



DOI: 10.14295/cad.cult.cienc.v19i2.3078

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ (PAU FERRO)

João Pereira da Silva Júnior<sup>1</sup>, Luciene Ferreira de Lima<sup>2</sup>, Antonia Thassya Lucas dos Santos<sup>3</sup>, Antonio Júdsen Targino Machado<sup>4</sup>, Rafael Pereira da Cruz<sup>5</sup>, Thiago Sampaio Freitas<sup>2</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>6</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>6</sup>, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga<sup>7\*</sup>

**Resumo:** Os fungos são micro-organismos comuns no ambiente, sendo que alguns vivem de forma comensal, habitando a superfície da pele, mucosas, trato respiratório, gastrointestinal e urogenital de humanos e animais, como é o caso das espécies pertencentes ao gênero *Candida*. O fluconazol é um dos fármacos mais usados para combater as enfermidades causadas por esses micro-organismos, atuando em um alvo específico dos fungos, entretanto, muitas linhagens já lhe são resistentes. A resistência a medicamentos tem despertado a necessidade de procurar novas alternativas de cunho natural. *Libidibia ferrea* popularmente conhecida como jucá ou pau ferro é uma espécie vegetal da família Fabaceae, que possui em sua composição substâncias avaliadas quanto a seu efeito antimicrobiano. Este estudo tem como objetivo verificar o efeito antifúngico do extrato, sozinho e combinado com o Fluconazol na inibição de crescimento de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida kruzei*, bem como na virulência fúngica. Os ensaios para determinação da Concentração Inibitória de 50% dos micro-organismos (CI<sub>50</sub>), foram realizados por microdiluição (8.192 a 8 µg/mL) e na combinação extrato/fármaco, o extrato foi avaliado em concentração subinibitória (CFM/16). A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi verificada por subcultivo em meio sólido. O efeito inibidor sobre a morfologia fúngica foi verificado em câmaras úmidas. O extrato apresentou efeito inibidor sobre os micro-organismos em concentrações elevadas e sem relevância clínica, demonstrando um comportamento de resistência ao extrato em questão. A CI<sub>50</sub> evidencia a potencialização do fármaco pelo extrato, onde a combinação dos dois reduziu a concentração de efeito do fluconazol frente a todas as linhagens. A CFM foi  $\geq 16.384$  µg/mL. Em relação a morfologia fúngica, o extrato inibiu a transição morfológica de *C. albicans* e *C. tropicalis* na concentração mais elevada. A espécie tem constituintes ativos para potencialização de efeito de fármaco comercial e para interferir na expressão de um importante fator de virulência fúngica.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica. Modulação. Antipleomorfismo.

<sup>1</sup>Graduado em C. Biológicas, Universidade Regional do Cariri - URCA

<sup>2</sup> Doutorandos, Programa de Pós-graduação em Química Biológica – URCA

<sup>3</sup> Mestra em Etnobiologia e Conservação da Natureza - UFRPE/URCA/UEPB/EFPE

<sup>4</sup> Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal da Paraíba – UFPB

<sup>5</sup>Especialista em Saúde Pública e Vigilância Sanitária pela Faculdade Venda Nova do Imigrante – FAVENI

<sup>6</sup> Docentes, departamento de Química – URCA

<sup>7</sup> Docente, departamento de C. Biológicas – URCA

\*Autor correspondente: [flaviana.morais@urca.br](mailto:flaviana.morais@urca.br)

Enviado: 09/12/2020 Aceito:29/12/2020

## EVALUATION OF THE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ (PAU FERRO) AQUEOUS LEAF EXTRACT ANTIFUNGAL ACTIVITY

**Abstract:** Fungi are microorganisms common in the environment, and some live in a commensal way, inhabiting the surface of the skin, mucous, respiratory tract, gastrointestinal and urogenital of humans, among other animals such as the species belonging to the genus *Candida*. Fluconazole is one of the most commonly used drugs to combat the diseases caused by these microorganisms, acting on a specific fungal target, however, many strains are already resistant to it. Drug resistance has awakened the need to look for new alternatives to a natural nature. *Libidibia ferrea* popularly known as jucá or pau ferro is a plant species of the Fabaceae family, which has in its composition substances evaluated for their antimicrobial effect. Assays for determination of 50% Inhibitory Concentration of Microorganisms (IC<sub>50</sub>) were performed by microdilution (8,192 to 8 µg/mL) and in the extract/drug combination the extract was evaluated at subinhibitory concentration (CFM/16). The Minimum Fungicide Concentration (MFC) was verified by subculture in solid medium. The effect on fungal morphology was verified in humid chambers. The extract influenced the microorganisms in high concentrations and without clinical relevance, demonstrating the behavior of resistance to the extract in question. The IC<sub>50</sub> shows the potentiation of the drug by the extract, where the combination of the two reduced the concentration of fluconazole effect against all strains. The MFC was  $\geq 16,384$  µg/mL. In relation to fungal morphology, the extract inhibited the morphological transition of *C. albicans* and *C. tropicalis* in the highest concentration. The species has potential for drug modulation and inhibition of fungal virulence.

