

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AÇÃO DE EXTRATO DE *Zingiber officinale* SOBRE LEVEDURAS DE *Cryptococcus gattii* E *Cryptococcus neoformans*

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

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

Resumo

Espécies de *Cryptococcus* são responsáveis por causar doenças no mundo todo conhecidas como criptococoses. Entre as criptococoses mais severas estão as meningites fúngicas. Este estudo visa analisar a atividade antifúngica do extrato vegetal de *Zingiber officinale* sobre leveduras de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, em busca de estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato para as espécies analisadas. As leveduras foram mantidas em meio YPD, e os ensaios de atividade antifúngica foram realizados com diferentes concentrações do extrato vegetal. Foi possível concluir que *Zingiber officinale* inibiu de forma mais efetiva *Cryptococcus gattii* em comparação com o *Cryptococcus neoformans* nas concentrações testadas e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida próxima de 6,25 mg/mL para as duas espécies fúngicas.

Palavras-chave: Fungos. Concentração Inibitória Mínima. Gengibre. Criptococose.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

Nas últimas décadas tem sido analisado o aumento expressivo no número de infecções fúngicas com graves consequências, como necrose tecidual, hemorragia e obstrução dos vasos sanguíneos. Dentre os fungos oportunistas, as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, têm sido responsáveis por causar doenças em indivíduos imunocomprometidos, contribuindo com o agravamento de quadros clínicos de portadores de HIV (REVANKAR, S. G. 2023). Essas espécies de fungos podem desenvolver-se em diferentes órgãos, causando a criptococose cutânea (pele), pulmonar (pulmões) ou do sistema nervoso central (meninges) (LI, S. S.; MODY, C. H. 2010).

A infecção por *Cryptococcus* spp. tem como forma de contágio o contato com esporos presentes em excrementos de pombos urbanos e psitacídeos domésticos, cavidades de espécies arbóreas com proliferação fúngica e, em alguns casos, através de contato com erupções cutâneas de indivíduos contaminados (CALLEJAS *et al.* 1998).

O tratamento da doença causada por esses fungos é realizado com medicamentos que em casos mais delicados podem ser agressivos ao organismo já debilitado pela infecção, sendo eles fluconazol e anfotericina B. Para amenizar o comprometimento do organismo no tratamento de pessoas acometidas por criptococose, tem se buscado alternativas menos tóxicas ao organismo, com tratamentos baseados em fitoterapia (LITVINTSEVA, A. P., & MITCHELL, T. G. 2012).

O gengibre (*Zingiber officinale*), originário do sul asiático e introduzido no Brasil como especiaria no século XVI (LUIZ, H. D.; NETO, F. 2008) e já conhecido fitoterápico, mostra-se promissor como agente antifúngico. Tal propriedade foi observada em experimento de atividade inibitória contra o crescimento de *Aspergillus flavus*, apontando para sua possível aplicação no desenvolvimento de medicamentos contra aspergilose (DE GRANDI, M.L., MACHINSKI JUNIOR, M. 2020).

Dessa forma, o presente trabalho possui como principal objetivo analisar a atividade antifúngica do extrato vegetal de *Zingiber officinale* sobre leveduras de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* com finalidade de estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de gengibre sobre ambas as espécies fúngicas mencionadas.

