

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AÇÃO ANTIFÚNGICA DE EXTRATO VEGETAL DE *Punica granatum* L. SOBRE LEVEDURA DE *Cryptococcus neoformans*

Erick José Nogueira de Andrade, Thais Cristina Colacio, Priscila Marciano
Leite, Flavia Villaça Moraes.

Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, eriick.n.andrade@gmail.com, thaiscolacio@gmail.com, prileite@univap.br, flavia@univap.br.

Resumo

Os fungos oportunistas são organismos que, em indivíduos imunocomprometidos, podem causar infecções graves e representar um risco para a vida. O gênero *Cryptococcus* inclui diversas espécies patogênicas para humanos e animais, sendo que uma das mais relevantes é o *Cryptococcus neoformans*, causador de doenças graves, como a criptococose, especialmente em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Devido ao aumento de pacientes afetados por esse fungo, a busca por alternativas aos tratamentos não convencionais para a criptococose, também tem crescido. Uma alternativa é o uso de plantas medicinais, como a Romã (*Punica granatum*), que possui atividade antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos. Este trabalho teve por objetivo analisar a ação antifúngica do extrato de Romã sobre leveduras de *C. neoformans*, utilizando a técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), para analisar o extrato como alternativa fitoterápica para o tratamento de doenças causadas por esse fungo. Os resultados evidenciaram que a romã apresenta resultados inibitórios significativos contra levedura de *C. neoformans*.

Palavras-chave: Fitoterapia. Criptococose. HIV. Fungicida.

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

Os fungos oportunistas são organismos encontrados em diversos ambientes, e podem colonizar a pele ou os intestinos, sem causar doença. Em indivíduos imunocomprometidos esses fungos podem causar infecções com risco à vida, caracterizadas por necrose tecidual, hemorragia e oclusão vascular, com resposta inflamatória mínima ou nula. Nas últimas décadas o número de infecções geradas por fungos tem crescido consideravelmente, e concomitantemente às pesquisas e experimentos que buscam as diversas formas de combater esses agentes etiológicos.

Cryptococcus é um gênero de fungos encapsulados que crescem na forma de leveduras e inclui diversas espécies patogênicas para humanos e animais. Uma das espécies mais comuns e de maior relevância médica é a *Cryptococcus neoformans*, causadora de doenças graves, sendo a mais relevante, aquela que afeta o SNC (Sistema Nervoso Central), Criptococose encefálica, e o pulmão, Criptococose pulmonar, embora possa afetar outras localidades do corpo (SHUN LI. Shu, CHRISTOPHER H., 2009). O *Cryptococcus neoformans* possui como principal fonte ambiental de propagação, o solo contaminado com excrementos de pombos (CALLEJAS. A, et. al, 1998).

Ademais, a infecção por espécies de *Cryptococcus* pode ocorrer por meio da inalação de esporos presentes no ambiente, principalmente, em áreas com grande concentração de aves e morcegos, que são os hospedeiros naturais do fungo. A infecção, também, pode ocorrer por contaminação direta por meio de contato do fungo com feridas na pele. O tratamento da infecção por espécies de *Cryptococcus*, geralmente, envolve o uso de antifúngicos, como o fluconazol ou anfotericina B, porém, nos dias atuais está cada vez mais comum o uso da fitoterapia (LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G., 2012).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Sabe-se que há uma gama de propriedades advindas de plantas medicinais e, cada vez mais, são realizados estudos sobre elas. Concomitantemente, é crescente o estudo sobre plantas com ação antimicrobiana, as quais podem se tornar, quando em medicamentos e doses corretas, uma terapia alternativa para pessoas resistentes à medicação convencional, além de ter menor custo e efeitos colaterais mais brandos (MENEZES *et al*, 2009).

Por fim, estudos têm demonstrado que a Romã (*Punica granatum L.*), fruta rica em compostos bioativos, originária da Turquia e difundida pelo território brasileiro, possui atividade antifúngica contra diversos fungos, como a *Candida albicans* (MACHADO *et al*, 2002).

Metodologia

Local de estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), em São José dos Campos - São Paulo.