**Keywords:** Antifungal activity. Modulation. Anti-pleomorphism.

### Introdução

Os fungos são micro-organismos comuns no ambiente, sendo que alguns vivem de forma comensal, habitando a superfície da pele, mucosas, trato respiratório, gastrointestinal e urogenital de humanos, entre outros animais. Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre as partes, esses fungos podem causar graves infecções (JANBON *et al.*, 2019).

Geralmente as infecções por fungos são predominantemente causadas por leveduras do gênero *Candida*. Este gênero quando estimulado, seja por fatores externos ou internos pode modificar sua morfologia, alterando sua forma de leveduras para pseudo-hifas ou hifas caracterizando um estado de virulência considerável (ROMO; KUMAMOTO, 2020; SINGH; TÓTH; GÁCSER, 2020).

A candidíase invasiva é reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no ambiente de saúde. Entretanto, outras espécies não-*albicans* tem aparecido em meios de isolados, tais como, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (PAPPAS *et al.* 2018; TAEI;

CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI, 2019).

No geral, o tratamento da candidíase é feito através de medicamentos do tipo oral, ou por contato no local afetado, usando azóis, polienos, alilaminas e equinocandinas, mas alguns podem ter efeitos colaterais, baixa absorção e eficácia limitada (BOYCE, *et al.*, 2019). O fluconazol é um dos antifúngicos mais usados para combater essa enfermidade, atuando em um alvo específico dos fungos, principalmente na inibição de determinada enzima lanosina-14 $\alpha$ -desmetilase, gerando um efeito fungistático (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Quando se trata de *Candida* spp as infecções têm mudado de forma significativa no decorrer dos anos. Mesmo com a descoberta de novas alternativa eficazes e existindo à disposição agentes antifúngicos, várias doenças causadas por fungos de cunho invasivo, ainda são responsáveis por altas taxas de mortalidade, salientando a candidíase invasiva. Dessa forma, o diagnóstico precoce somado ao tratamento eficaz são importantes para um prognóstico satisfatório (ALVAREZ-MORENO; 2019). A resistência a esses medicamentos tem despertado a necessidade de procurar novas alternativas de cunho natural e através de testes tem se observado que muitas plantas possuem princípio ativo em combate a diversas doenças (ZIDA *et al.*, 2017).

Os vegetais possuem uma diversidade de compostos ativos que são capazes de tratar muitas doenças, sendo extraídos de diversas partes, principalmente folhas (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Os fitoterápicos quando comparados aos produtos sintéticos possuem uma menor toxicidade, fator predominante em terapias dos grupos de cunho prioritário, como idosos, gestantes e crianças (SCHEFFELMEIER; MIASATO; VIEIRA; 2018). Estes produtos fitoterápicos desde muito tempo são utilizados na medicina popular para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos patogênicos, inclusive por fungos do gênero *Candida* (FENNER *et al.*, 2006).

O gênero *Libidibia* da família Fabaceae inclui 500 espécies, distribuídas em todo o mundo, a exemplo de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz também conhecida por “jucá” ou pau ferro ([Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea](#) - Sinonímia). *Libidibia ferrea* é caracterizada pelo seu conteúdo de polifenóis, terpenos e esteroides, bem como substâncias polissacarídicas que são principalmente responsáveis por suas propriedades biológicas (SOARES, 2015). Na medicina popular tem sido usada para tratar corrimento e inflamação uterina (VIEIRA; SOUSA; LEMOS, 2015), sintomas que podem estar associados à candidíase vulvovaginal (YANO *et al.*, 2018).

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo conhecer o potencial antifúngico de *Libidibia ferrea* no combate às espécies de *Candida*, seja na forma individual e combinado com o fluconazol e ainda seus efeitos na morfologia fúngica.

## **Material e Métodos**

### **Coleta do Material Vegetal**

O material botânico foi coletado às 09:00 ± 00:30 h no Horto de Plantas Medicinais da URCA (07°, 14', 19,3" de latitude Sul e 39°, 24', 53,8" de longitude West de Greenwich), cidade do Crato, Ceará, Brasil. Um exemplar de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz foi depositado no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, da Universidade Regional do Cariri - URCA, com o número de registro 13.905.

### **Preparação dos Extratos**

Para preparação do extrato foram utilizadas 1 kg de folhas frescas da *L. ferrea*, cortadas e colocadas em recipiente de vidro e em seguida submersas em 1,5 L de água destilada à temperatura de 80 °C, por 3 horas. Após este período o material foi filtrado, armazenado em recipientes de 150 mL e levados ao freezer para congelamento. Em seguida o extrato foi liofilizado modelo (Liotop L101), acondicionado em vidro âmbar e armazenado em congelador.

### **Diluentes, droga, meios de cultura e linhagens**

Nos ensaios microbiológicos foram utilizados como agentes solubilizadores dos extratos o Dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril. O fluconazol (cápsula - FLUCOMED) foi o fármaco de referência comercial. O meio de cultura no qual foi mantido o acervo microbiológico foi o *Ágar Sabouraud* Dextrose (ASD – KASVI), bastante utilizado para viabilização de culturas de leveduras. Antes de cada teste foram feitos subcultivos em placas de *Petri* contendo o mesmo meio para garantir o crescimento de linhagens jovens e viáveis. Para os testes realizados por microdiluição, o meio de cultura utilizado foi o *Caldo Sabouraud* Dextrose (CSD – KASVI) duplamente concentrado assegurando plenas condições de crescimento dos micro-organismos usados nos testes.

