

**ANA GABRIELLE DA ROCHA E SILVA**

**As fases fenológicas de *Commiphora leptophloeos* influenciam em seu potencial contra  
biofilme de *Candida* spp.?**

**SERRA TALHADA,**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**AS FASES FENOLÓGICAS DE *Commiphora leptophloeos* INFLUENCIAM NO SEU  
POTENCIAL CONTRA BIOFILME DE *Candida* spp.?**

**Ana Gabrielle da Rocha e Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Produtos Naturais com Aplicação à Microbiologia

**Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ ALVES DE LIMA**

Orientador

**Profa. Dra. VIRGÍNIA MEDEIROS DE SIQUEIRA**

Co-orientadora

**SERRA TALHADA,**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586f

Silva, Ana Gabrielle da Rocha e

As fases fenológicas de *Commiphora leptophloeos* influenciam em seu potencial contra biofilme de *Candida* spp.? / Ana Gabrielle da Rocha e Silva. - 2022.

71 f. : il.

Orientador: Andre Luiz Alves de Lima.

Coorientadora: Virginia Medeiros de Siqueira.

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Serra Talhada, 2022.

1. Antifúngico. 2. *Candida albicans*. 3. *Candida krusei*. 4. *Candida tropicalis*. 5. Fenologia. I. Lima, Andre Luiz Alves de, orient. II. Siqueira, Virginia Medeiros de, coorient. III. Título

CDD 338.95

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**AS FASES FENOLÓGICAS DE *Commiphora leptophloeos* INFLUENCIAM NO SEU  
POTENCIAL CONTRA BIOFILME DE *Candida* spp.?**

**Ana Gabrielle da Rocha e Silva**

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Biodiversidade e Conservação. Defendida e aprovada em 30/06/2022 pela seguinte Banca Examinadora.

---

Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima - Orientador  
[UAST/ UFRPE]

---

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Rogério de Aquino Saraiva – Membro Interno  
[UAST/UFRPE]

---

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Alysson Wagner Fernandes Duarte – Membro Externo  
[Campus Arapiraca / Universidade Federal de Alagoas]

---

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Diego de Souza Buarque – Membro Interno (suplente)  
[UAST/ UFRPE]

---

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Cynthia Maria Carneiro Costa – Membro Externo (suplente)  
[UAST/ UFRPE]

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal Rural de Pernambuco/UAST e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação pelo apoio e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, prof. André Lima, pela oportunidade de participar do programa, pelo apoio, ensinamentos e paciência. Não teria sido possível participar do programa sem sua ajuda. Obrigada!

À minha co-orientadora, profa. Virgínia Medeiros, por toda a ajuda na parte prática do trabalho, correções de texto e ensinamentos. Foi um prazer trabalhar com a senhora novamente!

À profa. Kelem Silva, pela disposição e ajuda nas análises de cromatografia, realizada no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

Aos discentes do Programa de pós-graduação em Produção Vegetal por terem me recebido e ajudado nos experimentos, especialmente à Paulo, por me ajudar na obtenção dos extratos. E à Nielson Dinivan, pela ajuda na estatística do trabalho. Obrigada.

À profa. Jacqueline Andrade da UFCA por disponibilizar as leveduras para os testes.

Ao Prof. José Victor, por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia e Imunologia/UFRPE (LAMIM), à Profa. Ana Carolina, por disponibilizar equipamentos do Laboratório Genoma/UFRPE e ao Prof. Rinaldo, por disponibilizar equipamentos do Laboratório de Bacterioses/UFRPE, fundamentais para o desenvolvimento de experimentos deste trabalho.

À Juliana Gleice, minha dupla, obrigada por me ouvir e aconselhar, não teria conseguido terminar sem sua ajuda. Obrigada por não me deixar desistir!

À minha família, pelo apoio emocional e financeiro. Obrigada por entenderem, pelo apoio e paciência.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Obrigada!

## Resumo

O aumento de leveduras resistentes aos antifúngicos existentes têm despertado o interesse por pesquisas por produtos naturais bioativos. No entanto, fatores ambientais influenciam a produção dos metabólitos secundários por vegetais, que podem interferir na viabilidade da produção. Assim, foi investigado se as fases fenológicas de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae), espécie de planta do semiárido do Brasil, influenciam na atividade antibiofilme de *Candida* spp., sozinhos e na presença do fluconazol. Foram coletadas folhas e cascas da planta, em duas fases fenológicas, i.e. com folhas/flores (coleta 1) e com frutos (coleta 2) e preparados extratos etanólicos e hexânicos a partir desse material. Foram determinadas a CIM e a CFM dos extratos, e os testes foram realizados frente a biofilmes em formação e em biofilmes pré-formados de *Candida albicans* (URM 4387), *C. krusei* (URM 6352) e *C. tropicalis* (URM 4262), por meio de duas metodologias: 1) microdiluição e quantificação colorimétrica com cristal violeta e 2) viabilidade celular com azul de metileno. Em ambas as metodologias foi possível observar que os extratos apresentaram efeito contra as leveduras com uma CIM entre 1mg/ml e 2mg/ml, e CFM igual ou superior a 2mg/ml. Também observou-se que os extratos foram capazes de diminuir as células viáveis dos biofilmes em mais de 50%. Os extratos não apresentaram efeito sinérgico junto ao fluconazol. Além disso, a análise com cromatografia de alta eficiência mostrou maior quantidade de ácido gálico nas cascas do que nas folhas de *C. leptophloeos* sem diferença entre as coletas para essa parte da planta. Nas folhas, o extrato da segunda coleta apresentou maior quantidade de ácido gálico que o da primeira. Percebeu-se que os extratos da segunda coleta apresentaram melhores efeitos sobre a formação de biofilmes de *Candida* spp. Enquanto que os extratos da primeira coleta das folhas apresentaram melhores resultados sobre os biofilmes pré-formados, e entre os extratos das cascas, o da segunda coleta se sobressaiu. Esses resultados sugerem que as fases fenológicas de *C. leptophloeos* exercem pouco efeito na atividade antibiofilme, entretanto, ressalta-se o efeito promissor de seus metabólitos sobre os biofilmes pré-formados de *Candida* spp.

**Palavras-chave:** Antifúngico, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, Fenologia.

## Abstract

The increase in yeasts resistant to existing antifungal drugs has raised interest in research for bioactive natural products. However, environmental factors influence the production of secondary metabolites by plants, which may interfere with the viability of production. Thus, we investigated whether the phenological phases of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae), a plant species from the semiarid region of Brazil, influence the antibiofilm activity of *Candida* spp. alone and in the presence of fluconazole. Leaves and bark of the plant were harvested in two phenological phases, i.e. with leaves/flowers (harvest 1) and with fruits (harvest 2) and ethanolic and hexanic extracts were prepared from this material. The MIC and MFC of the extracts were determined, and the tests were performed against biofilms in formation and in preformed biofilms of *Candida albicans* (URM 4387), *C. krusei* (URM 6352) and *C. tropicalis* (URM 4262), using two methodologies: 1) microdilution and colorimetric quantification with crystal violet and 2) cell viability with methylene blue. In both methodologies it was observed that the extracts presented effect against the yeasts with a MIC between 1mg/ml and 2mg/ml, and CFM equal or higher than 2mg/ml. It was noted that the extracts reduced the viable cells of the biofilms by more than 50%. It was no synergistic effect with fluconazole. Furthermore, High Performance Liquid Chromatography analysis showed higher amounts of gallic acid in the bark than in the leaves of *C. leptophloeos* with no difference between the harvests for this part of the plant. In the leaves, the extract from the second harvest showed a higher amount of gallic acid than the first one. It was noticed that the extracts of the second harvest presented better effects on the formation of biofilms of *Candida* spp. while the extracts of the first harvest from the leaves presented better results on the preformed biofilms, and among the bark extracts, the one from the second harvest stood out. These results suggest that the phenological phases of *C. leptophloeos* exert little effect on the antibiofilm activity, however, the promising effect of its metabolites on pre-formed biofilms of *Candida* spp. was highlighted.

**Key words:** Antifungal, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*,

Phenology.

### Lista de Figuras

- Figura 1. Etapas de formação do biofilme de *Candida* spp. Fonte: CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018. \_\_\_\_\_ 17
- Figura 2. *Commiphora leptophloeos* (Imburana-de-cambão) na Fazenda Buenos Aires, ErSerra Talhada / PE. Dezembro/2020. \_\_\_\_\_ 20
- Figura 3. *Commiphora leptophloeos* coleta em Serra Talhada/PE. (A) Coleta 1: dez/2020 – planta em fenofase vegetativa; (B) Coleta 2: mar/2021 – planta com frutos. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 4. Valores das Densidades Ópticas (DO), em 492 nm, dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *C. leptophloeos*, coletados em dez/2020 (coleta 1), sobre a formação de biofilme de *Candida* spp. As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas entre os valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_ 40
- Figura 5. Valores das Densidades Ópticas (DO), em 492 nm, dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em mar/2021 (coleta 2), sobre a formação de biofilme de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_ 41
- Figura 6. Valores da Densidade Óptica (DO – 492 nm) dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em dez/2020 (coleta 1), sobre biofilmes pré-formados de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras expressam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_ 42
- Figura 7. Valores das Densidades Ópticas (DO) dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólico das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em mar/2021 (coleta 2), sobre biofilmes pré-formados de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_ 43
- Figura 8.** Efeitos dos extratos sobre a morfologia das leveduras *Candida* spp. As setas indicam as pseudohifas. Observa-se que em (a) as pseudohifas são menos evidentes que em (c). (a) Extrato Etanólico das Cascas da coleta 2 – EEC2 (0,125mg/ml) frente à *C. krusei* URM 6352. (b) Extrato Hexânico das Folhas da coleta 2 – EHF2 (0,125mg/ml) frente à *C. krusei* URM 6352. (c) Controle de *C. krusei* URM 6352. \_\_\_\_\_ 44
- Figura 9. Presença e quantificação de ácido gálico em extratos etanólicos das folhas (EEF) e cascas (EEC) de *Commiphora leptophloeos* coletada em dez/2020 (coleta 1) e mar/2021 (coleta 2). a) EEF1; b) EEF2; c) EEC1; d) EEC2. \_\_\_\_\_ 53



## Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferenças das condições climáticas entre as coletas. \_\_\_\_\_32

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em mg/ml, de extratos etanólicos e hexânicos das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (EEC) de *Commiphora leptophloeos* coletados em dez/2020 (Coleta 1) e mar/2021 (coleta 2) frente às cepas de *Candida* spp. Todos os testes foram realizados em triplicatas. \_\_\_\_\_38

Tabela 3. Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. albicans* URM 4387 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planquitônicas não viáveis de *C. albicans* URM 4387 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_47

Tabela 4. Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. krusei* URM 6352 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planquitônicas não viáveis de *C. krusei* URM 6352 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_48

Tabela 5. Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. tropicalis* URM 4262 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planquitônicas não viáveis de *C. tropicalis* URM 4262 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_49

Tabela 6. Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. albicans* URM 4387 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. albicans* URM 4387 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_50

Tabela 7. Influência das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. krusei* URM 6352 por meio da técnica com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. krusei* URM 6352 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_\_51

Tabela 8. Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* URM 4262 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os

valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. tropicalis* URM 4262 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,001$ . \_\_\_\_52

**Sumário**

1. Introdução Geral_____	12
3. Referencial Teórico_____	14
3.1. <i>Candida</i> spp.: características gerais_____	14
3.2. Biofilmes de <i>Candida</i> spp. e resistência à antifúngicos_____	16
3.3. Produtos Naturais de origem vegetal com ação antifúngica e antibiofilme__	18
3.4. <i>Commiphora leptophloeos</i> _____	20
REFERÊNCIAS_____	22
Artigo Científico 1_____	29
Anexo_____	62

## **Apresentação**

Informamos que a parte inicial da dissertação, a saber, “Introdução” e “Referencial Teórico” seguem as normas ABNT, inclusive as referências. O artigo científico intitulado “Diferentes fases fenológicas e tecidos vegetais de *Commiphora leptophloeos* influenciam na atividade antibiofilme de *Candida* spp.” segue as normas da revista “**BMC Pharmacology and Toxicology**”, com exceção da língua. As regras da revista encontram-se em anexo.

## 1. Introdução Geral

As propriedades fitoterápicas das plantas medicinais são originadas de metabólitos secundários, os quais são compostos orgânicos gerados do metabolismo primário e que apresentam bioatividade (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Esses metabólitos são uma alternativa promissora de moléculas bioativas para a produção de novos fármacos, ou para aumentar a eficiência de uma droga já existente. O Fluconazol, por exemplo, é um dos antifúngicos mais utilizados para o tratamento de candidíase, no entanto, as leveduras do gênero *Candida* têm mostrado resistência ao medicamento, especialmente quando formam biofilmes (PEREIRA et al., 2020). Contudo, o uso de metabólitos secundários com capacidade antibiofilme pode aumentar a eficiência do fluconazol, diminuindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do medicamento, aumentando sua eficácia (ENDO et al., 2010).

Nos últimos anos, poucos antimicrobianos têm sido desenvolvidos, enquanto que os microrganismos tornam-se cada vez mais resistentes às drogas já conhecidas e utilizadas (BHATTACHARJEE; ALENEZI, 2020). Estudos apontam que os produtos naturais são a principal fonte de novas moléculas com capacidade antifúngica, além disso, esses produtos são mais eficientes quando usados em conjunto com uma droga já existente (MISHRA et al., 2020). Por exemplo, o extrato de *Artemisia annua* diminuiu a CIM do Fluconazol em 32 vezes quando testados contra *Candida albicans* MTCC 277 e ATCC 90028 (ROLTA et al., 2021) e o extrato de *Commiphora molmol* apresenta efeito sinérgico também com o Fluconazol contra *C. albicans* (clínica) diminuindo a CIM da droga em mais de 50% (ARORA et al., 2021).

A produção dos metabólitos secundários pode ser influenciada por fatores bióticos e abióticos, como a sazonalidade, idade da planta, índice pluviométrico, temperatura, herbivoria e fase fenológica do vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), tendo potencial para interferir na atividade biológica gerada por esses metabólitos. A fase fenológica, estágio de desenvolvimento da planta, pode determinar a produção de diferentes compostos bioativos e em diferentes concentrações pelo vegetal (CHEN et al., 2012; ÇIRAK et al., 2007). Entretanto, a potencialidade de muitas espécies vegetais com capacidade antibiofilme ainda precisa ser estudada (TRENTIN et al., 2013), além de entender qual a melhor época de coleta da planta em que essa capacidade é mais evidenciada.