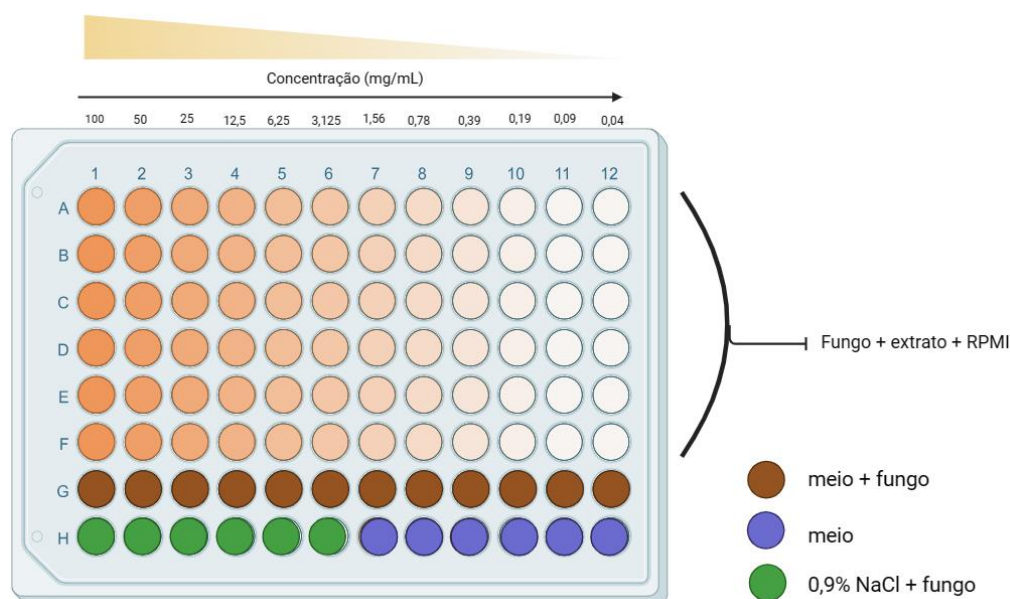
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Univap. As leveduras de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99), doadas pelo Prof. Dr. Lucas de Paula (Unesp), foram mantidas em placas de Petri contendo meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) em geladeira e repicadas, semanalmente. A 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 inoculadas em placas de Petri contendo meio YPD com ágar, e mantidas em estufa à 30°C, por 24h a 48h. Após crescimento fúngico, duas alçadas de cada espécie de levedura foram adicionadas em um tubo de microcentrifuga contendo 1,3 mL de 0,9% de NaCl, seguido de agitação em vortex, para homogeneização. Para definição da concentração celular, as suspensões fungicas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, mesmo comprimento de onda utilizado em estudos de *Candida albicans*, até a obtenção da concentração desejada de 10⁸ leveduras/mL. Uma solução de 0,9% de NaCl foi utilizada como solução base para uma calibragem do espectrofotômetro (zero). Após obtenção da suspensão na concentração desejada de cada espécie de *Cryptococcus* a 10⁸ leveduras/mL, foi realizada diluição 1/10 (1 mL de cada suspensão fúngica a 10⁸ leveduras/mL em tubos falcon contendo 9 mL de NaCl), resultando nas suspensões fúngicas a 10⁷ leveduras/mL, para cada espécie, as quais foram utilizadas nos ensaios com o extrato de Gengibre (Figura 1).

A análise da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de Gengibre sobre leveduras de *Cryptococcus spp.* foi realizada em placa de 96 poços (Figura 1), em que 100 µL do extrato vegetal foi diluído (linhas A a F e poços 1 a 12), de forma seriada (diluição 1/2) em triplicata, em 100 µL de meio RPMI. Após a diluição nos poços mencionados, 10 µL da mistura de cada poço foi removida para, em seguida, a adição de 10 µL da suspensão fúngica de 10⁷ leveduras/mL de cada espécie de *Cryptococcus* (linhas A e F - placa 1 - *C. gattii*, placa 2 - *C. neoformans*). Poços controle para o ensaio foram feitos, a saber: meio RPMI + fungo (linha G, para garantir crescimento do fungo); apenas meio RPMI (Linha H - coluna 1 a 6, para garantir ausência de contaminação do meio RPMI); e 0,9% de NaCl + fungo (Linha H - coluna 7 a 12). Após adição dos reagentes e inóculo do fungo, as microplacas foram embaladas em filme plástico e papel alumínio, e incubadas a 30°C por 48 horas. O resultado da CIM foi obtido por meio de leitura em leitor de microplacas *Synergy* em comprimento de onda a 530 nm e por visualização da turbidez.

Figura 1 – Imagem representativa do ensaio para obtenção da CIM do extrato de Gengibre sobre as leveduras *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99).



Fonte: Os Autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

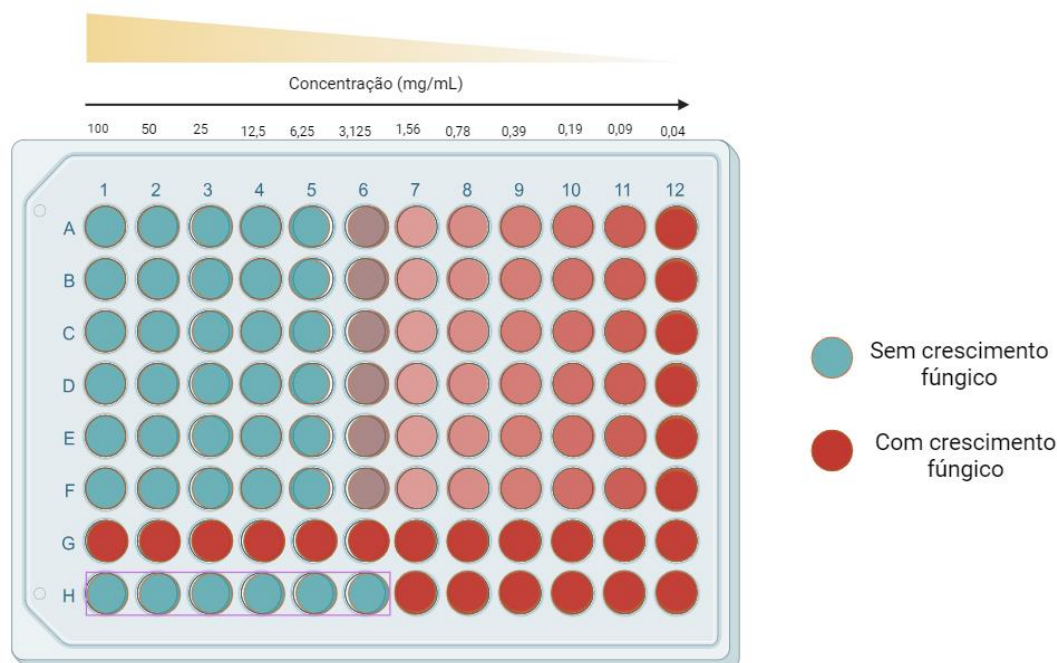
Após análise dos dados, também foi realizada leitura apenas da diluição de meio e extrato para conhecimento da absorção de luz específica do extrato de gengibre no leitor de microplacas Synergy.