Manutenção e preparo das leveduras de *Cryptococcus neoformans*

A levedura de *Cryptococcus neoformans* (H99) foi mantida em placas de petri contendo meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) em geladeira e repicada semanalmente. A cultura da levedura, para manutenção das células, foi feita em meio sólido YPD por incubação à 30°C, por 24h a 48h. Para os ensaios de atividade antifúngica, as leveduras, foram crescidas em placas de Petri contendo YPD por 48h. No dia do experimento, duas alçadas de leveduras foram colocadas em um tubo de microcentrifuga contendo 1,3 mL de 0,9% de NaCl. Após agitação em vórtex, para homogeneização, foi realizada uma leitura da ressuspensão fúngica em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, tendo a solução 0,9% de NaCl como base para a calibragem do aparelho. Desta forma foi possível alcançar a concentração de 10⁸ leveduras/mL. Seguiu-se, então uma diluição 1/10 (1 mL da suspensão fúngica a 10⁸ leveduras/mL em um tubo falcon contendo 9 mL de salina), resultando na suspensão fúngica a 10⁷ leveduras/mL, que foi utilizada no ensaio com o extrato de Romã.

Análise da atividade antimicrobiana do extrato de Romã

O extrato de Romã (*Punica granatum*) utilizado neste projeto foi doado pelo Prof. Dr. Lucas de Paula, da Universidade Estadual Paulista, e está diluído a 20% em Propilenoglicol (200 mg/ml).

A atividade do propilenoglicol sobre a levedura foi analisada por meio de um teste de difusão em disco da substância. Em uma placa de Petri, contendo meio YPD, foram inoculadas por espalhamento, 10⁶ leveduras de *C. neoformans* (H99). Sobre as leveduras, foram colocados 12 papeis de filtro estéreis (6 mm de diâmetro) sobre os quais foram adicionados 10 µL de diferentes diluições Propilenoglicol, obtidas por meio de diluição seriada ½ (12 vezes). A formação dos halos de inibição foi avaliada após incubação das placas a 30°C, por 48 horas.

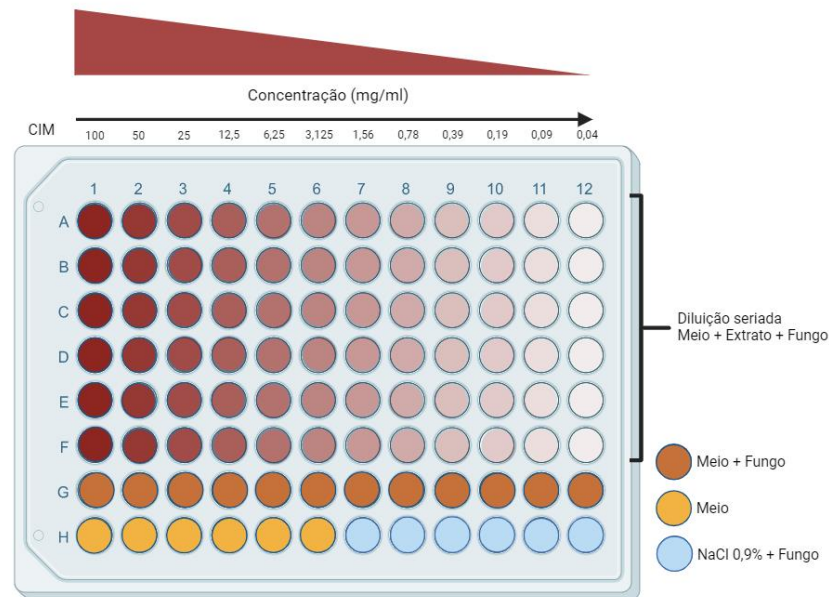
A análise da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da Romã sobre leveduras de H99 foi realizada em placa de 96 poços. O extrato de Romã (100 µL) foi diluído, de forma seriada (1/2) em meio Roswell park memorial institute 1640 - RPMI (100 µL). Após a diluição, 10 µL da mistura de cada poço foram removidos para adição de 10 µL da suspensão de 10⁷ leveduras/mL de H99.

Outros controles foram feitos, tais como, poços contendo somente meio RPMI, poços contendo meio RPMI + H99 e poços contendo somente 0,9% de NaCl + H99, como pode ser observado na figura 1.

