

## INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE *Nectandra grandiflora* NEES & MART SOBRE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

INVESTIGATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF *Nectandra grandiflora* NEES & MART ON SPECIES OF THE GENUS *Candida*

DOI: 10.16891/2317-434X.v12.e4.a2024.pp4777-4787

Recebido em: 13.05.2024 | Aceito em: 23.11.2024

**Naiza Saraiva Farias<sup>a\*</sup>, Rafael Pereira Cruz<sup>a</sup>, Joara Nályda Pereira Carneiro<sup>a</sup>, Wanderlei do Amaral<sup>b</sup>, Luiz Everson da Silva<sup>b</sup>, Giovana Mendes de Lacerda Leite<sup>a</sup>, Italo Rodrigues Garcia<sup>a</sup>, Maria Janice Pereira Lopes<sup>a</sup>, Elizângela Maria Ferreira Ricarte<sup>a</sup>, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga<sup>a</sup>**

**Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Matinhos – PR, Brasil<sup>b</sup>  
\*E-mail: naiza.farias@urca.br**

### RESUMO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas causadas por espécies do gênero *Candida*, caracteriza-se como grave ameaça à saúde pública global. Assim, produtos naturais surgem como possíveis agentes terapêuticos a serem utilizados no tratamento dessas infecções. No presente trabalho, buscou-se investigar o potencial antifúngico do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* contra cepas oportunistas do gênero *Candida*. Para os ensaios foram utilizadas as cepas padrão de *Candida albicans* INCQS 40006 e de *Candida tropicalis* INCQS 40042. A concentração inibitória de 50 % e a atividade intrínseca e combinada do óleo com o fluconazol foram avaliadas através do método de microdiluição em caldo; já a Concentração Fungicida Mínima e o efeito na transição morfológica dos fungos foram avaliadas por subcultivo em placa de Petri e em câmara úmida, respectivamente. No ensaio de concentração inibitória de 50 %, foi constatada melhor atividade do óleo contra *C. albicans*. A combinação óleo essencial com o fluconazol obteve melhor valor na concentração inibitória de 50 % tanto para *C. albicans* como para *C. tropicalis*. A curva de inibição de crescimento demonstrou efeito dependente do aumento da concentração. No ensaio da Concentração Fungicida Mínima verificou-se apenas efeito fungistático, para ambas as cepas. O óleo essencial de *N. grandiflora* apresentou efeito de inibição e redução na transição morfológica de *C. albicans*, no entanto, não apresentou efeito na transição morfológica de *C. tropicalis*. Dessa forma, constatou-se que o óleo essencial de *N. grandiflora* foi capaz de potencializar o efeito do fármaco fluconazol sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*, e de inibir o pleomorfismo de *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Fungos oportunistas; Lauraceae; Óleo essencial.

### ABSTRACT

The incidence of opportunistic fungal infections caused by species of the genus *Candida* is characterised as a serious threat to global public health. Natural products are therefore emerging as possible therapeutic agents to be used in the treatment of these infections. The aim of this study was to investigate the antifungal potential of the essential oil of *Nectandra grandiflora* leaves against opportunistic strains of the *Candida* genus. The standard strains of *Candida albicans* INCQS 40006 and *Candida tropicalis* INCQS 40042 were used for the tests. The 50 % inhibitory concentration and the intrinsic and combined activity of the oil with fluconazole were evaluated using the broth microdilution method; the Minimum Fungicidal Concentration and the effect on the morphological transition of the fungi were evaluated by subcultivation in Petri dishes and in a humid chamber, respectively. In the 50 % inhibitory concentration test, the oil was found to be more active against *C. albicans*. The combination of essential oil and fluconazole obtained the best value at 50 % inhibitory concentration for both *C. albicans* and *C. tropicalis*. The growth inhibition curve showed a concentration-dependent effect. The Minimum Fungicidal Concentration test showed only a fungistatic effect for both strains. The essential oil of *N. grandiflora* had an inhibitory effect and reduced the morphological transition of *C. albicans*; however, it had no effect on the morphological transition of *C. tropicalis*. Thus, the essential oil of *N. grandiflora* was able to potentiate the effect of the drug fluconazole on *C. albicans* and *C. tropicalis*, and to inhibit the pleomorphism of *C. albicans*.

**Keywords:** Opportunistic fungi; Lauraceae; Essential oil.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um aumento significativo no número estimado de espécies fúngicas do planeta, estimativas recentes apontam que há cerca de 2,2 e 3,8 milhões de espécies (HAWKSWORTH; LÜKING, 2017). Em 2020, o número de espécies descritas era cerca de 140.000, entre as quais, mais de 700 espécies estão relacionadas ao ser humano, seja de forma comensal ou patogênica (KONOPKA *et al.*, 2019; MENDONÇA *et al.*, 2022). Estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas morrem por ano em decorrência de alguma infecção fúngica, causada principalmente por espécies dos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (BONGOMIN *et al.*, 2017).