Diversas espécies do gênero *Commiphora* (Burseraceae) têm se destacado por apresentarem atividades biológicas, como *Commiphora molmol*, cuja resina apresenta

atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 1128) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (DOLARA et al., 2000). *Commiphora berryi* e *C. caudata* mostraram boa atividade contra *P. aeruginosa* (MTCC 2453) e *E. coli* (MTCC 739) (KUMARI et al., 2011). Nesse contexto, *C. leptophloeos* (Mart.) J.B.Gillet apresenta potencial atividade antifúngica. Entretanto, não há registros de estudos que tenham avaliado a influência das fases fenológicas de *C. leptophloeos* no seu potencial antifúngico.

*Commiphora leptophloeos*, conhecida como Imburana-de-cambão, é de ampla ocorrência no semiárido brasileiro (PEREIRA et al., 2017). É uma planta decídua cujas folhas e cascas são usadas popularmente para o tratamento de gastrite, diarreia, gripe, asma, bronquite, como cicatrizante, anti-inflamatório e anticancerígeno, problemas renais e cólica (DE ALBUQUERQUE et al., 2007; FREITAS; COELHO, 2014; NETO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; SANTOS; PEREIRA, 2020). Além dos usos medicinais da planta pela população, *C. leptophloeos* apresenta atividade antimicrobiana comprovada contra isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. (DA SILVA et al., 2019). Os extratos das folhas também apresentam atividade anti-inflamatória (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a), e o extrato etanólico da casca demonstrou atividade moderada contra *Candida krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. glabrata* (ATCC 90030) na sua forma planctônica (PESSOA et al., 2021).

Análises fitoquímicas de *C. leptophloeos* têm mostrado a presença de flavonoides, compostos fenólicos e açúcares redutores nas cascas (PEREIRA et al., 2017). As folhas também apresentam terpenos, compostos fenólicos, flavonoides saponinas e taninos (CORDEIRO et al., 2021). Este último tem capacidade antibiofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (TRENTIN et al., 2013). Estudos anteriores também identificaram a presença da vitexina, quercetina glicosídeo, isoorientina, orientina e luteolina (PESSOA et al., 2021), que têm sido reportadas com capacidade como anti-inflamatória, para o tratamento de doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer (CORDEIRO et al., 2021).

Embora a presença e quantidade desses metabólitos sejam os responsáveis pelas atividades biológicas das plantas, o conhecimento sobre os fatores que influenciam a produção desses metabólitos ainda é escasso (CHEN et al., 2012). Assim, o objetivo desse trabalho foi testar a hipótese que a composição fitoquímica das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* é variável a depender da época de coleta das amostras na

planta, além disso, essa mudança é suficiente para intervir na atividade antibiofilme de *Candida* spp. Também foi analisado se os extratos da planta potencializam o efeito do fluconazol sobre os biofilmes de *Candida* spp.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1. *Candida* spp.: características gerais

O gênero *Candida* compreende cerca de 200 espécies de leveduras unicelulares, aeróbicas, com temperatura ótima entre 25–30°C e pH entre 4-6. A grande diversidade de espécies permite o seu uso em processos biotecnológicos, como o uso de *C. utilis* no preparo de extratos de leveduras e proteínas hidrolisadas (KIELISZEK et al., 2017), além de ser empregada na produção de biosurfactantes, pois produz metabólitos secundários capazes de reduzir a tensão superficial e agir como emulsificante podendo ser aplicada em indústrias ambientais e alimentares (RIBEIRO et al., 2019).

*Candida* spp. tem ainda a capacidade de sintetizar compostos de interesse biotecnológico como álcoois, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, xilitol e glicerol. *Candida krusei* também pode ser usada como indicação de poluição de esgoto (GARCÍA et al., 2018). Algumas espécies de *Candida* são dimórficas, ou seja, podem sofrer alterações morfológicas, podendo ser encontradas em forma de levedura ou filamentosa com hifas verdadeiras ou pseudohifas (CIUREA et al., 2020). As hifas, chamadas de verdadeiras, são projeções do tubo germinativo que se ramifica com septos definidos. Já as pseudohifas são brotamentos que permanecem ligados à célula-mãe que ao se alongar dá origem a filamentos com constrições nas junções célula-célula, porém não há a formação de septos (SILVA et al., 2012).

Essas mudanças morfológicas são um importante fator de virulência, pois pode facilitar a invasão ao hospedeiro e dificultar a ação do sistema imune, já que as hifas são maiores que as leveduras (CIUREA et al., 2020). Apesar de cerca 80% das infecções por esse gênero serem causadas por *C. albicans*, a quantidade de infecções causadas por espécies não-*albicans* está aumentando, evidenciando a importância de se estudar também sobre essas leveduras. Entre essas espécies destaca-se *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, que possuem características distintas (CIUREA et al., 2020).

*Candida albicans* é um patógeno oportunista, fazendo parte da microbiota humana, geralmente presente no trato gastrointestinal e genitourinário. *C. albicans* é polimórfica, podendo ser encontrada na forma de levedura, com hifas verdadeiras,

pseudohifas e clamidosporos (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012). A formação de hifas por *C. albicans* tem ainda a capacidade de matar macrófagos do hospedeiro através do alongamento das hifas e perfuração do macrófago (MCKENZIE et al., 2010).

*Candida tropicalis* é capaz de formar hifas ou pseudohifas (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017). A candidíase oral causada por *C. tropicalis* é mais comumente encontrada em pacientes com transplante de medula óssea ou que fazem tratamento para leucemia, ou seja, pacientes com imunidade baixa, mostrando que os macrófagos são uma primeira linha de defesa eficiente. No entanto, as infecções por *C. tropicalis* têm maiores taxas de morbidade e mortalidade que *C. albicans* (KOTHAVADE et al., 2010).

*Candida parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, mas consegue mudar de sua forma leveduriforme para uma forma com pseudohifas, e essa mudança também é considerada um fator de virulência (TÓTH et al., 2018). As infecções causadas por esse patógeno estão frequentemente associadas a outros microrganismos formando o conhecido complexo *Candida parapsilosis*. Esse complexo é constituído por *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (SOUZA et al., 2018). Essas espécies apresentam fatores de virulência distintos como secreção de enzimas hidrolíticas, adesão nas células epiteliais do hospedeiro, formação de biofilme e atividade hemolítica (ATAIDES et al., 2020).

*Candida glabrata* é a espécie mais geneticamente distante de *C. albicans*, sendo haplóide e crescendo apenas na forma de levedura (BRUNKE; HUBE, 2013). Como não tem a habilidade de formar hifas, *C. glabrata* pode aproveitar de uma falha na defesa do hospedeiro ou aproveitar a formação das hifas de *C. albicans* para invadir as células do hospedeiro causando candidíase orofaríngea, por exemplo (CIUREA et al., 2020). Uma vez dentro da célula, *C. glabrata* é reconhecida pelos macrófagos como um microrganismo invasor. Porém, quando fagocitada, essa levedura modifica a maturação do fagossomo, permitindo sua sobrevivência e replicação até que o fagócito se rompe (BRUNKE; HUBE, 2013).

*Candida krusei*, assim como outras espécies do gênero, é polimórfica produzindo hifas à temperatura de 37°C e blastoconídeos e pseudohifas em temperaturas mais baixas. Essa espécie consegue se aderir às células epiteliais e endoteliais, mas não tão eficientemente quando *C. albicans*. Também é capaz de formar biofilmes e de liberar enzimas hidrolíticas que degradam macromoléculas do hospedeiro (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).



Percebe-se que o gênero *Candida* é bastante diverso, e com o aumento das infecções por espécies não-*albicans* cresce a necessidade de entender a biologia de outras espécies, a fim de investigar fontes de biomoléculas que possam atuar como antifúngicos para essas espécies.

## **2.2. Biofilmes de *Candida* spp. e resistência à antifúngicos**

Infecções por *Candida albicans* tem ganhado cada vez mais destaque, além de outras espécies como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, especialmente por estarem se tornando resistente às drogas antifúngicas utilizadas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

A resistência clínica ocorre quando o paciente não responde ao antifúngico administrado em dose padrão (COWEN et al., 2015). Essa resistência pode ser intrínseca ao microrganismo, ocorrendo antes mesmo de haver o contato com o antifúngico ou pode ser adquirida, ocorrendo após o contato com o antifúngico (SANTOS et al., 2018).

O mecanismo de resistência aos antifúngicos vai depender do modo de ação da droga, ocorrendo principalmente através da diminuição do acúmulo intracelular da droga, redução do efeito da droga ou diminuição da afinidade do alvo com a droga (PEREIRA et al., 2020). As principais classes de antifúngicos contra *Candida* são os polienos, azóis, equinocandinas e 5-flucitosina (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

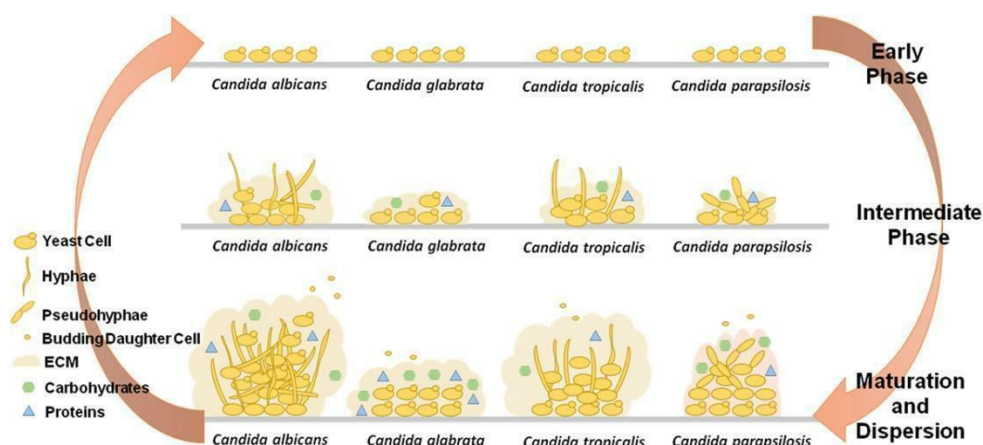
Os azóis são um grupo de compostos heterocíclicos de cinco membros com capacidade antifúngica, dentre os quais o fluconazol é o mais comumente usado para fins terapêuticos (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Os azóis têm como mecanismo de ação a rota da biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana celular fúngica (COWEN et al., 2015). A resistência de *Candida* às drogas dessa classe é promovida pela superexpressão de bombas de efluxo na membrana, que evitam o acúmulo de grandes quantidades de droga que poderiam matar a célula (PEREIRA et al., 2020).

Entre as leveduras do gênero, *Candida auris*, uma levedura multirresistente, tem sido reportada em diversos países causando infecções em pacientes imunocomprometidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Recentemente, *C. auris* foi isolada de pacientes com COVID-19 internados em UTIs de Salvador/BA (DE ALMEIDA et al., 2021).

As cepas de *C. auris* isoladas no Brasil, não foram resistentes ao fluconazol, ao contrário das isoladas em outros países, possivelmente porque essas cepas não tinham sido estressadas o suficiente para desenvolver a resistência (DE ALMEIDA et al., 2021). A presença de *C. auris* em pessoas com COVID-19 já tinha sido reportada em outros países, especialmente em pacientes que utilizavam de respiração mecânica ou cateteres urinários (PRESTEL et al., 2021; VILLANUEVA-LOZANO et al., 2021).

Infecções de *Candida* por meio de dispositivos médicos são comuns ocorrendo através da formação de biofilmes nesses equipamentos. Um biofilme é uma comunidade de microrganismos revestidos por uma matriz extracelular e aderidos a uma superfície, podendo ser composto de uma ou múltiplas espécies, que contribuem para as diferentes características do biofilme (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

O processo de formação dessas comunidades envolve quatro etapas (Figura 1), que vão desde a fixação das células na superfície até a dispersão desse biofilme (DE BARROS et al., 2020). A formação do biofilme começa com a adesão das células planctônicas, por meio das proteínas adesinas, à uma superfície formando uma camada de microrganismos que vai ser responsável por sustentar a estrutura do biofilme (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; WALL et al., 2019).



**Figura 1.** Etapas de formação do biofilme de *Candida* spp. Fonte: CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018.

Em seguida o biofilme continua a se desenvolver em uma fase chamada de proliferação, que é caracterizada pela formação de uma rede de hifas ou pseudohifas que garante a solidez do biofilme (DE BARROS et al., 2020). Essas hifas são essenciais para a estrutura e estabilidade do biofilme, servindo de suporte para outras hifas e células de leveduras (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Estudos têm demonstrado que existe uma relação entre a morfologia de *Candida* e a patogenicidade de seu biofilme, como *C. albicans*, que é mais patogênica na forma hifal quando comparado com a forma de levedura (ZHANG et al., 2016).

Essa espécie apresenta maior capacidade de filamentação em resposta a diversos fatores do hospedeiro como pH alcalino ou neutro, privação de nitrogênio e hormônios como progesterona e estradiol. Já as espécies não-*albicans* de *Candida*, têm menor capacidade de filamentação, e respondem a condições bem limitadas (KADOSH; MUNDODI, 2020). Durante a fase de maturação, ocorre a produção da matriz polimérica extracelular (EPS) que serve como uma liga que une todo o biofilme garantindo uma estrutura tridimensional (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Essa matriz é composta de carboidratos, proteínas, lipídios e DNA e é apontada como um dos principais fatores de virulência dos biofilmes, pois impede que os antifúngicos penetrem na sua estrutura (DE BARROS et al., 2020; WALL et al., 2019).

Dentro da matriz, as células se comunicam através de um sistema chamado de *Quorum-sensing* (QS), através da produção e liberação de moléculas sinalizadoras secretadas pelos microrganismos (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018; SHANKAR RAUT; MOHAN KARUPPAYIL, 2016).

Essas moléculas de *quorum-sensing* (MQS) são responsáveis por alterações fisiológicas na célula microbiana ou no biofilme como um todo (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). A molécula mais estudada é o farnesol, secretada por *C. albicans* podendo atuar como um interruptor da mudança morfológica de levedura para o crescimento de hifas, mas não consegue impedir o alongamento de hifas já existentes (HIROTA et al., 2017) e ajudando na dispersão do biofilme (PEREIRA et al., 2020).

A dispersão é a última fase do ciclo, em que ocorre a liberação de células que vão se aderir a outras superfícies, formando novos biofilmes (WALL et al., 2019). Esse processo pode ocorrer por meio dos próprios microrganismos tornando esse procedimento ativo ou de forma passiva, ocorrendo por meio de fatores externos (SONG et al., 2017).

