

Avaliação de Susceptibilidade *in vitro* de *Candida albicans* ao Ácido Gálico e ao Ácido Elágico

Leonardo Teixeira Ramos, Carmem Bianca Mecena do Espirito Santo, Carlos Antonio Spinosa Colatrelo, Luciana Lopes Guimarães

Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Rua Cesário Mota 8, F83A, 11045-040 Santos, São Paulo, Brazil.

E-mail: leoteixeira@unisanta.br

Resumo: A *Candida albicans* é uma levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios. O número restrito de classes de antifúngicos atualmente disponíveis e o aumento observado na resistência a estes antifúngicos levam a um crescente interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novas classes que atuem em diferentes alvos dos antifúngicos atualmente em uso. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do ácido gálico e do ácido elágico, compostos fenólicos naturalmente presente em diferentes espécies vegetais, em culturas de *Candida albicans* através do método de microdiluição.

Palavras chave: taninos; antifúngico, *Candida albicans*, ácido gálico, ácido elágico.

***In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to gallic acid and ellagic acid**

Abstract: *Candida albicans* is a yeast with a well-known pathogenic potential, with the ability to adhere to different mucous membranes and epithelia as the main factors of pathogenicity and virulence. The restricted number of antifungal classes currently available and the observed increase in resistance to these antifungals lead to a growing interest in research and development of new classes that act on different targets of the antifungals currently in use. In this context, the present study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of gallic acid and ellagic acid, phenolic compounds naturally present in different plant species, in cultures of *Candida albicans* through the microdilution method.

Keywords: tannins; antifungal, *Candida albicans*, gallic acid, ellagic acid.

Introdução

Candida é um gênero de fungos classificados como oportunistas, capazes de causar doenças infecciosas denominadas coletivamente de candidíase. A manifestação clínica mais comum da candidíase é a infecção vaginal, chamada monilíase vaginal ou vulvovaginite por *Candida* [1].

As infecções causadas pelo gênero *Candida* não se restringem à região genital feminina, podendo também acometer outras áreas como pele e vísceras, podendo adquirir caráter grave nas manifestações sistêmicas. O tratamento desta infecção fúngica inclui agentes tópicos e sistêmicos, sendo os mesmos utilizados de forma

profilática (em imunodeprimidos) e de forma terapêutica. Em infecções localizadas, os agentes tópicos são preferidos. Um exemplo disso é a manifestação oral da candidíase, especialmente nas formas pseudomembranosa e eritematosa, com tratamento realizado com medicamentos tópicos como a nistatina. Em infecções generalizadas e mais graves, usam-se agentes sistêmicos. O uso clínico de medicamentos como antibióticos de largo espectro também contribui para o aumento do risco das formas graves das infecções fúngicas, atualmente classificadas como Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) [2].

As IFIs representam uma relevante causa de enfermidade e mortalidade mundialmente, especialmente em indivíduos imunodeprimidos e, dentre os principais gêneros de fungos causadores de IFIs encontra-se o gênero *Candida*, sendo este associado às fungemias hospitalares, principalmente em setores críticos, como as unidades de terapia intensiva (UTI's). Este patógeno associa-se a internação prolongada, alta taxa de mortalidade e elevado custo hospitalar [3]. Em casos de infecção grave e sistêmica, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica.

O aumento observado na incidência de IFIs vem acompanhado pelo surgimento de cepas de fungos resistentes às classes de antifúngicos disponíveis, podendo resultar em falha terapêutica, fatos que tem estimulado a procura de opções terapêuticas aos antifúngicos utilizados na clínica médica. Quando comparados aos antimicrobianos do tipo antibacterianos, existe um número limitado de classes de drogas disponíveis contra infecções fúngicas, o que leva a um crescente interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novas classes que atuem em diferentes alvos dos antifúngicos atualmente em uso [4]. A toxicidade atribuída a determinadas classes de antifúngicos, por ex. a nefrotoxicidade associada ao uso de anfotericina B e a hepatotoxicidade associada ao uso de cetoconazol, também estimula a busca de novas moléculas que sejam seletivas/específicas para o metabolismo fúngico e que apresentem baixa toxicidade para humanos [5,6].