Nesse contexto, destaca-se as infecções fúngicas oportunistas, as quais, têm-se tornado uma crescente ameaça epidemiológica à saúde humana, devido ao aumento de incidência, estratégias de resistência e carência de agentes terapêuticos (DONLIN; MEYERS, 2022). A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou recentemente um relatório que aponta os patógenos fúngicos prioritários, os quais foram agrupados e categorizados em índice de patogenia crítico, alto e médio. Entre os gêneros incluídos, está o gênero *Candida*, com as espécies *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout e *Candida auris* Satoh & Makimura (Crítico), *Candida glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey & Yarrow, *Candida tropicalis* (Castell.) Berkhout, *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (Alto) e *Candida krusei* (Castell.) Berkhout (Médio) (OMS, 2022; INDEX FUNGORUM, 2024). Vale destacar, que o critério mais importante para essa classificação prioritária pela OMS foi a resistência antifúngica.

*Candida spp.* são fungos leveduriformes que compõem a microbiota normal dos seres humanos, entretanto, quando há um desequilíbrio nesta microbiota ou no sistema imune, algumas espécies deste gênero podem se tornar patogênicas. Dentre os fatores para patogenicidade e virulência desses microrganismos, a sua capacidade de morfogênese celular e a formação de biofilme lhe conferem sucesso na evasão às defesas do hospedeiro (SHAHABUDIN; AZMI, 2020). Diversas espécies de *Candida* são polimórficas e capazes de fazer a transição entre estados morfológicos distintos, abrangendo leveduras, hifas e pseudo-hifas (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

Estes fungos têm exibido resistência intrínseca e/ou adquirida a vários antifúngicos (GISI, 2022), tornando-se premente o desenvolvimento de pesquisas por substâncias ativas com atividade antimicrobiana. Nesse contexto, novas estratégias para contornar a resistência aos agentes antimicrobianos são desejadas e os produtos naturais surgem como valiosas fontes para a descoberta de novas drogas devido a sua ampla diversidade estrutural e de atividades biológicas (LI *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2023).

Entre as classes de compostos provindos de plantas com ação antimicrobiana estão os óleos essenciais que apresentam elevada quantidade de constituintes com propriedades biológicas ativas, sendo diversificados em sua composição química podendo ser ativos contra variadas espécies de microrganismos, apresentando múltiplos mecanismos de ação (BOREN; CROWN; CARLSON, 2020; ALJAAFARI *et al.*, 2021).

O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. é pertencente à família Lauraceae e é composto por cerca de 120 espécies distribuídas entre os continentes Americano, Africano, Asiático e Oceania (GRECCO *et al.*, 2016). A espécie *Nectandra grandiflora* é uma planta arbórea, nativa e endêmica do Brasil que se distribui nos domínios fitogeográficos Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, tendo nome popular, canela e canela-fedida (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2024). Estudos farmacológicos mostram que essa espécie apresenta atividade antibacteriana, antioxidante e ansiolítica (FERRAZ *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2005; GARLET *et al.*, 2019). Dessa forma, considerando a necessidade de novos agentes antifúngicos e baseando-se nos estudos etnofarmacológicos da espécie que indicam potencial terapêutico, este estudo teve como objetivo, investigar o potencial antifúngico do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* sobre as cepas oportunistas do gênero *Candida*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta e identificação do material botânico*

As folhas frescas da espécie foram coletadas para a extração de amostras do óleo essencial no município de Palmeira (25°38'S; 49°31'W), estado do Paraná, Brasil, no outono de 2018. Para a coleta e transporte do material vegetal na reserva foi emitida uma licença pelo Instituto Ambiental do Paraná (n° 284). Também foi realizado cadastro institucional junto ao Conselho de Gestão do

Patrimônio Genético – CGEN do Ministério Nacional do Meio Ambiente (Nº A0617A4).

No campo foram localizados espécimes da planta *Nectandra grandiflora*, marcando o ponto com auxílio de GPS, feito exsiccatas para a identificação taxonômica, registro fotográfico e coleta de 1 kg de material para extração do óleo essencial (SIMÕES *et al.* 2010). As exsiccatas foram preparadas e depositadas no Herbário das Faculdades Integradas Espírita (HFIE), onde foram herborizadas (HFIE – 8.820) (LAWRENCE, 1951).

### **Extração do óleo essencial**

O Óleo Essencial das Folhas de *Nectandra grandiflora* (OEFNg) foi extraído utilizando-se o sistema de hidrodestilação, no qual 100 g de folhas frescas foram trituradas e colocadas em um balão com capacidade para 2 L, acrescentando-se 1 L de água destilada e aquecido por 3 h. Após esse período, a mistura água/óleo foi obtida em aparelho doseador tipo Clevenger modificado (Gottlieb; Taveira-Magalhães, 1960), separada e tratada com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para absorção da água. O OEFNg foi filtrado e mantido sob refrigeração (-4° C) em frasco âmbar para conservação e análise.

### **Ensaio antifúngico**

#### *Microrganismos*

As cepas utilizadas *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) foram obtidas da Coleção de Cultura do Instituto Brasileiro de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

#### *Meios de cultura*

Foram utilizados os meios *Ágar Sabouraud Dextrose* (ASD - KASVI) e *Caldo Sabouraud Dextrose* (CSD, HIMEDIA), duplamente concentrados e preparados de acordo com as instruções do fabricante para os testes de avaliação da atividade antifúngica (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016). Na análise micromorfológica foi usado o *Potato Dextrose Ágar* (PDA) empobrecido e acrescido de ágar bacteriológico (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2017).

