

## **Bioatividade *in vitro* da planta, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) sobre *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*.**

Flávio Ezzeddine EL ASSAL, Maria do Rosário Rodrigues SILVA, Joelma A M de PAULA, Francielle Pereira de CARVALHO, Fernando Yano ABRÃO.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG

flessal@gmail.com

Apoio financeiro: CNPq

Palavras-chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*; atividade biológica; *Candida* sp; *Cryptococcus* sp.

### **Introdução**

Os fungos, largamente difundidos no meio ambiente são cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos pela frequência de doenças fúngicas sistêmicas graves, que têm aumentado nas últimas décadas, devido principalmente ao aumento de indivíduos imunocomprometidos. Esta maior ocorrência de infecções fúngicas em humanos, desperta o interesse no estudo de algumas enfermidades fúngicas, como criptococose e candidíase que são bastante comuns em todo o mundo (Pierce et al, 2008).

Estas infecções fúngicas apresentam-se recidivantes, sendo que o tratamento não é sempre efetivo, pois os antifúngicos disponíveis permitem a recorrência da doença, podem apresentar importante toxicidade e, além disso, são de alto custo (Chen & Sorrel 2007). Diante desse fato, a busca por novos agentes antifúngicos mais ativos, com menos efeitos colaterais e tóxicos e de baixo custo tem sido de grande importância no tratamento das infecções fúngicas. Muitos produtos naturais são conhecidamente utilizados na medicina popular como antimicrobianos, antineoplásicos, anticoagulantes, antiparasitários ou ainda como imunossuppressores (Yunes & Calixto 2001). Assim, a pesquisa de produtos naturais para uso na terapêutica das micoses tornou-se o objetivo de estudo de diversos pesquisadores, (Alves et al. 2000; Duarte et al. 2005; Morais et al., 2006).

Prévios estudos foram realizados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás verificando a atividade antifúngica de diferentes plantas e de seus componentes, usando testes de suscetibilidade *in vitro*. Neste contexto, a planta *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes), que faz parte da família Myrtaceae, e é popularmente conhecida como craveiro-do-mato, louro-cravo ou chá-de-bugre, apresenta propriedades antimicrobianas. Esta planta apresenta

composição química muito complexa, destacando-se como seus constituintes terpenos, fenilpropanóides, hidrocarbonetos, álcoois eugenol, metil-eugenol, taninos, flavonoides e traços de heterosídeos antraquinônicos que provavelmente são os responsáveis pela sua natureza antimicrobiana (Morais et al., 2006; Paula et al., 2008; Paula et al., 2011).

Algumas espécies de fungos são capazes de formar uma comunidade altamente estruturada de microrganismos associada a uma superfície e envolvidos por uma matriz extracelular: o biofilme, constituindo as denominadas células sésseis e desta forma mostrarem-se mais virulentos (Pierce et al, 2008). O presente trabalho visa avaliar a atividade antifúngica da planta *P. pseudocaryophyllus* sobre diferentes isolados pertencentes aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. nas formas planctônicas e sésseis.

## **Material e Métodos**

### **1-Teste de suscetibilidade *in vitro* para células planctônicas**

Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extrato bruto, frações acetato de etila, aquosa, hexânica, diclorometano e óleo essencial da planta *P. pseudocaryophyllus* foram determinados para 12 isolados de *Cryptococcus neoformans* e 12 de *Candida* spp. A técnica de microdiluição em caldo, segundo métodos de referência estabelecidos pelo documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), foi usada para verificar a suscetibilidade, e as concentrações dos extratos e frações variaram de 256 a 0,25 µg/mL sobre os fungos.

### **2-Formação de biofilmes e suscetibilidade *in vitro* para células sésseis**

Os biofilmes de *Candida* spp e de *Cryptococcus neoformans* foram formados em placas pré-esterilizadas de microtitulação de poliestireno com 96 orifícios, por pipetagem de suspensões padronizadas (100 µL de 10<sup>7</sup> células/mL) dentro de orifícios selecionados da placa e incubados por 48 h a 37°C (Ramage et al., 2001; Martinez & Casadeval. 2006). Extrato bruto, frações acetato de etila e aquosa de *P. pseudocaryophyllus* e o antifúngico fluconazol (usado como controle) foram adicionados ao biofilme formado em concentrações serialmente diluídas ao dobro, variando de 1024 a 2 µg/mL, com posterior incubação por mais 24 h a 35°C. Controles positivos (biofilme sem extrato) e negativos (extrato) foram usados no experimento.

A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMS - concentração inibitória mínima de células sésseis) foi determinada em leitora de Elisa com um comprimento de onda de 550nm. A atividade metabólica determinada pelos ensaios de redução por sais de tetrazólio, [3- (4,5-dimethyl-2 thiazyl) – 2,5diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT)] dos biofilmes expostos aos extratos e frações foi medida pela densidade óptica (DO). A CIMS foi determinada pela atividade metabólica correspondente a 50 (CIMS<sub>50</sub>) e 80% (CIMS<sub>80</sub>) de inibição comparada ao controle positivo.