### **2.3. Produtos Naturais de origem vegetal com ação antifúngica e antibiofilme**

O amplo uso de drogas antifúngicas pode levar o microrganismo a adquirir uma resistência a esse medicamento, dificultando ou até impossibilitando um tratamento (ZIDA et al., 2017). Assim, surge a necessidade de encontrar novos compostos com capacidade antifúngica, e as plantas medicinais apresentam uma alternativa, já que

muitas espécies possuem histórico de atividades antimicrobianas e são usadas em tratamentos de doenças (RAUT; KARUPPAYIL, 2016).

A ação antifúngica e antibiofilme dos produtos naturais têm diversos mecanismos de ação baseando-se principalmente na supressão da adesão do biofilme, inibição da formação da matriz exopolimérica e da sinalização da comunicação entre as células, o *Quorum sensing* (LU et al., 2019). Alguns desses produtos como os terpenos, timol, carvacrol e geraniol podem impedir a transição morfológica de *Candida*, de levedura para forma hifal. Essa transição é considerada um fator de virulência e faz parte da formação de biofilme, assim ao impedir essa transformação podem inibir o crescimento do biofilme (SOLIMAN; ALNAJDY; EL-KEBLAWY, 2017).

O extrato hidroalcolólico da casca do Angico, *Anadenanthera colubrina*, também foi capaz de impedir o crescimento do biofilme de *C. albicans* à uma concentração de 31µg/ml, provavelmente devido à inibição da conversão de levedura para hifa, além disso o extrato apresentou uma grande variedade de compostos fenólicos que podem ter sido responsáveis por desestruturar a parede celular da levedura (LIMA et al., 2014).

Outro mecanismo de ação para os antifúngicos naturais é a inibição da aderência de *Candida* nos tecidos do hospedeiro. A adesão é o primeiro estágio na formação do biofilme, pois é quando se forma uma camada basal de células que vai sustentar a estrutura do biofilme (PEREIRA et al., 2020). O extrato hidroalcolólico de *Croton urucuran*, conhecida como Sangra d'água, encontrada no Brasil conseguiu reduzir um biofilme de *Candida albicans* em 35%, à uma concentração de 7µg/ml (RAUT; KARUPPAYIL, 2016). Essa espécie tem forte capacidade antiaderente de *C. albicans* devido à apigenina, capaz de reduzir a formação do glucano e regular a expressão do gene responsável pela aderência da levedura (SOLIMAN; ALNAJDY; EL-KEBLAWY, 2017).

Outras espécies também apresentaram eficiência contra *Candida* como a *Stryphnodendron adstringens* que é conhecida como barbatimão, e o extrato da casca foi capaz de além de inibir a formação do biofilme e conseguiu inibir as células dispersas de biofilmes maduro prevenindo a disseminação de biofilmes (LUIZ et al., 2015). O alho, *Allium sativum*, também é um inibidor de *Candida*, pois um de seus componentes, a alicina, é capaz de interferir na integridade celular da levedura (SOLIMAN; ALNAJDY; EL-KEBLAWY, 2017).

#### 2.4. *Commiphora leptophloeos*

O gênero *Commiphora* compreende cerca de 150 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, e é caracterizado por árvores de porte pequeno ou arbustos, e pela produção de uma resina castanho-avermelhada, sendo utilizadas na medicina popular para tratamento de fraturas, dores, artrites, infecções parasitárias e doenças gastrointestinais (SHEN et al., 2012).

No Brasil, a representante desse gênero é a *Commiphora leptophloeos* (Figura 2), conhecida como Imburana ou Imburana-de-cambão, uma espécie dioica, decídua e com dispersão zoocórica feita pelo pássaro *Penelope jacucaca* (SILVA et al., 2020). A fenologia dessa espécie está relacionada com a precipitação e ao fotoperíodo (DE LIMA et al., 2012). O brotamento das folhas de *C. leptophloeos* começa no fim da estação seca e a perda das folhas do meio para o fim da estação chuvosa (DE LIMA et al., 2012). A floração ocorre entre a estação seca e a estação chuvosa, no período de novembro a janeiro, (LEITE; MACHADO, 2010) e a frutificação já na estação chuvosa, entre março e junho (SILVA et al., 2020).



**Figura 2.** *Commiphora leptophloeos* (Imburana-de-cambão) na Fazenda Buenos Aires, Serra Talhada / PE. Dezembro/2020.

É utilizada na medicina popular, principalmente no Nordeste do Brasil, para o tratamento de problemas renais, gripe, tosse, bronquite, inflamações em geral, dor de barriga, diarreia, cólicas, cicatrização, coriza, asma e dor de garganta, sendo utilizada as

folhas, flores, látex e casca do caule, geralmente na forma de lambedor (AGRA et al., 2007; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; NETO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Além do seu uso popular, *C. leptophloeos* possui atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante. O extrato aquoso da casca apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (TRENTIN et al., 2014). O extrato metanólico da casca apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*, o extrato de clorofórmio teve atividade contra *Mycobacterium smegatis*, e atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, o extrato metanólico e de ciclohexano apresentaram resultados à uma concentração mínima de 6,25 mg/ml, contra *Candida albicans* em sua forma planctônica (PEREIRA et al., 2017).

Essa espécie tem ainda grande potencial contra a bactéria *Staphylococcus* spp. (DA SILVA et al., 2019). De 60 isolados clínicos de casos de mastite em animais, o extrato etanólico da folha foi capaz de interferir na formação de biofilmes de 43 isolados, e o extrato da casca de 47 dos isolados testados, apesar de não terem exercido efeito no biofilme já formado (DA SILVA et al., 2019) demonstrando a capacidade antimicrobiana da planta.

As folhas de *C. leptophloeos* contém flavonoides como a rutina e quercetina, que são moléculas antioxidantes, antiinflamatórias e apresentam atividade imuno protetoras, justificando seu uso para tratamento da asma, por exemplo (CORDEIRO et al., 2021).

É evidente que, as infecções por *Candida* spp. têm aumentado nos últimos anos agravando-se pelo fato dessas leveduras terem diversos mecanismos de resistências aos antifúngicos utilizados, sendo a formação de biofilme um desses mecanismos. Os produtos naturais tem mostrado um efeito antibiofilme promissor, além da capacidade de potencializar o uso de antifúngicos. Nesse cenário, *Commiphora leptophloeos* apresenta grande potencial de atividade antifúngica contra *Candida* spp., fazendo-se necessário entender a influência da fisiologia da planta nessa atividade biológica, para que possa ser utilizada no seu máximo potencial.

**REFERÊNCIAS**

- AGRA, M. DE F. et al. Sinopse da Flora Medicinal do Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 03, p. 323–330, 2007.
- ARORA, S. et al. Synergistic Effect of Plant Extracts on Endodontic Pathogens Isolated from Teeth with Root Canal Treatment Failure: An In Vitro Study. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 552, 9 maio 2021.
- ATAIDES, F. S. et al. In vitro characterization of virulence factors among species of the *Candida parapsilosis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 3–7, 2020.
- BHATTACHARJEE, M. K.; ALENEZI, T. Antibiotic in myrrh from Commiphora molmol preferentially kills nongrowing bacteria. **Future Science OA**, v. 6, n. 4, p. FSO458, 20 fev. 2020.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 9 jun. 2020.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, 2013.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; DA SILVA, A. C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 13–23, 2004.
- CHEN, Y. et al. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. **Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 171–175, 2012.
- ÇIRAK, C. et al. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: Variation among plant parts and phenological stages. **Botanica Helvetica**, v. 117, n. 1, p. 29–36, 2007.
- CIUREA, C. N. et al. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 6 jun. 2020.
- CORDEIRO, M. L. DA S. et al. Antioxidant Activities of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett) (Burseraceae) Leaf Extracts Using In Vitro and In Vivo Assays. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–11, 24 abr.

2021.

- COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, jul. 2015.
- DA SILVA, I. F. et al. Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (mart.) J. B. Gillett against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–14, 2019.
- DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 1–11, 2021a.
- DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Antifungal and antibiofilm activities of B-type oligomeric procyanidins from *Commiphora leptophloeos* used alone or in combination with fluconazole against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–15, 2021b.
- DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- DE ALMEIDA, J. N. et al. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 220, 2021.
- DE BARROS, P. P. et al. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. **Mycopathologia**, v. 185, n. 3, p. 415–424, 2020.
- DE LIMA, A. L. A. et al. Do the phenology and functional stem attributes of woody species allow for the identification of functional groups in the semiarid region of Brazil? **Trees - Structure and Function**, v. 26, n. 5, p. 1605–1616, 2012.
- DOLARA, P. et al. Local anaesthetic, antibacterial and antifungal properties of sesquiterpenes from myrrh. **Planta Medica**, v. 66, n. 4, p. 356–358, 2000.
- ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 2010.
- FILIZOLA, B. DE C.; SAMPAIO, M. B. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de Cascas**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2015.
- FREITAS, A. V. L.; COELHO, M. DE F. B. Os “remédios do mato” por especialistas locais da comunidade São João da Várzea, Mossoró, RN, Brasil. **Interações**



- (**Campo Grande**), v. 15, n. 2, p. 249–264, 2014.
- GARCÍA, M. et al. Advances in the Study of *Candida stellata*. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 74, 4 set. 2018.
- GIORDANI, B. et al. Utilizing liposomal quercetin and gallic acid in localized treatment of vaginal *Candida* infections. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2020.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673–1689, 2020.
- HIROTA, K. et al. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 321–330, 2017.
- INÁCIO, M. C. et al. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. roots. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 467–473, 2016.
- KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- KADOSH, D.; MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16–18, 2020.
- KIELISZEK, M. et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 185–198, 2017.
- KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873–880, 2010.
- KUMAR, D. et al. A Recent Report on ‘Plants with Anti-*Candida* Properties’. **International Journal of Current Research and Review**, v. 12, n. 18, p. 25–34, 2020.
- KUMARI, R. et al. Antioxidant and antibacterial activities of bark extracts from *Commiphora berryi* and *Commiphora caudata*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 15, p. 1454–1462, 2011.
- KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for

- assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1068–1079, 2014.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 2020.
- LIBERATO, I. et al. Gallic acid leads to cell death of *Candida albicans* by the apoptosis mechanism. **Future Microbiology**, v. 17, p. 599–606, 2022.
- LIMA, R. D. F. et al. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- LU, L. et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2019.
- LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.
- MCKENZIE, C. G. J. et al. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1650–1658, 2010.
- MEDEIROS, R. M. DE et al. Regime pluvial dos municípios São Bento do Una e Serra Talhada – PE, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 2020.
- MISHRA, R. et al. Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- NETO, F. R. G. et al. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 4, p. 856–865, 2014.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 2015.
- PADDER, S. A.; PRASAD, R.; SHAH, A. H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v. 210, p. 51–58, 2018.
- PEREIRA, J. J. D. S. et al. *Commiphora leptophloeos* Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–10, 2017.
- PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–12, 2020.

- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.
- PESSOA, R. F. et al. Investigation of ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae) in treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, 2021.
- PFALLER, M. A. et al. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: Four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 760–763, 2006.
- PRESTEL, C. et al. *Candida auris* Outbreak in a COVID-19 Specialty Care Unit — Florida, July–August 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 2, p. 56–57, 2021.
- RIBEIRO, B. G. et al. Production and optimization of the extraction conditions of the biosurfactant from *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in the food industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1477–1482, 2019.
- RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014.
- RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. SPECIAL ISSUE, p. 587–590, 2011.
- ROLTA, R. et al. Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytocompounds of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, 2021.
- SANTOS, C. B.; PEREIRA, M. A. T. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS DA CAATINGA: As concepções dos moradores da fazenda Fagundes em Curaçá – BA. **Revista Científica do UniRios**, p. 194–225, 2020.
- SANTOS, G. C. D. O. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–23, 2018.
- SHANKAR RAUT, J.; MOHAN KARUPPAYIL, S. Phytochemicals as Inhibitors of *Candida* Biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4111–4134,

- 2016.
- SHEN, T. et al. The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 319–330, 2012.
- SILVA, É. E. DE M. E. et al. Fruiting phenology and consumption of zoochoric fruits by wild vertebrates in a seasonally dry tropical forest in the Brazilian Caatinga. **Acta Oecologica**, v. 105, 2020.
- SILVA, R. C. S. et al. Aspectos fitossociológicos e de crescimento de *Commiphora leptophloeos* no semiárido brasileiro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 89, p. 11, 2017.
- SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681–689, 2009.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SOLIMAN, S.; ALNAJDY, D.; EL-KEBLAWY, A. A. ET AL. Plants' natural products as alternative promising anti-*Candida* drugs. **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 104–122, 2017.
- SONG, X. et al. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. **Current Organic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 789–817, 2017.
- SOUZA, A. C. R. et al. Pathogenesis of the *Candida parapsilosis* complex in the model host *Caenorhabditis elegans*. **Genes**, v. 9, n. 8, 2018.
- SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 455–464, 2017.
- SOUZA, R. et al. Vegetation response to rainfall seasonality and interannual variability in tropical dry forests. **Hydrological Processes**, v. 30, n. 20, p. 3583–3595, 2016.
- TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, 2013.
- TÓTH, R. et al. Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

- TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- TRENTIN, D. S. et al. Medicinal plants from Brazilian caatinga: Antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 264–271, 2014.
- VILLANUEVA-LOZANO, H. et al. Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 5, p. 813–816, 2021.
- VIRGÍNIA DE LIMA LEITE, A.; MACHADO, I. C. Reproductive biology of woody species in Caatinga, a dry forest of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 11, p. 1374–1380, 2010.
- WALL, G. et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, 2019.
- ZHANG, K. et al. Effect of Antimicrobial Denture Base Resin on Multi-Species Biofilm Formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, 2016.
- ZIDA, A. et al. Substances naturelles actives sur *Candida albicans*, sources de nouveaux médicaments antifongiques : revue de la littérature. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2017.
- ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 13 out. 2017.

## Artigo Científico 1

### Diferentes fases fenológicas e tecidos vegetais de *Commiphora leptophloeos* influenciam na atividade antibiofilme de *Candida* spp.