#### *Preparo das substâncias*

O OEFNg foi medido 0,1 g e diluído inicialmente em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha) e posteriormente em 9000 mL de água destilada estéril, compondo uma concentração matriz de 8.192 µg/mL, solução teste. O antifúngico foi o fluconazol (cápsula - FLUCOMED), preparado na mesma concentração do óleo e diluído em água destilada estéril, utilizado como fármaco referência, devido a sua ampla utilização no sistema de saúde do Brasil.

#### *Preparo do inóculo*

As cepas fúngicas foram semeadas em placas de Petri contendo meio ASD e incubadas na estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período foram preparadas as suspensões dos microrganismos em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina. Essas suspensões foram agitadas com o auxílio de um aparelho de vórtex e comparadas a turbidez pela escala de McFarland (0,5) (CLSI, 2017). Os Microtúbulos do teste foram preparados em quadruplicata para cada levedura e para cada substância, cada um contendo 1350 µL de CSD e 150 µL do inóculo fúngico, perfazendo um volume de 1500 mL (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

#### *Avaliação da atividade intrínseca do OEFNg*

Para a análise da atividade intrínseca do OEFNg foi utilizado o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, utilizando o meio CSD. Cada poço foi preenchido com 100 µL da solução final dos inóculos, seguido da aplicação de 100 µL da solução do OEFNg ou fluconazol ambos nas mesmas concentrações, em seguida foi feita a microdiluição seriada nas concentrações (4096 a 4 µg/mL). O último poço foi reservado para o controle de crescimento fúngico (JAVADPOUR, 1996). Também foram realizados dois controles, um para a diluição do produto (contendo salina ao invés do inóculo) e outro para esterilidade do meio. As microdiluições foram realizadas em quadruplicata no sentido alfabético. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e, posteriormente, lidas em um espectrofotômetro ELISA (KASUAKI- 630 nm) e os dados obtidos foram utilizados para compor a CI<sub>50</sub> e a curva de crescimento fúngico (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

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

Inicialmente, todos os poços contidos nas microplacas de diluição em suas respectivas concentrações foram homogeneizados com auxílio de hastes estéreis. Após a homogeneização, foi transferido uma pequena alíquota da solução teste (meio + inóculo + produto natural) para placas de Petri contendo ASD e cartão guia, para o subcultivo de leveduras e verificação da viabilidade celular, exceto para controle de esterilidade. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em uma estufa bacteriológica e, posteriormente, verificadas quanto ao crescimento ou não de colônias de *Candida*. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico em colônias (ERNST *et al.*, 1999).

#### *Avaliação do efeito modificador na ação do fluconazol*

O efeito da combinação do produto natural e o fármaco fluconazol foi realizado para verificar possível ação potencializadora do fármaco através da adição do OEFNg. As soluções contendo o OEFNg foram testadas em concentração sub-inibitória (CM/16) de acordo com o método proposto por Coutinho *et al.* (2008), com algumas modificações, a exemplo da concentração subinibitória que foi obtida baseada na Concentração Matriz e não na Concentração Inibitória Mínima (CIM), uma vez que nesse estudo não foi determinada a CIM e sim a  $CI_{50}$  e além disso, as concentrações avaliadas também variaram. Microtúbulos foram preparados, contendo cada um deles 1256  $\mu$ L de CSD, 150  $\mu$ L de suspensão fúngica e 94  $\mu$ L da solução do OEFNg. A placa foi preenchida no sentido alfabético adicionando-se 100  $\mu$ L desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100  $\mu$ L do fármaco fluconazol. O último poço foi usado como controle de crescimento fúngico. Foi feito o controle de diluição, realizado em quadruplicata contendo 150  $\mu$ L de solução salina, 1256  $\mu$ L de CSD e 94  $\mu$ L de OEFNg, e o controle de esterilidade contendo 1500  $\mu$ L de meio. Após isso, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e posteriormente lidas em um espectrofotômetro ELISA (KASUAKI – 630 nm).

#### *Avaliação do efeito do óleo essencial e do fluconazol na micromorfologia*

Para avaliar o efeito sobre a transição morfológica foram considerados os valores da Concentração Matriz

(CM) 8.192  $\mu$ g/ mL, com base nesta informação e do ponto de vista de relevância clínica (1.024  $\mu$ g/mL) a CM foi dividida por 4 e 16, assumindo valores de concentração (acima e abaixo do ponto de corte de relevância clínica) de 2.048 e 512  $\mu$ g/ mL. Para o estudo de possíveis alterações na morfologia de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram preparadas câmaras úmidas com lâminas de microscopia estéreis contidas em placas de Petri e umedecidas com água estéril. Foi utilizado meio PDA empobrecido por diluição para estimular a transição morfológica. O óleo (CM/4, CM/16) foi misturado ao meio e vertido nas lâminas e, posteriormente, as leveduras foram semeadas em duas estrias paralelas. As câmaras foram incubadas a 37 °C por 24 h. Também foram realizados controle de crescimento e do fluconazol para fins comparativos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico trilocular L-2000I-TRINO/6633 (Bioval, São Paulo, Brasil) na objetiva de 40x, com câmera acoplada (Canon Power Shot – 2871) (zoom x5) para obtenção das imagens. Os ensaios foram realizados de acordo com Sidrim e Rocha (2010) e Mendes (2011) com algumas modificações.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5. Os dados obtidos por leitura espectrofotométrica foram expressos como média geométrica e a significância estatística foi avaliada por meio do teste ANOVA bidirecional seguido do teste post hoc de *Bonferroni* (onde  $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$  foram considerados significativos e  $p > 0,05$  não significativos). Os valores de  $IC_{50}$  foram obtidos por regressão não linear.