Os micro-organismos utilizados foram linhagens dos tipos padrão (CA INCQS 40006, CT INCQS 40042 e CK 40095), obtidas da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Estas linhagens fazem parte do acervo

microbiológico do Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri (LMAC) da Universidade Regional do Cariri, onde são conservadas em meio de cultura sólido a uma temperatura de 8 °C. Antes de cada teste as linhagens foram subcultivadas em placa de *Petri* contendo ASD (24 horas a 37 °C) para renovação e crescimento. Utilizando-se a escala de *McFarland*, a concentração dos inóculos foi padronizada por comparação de turbidez com o padrão 0,5 da escala (NCCLS, 2002). Os inóculos, assim preparados, foram utilizados nos testes de microdiluição.

### **Preparo de soluções**

A solução matriz para teste foi preparada após terem sido pesados 0,15 g do extrato, que em seguida, foi diluído em 1 mL de DMSO. Foi pesada a mesma quantidade de fluconazol (cápsula - FLUCOMED), sendo este diluído em água destilada. Com a finalidade de obter a concentração desejada para realização dos testes, os extratos sofreram nova diluição, em água destilada e estéril, de forma que a concentração de DMSO não exercesse qualquer atividade nas células testadas (STOPPA, *et al.* 2009). A concentração matriz do extrato e do fluconazol foi 16.384 µg/mL.

### **Atividade antifúngica intrínseca: determinação da concentração capaz de inibir 50% de micro-organismos (IC<sub>50</sub>)**

Este ensaio microbiológico foi realizado pelo método da microdiluição em placas de 96 cavidades. Em cada poço foram adicionados 100 µL de CSD duplamente concentrado contendo 10% de suspensão fúngica. Procedendo a microdiluição, 100 µL do produto natural ou do fluconazol (16.384 µg/mL) foram inseridos na primeira cavidade, misturados e diluídos na solução previamente contida neste, sendo depois distribuídos às demais cavidades, passando por um processo de diluição seriada. Nesse processo, as concentrações nas cavidades variaram de 8.192 µg/mL a 8 µg/mL. O último poço permaneceu como controle positivo para o crescimento dos micro-organismos (JAVADPOUR *et al.*, 1996, com modificações nas concentrações e controles utilizados). Controles de diluição dos produtos (utilizando salina ao invés de inóculo) e de esterilidade do meio também foram realizados.

Todos os testes foram realizados em quadruplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e após este período procedeu-se a leitura em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda (luz visível) de 630 nm. Os dados obtidos na leitura espectrofotométrica foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e a CI<sub>50</sub> do

extrato de *L. ferrea* (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

### **Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Para realização do teste, foram colocadas em cada cavidade da placa do teste de CIM (exceto controle de esterilidade) uma pequena haste estéril, que após misturar o meio contido no poço, homogeneizando-o, foi repassada a uma placa de Petri grande contendo meio CSD, transferindo uma pequena alíquota da solução-teste (meio + inóculo + produto natural) para subcultivo de leveduras e verificação de viabilidade celular. Após 24 horas de incubação, as placas foram verificadas quanto ao crescimento ou ausência de crescimento de colônias de *Candida* (ERNST *et al.*, 1999, com modificações). A concentração na qual não se verificar crescimento de colônia fúngicas será considerada a CFM dos produtos avaliados. A ausência de crescimento indica um efeito fungicida e a diminuição deste revela um efeito fungistático.

### **Atividade antifúngica combinada com o fluconazol: determinação da Concentração Inibidora de 50% de micro-organismos (CI<sub>50</sub>)**

Foi avaliado o efeito da combinação do extrato com a droga de referência, para constatar se houve ou não potencialização da ação do antifúngico pelo extrato. Para tanto, foi utilizado o produto natural em concentração subinibitória (CFM/16), de acordo com a metodologia utilizada por Coutinho *et al.* (2008), com pequenas modificações. O efeito potencializador da ação do antifúngico é considerado sinérgico, o efeito prejudicial da atuação deste, é considerado antagônico. As cavidades da placa foram preenchidas com 100 µL de meio + inóculo + extrato e em seguida, 100 µL do fluconazol na concentração de 16.384 µg/mL foi adicionado em cada primeiro poço da coluna, para diluição seriada em concentrações que variaram de 8.192 a 8 µg/mL. O último poço da coluna foi destinado ao controle de crescimento fúngico. Foram realizados controles de diluição dos extratos (inóculo substituído por salina) e controle de esterilidade do meio. A atividade do fluconazol também foi determinada para fins comparativos de efeito, assim como o controle de diluição do mesmo. O teste foi realizado em quadruplicada e as placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. Leitura e controles foram realizados conforme Morais-Braga *et al.* (2016).

