

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
INSTITUTO CIÊNCIAS DA VIDA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

Arthur Borborema Costa

**Atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii***

Governador Valadares - MG

2022

Arthur Borborema Costa

**Atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii***

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo,
como requisito parcial para obtenção
do título de bacharel em Farmácia, na
Universidade Federal de Juiz de Fora
– Campus Governador Valadares.

Orientadora: Prof. ^a Dra. Gabriella Freitas Ferreira

Governador Valadares - MG

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Borborema Costa, Arthur.

Atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* / Arthur Borborema Costa. -- 2022.

23 p.

Orientadora: Gabriella Freitas Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2022.

1. *Garcinia gardneriana*. 2. Atividade antifúngica. 3. *Cryptococcus* spp.. I. Freitas Ferreira, Gabriella, orient. II. Título.

Arthur Borborema Costa

**Atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii***

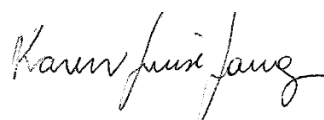
Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo,
como requisito parcial para obtenção
do título de bacharel em Farmácia, na
Universidade Federal de Juiz de Fora
– Campus Governador Valadares.

Aprovado em 10 de agosto de 2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. ^a Dra. Gabriella Freitas Ferreira – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV



Prof. ^a Dra. Karen Luise Lang
Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus GV



Prof. ^a Me. Mônica Maria de Almeida
Universidade Vale do Rio doce - GV

Resumo

A criptococose afeta, principalmente, pessoas imunocomprometidas, causando doença pulmonar grave, e pode levar à neurocriptococose. Além disso, pode causar lesões cutâneas. Os medicamentos disponíveis atualmente apresentam altas taxas de falha no tratamento das infecções fúngicas e o surgimento de resistência a fungos é um problema crescente. Nesse sentido, os produtos naturais são uma importante fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos de escolha no tratamento da criptococose. O presente trabalho visa o estudo da atividade antricriptocócica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Foram utilizadas folhas de *G. gardneriana* e, a partir delas, obtido o extrato etanólico, as frações, a cera epicuticular e o lupeol. Para as amostras, foram feitos experimentos de concentração inibitória mínima, concentração fungicida/fungistática mínima e ensaios de citotoxicidade, utilizando linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*, além de células de macrófagos J774A.1. A partir disso, foi possível observar melhores resultados da CIM: fração hexano (25 a 100µg/mL) e para o lupeol (12,5 a 100µg/mL) frente as espécies testadas. Logo, relacionando-se a CIM, CFM e dose letal 50% (DL⁵⁰), o lupeol apresentou um perfil interessante, visto que devido a sua CIM foi 4 vezes menor que sua DL⁵⁰ (52,8µg/mL).

Palavras-chave: *Garcinia gardneriana*. Atividade antifúngica. *Cryptococcus spp.*

Abstract

Cryptococcosis mainly affects immunocompromised people, causing severe lung disease and cryptococcal meningitis. In addition, it can cause skin lesions and neurocryptococcosis. The medicines currently available have high failure rates in the treatment of fungal infections and the emergence of fungal resistance is a growing problem. In this sense, natural products are a great alternative source in the discovery and development of new drugs of choice in the treatment of cryptococcosis. The present work aims to study the antifungal activity of *Garcinia gardneriana* leaves against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The tests of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicide/Fungistatic (CFM) against *Cryptococcus neoformans* and *C.gatti* assays were performed using ethanolic extract, the fractions, and the isolated compound lupeol. We also executed the cytotoxicity test using J774A.1 macrophage. It was possible to observe better MIC results for fraction hexane (25 to 100 µg/mL) and lupeol (12,5 to 100 µg/mL) for both species. Therefore, relating the CIM, CFM, and lethal dose (DL⁵⁰) of the experiments, lupeol presented relevance for further studies due to its MIC of 12,5µg/mL and DL⁵⁰ of 52,8 µg/mL.

Keyword: *Garcinia Gardneriana*. Antifungal Activity. *Cryptococcus spp.*

Introdução

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras cosmopolitas, encapsuladas e capazes de causar infecção que gera doença em diversos indivíduos. A criptococose, causada por esses microrganismos, é uma doença sistêmica que pode ser subaguda ou crônica, potencialmente fatal [1]. Apenas no final do século XIX, essas leveduras foram descobertas como patógenos que causam doenças em humanos, posteriormente, tornaram-se uma infecção de importância global com morbidade e mortalidade significativa [2].