Ana Gabrielle da Rocha e Silva\*, Virgínia Medeiros de Siqueira, André Luiz Alves de Lima

\*Autor Correspondente

#### Resumo

**Introdução:** A composição de metabólitos das plantas é afetada por fatores ambientais e biológicos, especialmente em ambientes semiáridos. Assim, a fase fenológica pode ser um indicador da sua composição fitoquímica, embora estudos com essa abordagem sejam escassos. O objetivo deste trabalho foi investigar se mudanças na fase fenológica de *Commiphora leptophloeos* influenciam em seu potencial antibiofilme de *Candida* spp. **Métodos:** Extratos etanólico e hexânico de folhas e cascas da planta, em duas fases fenológicas distintas, i.e. com folhas e flores (coleta 1) e com frutos (coleta 2), foram testados frente a três cepas: *Candida albicans* URM 4387, *C. krusei* URM 6352 e *C. tropicalis* URM 4262. O efeito dos extratos foi avaliado em células plactônicas para determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima por meio da microdiluição, e na formação de biofilmes e em biofilmes pré-formados por meio da técnica colorimétrica com cristal violeta e da viabilidade celular com azul de metileno. **Resultados:** Todos os extratos apresentaram efeito inibitório entre as concentrações de 2mg/ml e 1mg/ml, assim como efeito fungicida em concentrações igual ou superior a 2mg/ml. Todos os extratos foram capazes de diminuir células viáveis nos biofilmes em mais de 50%. Não houve sinergismo entre os extratos e o Fluconazol. Os extratos da segunda coleta (época de frutificação) apresentaram melhores resultados na atividade na formação de biofilme de *Candida* spp. Os extratos da primeira coleta das folhas mostraram maior capacidade inibitória frente aos biofilmes pré-formados, e entre os extratos da casca, a segunda coleta foi mais eficiente. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) mostrou que havia maior quantidade de ácido gálico nas cascas de *C. leptophloeos* que folhas, não havendo diferença entre as coletas para essa parte do vegetal. Já para as folhas, a quantidade de ácido gálico encontrada na segunda coleta foi maior que a quantificada na primeira coleta. **Conclusão:** Percebe-se a capacidade promissora dos extratos de *C. leptophloeos* frente aos biofilmes de *Candida* spp. Os resultados implicam que as fases fenológicas não são o único fator a exercer

influência sobre o efeito antibiofilme, deve-se também levar em consideração a parte da planta utilizada.

**Palavras-chave:** Antifúngico, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, Fenologia.

## Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por diversas infecções anualmente (KUMAR et al., 2020). Além disso, essas leveduras têm se tornado cada vez mais resistentes aos antifúngicos conhecidos, principalmente os azóis, que é considerada a maior classe de antifúngicos contra *Candida* (PEREIRA et al., 2020). Alternativamente, os metabólitos secundários (MS) de plantas têm se mostrado como uma fonte promissora de moléculas com propriedades antifúngicas (KUMAR et al., 2020), as quais geralmente apresentam baixo peso molecular e possuem atividades biológicas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Apesar disso, sabe-se que a fase fenológica da planta pode interferir na composição química desses MS (CHEN et al., 2012; ÇIRAK et al., 2007; INÁCIO et al., 2016), entretanto, esse é um tema ainda pouco explorado.

A atividade biológica é influenciada por fatores como a idade da planta, temperatura, sazonalidade e fases fenológicas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A época de coleta da planta é vista como o fator de maior influência, uma vez que a quantidade e natureza dos compostos ativos não são constantes durante todo o ano (CHEN et al., 2012; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As variações na composição dos MS dependem de cada espécie e de cada parte da planta, já que o acúmulo desses MS vai mostrar a especificidade de cada parte ou tecido do vegetal (LI et al., 2020).

Entre as atividades biológicas provenientes desses MS está a ação antifúngica, que pode ser exercida pelo extrato vegetal como um todo, por compostos isolados da planta ou em conjunto com drogas já conhecidas e utilizadas, como o Fluconazol (GIORDANI et al., 2020). Um exemplo dessa capacidade sinérgica com essas drogas é o extrato etanólico da resina da casca de *Commiphora molmol* que mostrou atividade sinérgica com o oflaxacino e com o fluconazol, evidenciando o potencial dessa planta (ARORA et al., 2021).

*Commiphora leptophloeos* é uma planta medicinal conhecida como Imburana-de-Cambão, amplamente distribuída no semiárido brasileiro (SILVA et al., 2017). Os

extratos da casca de *C. leptophloeos* apresentaram atividade antibiofilme de *Candida* spp. (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a) e os extratos das folhas mostraram atividade antifúngica moderada contra *Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* em suas formas planctônicas (PESSOA et al., 2021). Dessa forma, esta espécie parece bastante promissora para avaliar a influência das suas fases fenológicas no potencial antifúngico.

Os principais compostos identificados nas folhas de *Commiphora leptophloeos* são a orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina, isoquercetrina e quercetrina (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021b). As cascas também têm na sua composição o ácido gálico (PEREIRA et al., 2017), que possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas e antimicrobiana (LIBERATO et al., 2022), além de ácidos fenólicos e taninos, este último tem a capacidade de reduzir biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (TRENTIN et al., 2013).

Nesse contexto, esse trabalho testou a hipótese que há alteração na composição fitoquímica das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em decorrência da época da coleta, e que, conseqüentemente, essa variação na composição influencia na sua ação antifúngica. Também foi avaliado o efeito dos extratos isolados e em associação com a droga Fluconazol contra biofilmes de *Candida* spp.

## **Materiais e Métodos**

### **Área de estudo e coleta do material botânico**

As folhas e cascas de cinco indivíduos de *Commiphora leptophloeos* foram coletadas na Fazenda Buenos Aires (07° 57' 45,6''S; 38° 23' 02,3'' W), uma área privada, com vegetação nativa bem preservada, localizada no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. A região é caracterizada por clima semiárido quente, tipo Bwh pela classificação de Köppen (MEDEIROS et al., 2020), com uma precipitação média anual de 574 mm (SOUZA et al., 2016).

*Commiphora leptophloeos* é uma espécie decídua, com fenologia influenciada diretamente pelo fotoperíodo, e secundariamente pela precipitação, tendo em vista que armazena grandes reservas de água (DE LIMA et al., 2012). Essa espécie inicia a perda de suas folhas ainda na estação chuvosa (do meio para o fim da estação) e inicia o brotamento de novas folhas no fim da estação seca (DE LIMA et al., 2012). No período de novembro a janeiro (Tabela 1), na transição entre as estações seca e chuvosa, ocorre o brotamento e início da floração (LEITE; MACHADO, 2010), e entre março e junho, estação chuvosa, ocorre a frutificação (SILVA et al., 2020).



**Tabela 1.** Diferenças das condições climáticas entre as coletas de *Commiphora leptophloeos* em Serra Talhada/PE. A primeira coleta foi realizada no fim da estação seca (dez/2020) e a segunda coleta realizada na estação chuvosa (mar/2021).

Coleta	Primeira (1)	Segunda (2)
<b>Data</b>	10/12/2020	04/03/2021
<b>Hora</b>	08:00 – 11:00	08:00 – 11:00
<b>Temp. média</b>	28°C	27°C
<b>Umidade média</b>	50%	60%
<b>Índice pluviométrico (do dia)</b>	0.0	0.0
<b>Índice pluviométrico total (do mês)</b>	1.7	186.8

Para avaliar se há influência da fase fenológica no efeito antibiofilme dos extratos, foram realizadas duas coletas. A primeira realizada no mês de dezembro de 2020, no fim da estação seca, quando a planta inicia a produção de folhas e flores, e a segunda em março de 2021, na estação chuvosa, quando há formação de frutos, ambas no período matutino (Figura 3).



**Figura 3.** *Commiphora leptophloeos* coletada em Serra Talhada/PE. (A) Coleta 1: dez/2020 – planta em fenofase vegetativa; (B) Coleta 2: mar/2021 – planta com frutos.

O material botânico de cinco indivíduos foi coletado nas mesmas condições ambientais, dentro de uma área de aproximadamente 0,1 ha. As cascas (~1kg de material fresco) foram coletadas retirando-as da segunda ou terceira ramificação, nunca ultrapassando 1/3 da circunferência total da ramificação. Foram coletadas folhas recém-expandidas e saudáveis (~800g de material fresco), observando se havia ausência de fungos ou marcas de ataques de herbívoros (FILIZOLA; SAMPAIO, 2015).

As folhas e cascas foram transportadas ao laboratório protegidas da luz e imediatamente colocadas em estufa de circulação de ar a 40°C por cinco dias para secagem completa (DA SILVA et al., 2019).

### **Obtenção dos extratos vegetais**

A extração foi realizada através da maceração das folhas e cascas separadamente, utilizando etanol 99,5% (P.A.) por 72 horas, seguida de filtração em papel Whatman (DA SILVA et al., 2019); o solvente foi evaporado utilizando um evaporador rotativo IKA RV 05 Basic, nunca ultrapassando 45°C. O mesmo processo foi repetido, substituindo o etanol por hexano (DA SILVA et al., 2019). A proporção utilizada na extração foi de 1g de material para 5 ml de solvente. Foram obtidos seis extratos sendo, dois extratos etanólicos das folhas das duas coletas (EEF1, EEF2); dois extratos hexânicos das folhas das duas coletas (EHF1, EHF2) e dois extratos etanólicos das cascas das duas coletas (EEC1, EEC2). Os extratos hexânicos das cascas não foram utilizados, uma vez que a quantidade obtida foi muito baixa, não sendo suficiente para fazer as análises.

### **Determinação de ácido gálico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC):**

Os extratos etanólicos foram analisados quanto à presença do ácido gálico, que é um composto fenólico com atividade antifúngica e antibiofilme de *Candida* spp. (GIORDANI et al., 2020). A análise foi feita usando o HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000, controlado pelo software Chromeleon Chromatography Management System, com coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Foi usado o método isocrático, com fase móvel consistindo de água acidificada com ácido acético 2% (fase A), e metanol puro (fase B), à uma taxa de fluxo de 0,8 mL / min, comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 270 nm, volume de injeção de 20 µl, e tempo de retenção de 10 min. O padrão utilizado na curva padrão foi ácido gálico nas concentrações de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 e 0.25mg/ml. Outros compostos não foram testados devido à falta de padrões, no laboratório, para comparação. O ácido gálico foi identificado pela comparação de seu tempo de retenção com o padrão correspondente (PEREIRA et al., 2017).

### **Cepas e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Fungicida (CMF):**

As cepas de *Candida albicans* (URM 4387), *C. tropicalis* (URM 4262) e *C. krusei* (URM 6352) foram obtidas por meio de colaboração com o Departamento de Biologia da Universidade Federal do Cariri (UFCA), Brejo Santo, Ceará, cultivadas a 37 °C e mantidas em meio Agar *Yeast Extract Peptone Dextrose* (A-YEPD: HIMEDIA) sob refrigeração.

A concentração inibitória mínima (CIM) é a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano responsável por inibir o crescimento de um microrganismo (bactéria ou fungo), ou seja, que tem atividade bacteriostática ou fungistática (ANDREWS, 2001). Já a concentração mínima fungicida (CMF) é aquela menor concentração do agente terapêutico capaz de impedir 100% do crescimento microbiano (BHATTI et al., 2014).

Para determinação da CIM, em placas de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 100 µl de C-YPD, 50 µl de cada concentração do extrato (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) e 50 µl da suspensão de células de leveduras ( $10^6$  células/ml) (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação (60 rpm). A CIM foi considerada a concentração mínima necessária para inibir a formação do biofilme (ausência de turvação no fundo do poço) quando comparado com o controle negativo (sem adição de extrato).

A CMF foi determinada por meio da técnica da gota, na qual 10 µl do conteúdo da CIM, bem como 10 µl dos conteúdos das duas concentrações dos extratos superior e inferior ao valor da CIM, foram semeadas em placas de Petri contendo Agar YEPD, segundo a metodologia de Jovito (2016). Essas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e após este período foi observado o crescimento ou não de colônias das leveduras. A CMF foi determinada pela menor concentração na qual não se observou o crescimento de colônias de leveduras na superfície do Agar YEPD.

Para ambas as análises, o controle positivo foi composto pela adição nos poços do C-YEPD mais a suspensão de células da levedura; já o controle negativo foi composto pela adição do C-YEPD mais os extratos do vegetal. Todo experimento foi realizado em triplicata.

#### **Determinação da capacidade de formação de biofilmes**

A capacidade de formação de biofilmes pelas cepas de *Candida* spp. selecionadas foi avaliada conforme a biomassa total dos biofilmes seguindo

metodologia descrita por Silva et al. (2009). As leveduras foram previamente cultivadas em A-YEPD por 18 h a 37 °C. Após este período, as células das leveduras foram suspensas em Água Destilada Esterilizada (ADE) e a quantidade de células foi ajustada para  $10^6$  cels/mL com o auxílio de uma escala de McFarland. Desta suspensão de células de leveduras, 50 µl foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato contendo Caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (C-YPD) e incubadas sob agitação a 60 rpm e 37 °C por 24 h. Após este período, o sobrenadante dos poços foi pipetado e descartado (SILVA et al., 2009).

Para avaliação da formação do biofilme, foi utilizado o método colorimétrico com cristal violeta, ou seja, após o crescimento dos biofilmes e retirada do sobrenadante, foram adicionados em cada poço 100 µl de uma solução de cristal violeta a 1% por 5 min. Após este período, o cristal violeta foi removido com auxílio de uma pipeta seguido da adição de 100µl de Etanol Absoluto (99,4 P.A.). Após solubilização e homogeneização do cristal violeta, todo o volume de cada poço foi transferido para uma nova placa de 96 poços, e foi submetida a leitura de Densidade Óptica (DO) (ELISA MULTISCAN GO, Thermo Scientific), em comprimento de onda de 492 nm (TAFF et al., 2013).

Foi considerada levedura formadora de biofilme aquelas com leitura de DO maior que 0,1, enquanto para a intensidade de formação de biofilme as leveduras foram classificadas como forte ( $>0,3$ ), moderada ( $>0,2$  e  $<0,3$ ) e fraca ( $>0,1$  e  $<0,2$ ), segundo Pfaller et al. (2006). O controle negativo foi realizado utilizando-se apenas o C-YPD. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

## **Avaliação do efeito anti-biofilme dos extratos por meio da técnica de microdiluição**

### **Na formação dos biofilmes**

Para avaliar o efeito dos extratos na formação dos biofilmes foram utilizados 100 µl de C-YEPD, 50 µl de cada concentração do extrato (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) e 50 µl da suspensão de células de leveduras ( $10^6$  células/ml) em placas de 96 poços, que foram incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação (60 rpm). As placas também continham poços sem os extratos, para controle de crescimento. Para quantificação da biomassa total dos biofilmes, foi utilizado o método

colorimétrico com cristal violeta e leitura em Leitor de placa de ELISA Multiscan GO Thermo Scientific, com comprimento de onda de 492nm. Este método é baseado na capacidade que o cristal violeta tem em se ligar às moléculas carregadas negativamente presentes na parede celular de leveduras, bem como na matriz extracelular de polissacarídeos produzida nos biofilmes, havendo então uma correlação direta entre a quantidade de biofilme (biomassa) formado e o valor da DO obtida (NEGRI et al., 2010).