### **Avaliação do efeito sobre a transição morfológica**

Para verificar se o produto natural causa alguma modificação na morfologia fúngica, por meio da inibição de emissão de hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis micro morfológicas para observação de leveduras. Dentro da câmara úmida, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos três mL de meio PDA, empobrecido por diluição, contendo o produto natural nas concentrações 8.192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CSA), 2.048  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CSA/4) e 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CSA/16), onde CSA é a Concentração Superior Avaliada na microdiluição (primeiro poço). De placas de *Petri* previamente inoculadas, foram captadas alçadas de inóculos com alça calibrada (1  $\mu\text{L}$ ) e feitas duas estrias paralelas, sobre o meio já solidificado, sendo, em seguida, cobertas por uma lamínula estéril. As câmaras foram levadas à incubadora e após 24 h (37 °C) procedeu-se a visualização do cultivo em microscopia óptica utilizando objetiva de 40 X. Uma câmera fotográfica foi acoplada ao microscópio para captura de imagens, utilizando-se um zoom de 5 X. Um controle para crescimento de leveduras (cuja emissão de hifas seria estimulada pelo empobrecimento do meio) foi realizado. Os ensaios foram realizados de acordo com Sidrin e Rocha (2010) em observância aos experimentos de Arrua *et al.* (2014), com algumas modificações.

### **Análise estatística**

Os testes foram realizados em quadruplicada e os dados obtidos para cada concentração de amostra, através da leitura espectrofotométrica, foram verificados quanto à sua distribuição normal e, em seguida, analisados por ANOVA de uma via por meio do teste *post hoc* de Tukey. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram obtidos por regressão não linear para a finalidade da interpolação de valores a partir de curvas padrão (usando o *software Graphpad Prism*, v. 5.0). Os valores de crescimento da concentração estão representados em % e os valores da  $\text{IC}_{50}$  estão expressos como  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Resultados**

As Figuras 1, 2 e 3, mostram a inibição do crescimento dos micro-organismos CA INCQS 40006, CT INCQS 40042 e CK INCQS 40095, nas quais tanto a solução contendo apenas o fluconazol como solução com o extrato apresentaram efeito em concentrações mais altas, revelando resistência ao fármaco e o extrato em questão. A solução contendo o Fluconazol e o

extrato em concentração subinibitória (CFM/16) causou resultado relevante de inibição em concentrações menores, onde o extrato potencializou o efeito do fármaco.

As concentrações avaliadas apenas inibiram o crescimento fúngico, para efeito fungicida há necessidade de concentrações superiores (CFM)  $\geq 16.384 \mu\text{g/mL}$ , frente as cepas de *Candida* avaliadas. A concentração capaz de inibir 50% dos micro-organismos (CI<sub>50</sub>) pelo fluconazol foi mais baixa que a do extrato contra todas as linhagens, conforme pode ser verificado na tabela 1. Após combinação do fármaco com o extrato a concentração de efeito (IC<sub>50</sub>) foi reduzida em 63% (contra *C. albicans*), 72% (contra *C. tropicalis*) e 54% (contra *C. krusei*) relevando que o extrato potencializou o efeito do fluconazol.

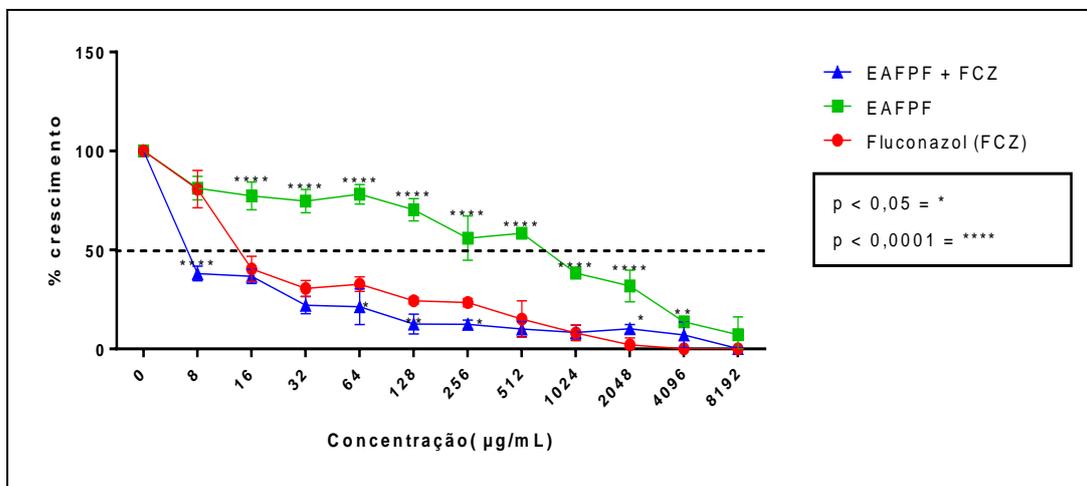
Em relação ao potencial fungicida do extrato do pau ferro, para se obter a CFM, seriam necessárias concentrações  $>8192 \mu\text{g/mL}$  visto que nesta, ainda se verificou formação de colônias. Portanto, o efeito verificado nos ensaios foi fungistático e não fungicida, pois o extrato apenas inibiu o crescimento de colônias fúngicas, sem causar mortalidade celular.