A criptococose pode afetar pessoas imunocomprometidas e imunocompetentes. As formas clínicas mais comuns são pneumonia e meningite criptocócica [3]. A infecção pulmonar pode evoluir para disseminação hematogênica, com afinidade para o sistema nervoso central (SNC). Na neurocriptococose, os principais sintomas são confusão mental, cefaleia e febre [2]. No entanto, existe a possibilidade de ocorrer também lesões em outros órgãos e tecidos, demonstrando disseminação dos fungos [4]. A forma cutânea ocorre em 15% dos casos e pode gerar lesões acneiformes, úlceras, entre outros [2].

Para pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a criptococose é a principal causa da meningite fúngica, com mais de 81% de mortalidade global. As mortes ocorrem em maior número na África Subsaariana, onde chegam a uma mortalidade de 70% [4]. A América Latina possui uma incidência estimada de 5.300 casos/ano. Entre esses, Colômbia e Brasil se destacam em maior incidência, com números entre 1.001 e 2.500 [5].

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2012 foi constatado que a criptococose associada à SIDA foi a primeira infecção oportunista a aparecer em cerca de 4,4% dos casos diagnosticados com SIDA, ainda sobre, pode-se citar a região Sudeste com elevada prevalência da SIDA, assim como da criptococose associada à SIA (8 a 12% de casos) [6].

Ainda no Brasil, a criptococose é a micose sistêmica com o segundo maior número de internações entre os anos de 1998 e 2006 (registrando 4.055 internações nesse período), conforme dados do Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS) [7]. Com relação a mortalidade para o ano de 2020, foi registrado 120 casos de óbito de criptococose no país, dentre

eles, 1 caso em Belo-Horizonte, Ipatinga, Betim, contagem e Taiobeiras-MG e 2 casos em Juiz de Fora- MG [8].

Diversos trabalhos tem estudado atualmente os fármacos utilizados no tratamento da criptococose, tendo em vista principalmente a eficácia no tratamento. Nesse sentido, somente três classes de fármacos antifúngicos foram consideradas no tratamento: os azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol), os polienos (anfotericina B), e um fármaco da classe das pirimidinas, a 5-flucitosina que não se encontra acessível no Brasil. Entretanto, alguns desses fármacos apresentam altas taxas de falha no tratamento das infecções fúngicas e o surgimento de resistência a fungos é um problema crescente [1]. Ademais, tratar a neurocriptococose é difícil devido à presença da barreira hematoencefálica que causa limitação da difusão de fármacos nos tecidos cerebrais [4]. O alto custo do tratamento, o número emergente de linhagens resistentes e a dificuldade em desenvolver novos antifúngicos representam desafios no tratamento da criptococose [9].

Nessa problemática atual, os produtos naturais desempenham um importante papel nos processos de descoberta e de desenvolvimento de novos fármacos [10]. Os metabólitos secundários das plantas são utilizados como fonte de substâncias na busca por moléculas com atividade farmacológica [11].

A família Clusiaceae é rica em compostos químicos com atividades biológicas variadas, principalmente antifúngicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais e antidepressivas [12]. *Garcinia gardneriana* (Sinonímia *Rheedia gardneriana*) pertence à família Clusiaceae e é conhecida popularmente como bacupari. A espécie é nativa da mata atlântica, sendo também encontrada na Austrália, Ásia, zonas tropicais da África e da Polinésia [11,13]. Nas suas folhas, já foram reveladas as presenças de biflavonóides, benzofenonas, terpenos e xantonas, demonstrando atividades analgésicas e antiinflamatórias [13]. Além dessas atividades, esses compostos também possuem atividades antibacterianas, antiparasitárias e antifúngicas [11].

Portanto, dada a importância clínica atual da criptococose e também a utilização dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos, o presente trabalho visa o estudo da atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana* frente a *C. neoformans* e *C. gattii*.