## RESULTADOS

Considerando a concentração necessária para inibir 50 % das células fúngicas a Tabela 1, demonstra que o fluconazol teve este efeito em 3096,83  $\mu$ g/mL contra CA INCQS 40006 e em 3397,05  $\mu$ g/mL frente a CT INCQS 40042. Já o OEFNg atuou neste percentual de inibição em 389,18  $\mu$ g/mL e 1747,43  $\mu$ g/mL frente a CA INCQS 40006 e CT INCQS 40042 respectivamente, sendo possível constatar que a ação do OEFNg foi mais eficaz contra CA INCQS 40006 e apresentou atividade em menor concentração que o fluconazol para ambas as cepas.

**Tabela 1.** Concentração Inibitória de 50 % (CI<sub>50</sub>) µg/mL do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* Ness & Mart e do fluconazol contra cepas de *Candida*.

Produto testado	CA INCQS 40006	CT INCQS 40042
FCZ	3096,83	3397,05
OEFNg	389,18	1747,43
OEFNg + FCZ	189,92	418,40

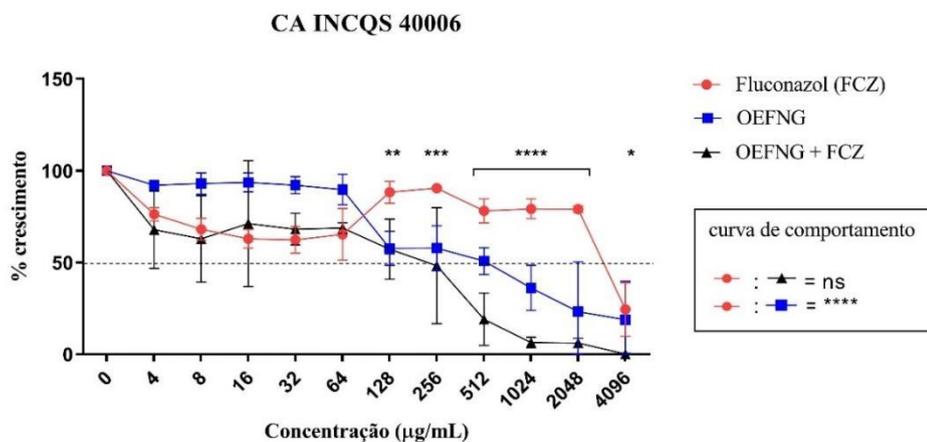
CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; FCZ: Fluconazol; OEFNg: Óleo Essencial das Folhas de *Nectandra grandiflora* Ness & Mart.

A combinação do OEFNg com o fluconazol obteve melhor valor de CI<sub>50</sub>, quando comparado com os valores da ação isolada do OEFNg e do fármaco, com concentrações de 189,92 µg/mL contra CA INCQS 40006 e de 418,40 µg/mL frente a CT INCQS 40042,

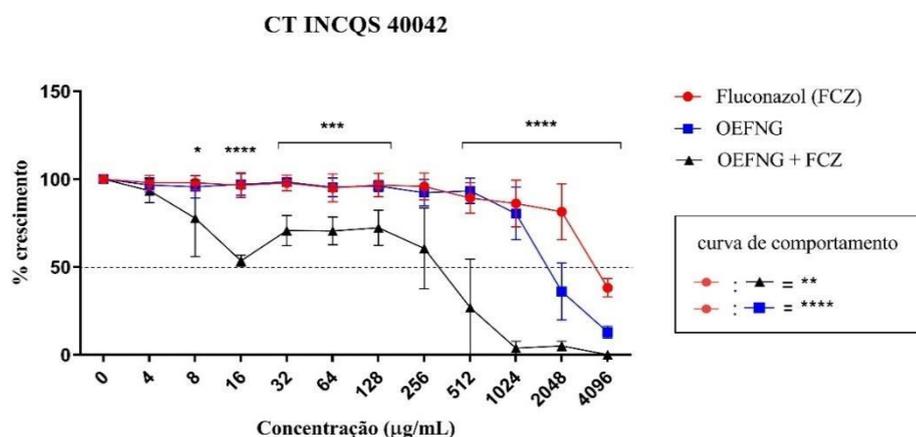
evidenciando potencialização do antifúngico. A Figura 1A e 1B, demonstra a curva de crescimento de CA e CT sob ação dos produtos avaliados. Observa-se efeito dependente do aumento da concentração, para a redução na porcentagem de microrganismos viáveis.

**Figura 1.** Curva de crescimento fúngico da ação intrínseca e combinada do fluconazol (FCZ) com Óleo Essencial das Folhas de *Nectandra grandiflora* Ness & Mart (OEFNg) contra estirpes de *Candida*.