**Tabela 1.** Concentrações capazes de inibir 50 % dos micro-organismos (IC<sub>50</sub>)

Linhagens	FCZ	EAFLF	EAFLF+FCZ
CA INCQS 40006	16,28 $\mu\text{g/mL}$	631,01 $\mu\text{g/mL}$	5,25 $\mu\text{g/mL}$
CT INCQS 40042	234,10 $\mu\text{g/mL}$	3351,71 $\mu\text{g/mL}$	3,76 $\mu\text{g/mL}$
CK INCQS 40095	14,83 $\mu\text{g/mL}$	1002,89 $\mu\text{g/mL}$	8,55 $\mu\text{g/mL}$

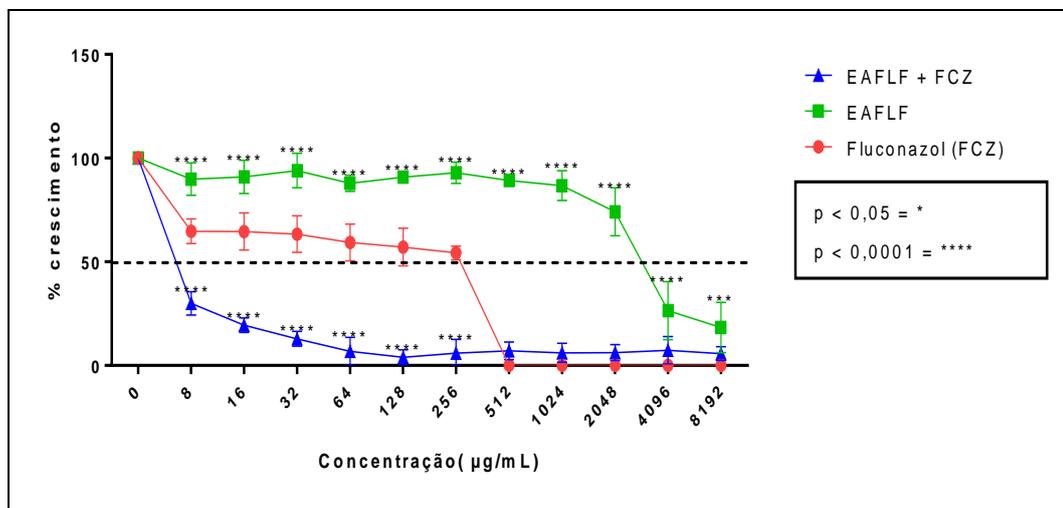
**Legenda:** CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida Krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade e saúde; FCZ: Fluconazol; EAFLF: Extrato Aquoso das Folhas de *Libidibia ferrea*.

**Figura 1.** Efeito do Extrato Aquoso das Folhas de *Libidibia ferrea* contra *Candida albicans*.



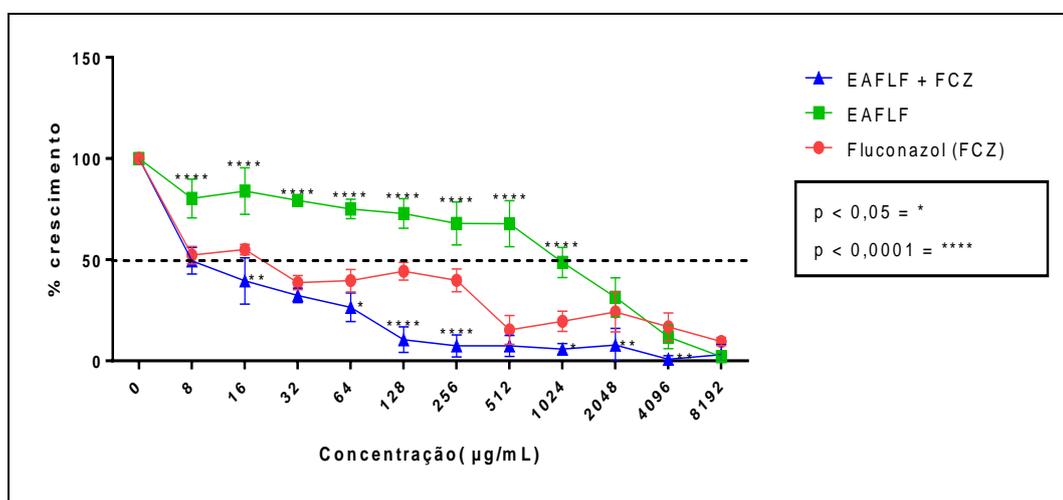
**Legenda:** EEAFLF: Efeito do Extrato Aquoso da Folha de *Libidibia ferrea*; FCZ: Fluconazol