Adicionalmente, procedeu-se ao cálculo do desvio padrão das concentrações do extrato que continham meio de cultura, extrato e fungo. Essa análise estatística foi realizada após a etapa de leitura e não teve interferência no experimento, uma vez que o objetivo principal era avaliar se o extrato foi capaz de inibir o crescimento dos fungos. Com os novos valores obtidos, foram criadas duas novas tabelas que apresentam apenas as concentrações de crescimento dos fungos em cada poço da microplaca, subtraindo a possível interferência que a coloração intensa do extrato pudesse acarretar.

As informações das tabelas contando com desvio padrão foram traduzidas para o gráfico descrito na Figura 2, onde percebe-se que em todas as concentrações houve um crescimento fúngico. *Cryptococcus gatti* manteve uma inibição maior em comparativo com *Cryptococcus neoformans*, visto que a partir da concentração presente no poço 6, equivalente a concentração 3,125mg/mL, *C. neoformans* apresentou um salto de crescimento discrepante em relação ao desenvolvimento de *Cryptococcus gatti*.

A representação da placa de 96 poços pelo programa *BioRender* está apresentada na Figura 2 e os resultados obtidos a partir da análise dos dados obtidos das placas pela leitura espectrofotométrica para as espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99) estão apresentados na Figura 3.

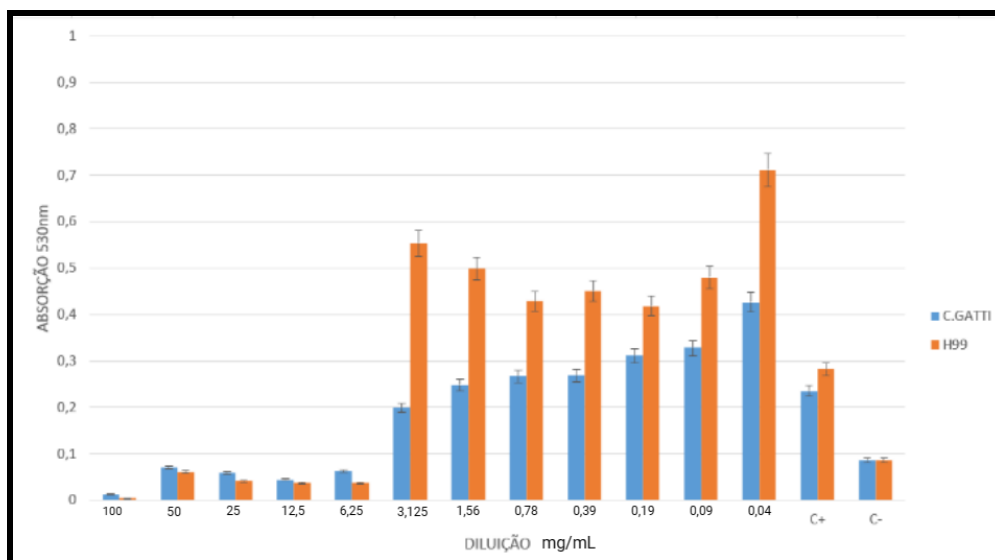
Figura 2 – Imagem representativa do resultado do ensaio para obtenção da CIM do extrato de Gengibre sobre leveduras das espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99) obtida por meio do programa *BioRender*.



Fonte: Os Autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 3 – Gráfico indicando a presença de leveduras *Cryptococcus gattii* (azul) e *Cryptococcus neoformans* (H99) (laranja) por meio do aumento da absorbância em espectrofotometria em λ 530 nm.



Fonte: Os Autores, 2023.

De acordo com a Figura 3 e também, por visualização direta do crescimento fúngico na placa (dados não mostrados) foi possível definir neste trabalho, para o extrato de Gengibre, Concentração Inibitória Mínima de 6,25 mg/mL sobre as duas espécies de *Cryptococcus*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99).