#### **Em biofilmes pré-formados:**

Para formação dos biofilmes, foram adicionados 100 µl de C-YEPD e 50 µl da suspensão de células de leveduras ( $10^6$  células/ml) em placas de 96 poços, e incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação (60 rpm). Após este período, para verificar a influência dos extratos em biofilmes já formados, foram adicionados a cada poço 50 µl de cada concentração do extrato (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL), deixando os extratos em contato com os biofilmes, sob agitação (60 rpm), por 24 horas. Após este período, todo o sobrenadante foi removido com uma pipeta e a biomassa dos biofilmes foi quantificada pelo método colorimétrico com cristal violeta, como descrito no item anterior.

#### **Avaliação do efeito antibiofilme dos extratos por meio de coloração com azul de metileno**

Este método permite estimar a porcentagem de células viáveis presentes numa amostra e é baseado no fato de que células vivas contêm enzimas capazes de reduzir o azul de metileno a compostos incolores. Quando células estão imersas no azul de metileno, que entra no interior da célula, as enzimas das células vivas descoloram a matéria corante. Já as células mortas, nas quais a enzima está inativa, não reagem permanecendo coradas de azul (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014).

Assim, esta etapa foi realizada para avaliar, por meio de uma técnica independente de cultivo, o efeito dos extratos na viabilidade celular das leveduras estudadas, tanto na formação de biofilmes, como em biofilmes pré-formados, como já descrito anteriormente. Seguiu-se metodologia descrita por Ceccato-Antonini, Tosta e Silva (2004) com modificações.

Após contato com as diferentes concentrações dos extratos, tanto na formação de biofilmes, quanto em biofilmes pré-formados, foi retirado o sobrenadante e adicionado a

cada poço da placa multipoços 200 µl de tampão PBS e, com o auxílio de uma pipeta, as células foram gentilmente desprendidas do fundo do poço, transferidas para um tubo Eppendorf e centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e novamente foram adicionados 200 µl de tampão PBS. Este processo de lavagem foi realizado por 3 vezes para que fosse removido o extrato ou qualquer outra sujeira, evitando interferência na leitura dos resultados. Em cada amostra foi então adicionado 200 µl do corante azul de metileno (1%) e deixado em contato com as células das leveduras por 10 min. Após este período, utilizando uma câmara de Neubauer e microscópio ótico de campo claro, foi então observado um total de 100 células por amostra e calculada a estimativa de células viáveis (% da viabilidade = (número de células não coradas/número de células totais) x 100).

### **Na morfologia das células de leveduras**

Para avaliar se os extratos tinham efeito na estrutura das células e na formação de pseudohifas, foram preparadas lâminas das leveduras expostas às concentrações dos extratos de 1mg/ml e 0,125mg/ml. Nesta etapa, foi observado sob microscopia se houve alteração na morfologia celular das leveduras, se as mesmas emitem ou não tubo germinativo, se havia ou não células de reprodução assexuadas (brotos), ou ainda se as leveduras formavam ou não pseudohifas, parâmetros relacionados à virulência e à capacidade de formação de biofilmes das mesmas (CIUREA et al., 2020; MCKENZIE et al., 2010).

### **Análises Estatísticas**

Os dados obtidos para cada concentração de amostra foram verificados quanto à sua distribuição normal e, em seguida, analisadas por ANOVA de uma via e posteriormente por meio do teste de Tukey, usando o software R.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **Resultados**

Neste estudo foi avaliado se a fase fenológica que se encontra o vegetal na época de coleta influencia na capacidade antibiofilme de *Candida* spp. Percebeu-se que todos os extratos das folhas e cascas mostraram efeito inibitório tanto na formação dos

biofilmes quanto nos biofilmes pré-formados. Além disso, percebeu-se que, com relação à formação de biofilmes, os extratos da segunda coleta apresentaram maior efeito inibitório que os da primeira. Enquanto que frente aos biofilmes pré-formados, os extratos das folhas da primeira coleta foram melhores que os da segunda, e o extrato da casca da segunda coleta mostrou-se mais eficaz que o da primeira. Também foi verificada a presença do ácido gálico nas cascas e folhas de *C. leptophloeos*, sendo que as cascas continham uma quantidade significativamente maior que nas folhas, embora sem diferença entre as coletas. Nas folhas, a diferença na quantidade de ácido gálico é perceptível, já que na época de frutificação (segunda coleta) as folhas continham mais ácido gálico que quando na época vegetativa (primeira coleta).

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Fungicida (CMF)

A CIM dos extratos variou entre 1 mg/ml e 2 mg/ml (Tabela 1). Os menores valores da CIM obtidos foram de 1,75 mg/ml dos extratos EHF1 e EEC1 frente a *C. albicans* URM 4387, de 1 mg/ml do extrato EEF2, frente a *C. tropicalis* URM 4262 e de 1,5 mg/ml de todos os extratos frente a *C. cruzei* URM 6352.

Todos os extratos (de ambas as coletas) apresentaram efeito fungicida sobre as cepas estudadas, com concentração igual ou superior a 2 mg/ml (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em mg/ml, de extratos etanólicos e hexânicos das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (EEC) de *Commiphora leptophloeos* coletados em dez/2020 (Coleta 1) e mar/2021 (coleta 2) frente às cepas de *Candida* spp. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Extrato	Levedura					
	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	URM 4387		URM 6352		URM 4262	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
(mg/ml)		(mg/ml)		(mg/ml)		
<b>EEF1</b>	2	>2	1,5	2	1,5	2
<b>EHF1</b>	1,75	2	1,5	2	1,5	2
<b>EEC1</b>	1,75	2	1,5	2	1,5	2

<b>EEF2</b>	2	>2	1,5	2	1	2
<b>EHF2</b>	2	>2	1,5	2	1,5	2
<b>EEC2</b>	>2	>2	1,5	2	1,5	2

### Capacidade de Formação de biofilmes

Todas as cepas foram previamente testadas quanto à sua capacidade de formação de biofilme, e classificadas como forte (DO > 0,3), moderada (DO > 0,2 < 0,3) ou fraca (DO > 0,1 < 0,2).

Nesse sentido, *C. albicans* URM 4387 (DO = 0,35) e *C. krusei* URM 6352 (DO = 0,31) foram consideradas como fortes formadoras de biofilme, enquanto que *C. tropicalis* URM 4262 (DO = 0,29) foi considerada como formadora de biofilme moderada.

### Efeito dos extratos na formação dos biofilmes

Foi observado o efeito dos extratos etanólicos e hexânicos das folhas e cascas de *C. leptophloeos* na formação de biofilmes de *Candida* spp., por meio da quantificação das biomassas dos biofilmes, as quais foram determinadas pela técnica colorimétrica com cristal violeta e posterior leitura das respectivas Densidades Ópticas (DOs).

Os valores das DOs indicam a quantidade de biomassa dos biofilmes fúngicos formados em cada poço da placa de microdiluição. Assim, considera-se que, quanto menor a leitura da DO, menor a biomassa presente, conseqüentemente, melhor a ação do extrato na inibição da formação do biofilme.

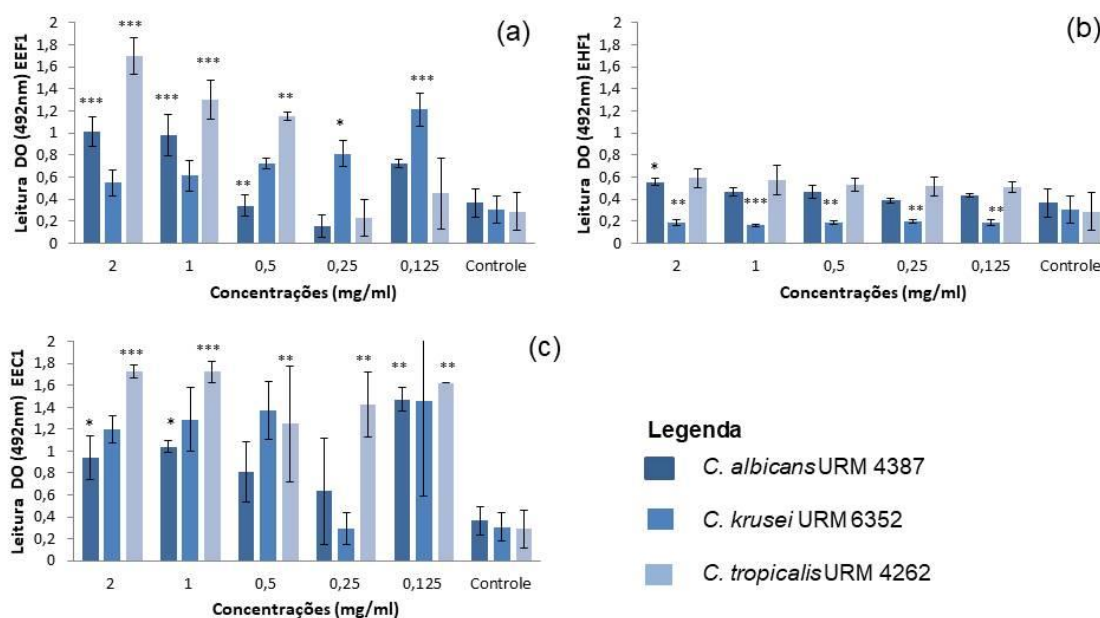
Percebe-se que o efeito do extrato EEF1 sobre a cepa de *C. krusei* foi significativo (Figura 4a). Embora o valor da DO do extrato EEF1 tenha sido maior que a do controle, nota-se que há uma relação indireta entre as concentrações do extrato e a biomassa observada. No entanto, não é possível constatar esse padrão ao analisarmos o efeito do extrato EEF1 sobre as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Figura 4a). Para essas leveduras, acontece o inverso: nas maiores concentrações dos extratos os valores da DO são maiores quando comparados às menores concentrações dos extratos. Desta forma, uma das possíveis explicações para os resultados obtidos por meio desta técnica, é que o efeito do extrato não foi inibitório, mas sim favoreceu o crescimento do biofilme.



O extrato EHF1 também se mostrou eficiente quando testado contra *C. krusei* URM 6352 (Figura 4b). Desta vez, o valor da DO de todas as concentrações testadas foram menores que a do controle, mostrando o efeito inibitório deste extrato. Assim, destacamos que o extrato EHF1 foi o único que, quando comparado ao controle, inibiu o desenvolvimento de biofilmes por *C. cruzei* URM 6352.

Quando testado contra *C. albicans* URM 4387 e *C. tropicalis* URM 4262, o extrato EHF1 apresentou uma leitura maior que a do controle, ao contrário do esperado, ou seja, causando também um possível favorecimento do crescimento do biofilme por estas leveduras.

O extrato EEC1 apresentou maior valor de DO que todos os controles das leveduras testadas (Figura 4c), além de não haver uma relação inversa entre a concentração do extrato e a quantidade de biomassa dos biofilmes.

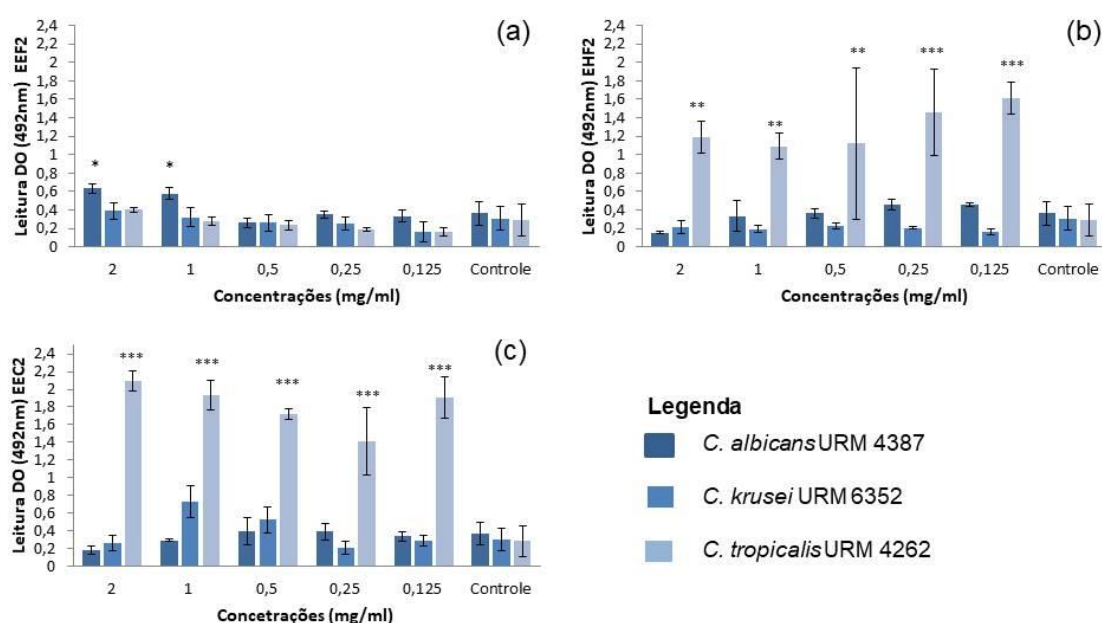


**Figura 4.** Valores das Densidades Ópticas (DO), em 492 nm, dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *C. leptophloeos*, coletados em dez/2020 (coleta 1), sobre a formação de biofilme de *Candida* spp. As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas entre os valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

O extrato etanólico de folhas da segunda coleta (EEF2) conseguiu inibir o desenvolvimento do biofilme das cepas de *C. krusei* e *C. tropicalis* (Figura 4a), pois os valores de DO foram menores que as dos controles.

O extrato hexânico de folhas da segunda coleta (EHF2) (Figura 5b) foi eficiente frente à formação de biofilmes de *C. albicans*, nesse caso nota-se que além dos valores de DO terem sido menores que o controle, as leituras têm relação indireta com a concentração, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, menor a quantidade de biomassa do biofilme para essa levedura. Para as outras duas cepas de *Candida*, não se observa esta relação.

A eficiência do extrato etanólico de casca da coleta 2 (EEC2) (Figura 5c) é percebida sobre a formação dos biofilmes de *C. albicans* URM 4387, que da mesma forma que o EHF2, mostrou valores de DOs menores que o controle, e com a relação valor da DO/concentração do extrato atendida.