(A)



(B)



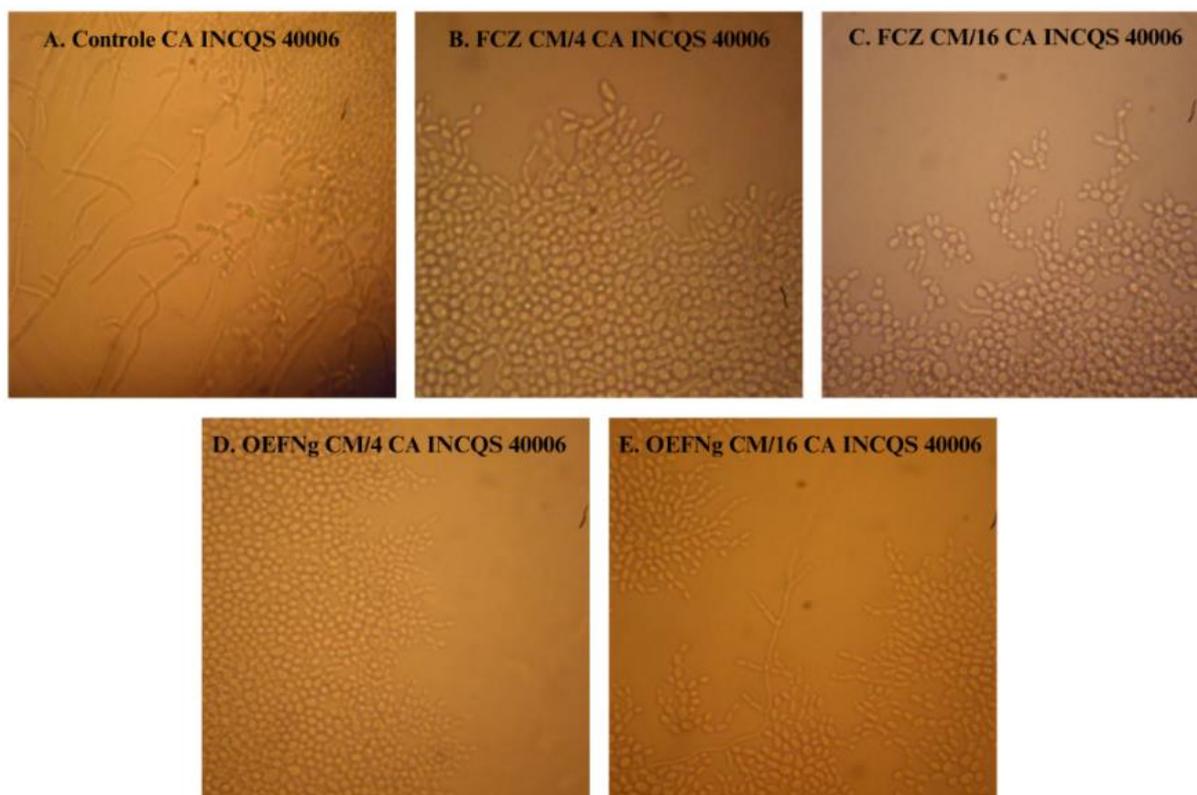
**A:** *Candida albicans* (CA); **B:** *Candida tropicalis* (CT); INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Na avaliação da CFM foi analisado o efeito do OEFNg e deste em combinação com o fluconazol. Os resultados mostraram que nas concentrações testadas, não houve efeito fungicida, sendo verificado apenas efeito fungistático sugerindo, portanto,  $CFM \geq 8.192 \mu\text{g/mL}$  para ambas as cepas, uma vez que foi verificado crescimento de colônia fúngica no subcultivo em placas de Petri.

Após realização da CFM, foram realizados testes para verificar a ação do OEFNg e do fluconazol na transição morfológica das leveduras. O fármaco controle

inibiu as alterações morfológicas em todas as concentrações. A Figura 2, mostra o controle de crescimento de CA INCQS 40006, onde é evidente a formação de hifas filamentosas. Pode-se observar também o efeito do fluconazol nas concentrações testadas CM/4 (2048  $\mu\text{g/mL}$ ) e CM/16 (512  $\mu\text{g/mL}$ ) causando redução total dos filamentos. O OEFNg inibiu a formação das estruturas filamentosas de CA INCQS 40006, na concentração mais alta, além disso, reduziu a quantidade destas na menor concentração analisada.

**Figura 2.** Efeito do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* Ness & Mart e do fluconazol na transição morfológica de *Candida albicans*. **A.** Controle do crescimento, presença de estrutura filamentososa; **B** Controle do fluconazol na concentração CM/4; **C.** Controle do fluconazol na concentração CM/16; **D.** Efeito do OEFNg na concentração CM/4; **E.** Efeito do OEFNg na concentração CM/16. Exibição ampliada 40 x.