Neste contexto, alternativas à base de compostos naturais, tais como os compostos fenólicos, os óleos essenciais e extratos de produtos naturais, têm sido propostos [7]. Existe um interesse crescente em revisitar produtos naturais para a descoberta de novos medicamentos. Historicamente, produtos naturais obtidos de plantas e animais foram as fontes de praticamente todas as preparações medicinais e, mais recentemente os produtos naturais continuam a entrar ensaios clínicos ou então

forneem protótipos moleculares para compostos que entraram em ensaios clínicos, particularmente agentes antineoplásicos e antimicrobianos [8]. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de dois compostos isolados de origem vegetal: ácido gálico e ácido elágico.

O ácido gálico é um composto fenólico presente em diferentes espécies vegetais como *Hamamelis* spp (“Hamamelis”) e *Terminalia catappa* (“chapéu-de-sol”). O ácido gálico é encontrado tanto na forma livre quanto como parte da estrutura de taninos [9, 10]. Já o ácido elágico é um composto polifenólico presente em diferentes espécies vegetais, tais como *Punica granatum* (“romã”) e *Terminalia catappa* (“chapéu-de-sol”) [10].

Metodologia

Cultura de fungos : Leveduras de *Candida albicans* foram cultivadas em meio líquido (caldo Sabouraud-dextrose) e as culturas serão mantidas a 37° C em estufa.

Preparo do inóculo: Leveduras de *Candida albicans* foram cultivadas em caldo Sabouraud-dextrose em temperatura de 35°C, com ao menos três repiques sucessivos de 24 horas previamente ao experimento. Para a realização dos ensaios de susceptibilidade *in vitro* com o ácido gálico e o ácido elágico, no dia do experimento as leveduras serão contadas e a suspensão do inóculo foi ajustada para $2,5 \times 10^3$ céls/mL em caldo Sabouraud-dextrose.

Testes de susceptibilidade *in vitro*: Para realização dos testes de susceptibilidade para a avaliação do efeito antifúngico do ácido gálico e ácido elágico (Sigma-Aldrich), foi utilizado o método de microdiluição, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo documento CSLI M27 A-3 [11] com modificações. O ácido gálico foi testado em concentrações que variam de 1,25 a 10 mg/mL e as microplacas serão incubadas a 35° C por 24h. A menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo nos poços será identificada como a Concentração Mínima Inibitória (CIM) da substância para este microrganismo. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes, sendo realizados controles com os diluentes dos inibidores (controle-inóculo) em suas concentrações finais. Adicionalmente, para cada ensaio, foram realizados controles com fluconazol (64 µg/mL).

Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram atividade antifúngica em culturas de *Candida albicans*, na concentração 5 mg/mL de ácido gálico (figura 1), sendo esta concentração definida como a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

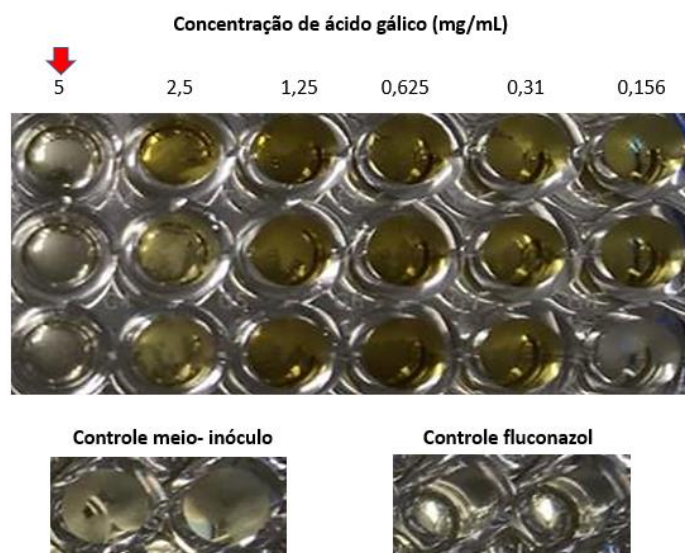


Figura 1. Resultado das análises da atividade antifúngica do ácido gálico. A seta vermelha indica a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os resultados obtidos para as análises com o ácido elágico revelaram a CIM de 5 mg/mL (figura 2).