O resultado para definição da CIM foi verificado após incubação das placas embaladas em filme plástico e papel alumínio, a 30°C por 48 horas, por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 530 nm e por visualização da turbidez.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - Esquema de microdiluição usada na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de Romã sobre as leveduras de H99



Fonte: Os autores, 2023.

Resultados

O teste de difusão em disco do Propilenoglicol sobre as leveduras H99 constatou que o solvente do extrato de Romã não possuía por si só propriedade antifúngica, como pode ser observado na Figura 2. Também foi realizado teste de viabilidade no meio *RPMI* usado no experimento, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 2 - Teste de difusão em disco do Propilenoglicol sobre leveduras de H99.



Fonte: Os autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

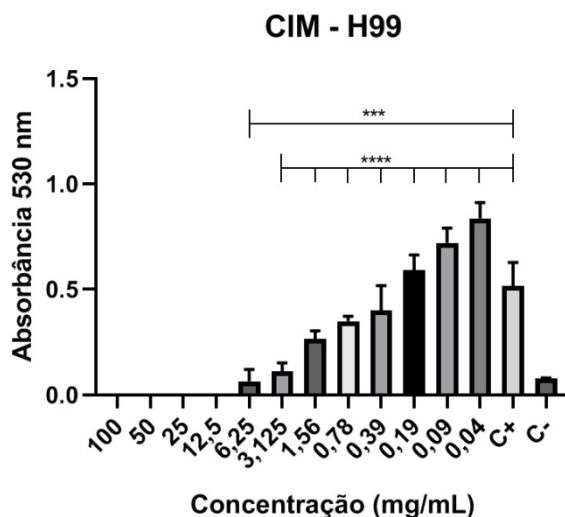
Figura 3 - Teste de viabilidade do meio de cultura RPMI



Fonte: Os autores, 2023.

A análise do efeito inibitório do extrato de Romã foi realizada por meio da CIM como mostrado na Figura 4. O extrato apresentou crescimento visível (turbidez) a partir da diluição onde a concentração do extrato está a 6,25 mg/mL. Como pode ser observado na Figura 3 a CIM do extrato de Romã sobre as leveduras de H99 é 12,5 mg/mL.

Figura 4 - Determinação experimental da CIM das diluições de extrato de romã em levedura de *Cryptococcus neoformans* - *** $P \leq 0.0001$ e **** $P \leq 0.00001$.



Fonte: Os autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Os fármacos são amplamente utilizados em todo o mundo para o tratamento de micoses sistêmicas, porém estes causam muitos efeitos colaterais, o que gera uma elevada taxa de abandono dos pacientes ao tratamento antes de cumprir integralmente o protocolo para cura completa. Alguns pacientes, eventualmente, retornam ao tratamento sozinhos, utilizando o que restou dos medicamentos do tratamento iniciado ou recorrendo à compra de medicamentos de venda livre ou àqueles anteriormente prescritos, para assim tratar os sintomas. Tudo isso, aumenta a recidiva da doença, o aparecimento de resistência microbiana e corrobora com o surgimento de isolados resistentes às substâncias utilizadas (MATOS *et al*, 2018).

O *Cryptococcus neoformans* é farmacologicamente tratado com os fungicidas anfotericina B, flucitosina, fluconazol e itraconazol, e são amplamente estudado formas alternativas de tratamento, através de testes de Concentração Inibitória Mínima. Estudos realizados com extratos vegetais naturais demonstram a eficiência de alguns fitoterápicos perante o H99, como apontado pela Universidade Federal de Juiz de Fora que através do tratamento de *C. neoformans* com extrato de Camomila chegou a uma CIM de 0,156 mg/ml (COELHO, A. G. *et al*, 2012). Também foi estudado, pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, o extrato proveniente das folhas do Pequi, que mostrou atividade antifúngica sobre *C. neoformans* de 89,5% das células testadas em uma concentração menor ou igual a 1 mg/mL (PASSOS, X. S. *et al*, 2002). Em outro trabalho, Costa *et al*. (2000), usando o óleo essencial extraído das folhas de Algodão-do-cerrado, espécie nativa do cerrado, mostraram atividade antifúngica desse extrato (CIM de 3.12 mg/mL) sobre leveduras de *Cryptococcus neoformans*.