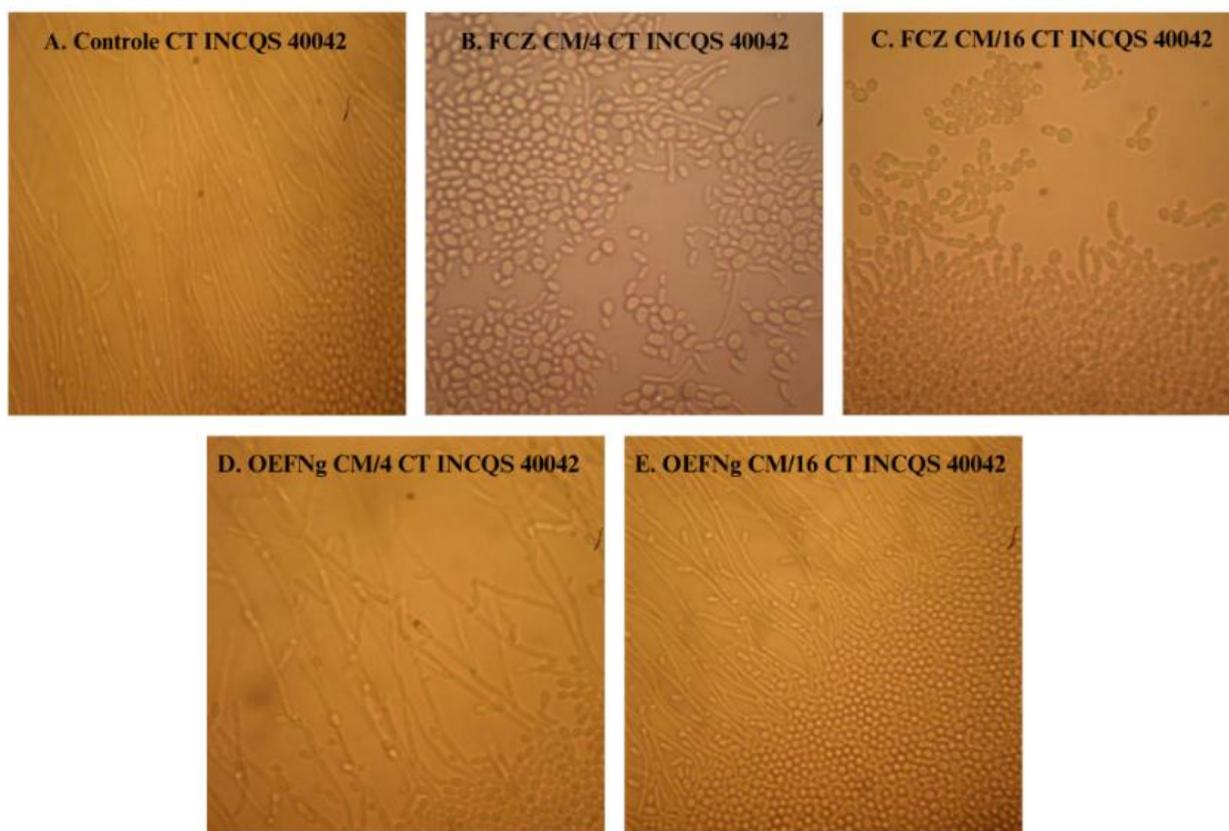


CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; FCZ: Fluconazol; CM: Concentração Matriz (8192  $\mu\text{g/mL}$ ); OEFNg: Óleo Essencial das Folhas de *Nectandra grandiflora*.

O efeito do OEFNg e do fluconazol na transição morfológica de CT INCQS 40042 é observado na Figura 3, é mostrado tanto o controle de crescimento de CT INCQS 40042 verificando-se a formação de estruturas

filamentosas, evidenciando expressão da virulência, quanto a inibição e redução das estruturas filamentosas pelo fluconazol, não havendo efeito por parte do OEFNg.

**Figura 3.** Efeito do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. e do fluconazol na transição morfológica de *Candida tropicalis* **A.** Controle do crescimento, presença de estruturas filamentosas; **B.** Controle do fluconazol na concentração CM/4. **C.** Controle do fluconazol na concentração CM/16. **D.** Efeito do OEFNg na concentração CM/4; **E.** Efeito do OEFNg na concentração CM/16.



CT: *Candida tropicalis*. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; FCZ: Fluconazol; CM: Concentração Matriz (8192 µg/mL); OEFNg: Óleo Essencial das Folhas de *Nectandra grandiflora*. Exibição 40x ampliada.

## DISCUSSÃO

Estudos microbiológicos realizados anteriormente avaliaram o potencial antifúngico de algumas espécies do gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. Truiti *et al.* (2006) avaliaram o extrato etanólico de *N. falcifolia* (Nees) J.A. Castigl. ex Mart.Crov. & Piccinini frente as espécies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, e constataram que o extrato não apresentou atividade antifúngica frente as leveduras analisadas.

Danielli *et al.* (2017) avaliaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *N. megapotamica* (Spreng.) Mez e *N. lanceolata* Ness através de ensaios de microdiluição frente as leveduras de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*. Foi verificado que o óleo de ambas as espécies não foi

eficaz frente as leveduras de *Candida*, no entanto, inibiram seletivamente o crescimento dos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*.