**Figura 5.** Valores das Densidades Ópticas (DO), em 492 nm, dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em mar/2021 (coleta 2), sobre a formação de biofilme de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### Efeito dos extratos em biofilmes pré-formados

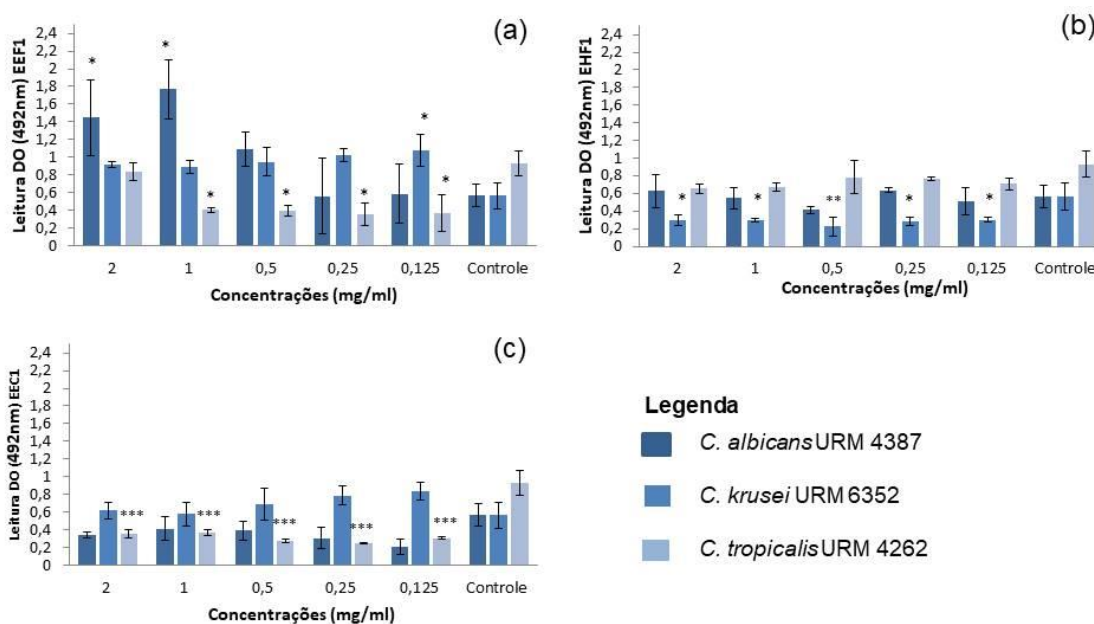
Para essa análise, foi feita a leitura das DOs dos biofilmes pré-formados sem ação dos extratos, ou seja, os controles positivos e que são utilizados como padrão comparativo para analisar os efeitos dos extratos em biofilmes pré-formados das leveduras estudadas.

Observou-se que, o extrato EEF1 (Figura 6a) apresentou efeito contra os biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* URM 4262, pois, com exceção da concentração

de 2 mg/ml, as leituras de DO foram menores na presença dos extratos, quando comparadas ao controle positivo. Para este mesmo extrato, os valores das DOs dos biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* foram todos maiores que o controle positivo, podendo aqui ter havido uma influência positiva deste extrato no desenvolvimento dos biofilmes.

Os valores de DO após ação do extrato EHF1 (Figura 6b) foram menores que todos os controles das cepas testadas. No entanto, não foi apresentada a correlação esperada, ou seja, quando mais concentrado o extrato, menor a biomassa do biofilme.

O extrato EEC1 (Figura 6c) também apresentou valores de DOs menores que os controles das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, novamente sem o padrão esperado. Esse padrão, porém, é observado quando o extrato está em contato com o biofilme de *C. krusei*, cuja leitura aumenta à medida que diminui a concentração, mesmo sendo uma DO maior que a do controle.



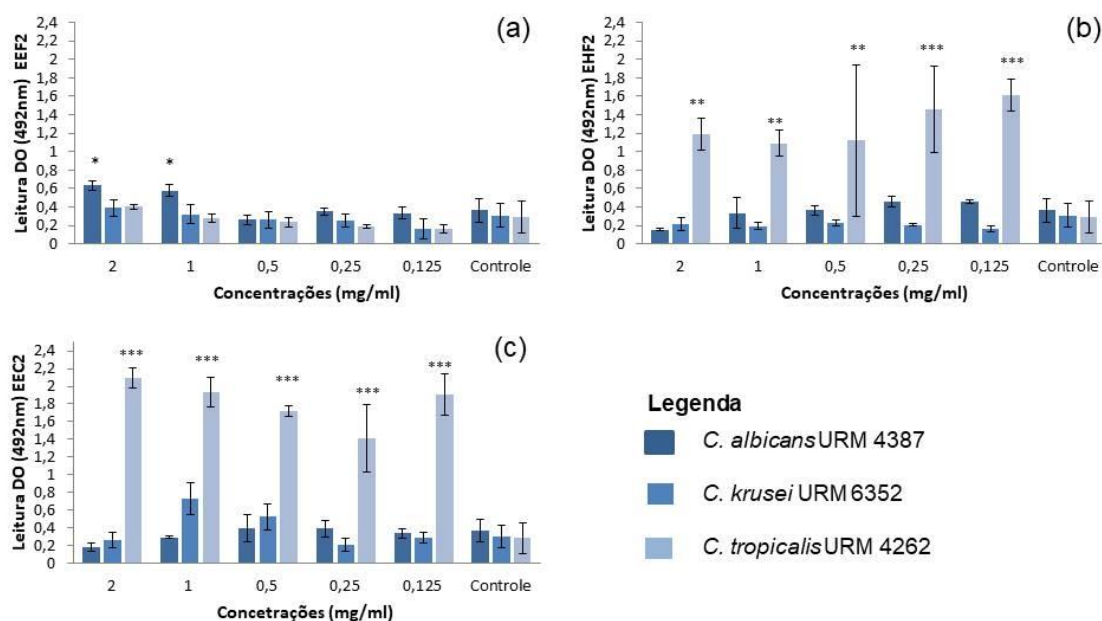
**Figura 6.** Valores da Densidade Óptica (DO – 492 nm) dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólicos das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em dez/2020 (coleta 1), sobre biofilmes pré-formados de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras expressam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p <0,001.

O extrato EEF2 (Figura 7a) apresentou efeito significativo contra os biofilmes pré-formados de *C. albicans* URM 4387 e *C. tropicalis* URM 4262, no entanto, foi verificado que a concentração mais alta teve uma maior leitura de DO que as demais

concentrações, sugerindo, novamente, que os extratos tenham favorecido o desenvolvimento dos biofilmes.

O extrato EHF2 (Figura 7b) apresentou efeito antibiofilme contra a cepa de *C. krusei* URM 6352. Aqui percebe-se o efeito oposto do extrato EEF2 (Figura 7a), pois contra essa levedura o extrato apresentou valor de DO menor que a do controle, principalmente na concentração mais alta (2 mg/ml) mostrando sua capacidade de diminuir a biomassa do biofilme.

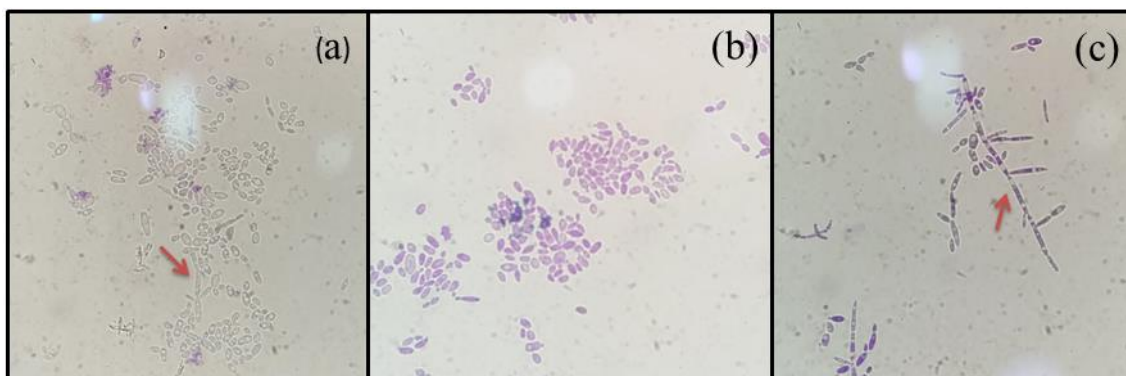
No extrato EEC2 (Figura 7c), os valores de DO foram menores que todos os controles para as três leveduras estudadas, indicando o efeito inibitório desse extrato.



**Figura 7.** Valores das Densidades Ópticas (DO) dos extratos etanólicos (a) e hexânicos (b) das folhas (EEF e EHF) e etanólico das cascas (c) (EEC) de *Commiphora leptophloeos*, coletados em mar/2021 (coleta 2), sobre biofilmes pré-formados de *Candida* spp. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças estatísticas dos valores das médias da DO comparadas com o controle para cada cepa de *Candida* spp. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### Análise morfológica das leveduras

Foi observado que, na presença dos extratos (EEF1, EHF1, EEC1, EEF2, EHF2 e EEC2), as leveduras não se multiplicaram, apresentando assim uma menor quantidade de células, visualmente, quando comparadas com o controle positivo (células sem o extrato). Esse controle mostrava uma grande quantidade de células em divisão (brotamento), enquanto que as células das leveduras que foram submetidas à ação dos extratos apresentavam uma quantidade muito menor de brotamentos e pseudohifas (Figura 8).



**Figura 8.** Efeitos dos extratos sobre a morfologia das leveduras *Candida* spp. As setas indicam as pseudohifas. Observa-se que em (a) as pseudohifas são menos evidentes que em (c). (a) Extrato Etanólico das Cascas da coleta 2 – EEC2 (0,125mg/ml) frente à *C. krusei* URM 6352. (b) Extrato Hexânico das Folhas da coleta 2 – EHF2 (0,125mg/ml) frente à *C. krusei* URM 6352. (c) Controle de *C. krusei* URM 6352.

### Viabilidade celular – Azul de metileno

Essa metodologia permite observar a quantidade de células não viáveis, através da coloração com azul de metileno e contagem das células. Assim, considera-se que quanto maior o número de células não viáveis, maior a capacidade antifúngica e antibiofilme do extrato.

#### Na formação de biofilmes

Todos os extratos, de ambas as coletas, foram capazes de diminuir a formação dos biofilmes das cepas de *Candida* spp. (Tabelas 3, 4 e 5). No extrato EEF1, sua forte coloração na maior concentração (2mg/ml) impediu a visualização das células, portanto não foi possível contabilizar as células afetadas por esse extrato nessa concentração. No entanto, percebe-se que a concentração 1mg/ml foi capaz de diminuir mais de 50% das células de todas as leveduras estudadas, tendo maior efeito sobre *C. tropicalis* URM 4262, diminuindo mais de 86% das células (Tabela 5).

O extrato EHF1, na concentração de 2mg/ml diminuiu 84,6% das células de *C. albicans* URM 4387 (Tabela 2), 94,6% das células de *C. krusei* URM 6352 (Tabela 4) e 87,6% de *C. tropicalis* URM 4262 (Tabela 5). Quando comparados os efeitos do extrato etanólico (EEF1) e hexânico de folhas (EHF1) sobre as leveduras, o extrato EHF1 teve um efeito maior em todas as concentrações (Tabela 3, 4 e 5). O extrato EEC1 também foi mais eficiente contra as leveduras de *C. krusei* URM 6352 (Tabela 4), inviabilizando 96,3% das células. Além disso, o extrato da casca da primeira coleta apresentou maior efeito que o extrato da folha (EEF1) sobre as leveduras testadas (Tabela 3, 4 e 5).

O extrato EEF2 foi mais eficiente contra *C. tropicalis* URM 4262, diminuindo mais de 89% das células na concentração de 1mg/ml (Tabela 5). O extrato EHF2 teve maior eficiência na concentração de 2mg/ml contra todas as cepas de *Candida* (Tabela 3, 4 e 5). Quando comparado o efeitos dos dois extratos sobre as leveduras, o extrato EEF2 apresentou melhores resultados em todas as concentrações.

Da mesma forma, o extrato EEC2 também apresentou maior eficiência na concentração mais alta (2mg/ml) contra *C. krusei* URM 6352 (Tabela 5) e *C. tropicalis* URM 4262 (Tabela 5), já contra *C. albicans* URM 4387 a concentração de 0,5mg/ml foi mais eficiente, pois não houve diferença estatística significativa em comparação as concentrações superiores. Quando comparado com o extrato das folhas, o extrato EEF2 foi mais eficiente em inibir a formação dos biofilmes.

Quando comparadas as diferenças nos efeitos dos extratos de coletas diferentes, percebe-se que mesmo na concentração mais baixa, ou seja 0,125mg/ml, o extrato EEC2 apresentou efeito maior que o EEC1. Entre os extratos das folhas, a capacidade inibitória do extrato etanólico da segunda coleta (EEF2) foi maior que o da primeira (EEF1). Porém nos extratos hexânicos ocorre o inverso, o extrato EHF1 tem maior efeito sobre as leveduras que o EHF2.

Isso implica dizer que a fase fenológica do vegetal não é único fator que influencia na potencialidade dos extratos. Embora todos tenham tido algum efeito sobre *Candida* spp., é necessário se ater a parte da planta e ao solvente utilizado.

### **Em biofilmes pré-formados**

Quando testado contra o biofilme pré-formado de *C. albicans* URM 4387 (Tabela 6), o extrato EEF1 foi capaz de diminuir as células do biofilme em 52% na concentração de 1mg/ml. Novamente, não foi possível observar a quantidade de células viáveis na concentração de 2 mg/ml devido à coloração do extrato. No entanto, na concentração de 1 mg/ml percebe-se a eficiência do extrato, já que foi capaz de diminuir mais de 70% as células viáveis dos biofilmes de *C. krusei* URM 6352 (Tabela 7) e *C. tropicalis* URM 4263 (Tabela 8).

O extrato EHF1 (Tabela 6) foi mais eficiente contra o biofilme de *C. albicans* URM 4387 diminuindo em mais de 70% as células viáveis do biofilme, na concentração de 1 mg/ml. Quando feita a comparação entre os extratos das folhas, EEF1 e EHF1, percebeu-se que, sobre biofilmes pré-formados o extrato etanólico teve maior efeito inibitório. O extrato EEC1 foi capaz de reduzir mais de 80% do biofilme de *C. albicans*

(Tabela 6) e *C. tropicalis* (Tabela 8), e quando comparado com o efeito do extrato das folhas, EEC1 apresentou melhor efeito em todas as concentrações.