## Resultados e Discussão

Os extratos e frações da planta *P. pseudocaryophyllus* foram capazes de inibir os isolados de *Candida* spp em concentrações que variaram de >256 a 64 µg/mL e os isolados de *C. neoformans* em concentrações de >256 a 32 µg/mL. As concentrações inibitórias dos extratos e frações desta planta sobre as leveduras encontram-se nas tabelas 1 e 2. Segundo Aliaginis et al.(2001) concentrações inibitórias inferiores a 500 µg/mL são consideradas como forte inibidores de crescimento do microrganismo, portanto podemos considerar que a planta testada é de elevada importância.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIM), da planta *P. pseudocaryophyllus* para 12 isolados de *Candida* sp.

[ ] (µg/ mL)	Extrato bruto	Fração Hexânica	Fr. Diclorometano	Fr. Acetato de Etila	Fr. aquosa	Óleo Essencial
>256	2	12	12	-	-	11
256	8	-	-	11	5	1
128	2	-	-	1	2	-
64	-	-	-	-	5	-

Considerando que o extrato bruto e as frações acetato de etila e aquosa mostraram-se biologicamente mais ativas para as leveduras, a suscetibilidade *in vitro* destas frações e do extrato foram realizadas para biofilmes formados por *Candida* spp e por *C. neoformans*. Os fungos quando formando biofilmes apresentam-se normalmente mais resistentes aos antifúngicos sendo que as concentrações inibitórias tornam-se muito elevadas (Ramage et al., 2005).

As concentrações correspondentes a CIMS<sub>50</sub> e CIMS<sub>80</sub> de *P.*

*pseudocaryophyllus* sobre os biofilmes de *Candida* spp e de *Cryptococcus neoformans* foram muito maiores do que as observadas para células planctônicas como são mostrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 2. Valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM), da planta *P. pseudocaryophyllus* para 12 isolados de *Cryptococcus* sp.

[ ] (µg/ mL)	Extrato bruto	Fração Hexânica	Fr. Diclorometano	Fr. Acetato de Etila	Fr. aquosa	Óleo Essencial
>256	-	-	-	-	-	-
256	-	8	7	-	-	9
128	2	2	3	4	-	2
64	7	2	2	4	9	1
32	3	-	-	4	3	-

Tabela 3. Concentrações inibitórias (CIMS<sub>50</sub> e CIMS<sub>80</sub>) de *P. pseudocaryophyllus* para biofilmes de 10 isolados de *Candida* sp.

[ ] (µg/mL)	Extrato bruto		Fr Acetato etila		Fr. aquosa		Fluconazole	
	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>50</sub>	CIMS <sub>8</sub>
	0	0	0	0	0	0		0
>1024	2	10	6	10	5	10	7	10
1024	8	-	3	-	4	-	2	-
512	-	-	1	-	1	-	1	-

Tabela 4. Concentrações inibitórias (CIMS<sub>50</sub> e CIMS<sub>80</sub>) de *P. pseudocaryophyllus* para biofilmes de 10 isolados de *Cryptococcus neoformans*

[ ] (µg/mL)	Extrato bruto		Fr Acetato etila		Fr. aquosa		Fluconazole	
	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>5</sub>	CIMS <sub>8</sub>	CIMS <sub>50</sub>	CIMS <sub>8</sub>
	0	0	0	0	0	0		0
>1024	7	10	9	10	5	10	-	6
1024	2	-	1	-	5	-	5	4
512	1	-	-	-	-	-	4	-
256	-	-	-	-	-	-	1	-

## Conclusões

A planta *P. pseudocaryophyllus* apresentou uma boa atividade sobre os fungos, sugerindo que testes de citotoxicidade e testes in vivo são necessários para que se introduza esta planta como fitoterápico de uso no tratamento de infecções fúngicas.

## Referências Bibliográficas

AliGiannis, N, Kalpoutzakis, E, Mitaku, S, Chinou, IB 2001. Composition and

- antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.49, p.4168-4170.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EF, Smânia Jr A, Zani CL 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- Chen S, Sorrel T 2007. Antifungal agents – new drugs, old drugs. *The Medical Journal of Australia (MJA)* 187: 404-409
- CLSI *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Third Informational Supplement*. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Dermelina C 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 97: 305-311.
- Martinez LR, Casadevall A 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 1021-1033.
- Morais SM; Cantunda-Junior FEA; Silva ARA; Martins Neto JS 2006 Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil, *Quim Nova*. 29:907-910.
- Paula JAM, Paula JR, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD 2008. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum -Myrtaceae *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn* 18: 265-278.
- Paula JAM 2011. Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum -Myrtaceae.
- Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley Jr FL, Mowalt E, Ramage G, Lopez-Ribot JL 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols* 3 :1494-1500.
- Ramage G, Vande-Walle K, Lopez-Ribot JL 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 4:633-638.
- Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL 2001. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2475-2479.
- Yunes RA, Calixto JB 2001. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 500p.