Os estudos citados acima mostram a eficácia do uso dos diferentes extratos vegetais sobre leveduras de H99. Um estudo realizado na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, com os fármacos utilizados para o tratamento desta micose sistêmica, apontou que os fármacos Fluconazol e Anfotericina B apresentam CIM sobre leveduras de H99, respectivamente, de 4 mg/mL e 2 mg/mL, com inibição de 90% das células, as quais são mais elevadas que os extratos de Camomila, Pequi e Algodão-do-cerrado. (SILVA, P. R. *et al*, 2008)

A Concentração Inibitória mínima é utilizada para avaliar a capacidade fungistática do tratamento perante o fungo e determina a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico, utilizando o método de microdiluição em caldo. Neste experimento o extrato de *Punica granatum* apresentou para a inibição do crescimento de *Cryptococcus neoformans* uma CIM com concentração de 12,5mg/mL do extrato, mostrando a eficiência e capacidade fungicida do Romã, o que vai de encontro com um estudo realizado pela Universidade Paulista que apresentou como menor concentração de *P. granatum* que inibiu o crescimento fúngico de *Candida albicans* a de 25 mg/mL, também mostrando sua eficiência (BERNARDO, L. P. *et al*, 2015), e outro realizado pela Universidade Tecnológica Federal Do Paraná em que capacidade de inibição do crescimento fúngico do romã foi de concentrações 1% e 5% do extrato de *Punica granatum* para espécies do gênero *Penicillium* (RIBEIRO, D. C. 2017).

Conclusão

O extrato vegetal de *Punica granatum* foi analisado e apresentou uma atividade inibitória utilizando a técnica de concentração inibitória mínima contra levedura de *Cryptococcus neoformans*. O extrato apresentou resultados significativos no teste CIM, principalmente nas concentrações de 6,25 e 3,125 mg/mL, em que o crescimento fungico foi menor, evidenciando que o extrato possui efeito fungistático promissor em levedura de *C. neoformans*. Esses estudos corroboram com este trabalho, que evidencia mais um extrato com ação antimicrobiana sobre leveduras de *Cryptococcus neoformans*, aumentando o conhecimento sobre o potencial antimicrobiano de extratos sobre o fungo e, também, sobre o potencial antimicrobiano do extrato de Romã, individualmente.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

BERNARDO, L. P., ALAVARCE, R. A. S., PORTO, V. C. **Efeito antimicrobiano in vitro da Punica Granatum sobre Candida albicans**. 2015, Anais. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Relatório de Recomendação nº 614, 2021

COELHO, A. G. et al. (EDS.). **Atividades antimicrobiana e antioxidante da Chamomilla recutita L.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2012. v. 38

COSTA, E.O., GARINO JÚNIOR, F.; MELVILLE, P.A. **Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo**. *Napagama*, v.3, n.4, p.6-13, 2000

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil** - 3ª edição. Plantarum, 2009.

MATOS, J. F. et al. **Prevalência, perfil e fatores associados à automedicação em adolescentes e servidores de uma escola pública profissionalizante**. *Cadernos saúde coletiva*, v. 26, n. 1, p. 76–83, 2018.

MENEZES, T. O. A. et al. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de Candida albicans**. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 38, n. 3, p. 184–191, 2009.

NIELSEN, K. et al. **Cryptococcus neoformans strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection**. *Infection and immunity*, v. 73, n. 8, p. 4922–4933, 2005.

Ribeiro, D. C. (2017). **Avaliação da Atividade Antifúngica do Extrato de Casca de Romã Sobre Fungos Deteriorantes do Pão**. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná.

SILVA, P. R. DA et al. **Susceptibilidade a antifúngicos de variedades de Cryptococcus neoformans isoladas de pacientes em hospital universitário**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 158–162, 2008.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Lucas de Paula, da Universidade Estadual Paulista por fornecer o extrato vegetal utilizado neste trabalho, bem como também as especificações técnicas da amostra.