O extrato EEF2 foi mais eficiente contra os biofilmes de *C. albicans* (Tabela 6) e *C. krusei* (Tabela 7) com redução desses biofilmes superior a 70% desses biofilmes na concentração de 1 mg/ml. O biofilme de *C. albicans* URM 4387 sofreu a maior redução (67% do biofilme) em contato com o extrato EHF2 (Tabela 7) quando comparada às outras leveduras. Assim, como na primeira coleta, o EEF2 foi mais eficiente que o EHF2 quando testados frente aos biofilmes pré-formados. Já em contato com o extrato EEC2, *C. krusei* (Tabela 7) que teve uma maior redução, já que o extrato tornou 90% das células dos biofilmes em não viáveis na concentração de 2 mg/ml. Esse extrato também foi mais eficaz que o extrato das folhas (EEF2).

Houve diferença entre os efeitos dos extratos em coletas diferentes. Entre os extratos das cascas, percebeu-se que o EEC2 teve maior capacidade antibiofilme que o EEC1, mesmos nas concentrações mais baixas. Entre os extratos das folhas, os extratos da primeira coleta (EEF1 e EHF1) foram os apresentaram maior efeito sobre os biofilmes pré-formados.

Assim, da mesma forma que na formação de biofilme, fica evidente que não se pode considerar a fase fenológica como único fator determinante a influenciar a atividade biológica. Deve-se também levar em consideração a parte da planta e o solvente para obter uma melhor ação dos extratos.

## 6.1. Na formação de biofilmes

**Tabela 3.** Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. albicans* URM 4387 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planquitônicas não viáveis de *C. albicans* URM 4387 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Concentração do extrato (mg/ml)						Concentração do extrato (mg/ml)					
EEF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	NV	55,3 <sup>***</sup>	44,3 <sup>***</sup>	22,3 <sup>***</sup>	10,6	Média	NV	79,6 <sup>***</sup>	65,0	54,0 <sup>**</sup>	36,0
DP		±3,6	±1,2	±2,4	±3,0	DP		±2,0	±5,3	±0,8	±4,5
EEC1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEC2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	91,3	84,6 <sup>**</sup>	72,0	67,6 <sup>*</sup>	54,3	Média	81,0	73,3	65,3	50,3 <sup>*</sup>	45,3
DP	±6,0	±6,1	±6,5	±8,5	±6,6	DP	±1,7	±4,7	±1,1	±4,1	±3,5
EHF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EHF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	84,6 <sup>*</sup>	77,6 <sup>***</sup>	72,6 <sup>***</sup>	66,0 <sup>***</sup>	54,6	Média	80,0	64,6 <sup>*</sup>	58,6 <sup>***</sup>	57,6 <sup>**</sup>	44,6
DP	±3,5	±3,7	±3,2	±1,7	±1,5	DP	±2	±3,2	±1,1	±1,5	±0,5

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.



**Tabela 4.** Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. krusei* URM 6352 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planquitônicas não viáveis de *C. krusei* URM 6352 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p <0,001.

Concentração extratos (mg/ml)						Concentração extratos (mg/ml)					
EEF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	NV	75,0*	68,6***	56,3**	42,3	Média	NV	86,6***	61,3***	50,6***	36,6
DP		±5,2	±2,3	±1,1	±1,5	DP		±1,5	±3,2	±2,5	±2,8
EEC1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEC2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	96,3***	87,3	79,6	45,0**	32,3	Média	93,6***	70,0***	60,0***	50,6*	40,3
DP	±1,5	±3,0	±4,1	±6,0	±3,0	DP	±3,5	±2,0	±2,6	±3,7	±3,5
EHF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EHF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	94,6**	88,3***	64,6	53,3**	42,3	Média	81,3	67,3	55,6***	44,3***	32,3
DP	±2,0	±3,5	±0,5	±1,5	±2,0	DP	±2,3	±3,0	±2,0	±3,5	±1,1

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.

**Tabela 5.** Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* na formação de biofilmes de *C. tropicalis* URM 4262 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células planctônicas não viáveis de *C. tropicalis* URM 4262 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p<0,001.

Concentração dos extratos (mg/ml)						Concentração dos extratos (mg/ml)					
<b>EEF1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>	<b>EEF2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>
Média	NV	86,3 <sup>***</sup>	79,0	63,0 <sup>**</sup>	51,6	Média	NV	89,3	74,0 <sup>***</sup>	61,0 <sup>***</sup>	57,0
DP		±2,0	±1,0	±3,6	±3,0	DP		±2,5	±3,6	±2,6	±2,0
<b>EEC1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>	<b>EEC2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>
Média	91,3 <sup>***</sup>	80 <sup>***</sup>	76,6 <sup>***</sup>	41,6 <sup>**</sup>	19,6		91,6 <sup>***</sup>	69,3	50,3	47,0 <sup>***</sup>	34,6
DP	±3,2	±2	±1,5	±2,5	±2,0	DP	±5,6	±2,0	±4,0	±1,7	±3,5
<b>EHF1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>	<b>EHF2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,250</b>	<b>0,125</b>
Média	87,6	83,3	66,6	58,6	49,0	Média	82,0	70,6 <sup>***</sup>	53,6 <sup>*</sup>	46,6 <sup>***</sup>	39,3
DP	±0,5	±3,7	±0,5	±3,0	±2	DP	±2,6	±2,0	±1,1	±2,5	±2,5

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.

## 6.2. Em biofilmes pré-formados

**Tabela 6.** Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. albicans* URM 4387 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. albicans* URM 4387 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p <0,001.

Concentração do extrato (mg/ml)						Concentração do extrato (mg/ml)					
<b>EEF1</b>	2	1	0,5	0,250	0,125	<b>EEF2</b>	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	NV	52,0**	34,6***	19,6**	10,6	Média	NV	71,0**	50,0*	42,6**	28,6
DP		±2,6	±2,8	±2,08	±1,5	DP		±3,6	±2,6	±4,1	±2,5
<b>EEC1</b>	2	1	0,5	0,250	0,125	<b>EEC2</b>	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	87,3	80	62,3	58,0	47,3	Média	75,0	69,0	59,6**	51,0	39,3
DP	±4,7	±2,6	±4,7	±4,3	±2,0	DP	±5,0	±2,6	±4,7	±4,0	±3,2
<b>EHF1</b>	2	1	0,5	0,250	0,125	<b>EHF2</b>	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	77,6	71,0	58,0	39,0**	20,6	Média	67,6***	64,6*	55,6	29,3***	18,0
DP	±1,1	±1,7	±3,0	±1,7	±3,2	DP	±0,5	±3,2	±3,0	±2,5	±3,0

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.

**Tabela 7.** Influência das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. krusei* URM 6352 por meio da técnica com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. krusei* URM 6352 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p<0,001.

Concentração extratos (mg/ml)						Concentração extratos (mg/ml)					
EEF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	NV	70,3	63,0**	44,3***	33,6	Média	NV	73,0***	51,3**	32,3***	17,3
DP		±3,2	±2,0	±3,5	±1,1	DP		± 3,5	±1,8	±2,4	± 1,6
EEC1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEC2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	80	63,3	59,6***	35,3*	22,3	Média	90,0***	76,3*	61,0*	35,3*	29,3
DP	±3	±5,5	±2,5	±2,5	±2,3	DP	±1,0	±1,1	±1,7	±2,5	±2,0
EHF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EHF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	65,6*	52,6***	35,0***	32,6***	21,3	Média	59,0***	54,0**	47,3**	34,3**	14,3
DP	±2,5	±3,7	±2,0	±3,5	±2,0	DP	±4,0	±3,0	±2,0	±0,5	±2,0

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.

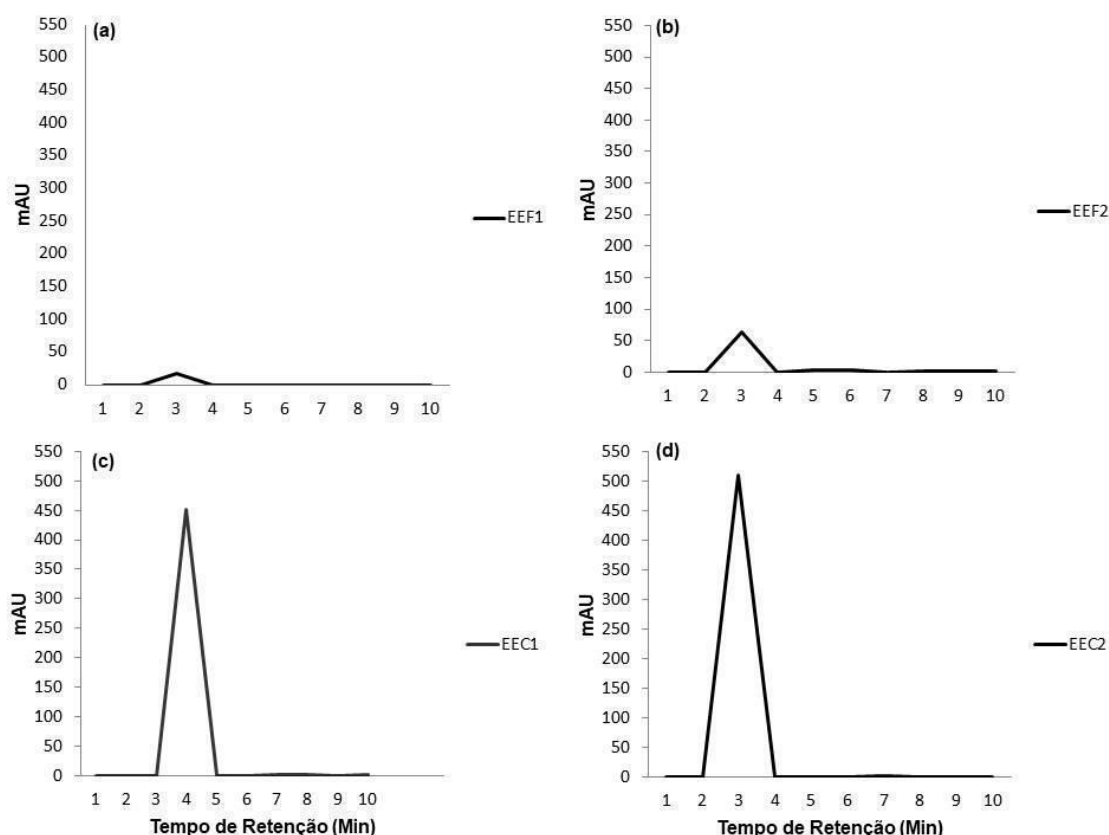
**Tabela 8.** Influência dos extratos das folhas e cascas de *Commiphora leptophloeos* em biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* URM 4262 por meio da técnica de coloração com azul de metileno. Os valores indicam a porcentagem de células em biofilme não viáveis de *C. tropicalis* URM 4262 após ação de diferentes extratos de *Commiphora leptophloeos*. Os valores estão expressos pela média aritmética das triplicatas. Os símbolos indicam diferenças estatísticas do percentual de células viáveis comparadas com o controle para cada extrato. \* = p <0,05; \*\* = p <0,01; \*\*\* = p<0,001.

Concentração extratos (mg/ml)						Concentração extratos (mg/ml)					
EEF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	NV	74,6*	56,6***	53,6**	40	Média	NV	67,3***	62,0***	38,6	16,3
DP		±3,2	±4,7	±4,7	±2,6	DP		±4,5	±3,4	±6,0	±3,0
EEC1	2	1	0,5	0,250	0,125	EEC2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	87,3**	76,6	58,0***	30,3***	17,3	Média	87,3***	58,6***	51,6	42,6*	19,3
DP	±2,0	±0,5	±4,0	±2,5	±3,2	DP	±2,5	±3,2	±5,7	±0,5	±4,5
EHF1	2	1	0,5	0,250	0,125	EHF2	2	1	0,5	0,250	0,125
Média	64,3	58,3***	50,3*	43,6**	19,6	Média	61,0***	58,6***	41*	32,3*	15,3
DP	±4,0	±7,0	±4,0	±3,0	±2,0	DP	±3	±0,5	±2,0	±3,0	±2,8

DP = desvio padrão; NV = não visível; EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta 1; EEF2 - EEF1- Extrato etanólico de folha – coleta2; EEC1 - Extrato etanólico de caule – coleta 1; EEC2 - Extrato etanólico de caule – coleta 2; EHF1 - Extrato hexânico de folha – coleta 1; EHF2 - Extrato hexânico de folha – coleta 2.

## 7. Determinação da presença de ácido gálico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC):

A análise por HPLC foi realizada a fim de determinar se havia diferença na quantidade de ácido gálico nos extratos obtidos a depender da época de coleta. Foi verificada a presença de ácido gálico nos extratos etanólicos de folhas e cascas, em ambas as coletas (Figura 9). No entanto, o extrato da folha apresentou uma concentração mais baixa do ácido gálico na primeira coleta (0,0003 mg/ml) quando comparado com a segunda (0,0023 mg/ml) (Figura 9b). A concentração de ácido gálico nas cascas variou de 0,0160 mg/ml (coleta 1) e 0,0218 mg/ml (coleta 2), contudo essa diferença não foi significativa, indicando que esse composto não varia temporalmente nessa parte da planta.



**Figura 9.** Presença e quantificação de ácido gálico em extratos etanólicos das folhas (EEF) e cascas (EEC) de *Commiphora leptophloeos* coletada em dez/2020 (coleta 1) e mar/2021 (coleta 2). a) EEF1; b) EEF2; c) EEC1; d) EEC2.

## Discussão

Uma das dificuldades de se combater infecções por *Candida* spp., é a capacidade desses microrganismos formarem biofilmes que dificulta, e por vezes impede, a ação de antifúngicos (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Além disso, espécies desse gênero também são capazes de mudar sua forma de levedura (unicelular) para uma forma pluricelular, com formação de hifas ou pseudohifas (CIUREA et al., 2020) dificultando a entrada de antifúngicos no biofilme e impossibilitando sua ação.

O presente estudo foi realizado para entender se o efeito dos extratos de *C. leptophloeos* sobre biofilmes de *Candida* spp. varia a depender da época de coleta da planta, ou seja, da sua fase fenológica. Para tal, avaliou-se como os extratos influenciaram na formação de biofilmes e no desenvolvimento de biofilmes pré-formados, sendo utilizada a técnica colorimétrica com cristal violeta que possibilita a quantificação da biomassa dos biofilmes.

Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada dentro deste campo da pesquisa (COSTA et al., 2013), a análise dos resultados obtidos por meio da técnica com cristal violeta levantaram algumas questões, por exemplo: (1) os valores das DOs dos controles, em sua maioria, estavam abaixo dos valores das DOs após ação dos extratos, resultado este não esperado, uma vez que nos controles não há ação de nenhum agente inibitório, nos levando a sugerir que os extratos estimularam a formação dos biofilmes na maioria dos tratamentos; (2) não se observou a relação esperada entre a concentração dos extratos e a quantidade de biomassa fúngica, ou seja, para a maioria dos extratos, quanto maior a concentração do extrato, maior era a biomassa fúngica, também nos levando a sugerir que os extratos estimularam a formação dos biofilmes; e por fim, (3) a coloração dos extratos pode ter interferido na leitura dos valores das DOs no espectrofotômetro.