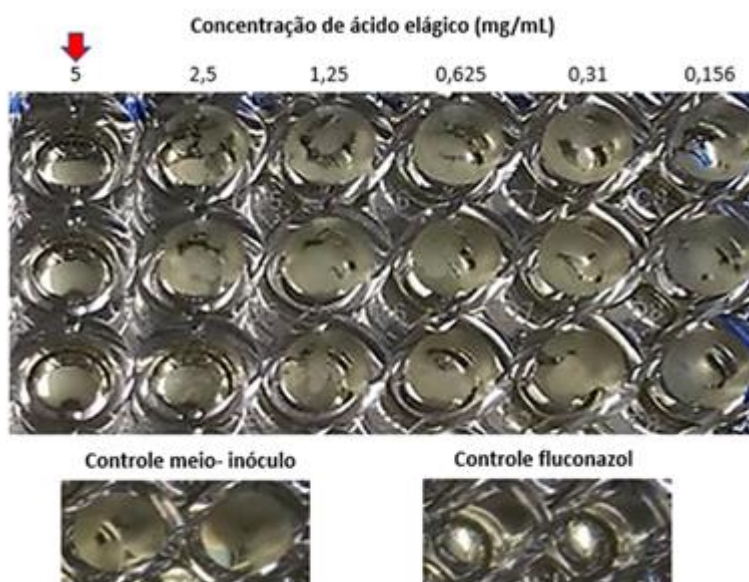


Figura 2. Resultado das análises da atividade antifúngica do ácido elágico. A seta vermelha indica a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A combinação dos resultados gerados a partir deste estudo poderá levar à otimização destas moléculas através de modificações na estrutura molecular, visando a síntese de novos antifúngicos altamente específicos e eficazes no tratamento de diferentes infecções fúngicas.

Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o potencial antifúngico *in vitro* do ácido gálico e do ácido elágico em culturas de *Candida albicans*.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao apoio dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na forma de concessão de bolsa de iniciação científica (PIBIC-CNPq).

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2008: Rename 2006. Brasília : Ministério da Saúde, 2008.
2. Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In Combating Fungal Infections, Ahmad et al. (eds.), 2010. DOI 10.1007/978-3-642-12173-9_2, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. MIMICA, et al.. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009, 45: 1.
4. Ramana, K V, Sabitha Kandi, Venkata Bharatkumar P, CH V Sharada, Ratna Rao, Ratna Mani, and Sanjeev D Rao. Invasive Fungal Infections: A Comprehensive Review. American Journal of Infectious Diseases and Microbiology 2013, 1, (4): 64-69.
5. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev Iberoam Micol. 2009, 31;26(4):223-7.
6. Yan JY, Nie XL, Tao QM, Zhan SY, Zhang YD. Ketoconazole associated hepatotoxicity: a systematic review and meta- analysis. Biomed Environ Sci. 2013, 26(7):605-10.
7. Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IR, Svidzinski TI, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. Molecules 2014,19(3):2925-56.
8. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nat Rev Drug Discov. 2015, 14:111-29.
9. Natella, F., Guantario, B., Ambra, R., Ranaldi, G., Intorre, F., Burki, C., & Canali, R.. Human metabolites of Hamaforton™(hamamelis virginiana L. Extract) modulates fibroblast extracellular matrix components in response to UV-A irradiation. Frontiers in Pharmacology 2021, 12, 747638.
10. Terças A. G., Monteiro A.S., Moffa E.B., Santos J.R.A., Sousa E.M., Pinto A.R.B., Costa P.C.S., Borges A.C.R., Torres L;M.B., Barros A.K.D, Fernandes E.S.,

Monteiro C.A. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. *frontiers in Microbiology* 2017, 8 : 595.

11. CSLI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard, M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.