**Figura 2.** Efeito do Extrato Aquoso das Folhas de *Libidibia ferrea* contra *Candida tropicalis*.



**Legenda:** EAF LF: Efeito do Extrato Aquoso da Folha da *Libidibia ferrea*; FCZ: Fluconazol.

**Figura 3.** Efeito do Extrato Aquoso das Folhas de *Libidibia ferrea* contra *Candida krusei*



**Legenda:** EEAFLF: Efeito do Extrato Aquoso da Folha de *Libidibia ferrea*; FCZ: Fluconazol

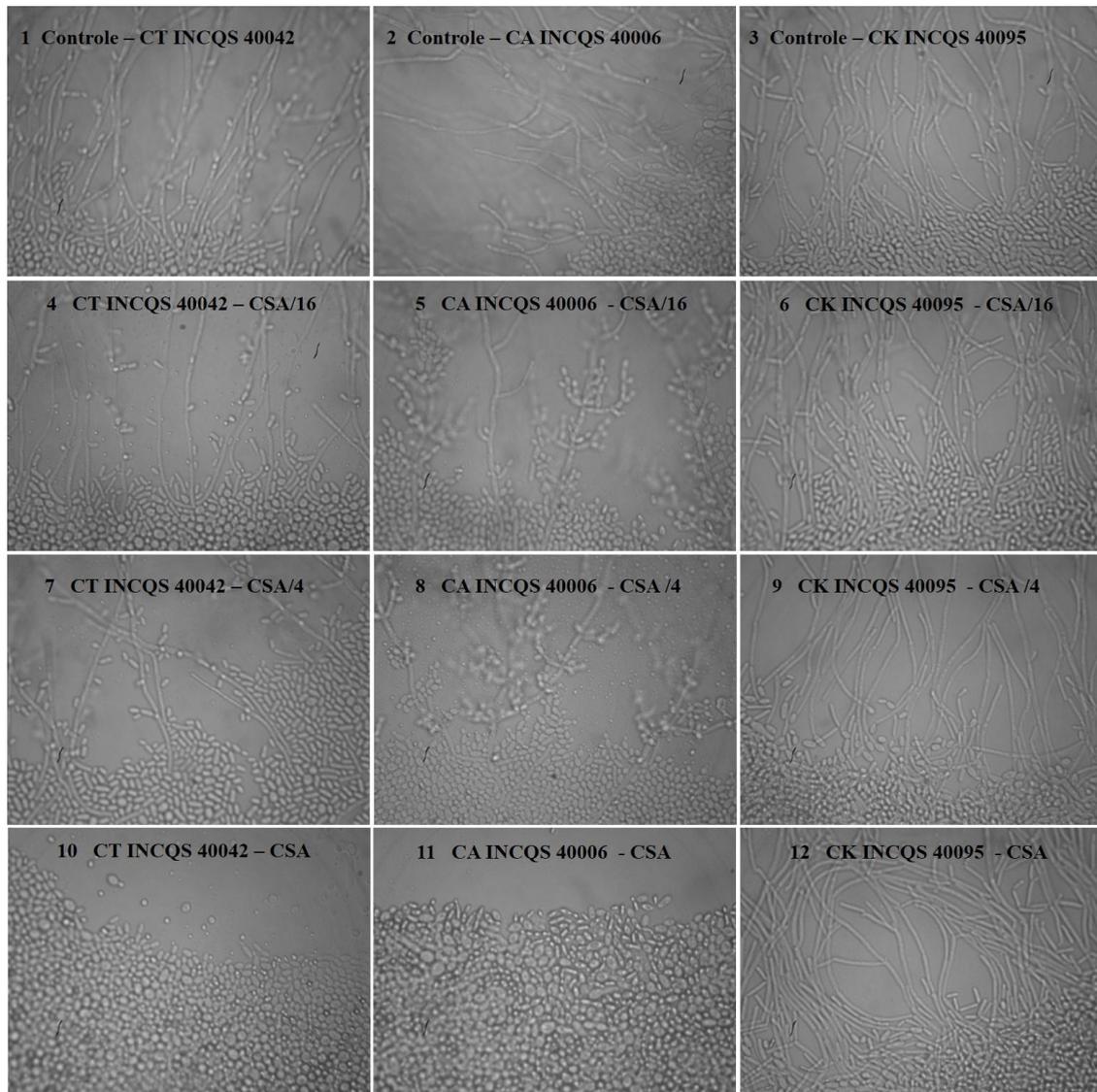
O extrato da *Libidibia ferrea* foi testado para verificação de efeito na morfológicas de *Candida* spp. (Figura 4). No grupo controle observa-se filamentos de hifas bem desenvolvidos indicando que o meio empobrecido causou estresse e estimulou tal crescimento.

Contra *C. tropicalis* CT 40042, na concentração menor, de 512 µg/mL (CSA/16), verifica-

se além das formas leveduriformes formas filamentosas em grande número. Na concentração intermediária de 2.048 µg/mL (CSA/4) já se verifica além das formas leveduriforme também filamentosos e na maior concentração de 8.192 µg/mL (CSA) apenas formas leveduriforme caracterizando inibição de formas filamentosas. Os testes com o extrato da *L. ferrea* contra *C. krusei* CK 40095 mostrou que nas concentrações testadas houve crescimento de forma leveduriforme e filamentosas, caracterizando a não inibição da transição morfológica. Nos ensaios realizados frente à espécie de *C. albicans* CA 40006, na concentração 512 µg/mL (CSA/16) também apresentou formas leveduriforme e poucas formas filamentosas caracterizando uma melhor inibição do que as demais espécies, ocorrendo o mesmo na concentração intermediária de 2.048 µg/mL (CSA/4), enquanto na concentração maior 8.192 µg/mL (CSA) verificou-se predomínio da forma leveduriforme e não da filamentososa, considerada invasora de substratos.