O fato de que a forte coloração dos extratos, especialmente dos extratos etanólicos das folhas, ter dificultado a leitura dos resultados por meio do espectrofotômetro, apesar das diluições que foram realizadas, também foi observado em outros estudos tratando da mesma espécie de planta (DANTAS-MEDEIROS et al., 2021a).

Assim, esta terceira questão levantada, nos fez realizar os testes por meio da técnica de viabilidade celular com azul de metileno. Esta técnica permite quantificar células de leveduras não viáveis, uma vez que estas não apresentam atividade enzimática, não conseguindo reduzir o corante azul de metileno. Quando analisados os resultados obtidos, percebeu-se que todos os extratos apresentaram capacidade inibitória, tanto na formação de biofilmes, quanto também em biofilmes pré-formados.

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para avaliar os biofilmes formados por *Candida* spp. Entre elas a contagem de células viáveis é um dos métodos mais utilizados, inclusive para análise da eficácia de antifúngicos contra biofilmes de *Candida* spp. (COSTA et al., 2013).

Após as análises, percebeu-se que os extratos da segunda coleta das cascas, na qual o vegetal estava com formação de frutos, apresentaram um efeito mais inibitório sobre os biofilmes quando comparados com os extratos da casca da primeira coleta, quando o vegetal estava com formação de folhas e flores. Já para os extratos das folhas, os extratos da primeira coleta apresentaram melhores resultados.

Além da capacidade de diminuir a formação do biofilme, os extratos foram capazes de diminuir a biomassa do biofilme já formado. Esse efeito antimicrobiano das cascas e folhas de *C. leptophloeos* também foi observado por outros autores (PEREIRA et al., 2017; PESSOA et al., 2021).

Os extratos de *C. leptophloeos* também foram capazes de diminuir a formação de pseudohifas de *C. albicans* URM 4387, *C. krusei* URM 6352 e *C. tropicalis* URM 4262, que é considerado um importante fator de virulência dessas leveduras (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Apesar de serem necessários estudos clínicos, o fato dos extratos mostrarem essa capacidade em laboratório, mostra que os extratos apresentam alta capacidade antifúngica, sendo uma fonte promissora de compostos que possam ser usados no tratamento dessas infecções.

Através da técnica de HPLC, foi realizada a quantificação de ácido gálico, que é um composto fenólico, conhecido por suas propriedades antioxidantes e antibiofilmes de bactérias e de *C. albicans* (GIORDANI et al., 2020).

Foi observada que a presença do ácido gálico nos extratos etanólicos das cascas foi em maior quantidade que nos extratos das folhas. A época da coleta não influenciou



a quantidade de ácido gálico nos extratos das cascas, no entanto, o extrato das folhas da segunda coleta apresentou maior quantidade do composto que o da primeira coleta.

A presença desse composto é um indicativo do potencial desses extratos frente ao biofilme, uma vez que esse composto atua na suspensão da adesão das células de levedura à superfície (LAHIRI et al., 2019). Adicionalmente, em um estudo recente, Liberato et al, (2022) estudaram os efeitos do ácido gálico em *Candida* spp. resistente ao fluconazol, e concluíram que este age de diferentes formas na célula desta levedura, e.g. interferindo na integridade da membrana bem como no potencial transmembrana das mitocôndrias, causando apoptose celular.

No presente trabalho foi observada a presença do ácido gálico em todos os extratos etanólicos das folhas e cascas, apesar de em diferentes quantidades. Esse resultado corrobora com estudos anteriores, que encontraram ácido gálico nas cascas de *C. leptophloeos* (PEREIRA et al., 2017).

As cascas de *C. leptophloeos* apresentaram uma maior quantidade de ácido gálico que as folhas, em ambas as coletas. Já nas folhas, observa-se que a quantidade desse composto foi maior na segunda coleta. Isso indica que as folhas tendem a produzir mais ácido gálico na época de frutificação.

O ácido gálico tem propriedades antifúngicas que podem ser importantes para a defesa da planta contra doenças causadas por patógenos fúngicos. Um estudo recente também reportou variações na quantidade de ácido gálico em meses diferentes, o que pode estar relacionando com a construção da defesa química da planta durante seu desenvolvimento (ZHOU et al., 2020).

É evidente que as atividades biológicas, exercidas pelos metabólitos secundários das plantas, podem sofrer influência da fase fenológica em que se encontra o vegetal na época de coleta (ÇIRAK et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Ao avaliarmos os efeitos dos extratos, de diferentes fases fenológicas, sobre os biofilmes pré-formados de *Candida* spp., percebe-se que os extratos da casca preparados na fase de frutificação da planta foram ligeiramente melhores. Apesar de ser uma diferença pequena, esses extratos apresentaram um maior percentual de células inviáveis quando comparados com a primeira coleta.

Diferenças na quantidade de metabólitos a depender da fase fenológica foram reportadas para outras espécies (ÇIRAK et al., 2007; SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017), no entanto, essa é a primeira vez que esse estudo é realizado com *C. leptophleas*.

Essa espécie é caracterizada por iniciar o brotamento das folhas no fim da estação seca, assim, quando chega a estação chuvosa a planta já está com frutos prontos para a dispersão (DE LIMA et al., 2012). Essa estratégia pode explicar porque os extratos da casca da segunda coleta (época chuvosa) apresentaram maior efeito que os da primeira, uma vez que, como a planta já está em seu pleno desenvolvimento, podendo então investir energia na produção de metabólitos secundários que tenham atividades biológicas.

No entanto, para as folhas, os extratos da primeira coleta que apresentaram maior capacidade antibiofilme. Assim, fica evidente que a fase fenológica não é o único fator a determinar a atividade biológica da planta. Sabe-se que diferenças na composição dos metabólitos secundários ocorre de forma diferente para cada parte da planta (CHEN et al., 2012), já que, na mesma época, partes os tecidos vegetais produzem metabólitos diferentes em quantidades diferentes.

Assim, cabe ao pesquisador, investigar qual parte da planta oferece em melhor resultado e em qual fase fenológica/época de coleta esse resultado é otimizado.

## **Conclusão**

As atividades biológicas das plantas são resultados da ação de metabólitos secundários produzidos, os quais sofrem influências da fisiologia do vegetal. Assim, determinar a época de coleta de um material botânico é crucial para o desenvolvimento de extratos com sua capacidade máxima. Assim, testamos se havia influência das fases fenológicas (vegetativa e reprodutiva) de *Commiphora leptophloeos* sobre biofilmes de *Candida* spp. Percebeu-se que houve uma ligeira diferença entre o efeito dos extratos das folhas e cascas de *C. leptophloeos* sobre os biofilmes de *Candida* spp., sendo que, os extratos da casca obtidos na segunda coleta apresentaram maior efeito. Ao analisarmos a presença de ácido gálico nos extratos, percebemos que, embora as cascas apresentem uma quantidade maior de ácido gálico, não houve diferença significativa entre as coletas. No entanto, essa diferença é perceptível nos extratos das folhas. Esses resultados indicam

que, a depender do objetivo do pesquisador, a época de coleta e a parte da planta a ser utilizada são fatores importantes a serem considerados para se obter os melhores resultados de uma determinada atividade biológica, bem como maiores concentrações do composto desejado.

## REFERÊNCIAS

- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5–16, 2001.
- ARORA, S. et al. Synergistic Effect of Plant Extracts on Endodontic Pathogens Isolated from Teeth with Root Canal Treatment Failure: An In Vitro Study. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 552, 9 maio 2021.
- BHATTI, H. N. et al. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1597–1626, 2014.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; DA SILVA, A. C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 13–23, 2004.
- CHEN, Y. et al. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. **Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 171–175, 2012.
- ÇIRAK, C. et al. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: Variation among plant parts and phenological stages. **Botanica Helvetica**, v. 117, n. 1, p. 29–36, 2007.
- CIUREA, C. N. et al. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 6 jun. 2020.
- COSTA, A. C. B. P. et al. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 614–622, 2013.
- DA SILVA, I. F. et al. Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (mart.) J. B. Gillett against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–14, 2019.
- DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Antifungal and antibiofilm activities of B-type oligomeric procyanidins from *Commiphora leptophloeos* used alone or in combination with fluconazole against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. February,

p. 1–15, 2021a.

DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Mass spectrometry characterization of Commiphora leptophloeos leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 1–11, 2021b.

DE LIMA, A. L. A. et al. Do the phenology and functional stem attributes of woody species allow for the identification of functional groups in the semiarid region of Brazil? **Trees - Structure and Function**, v. 26, n. 5, p. 1605–1616, 2012.

FILIZOLA, B. DE C.; SAMPAIO, M. B. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de Cascas**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2015.

GIORDANI, B. et al. Utilizing liposomal quercetin and gallic acid in localized treatment of vaginal Candida infections. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

INÁCIO, M. C. et al. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of Cochlospermum regium (Schrank) Pilg. roots. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 467–473, 2016.

KUMAR, D. et al. A Recent Report on ‘Plants with Anti-Candida Properties’. **International Journal of Current Research and Review**, v. 12, n. 18, p. 25–34, 2020.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1068–1079, 2014.

LAHIRI, D. et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 2, 2019.

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, n. June 2019, p. 80–89, mar. 2020.

LIBERATO, I. et al. Gallic acid leads to cell death of Candida albicans by the apoptosis mechanism. **Future Microbiology**, v. 17, p. 599–606, 2022.

MCKENZIE, C. G. J. et al. Contribution of Candida albicans cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1650–1658, 2010.

MEDEIROS, R. M. DE et al. Regime pluvial dos municípios São Bento do Una e Serra Talhada – PE, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e933986766,

2 ago. 2020.

NEGRI, M. et al. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. **British Journal of Biomedical Science**, v. 67, n. 3, p. 120–125, 2010.

PEREIRA, J. J. D. S. et al. *Commiphora leptophloeos* Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–10, 2017.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–12, 2020.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.

PESSOA, R. F. et al. Investigation of ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae) in treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 113564, 25 mar. 2021.

PFALLER, M. A. et al. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: Four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 760–763, 2006.

SILVA, É. E. DE M. E. et al. Fruiting phenology and consumption of zoochoric fruits by wild vertebrates in a seasonally dry tropical forest in the Brazilian Caatinga. **Acta Oecologica**, v. 105, n. June 2019, p. 103553, 2020.

SILVA, R. C. S. et al. Aspectos fitossociológicos e de crescimento de *Commiphora leptophloeos* no semiárido brasileiro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 89, p. 11, 2017.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681–689, 2009.

SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 455–464, 2017.

SOUZA, R. et al. Vegetation response to rainfall seasonality and interannual variability in tropical dry forests. **Hydrological Processes**, v. 30, n. 20, p. 3583–3595, 2016.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, 2013.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

VIRGÍNIA DE LIMA LEITE, A.; MACHADO, I. C. Reproductive biology of woody

species in Caatinga, a dry forest of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 11, p. 1374–1380, 2010.

ZHOU, X. et al. Metabolism of gallic acid and its distributions in tea (*Camellia sinensis*) plants at the tissue and subcellular levels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–13, 8 ago. 2020.

## Anexo 1

### Normas da revista: BMC Pharmacology and Toxicology

#### Research article

##### Criteria

Research articles should report on original primary research, or present a new experimental or computational method, test or procedure. Manuscripts reporting results of a clinical trial must conform to CONSORT 2010 guidelines. Authors of randomized controlled trials should submit a completed CONSORT checklist alongside their manuscript, available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). Research articles may also report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [editorial policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research and bibliometric analysis will not be considered. Studies reporting descriptive results from a single institution or region will only be considered if analogous data have not been previously published in a peer reviewed journal and the conclusions provide distinct insights that are of relevance to a regional or international audience.

*BMC Pharmacology and Toxicology* strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's [information on recommended repositories](#). Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the [Editorial Policies Page](#).

Cropped gels and blots can be included in the main text if it improves the clarity and conciseness of the presentation. In such cases, the cropping of the blot must be clearly evident and must be mentioned in the figure legend. Corresponding uncropped full-length gels and blot must be included in the supplementary files. These uncropped images should indicate where they were cropped, be labelled as in the main text and placed in a single supplementary figure. The manuscript's figure legends should state that 'Full-length blots/gels are presented in Supplementary Figure X'. Further information can be found under 'Digital image integrity' which are detailed on our [Standards of Reporting](#) page.

**Professionally produced Visual Abstracts**  
*BMC Pharmacology and Toxicology* will consider visual abstracts. As an author submitting to the journal, you may wish to make use of services provided at Springer Nature for high quality and affordable visual abstracts where you are entitled to a 20% discount. Click [here](#) to find out more about the service, and your discount will be automatically be applied when using this link.

#### Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

### **Title page**

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
  - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
  - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names and institutional addresses for all authors
  - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

### **Abstract**

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our editorial policies for more information on trial registration

### **Keywords**

Three to ten keywords representing the main content of the article.

### **Background**

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.



**Methods**

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

**Results**

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

**Discussion**

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

**Conclusions**

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

**List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

**Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### ***Ethics approval and consent to participate***

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval and for experimental studies involving client-owned animals, authors must also include a statement on informed consent from the client or owner.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

### ***Consent for publication***

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

### ***Availability of data and materials***

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Authors are also encouraged to preserve search strings on searchRxiv <https://searchrxiv.org/>, an archive to support researchers to report, store and

share their searches consistently and to enable them to review and re-use existing searches. searchRxiv enables researchers to obtain a digital object identifier (DOI) for their search, allowing it to be cited.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].<sup>[Reference number]</sup>

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in *BMC Research Notes*, you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

### ***Competing interests***

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

### ***Funding***

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

### ***Authors' contributions***

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

### ***Acknowledgements***

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

### ***Authors' information***

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

### ***Footnotes***

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### **References**

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

**Web links and URLs:** All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both

the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

**Example reference style:**

*Article within a journal*

Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234-5.

*Article within a journal (no page numbers)*

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Medicine. 2013;11:63.

*Article within a journal by DOI*

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

*Article within a journal supplement*

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

*Book chapter, or an article within a book*

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

*OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)*

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

*Complete book, authored*

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

*Online document*

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document). Accessed 15 Jan 1999.

*Online database*

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

*Supplementary material/private homepage*

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

*University site*

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

*FTP site*

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

*Organization site*

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

*Dataset with persistent identifier*

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.