

Os autores negam qualquer conflito de interesses.

Referências

- Arantes, A., Carvalho, E. da S., Medeiros, E. A. S., Farhat, C. K., & Mantese, O. C. (2004). Pediatric risk of mortality and hospital infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 25(9), 783–785. <https://doi.org/10.1086/502478>
- Bento, T. S., Torres, L. M. B., Fialho, M. B., & Bononi, V. L. R. (2014). Growth inhibition and antioxidative response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), 79–86. <https://doi.org/10.1111/lam.12159>
- Berman, J., & Krysan, D. J. (2020). Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(6), 319–331. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>
- Bueno, P. C., Pereira, F. M., Torres, R. B., & Cavalheiro, A. J. (2015). Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. *Journal of separation science*, 38(10), 1649–1656. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401421>
- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Silva, A. R., de Andrade Neto, J. B., da Silva, C. R., Campos, R. de S., Costa Silva, R. A., Freitas, D. D., *et al.* (2016). Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: Action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3551–3557. <https://doi.org/10.1128/AAC.01846-15>
- Oliveira, J. R., de Castro, V. C., das Graças Figueiredo Vilela, P., Camargo, S. E. A., Carvalho, C. A. T., Jorge, A. O. C., & de Oliveira, L. D. (2013). Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 208. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-208>
- Oliveira, J. R., de Jesus, D., Figueira, L. W., de Oliveira, F. E., Pacheco Soares, C., Camargo, S. E. A., *et al.* (2017). Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 242(6), 625–634. <https://doi.org/10.1177/1535370216688571>
- Desai, J. V., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(10), a019729–a019729. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019729>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00002-1)
- Espindola, L. S., Vasconcelos Júnior, J. R. e., de Mesquita, M. L., Marquié, P., de Paula, J. E., Mambu, L., & Santana, J. M. (2004). Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica*, 70(11), 1093–1095. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832655>
- Ferreira, P. M. P., Costa-Lotufo, L. V., Moraes, M. O., Barros, F. W. A., Martins, A. M. A., Cavalheiro, A. J., *et al.* (2011). Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 83(4), 1373–1384. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652011005000040>
- Ferreira, Paulo Michel Pinheiro, Santos, D. B., Silva, J. do N., Goudinho, A. F., Ramos, C. L. S., Souza, P. C. *et al.* (2019). Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS). *Journal of Ethnopharmacology*, 241(112004), 112004. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112004>
- Güntzel, A. R. D. C. (2009). Avaliação das atividades farmacológicas de extrato de *Casearia sylvestris* Sw. <http://hdl.handle.net/10737/85>
- Lara, H. H., Guisbiers, G., Mendoza, J., Mimun, L. C., Vincent, B., Lopez-Ribot, J. L., & Nash, K. L. (2018). Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2697–2708. <https://doi.org/10.2147/ijn.s151285>
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., & Duan, J. (2015). Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 421–430. <https://doi.org/10.1111/lam.12401>
- Mahizan, N. A., Yang, S.-K., Moo, C.-L., Song, A. A.-L., Chong, C.-M., Chong, C.-W., *et al.* (2019). Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(14), 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>
- Mardegan, R. C. (2007). Inhibitory activity of plant extracts on *Candida* spp and on proteinases synthesized by *Candida albicans*. <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/289371>
- Matilde, F. A. V. (2014). *Candida glabrata* an emerging pathogen? <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/13041/1/Matilde%20Filipa%20Alexandra%20Veiga.pdf>
- Mesquita, M. L., Grellier, P., Mambu, L., de Paula, J. E., & Espindola, L. S. (2007). In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.015>

- Moo, C.-L., Yang, S.-K., Yusoff, K., Ajat, M., Thomas, W., Abushelaibi, A., *et al.* (2020). Mechanisms of antimicrobial resistance (AMR) and alternative approaches to overcome AMR. *Current Drug Discovery Technologies*, 17(4), 430–447. <https://doi.org/10.2174/1570163816666190304122219>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Paula-Ramos, L., da Rocha Santos, C. E., Camargo Reis Mello, D., Nishiyama Theodoro, L., De Oliveira, F. E., Back Brito, G. N., *et al.* (2016). *Klebsiella pneumoniae* planktonic and biofilm reduction by different plant extracts: In vitro study. *TheScientificWorldJournal*, 2016, 3521413. <https://doi.org/10.1155/2016/3521413>
- Pereira, Flaviane G., Marquete, R., Domingos, L. T., Rocha, M. E. N., Ferreira-Pereira, A., Mansur, E., & Moreira, D. L. (2017). Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(4), 2817–2824. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170339>
- Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* survival strategies. *Advances in Applied Microbiology*, 91, 139–235. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>
- Ribeiro, S. M., Fratucelli, É. D. O., Bueno, P. C. P., de Castro, M. K. V., Francisco, A. A., Cavalheiro, A. J., & Klein, M. I. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2717-z>
- Rodrigues, A. M. S., De Paula, J. E., Degallier, N., Molez, J. E., & Espindola, L. S. (2006). Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(2), 314–317. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[314:LAOSCP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[314:LAOSCP]2.0.CO;2)
- Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(7), 836. <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>
- Santos, A. G., Ferreira, P. M., Vieira Júnior, G. M., Perez, C. C., Gomes Tininis, A., Silva, G. H., Bolzani, V., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., & Cavalheiro, A. J. (2010). Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chemistry & biodiversity*, 7(1), 205–215. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800342>
- Santos, P. B. do R. E. D., Ávila, D. da S., Ramos, L. de P., Yu, A. R., Santos, C. E. da R., Berretta, A. A., *et al.* (2020). Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 36(7), 834–845. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1823972>
- Sarpietro, M. G., Di Sotto, A., Accolla, M. L., & Castelli, F. (2015). Interaction of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. *Thermochimica Acta*, 600, 28–34. doi:10.1016/j.tca.2014.11.029
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Xie, C., Sun, L., Meng, L., Wang, M., Xu, J., Bartlam, M., & Guo, Y. (2015). Sesquiterpenes from *Carpesium macrocephalum* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and dimorphism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(22), 5409–5411. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.09.013>