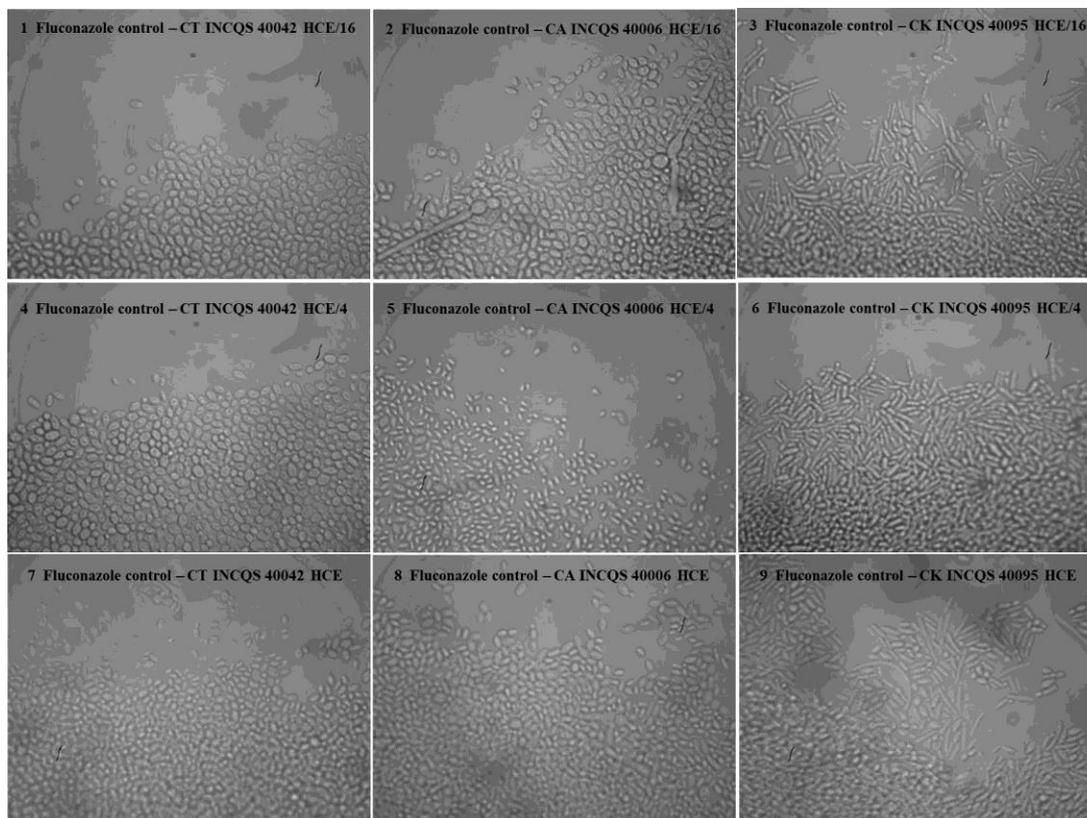
O efeito do fluconazol na morfologia é mostrado na Figura 5, onde pode ser observada a inibição dos filamentos de hifas nas concentrações testadas.

**Figura 4.** Efeito do extrato da folha da *Libidibia ferrea* sobre a morfologia fúngicas.



**Legenda:** CT: *Candida Tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; CSA: Concentração Superior Avaliada (8.192 µg/mL). O controle mostra a virulência da linhagem, através da emissão de estruturas filamentosas invasivas.

**Figura 5.** Efeito do fluconazol sobre a morfologia fúngica



**Legenda:** CT: *Candida Tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; CSA: Concentração Superior Avaliada (8.192 µg/mL)

## Discussão

As espécies de *Candida* do presente estudo são consideradas resistentes quando se destaca as concentrações para o fármaco padrão usado que é o fluconazol, considerando os valores de CIMs  $\leq 8$  µg/mL de acordo com os valores de *breakpoints* do Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínicos (NCCLS, 1992). De acordo com Sampaio et al (2009), o extrato do fruto do pau-ferro obtido por maceração com metanol a 70% a 72 h apresenta atividade antifúngica contra *C. albicans* (CIM: 25 µg/mL). Mesmo sendo uma metodologia diferente de obtenção do extrato bruto, se confirma um potencial antifúngico em relação aos componentes da espécie vegetal estudada.

Ferreira (2012), realizando testes de microdiluição com o extrato bruto do pau-ferro obtido pela técnica de (EBR) Extrato Bruto por Refluxo sobre cepas padrão de *Candida spp* da *American*

*Type Culture Collection* (ATCC), obteve CIM satisfatória nas concentrações de 62,5 – 125 µg/mL para *C. albicans*, e 31,25 – 250 µg/mL para *C. krusei*, levando em consideração a maior concentração avaliada 1.000 µg/mL.

Na avaliação feita por Ferreira (2012) foi verificado resultados semelhantes frente a cepas do mesmo gênero considerando a concentração > 1.000 µg/ mL assim apresentando apenas efeito fungicida contra *Candida dubliniensis*. Mesmo sendo usado concentrações superiores diferentes com a mesma metodologia, observa-se a resistência das demais espécies avaliadas aos extratos utilizados nos testes, caracterizando uma ineficácia em concentrações menores.