Em contraposição, há estudos que relatam atividade antifúngica da espécie *N. megapotamica* contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, através de ensaios de microdiluição em caldo e disco difusão (GARCEZ *et al.*, 2009; BARNECHE *et al.*, 2010; PERIGO *et al.*, 2022). A atividade antifúngica de *N. grandiflora* frente a fungos do gênero *Candida* não é relatada na literatura, no entanto, o extrato da folha dessa planta já foi avaliado frente a espécie fúngica *Aspergillus niger* e demonstrou inibição do crescimento fúngico (SILVA *et al.*, 2018).

No presente estudo, constatou-se que o OEFNg tem apenas ação fungistática para *C. albicans* e *C. tropicalis* tanto na atividade intrínseca quanto na

combinada com fluconazol, ao ter sua CFM investigada. Coutinho *et al.* (2008) destaca que a combinação fármaco/produto natural pode melhorar a eficácia de tratamentos, uma vez que pode ser administrado doses menores, reduzindo significativamente a toxicidade no organismo. Vale ressaltar, que o fluconazol é o fármaco de referência utilizado no tratamento de infecções por *Candida*. No entanto, as espécies desse gênero têm apresentado mecanismos de resistência a esse fármaco (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019). É válido dizer, que este é o primeiro estudo que relata a análise do óleo essencial de *N. grandiflora* em combinação com um antifúngico, e os resultados obtidos demonstram que a atividade combinada do OEFNg com o FCZ poderia surgir como alternativa para potencializar o efeito desse medicamento.

A transição morfológica é um dos principais fatores de virulência do gênero, consistindo na capacidade que as espécies possuem em mudar da sua forma de levedura para a forma filamentososa (hifas). Essa forma filamentososa pode se tornar invasiva a nível tecidual quando há um desequilíbrio na relação patógeno-hospedeiro (SALAZAR *et al.*, 2022). No presente trabalho, o OEFNg foi capaz de inibir a transição morfológica de *C. albicans*, no entanto, não impediu o pleomorfismo de *C. tropicalis*.

O efeito potencializador do óleo essencial de *N. grandiflora* em associação com o fluconazol e a sua capacidade de inibir a virulência fúngica frente a *C. albicans* pode estar relacionado à presença de constituintes químicos com efeito antifúngico. Entre esses constituintes destaca-se a classe dos terpenos com ampla variedade de compostos com atividade antifúngica (BARROS *et al.*, 2023). Dessa forma, a atividade verificada neste estudo pode ser devido à interação dos compostos presentes no óleo atuando em conjunto entre si e com o fluconazol.

A composição química deste óleo essencial já foi relatada no estudo de Amaral *et al.* (2017) que evidenciaram a presença majoritária de terpenos, monoterpênicos e sesquiterpenos. Os pesquisadores identificaram na composição 16 constituintes (45,3 %) com predominância para a classe dos sesquiterpenos, relatando a presença dos compostos majoritários di-hidro-Karanone (30,9 %)  $\alpha$ -Selinene (2,7 %) e 4,5-di-epi-aristolochene (2,6 %). Entretanto, em relação a estes compostos, não há registros na literatura sobre atividade

antifúngica, sendo um campo que ainda precisa ser investigado. Cunico *et al.* (2010) relataram a presença de 33 compostos no OE das folhas de *N. grandiflora*, dentre os quais houve o predomínio de sesquiterpenóides. Silva (2013) identificou 47 compostos no OE das folhas de *N. grandiflora*, dos quais 29 pertenciam a classe dos sesquiterpenóides e 17 a classe dos monoterpênicos. Embora as atividades relatadas neste estudo possam estar associadas a presença desses compostos, ainda não é possível saber qual(is) composto(s) presente no OEFNg está diretamente associado a estas atividades, visto que não existem estudos dos compostos majoritários encontrados no óleo, em relação à atividade antifúngica.

É preciso destacar que este é o primeiro trabalho que relata o efeito biológico de *N. grandiflora* sobre o dimorfismo fúngico de espécies de *Candida*, e sobretudo o primeiro estudo que relata o potencial antifúngico da espécie frente a fungos pertencentes a esse gênero.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *N. grandiflora* apresentou atividade antifúngica em concentrações elevadas, no entanto, a atividade combinada com o fluconazol mostrou potencialização do antifúngico contra as espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Na análise da CFM, constatou-se que o óleo apresentou apenas efeito fungistático para ambas as espécies, uma vez que inibiu o crescimento, mas não inviabilizou a célula fúngica. A transição morfológica de *C. albicans* foi inibida na maior concentração analisada do OEFNg e reduzida na menor concentração, entretanto, não houve inibição, nem redução na transição morfológica de *C. tropicalis*. A ação do óleo no dimorfismo fúngico de *C. albicans*, evidencia a necessidade de investigar melhor os mecanismos específicos que atuam sobre o fator de virulência da espécie.

Os dados obtidos nesse estudo, indicam a necessidade de mais pesquisas que possam melhor elucidar o potencial antifúngico da espécie, a fim de contribuir com a caracterização biológica de *N. grandiflora* quanto à sua bioatividade e, consequentemente, com o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas para o embasamento de terapias capazes de combater infecções causadas pelo gênero *Candida* ou de outras espécies de fungos.