Percebe-se, na Figura 3, que as leveduras de *Cryptococcus neoformans* (H99), submetidas à concentração de 3,125 mg/mL do extrato de Gengibre apresentam crescimento maior em relação as leveduras de *Cryptococcus gattii*, porém concentrações entre 6,25 mg/mL e 3,125 mg/mL serão necessárias para definição de uma CIM diferencial entre as duas espécies.

Discussão

No presente trabalho, os efeitos antifúngicos do extrato de *Zingiber officinale* foram investigados sobre leveduras de *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans*. Foi possível definir a Concentração Inibitória Mínima 6,25 mg/mL. Entretanto, extrato de *Zingiber officinale*, na concentração 3,125 mg/mL, ocasionou crescimento diferencial entre as espécies de *Cryptococcus*, sugerindo menor efetividade do extrato sobre a espécie *Cryptococcus neoformans* em comparação com a espécie *Cryptococcus gattii*.

Este crescimento diferencial pode estar ligado ao fato da cápsula mucopolissacarídica de *C. neoformans* ter uma constituição que permite uma maior adaptabilidade, auxiliando no ambiente ao dificultar predação por amebas e nematóides, impedindo o processo de fagocitose, características que podem indicar maior fator de virulência por Brito (2014).

O potencial antifúngico do *Zingiber officinale* foi relatado em estudos anteriores em diferentes espécies fúngicas. Akrum (2020) descreve sobre a eficácia da utilização de extrato etanólico de *Zingiber officinale* sobre *Candida albicans* e *Candida krusei*. A eficácia antifúngica do extrato de gengibre, também, foi descrita sobre *Aspergillus flavus* no armazenamento de grãos de milho, onde superou níveis de inibição do boldo (*Pneumus boldus*) e citronela, extratos conhecidos na literatura como eficientes antifúngicos contra *Aspergillus flavus* (NERILO et al, 2020).

Alguns extratos vegetais aquosos tem ações antifúngicas sobre leveduras de *Cryptococcus neoformans*, como os de algumas plantas originárias da flora nativa da região nordeste brasileira,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) e jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), os quais possuem CIM a partir de 4 mg/mL (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2015).

Conclusão

Neste trabalho, foi possível verificar para o extrato de *Zingiber officinale*, uma Concentração Inibitória Mínima de 6,25 mg/mL sobre as duas espécies de *Cryptococcus*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (H99).

Notou-se, também, que as leveduras de *Cryptococcus neoformans* (H99), submetidas à concentração de 3,125 mg/mL do extrato de Gengibre apresentaram crescimento maior em relação as leveduras de *Cryptococcus gattii*, porém novos ensaios com concentrações do extrato de *Zingiber officinale* entre 6,25 mg/mL e 3,125 mg/mL serão necessários para definição de uma CIM diferencial entre as duas espécies.

Referências

AGHAZADEH, M. *et al.* Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (in vitro study). **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 2, 2016.

AKROUM, S. Activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* sur les espèces du genre *Candida* et sur *Streptococcus pneumoniae*. **Annales pharmaceutiques francaises**, v. 79, n. 1, p. 62–69, 2021.

BARBOSA JUNIOR, A. M. *et al.* Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 120–132, 2015.

DE BRITO, P. Perfil de carboidratos de parede celular de *Cryptococcus neoformans* e capacidade de formação do biofilme para avaliação do tratamento da criptococose experimental. **Universidade federal de Pernambuco centro de ciências biológicas departamento de micologia**. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/26266/1/DISSERTA%3c%87%3c%83O%20Pamella%20de%20Brito%20Ximenes.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DE SOUZA, A. B. Potencial antifúngico do óleo essencial proveniente da *Lippia grata* frente a isolados clínicos do complexo *Cryptococcus neoformans*. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte: centro de biociências**. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/53518/1/Potencialantifungico_Souza_2023.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* by Casadevall, Arturo & Perfect, John R. (1998) ASM Press, Washington, DC. Hardcover. 542 pp. 89.95. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 37, n. 5, p. 371–371, 2008.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186–196, 2010.

LUIZ, H. D.; NETO, F. **Estudo sobre gengibre na medicina popular**. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5D3lu05EHeEnqPI_2013-5-10-12-17-59.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MÜLLER, M.; NISHIZAWA, M. A criptococose e sua importância na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. p. 24–29, 2017.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

NERILO, S. B. et al. Atividade antifúngica e inibição da produção de aflatoxinas pelo óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe contra *Aspergillus flavus* em grãos de milho armazenados. **Ciencia rural**, v. 50, n. 6, p. e20190779, 2020.

PEREIRA, K. et al. Avaliação da atividade antifúngica e mecanismo de ação de compostos naturais e sintéticos em leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*. **Universidade federal de Goiás**. Disponível em:

<<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4180/5/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-%20Kamila%20Pereira%20da%20Silva%20-%20202014.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

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.