Nos estudos de Ferreira (2012), foi obtida IC<sub>50</sub> nas concentrações de 125 µg/mL *C. albicans* e para as *Candida* não *albicans* o IC<sub>50</sub> foi 31,25 µg/mL, mesmo se utilizando o extrato bruto por refluxo utilizando como solventes água e acetona considerando a maior concentração de 1.000 µg/mL, se verificou uma eficácia de redução de efeito em 94% para *Candidas* não *albicans* e 70% para *C. albicans*. A diferença de resultados pode ser devido a fatores metodológicos, solventes utilizados ou até mesmo a disposição da espécie vegetal e localização geográfica.

As mudanças morfológicas dos fungos é fator de grande importância para a invasão e virulência do fungo. A espécie *C. albicans* pode ser encontrada na forma leveduriforme ou filamentosa, fenômeno denominado polimorfismo. Geralmente, a forma filamentosa está associada ao estabelecimento da doença e a invasão tecidual, enquanto a forma leveduriforme está associada ao estado comensal (CHEN et al., 2020; ROMO; KUMAMOTO, 2020).

Sales *et al.* (2017), avaliou os efeitos do extrato da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, mais conhecida como angico, que pertence à família Fabaceae. Seus resultados mostraram ação do extrato do angico sobre morfologia fúngicas de cepas *C. albicans* em concentrações superiores de 1.000 µg/mL do extrato, mesmo sendo utilizado metodologias distintas e espécies diferentes, porém com a família vegetal em comum, se obteve um paralelo com o extrato do pau ferro, observando-se que à medida que se aumenta a concentração se obtém a inibição de estruturas filamentosas de espécies de *Candida*.

## Conclusão

*Libidibia ferrea* possui em seus componentes moleculares inibidores capazes de causarem efeito fungistático, mesmo que em concentrações não satisfatórias e de potencializar o efeito do fluconazol em relação frente às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Foi possível observar a inibição de estruturas filamentosas invasivas nas concentrações superiores avaliadas,

com exceção da *C. krusei*, podendo ser destacado o seu potencial de efeito sobre importante fator de virulência fúngica, corroborando cientificamente o uso etnomedicinal. Maiores estudos das frações e componentes isolados do extrato em questão são necessários para futuros posicionamentos quanto aos mecanismos pelos quais a planta age contra as espécies de *Candida* em questão. Este foi o primeiro relato de efeito do potencial antivirulência fúngica relacionado à espécie *L. ferrea*.

## Referências

ALVAREZ-MORENO, C. A. Antifungal stewardship: consensus on the diagnosis, treatment, and prevention of *Candida* spp. disease is a fundamental step in the road map to achieve it. **Infectio**, v. 23, n. 3, p. 213-214, 2019.

ARRUA, J. M. M. *et al.* Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*. **Steviana**, v. 6, p. 20-35, 2014.

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BOYCE, K. *et al.* Insights into the global emergence of antifungal drug resistance. **Microbiology Australia**, v. 40, n. 2, p. 87-91, 2019.

CHEN, H. *et al.* The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

ERNST, B. *et al.* The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. **Immunity**, v. 11, n. 2, p. 173-181, 1999.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, M. R. A. **Triagem antifúngica de Extratos Obtidos de Espécies Vegetais do Nordeste Brasileiro**. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.

JANBON, G. *et al.* Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity

and diversity of approaches. **Genes & Immunity**, v. 20, n. 5, p. 403-414, 2019.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* High-performance liquid chromatography-diodic array detector, fungistatic, and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* mart. ex DC. Against yeasts of the genus *Candida*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 8, p. 1837-1851, 2016.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standard. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Proposed standard.** Villanova, NCCLS, v.12, 22p., M27-P. 1992.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standard. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras;** Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On commensalism of *Candida*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16, 2020.

SALES, E. A. L. S. *et al.* Antifungal activity, phytochemical characterization and thermal profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2017.

SAMPAIO, F. C. *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

SCHEFFELMEIER, B. B.; MIASATO, J. M.; VIEIRA, B. A. A. Herbal medicines: a possibility in the pediatric dental clinic. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 77-82, 2018.

SIDRIN, J. J. C, ROCHA, M. F. G. **Medical mycology in the light of contemporary authors.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2010.

SINGH, D. K.; TÓTH, R.; GÁCSEK, A. Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 94, 2020.

SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140-150, 2015.

STOPPA, M. A. *et al.* Comparative study of the recommended CLSI and EUCAST

methodologies for evaluation of antifungal activity. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TAEI, M.; CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. An alarming rise of non-*albicans* *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. **BMC research notes**, v. 12, n. 1, p. 779, 2019.

VIEIRA, L. S.; SOUSA, R. S.; LEMOS, J. R. Plantas medicinais conhecidas por especialistas locais de uma comunidade rural maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1061-1068, 2015.

YANO, J. *et al.* Novel mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis:“neutrophil anergy”. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 3, 2018.

ZIDA, A. *et al.* Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.