## REFERÊNCIAS

- ALJAAFARI, M. N. *et al.* An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 628, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26030628>.
- AMARAL, W. *et al.* Essential Oil Yield and Composition of Native Tree Species from Atlantic Forest, South of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p. 1525-1535, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1346484>.
- BARNECHE, S. *et al.* Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 878-885, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000044>.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O. DENNING, D. W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. DOI: [10.3390/jof3040057](https://doi.org/10.3390/jof3040057).
- BOREN, K.; CROWN, A. A.; CARLSON, R. Multidrug and pan-antibiotic resistance—the role of antimicrobial and synergistic essential oils: a review. **Natural product communications**, v. 15, n. 10, p. 1934578X20962595, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X20962595>.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard-fourth edition. CLSI document M27- A4. Wayne, PA. 2017.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 670-675, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500005>.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Potencialização da atividade antibiótica contra *Escherichia coli* multirresistente por *Mentha arvensis* L. e clorpromazina. **Quimioterapia**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000151267>.
- CUNICO, M. M. *et al.* Estudo Preliminar Antimicrobiano e Fitoquímico do Óleo Essencial Foliar da *Nectandra grandiflora* Ness (canela-amarela). In: International conference on education for sustainable development. **Anais**, UFPR, Curitiba, 2010.
- DANIELLI, L. J. *et al.* Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 102, n. 1, p. 7-15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.013>.
- DONG, F. R.; GAO L.; WANG L.; JIANG, YY.; JIN, YS. Natural Products as Antifungal Agents against Invasive Fungi. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 1859-1917, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026623666230417105227>.
- DONLIN, M. J.; MEYERS, M. J. Repurposing and optimization of drugs for discovery of novel antifungals. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 7, p. 2008-2014, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.021>.
- ERNST, E. J. *et al.* *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999. DOI: [10.1016/s0732-8893\(98\)00130-8](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(98)00130-8).
- FERRAZ, E. O. *et al.* Seasonality effects on chemical composition, antibacterial activity and essential oil yield of three species of *Nectandra*. **Plos One**, v. 13, n. 9, p. e0204132, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204132>.
- FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Nectandra* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB8424>. Acesso em: 14 ago. 2024.
- GARCEZ, F. R. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200026>.

GARLET, Q. I. *et al.* *Nectandra grandiflora* essential oil and its isolated sesquiterpenoids minimize anxiety-related behaviors in mice through GABAergic mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 375, p. 64-80, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.05.003>.

GEDDES-MECALISTER, J.; SHAPIRO, R. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.13739>.

GISI, U. Crossover between the control of fungal pathogens in medicine and the wider environment, and the threat of antifungal resistance. **Plant Pathology**, v. 71, n. 1, p. 131-149, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13429>.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemical analyst**, v. 49, n. 4, p. 114, 1960.

GRECCO, S. S.; LORENZI, H.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. J. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 27, n. 17-18, p.793-810, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.07.009>.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017. DOI: [10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016)

INDEX FUNGORUM. *Candida*. Disponível em: <https://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso em: 13 ago. 2024.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm9509410>.

KONOPKA, J. B. *et al.* One health: fungal pathogens of humans, animals and plants: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, on October 18, 2017. **Colloquium Report**, p. 1-3, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1128/aamcol.18oct.2017>.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, v. 1, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa 1951, p. 296.

LI, F.; WANG, H.; LI, D.; CHEN, Y. DOU. Q. P. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 5, p. 417-420, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639>.

MENDES, J. M. **Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis***. 2011. 78p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos- Concentrações: Farmacologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

MENDONÇA, A.; SANTOS, H.; FRANCO-DUARTE, R.; SAMPAIO, P. Fungal infections diagnosis e past, present and future. **Research in Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 103915, 2022. DOI: [10.1016/j.resmic.2021.103915](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103915).

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial pathogenesis**, v. 95, n. 1, p. 200-207, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.013>.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence?. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 2, p. 302-313, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Genebra: OMS, 2022.

PERIGO, C. V. *et al.* Essential Oils of Aromatic Plant Species from the Atlantic Rainforest Exhibit Extensive Chemical Diversity and Antimicrobial Activity. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1844, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121844>.

RIBEIRO, A. B. *et al.* A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n.3, p. 526-530, 2005.

DOI: <https://doi.org/10.1590/S010350532005000400005>.

SALAZAR, G. J. T. *et al.* Antioxidant and Antifungal Activity of the *Cynophalla flexuosa* (L.) J. Presl (Capparaceae) against Opportunistic Fungal Pathogens. **Future Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 16-30, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010002>.

SHAHABUDIN, S.; AZMI, N. S. *Candida*, the opportunistic human pathogen. **Materials science forum**, v. 981, n. 4, p. 309-315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.981.309>.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 388, 2010.

SILVA, D. T. **Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: Rendimento, Composição Química e Atividades Biológicas**. 141 f. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.

SILVA, D. T.; HERRERA, R.; HEINZMANN, B. M.; CALVO, J.; LABIDI, J. *Nectandra grandiflora* by-products obtained by alternative extraction methods as a source of phytochemicals with antioxidant and antifungal properties. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 372, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020372>.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2010.

TRUITI, M. C. T.; BERSANI-AMADO, C. A.; FILHO, B. P. D.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C. Screening of Five Brazilian Plants for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 7, p. 516-521, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880200600879005>.