Materiais e métodos

Linhagens e desenho experimental

Nesse trabalho foram utilizadas seis linhagens de *C. neoformans* e seis linhagens de *C. gattii*, todas oriundas da coleção de cultura da Universidade de Geórgia (Atlanta, GA, Estados Unidos). Os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose (SDA) a 4°C. Antes de cada teste, as linhagens foram cultivadas em SDA por 72 h a 35°C. Inicialmente foi realizada a coleta das folhas de *G. gardneriana*, a partir da sua extração por maceração exaustiva em etanol e posterior eluição eluotrópica com os solventes em série obteve-se o extrato etanólico, as frações hexano, acetato de etila, diclometano e butanol e a cera epicuticular. Foram feitos experimentos de triagem para escolha da fração mais ativa, utilizando-se duas linhagens: *C. gattii* ATCC WM161 e *C. neoformans* ATCC H99. A fração hexano foi escolhida e submetida a cromatografia líquida a vácuo e posterior obtenção do seu composto majoritário, que foi utilizado juntamente com a fração hexano para os demais experimentos de concentração inibitória mínima, concentração fungicida/fungistática mínima com as 12 linhagens apresentadas no quadro 1, além da realização de ensaios de citotoxicidade. Todos os experimentos foram executados em pelo menos duplicatas realizadas em dias diferentes.

Local de coleta, identificação e preparo

Folhas de *Garcinia gardneriana*, foram coletadas no município de Governador Valadares/MG, identificadas pelo botânico Vinícius Antonio de Oliveira Dittrich (Universidade Federal de Juiz de Fora) e depositadas sob o número CESJ 70502 no Herbário Leopoldo Krieger, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG. O presente trabalho foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen, sob o número de registro A58097B. As folhas foram dispostas em bandejas e secas até peso constante em estufa de ar circulante com temperatura controlada em torno de 45°C. As folhas foram trituradas/pulverizadas em moinho de facas.

Obtenção do extrato bruto e frações

1200g de folhas trituradas foram submetidas à extração por maceração exaustiva em etanol 96°GL (96% v/v) por 7 dias. O extrato foi filtrado em papel

de filtro qualitativo e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50°C, obtendo-se o extrato etanólico bruto de *Garcinia gardneriana* (EEGG).

70g do extrato etanólico bruto foi diluído em metanol/água (95:5 v/v) e submetido à partição com solventes em série eluotrópica fração n-hexano de *Garcinia gardneriana* (FHGG), fração acetato de etila de *Garcinia gardneriana* (FAGG), fração diclorometano de *Garcinia gardneriana* (FDGG) e fração butanol de *Garcinia gardneriana* (FBGG). As frações FHGG, FAGG, FDGG e FBGG; foram concentradas em evaporador rotatório em pressão reduzida a 50°C.

A cera epicuticular de *Garcinia gardneriana* (CEGG) foi extraída por imersão das folhas frescas (8 g) em acetona por 2 min. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório em pressão reduzida à 50°C, obtendo-se 127mg.

Isolamento e identificação do lupeol

A FHGG foi submetida à Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), utilizando sílica-gel 60G como fase estacionária e n-hexano com volumes crescentes de acetato de etila como fase móvel. Foram obtidas 21 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas de acordo com sua similaridade cromatográfica.

As frações 13, 14 e 15 obtidas na CLV, continham maior similaridade cromatográfica, por isso essas 3 frações juntas, foram submetidas à Cromatografia em Coluna Clássica (CC) utilizando n-hexano como fase móvel, permitindo o isolamento do triterpeno lupeol. A identificação do lupeol, foi realizada através de espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN, bem como através de comparação com dados da literatura.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima do EEGG, da CEGG, das frações de *G. gardneriana* e do lupeol foi realizado através do método da microdiluição em caldo, conforme proposto pelo documento M27-A3 do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” com modificações [14].

O inóculo fúngico foi preparado em solução salina estéril e realizadas diluições para ajustar a turbidez, por meio da escala de Mcfarland (0,5) que corresponde à concentração de 1x10⁶ a 5x10⁶ UFC/mL. Em seguida, o inóculo foi diluído em caldo RPMI - 1640 de modo a alcançar a concentração final de 1x10³ a 5x10³ UFC/mL [14].

Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do EEGG, das frações FHGG, FAGG, FDGG, FBGG, da CEGG e do lupeol, uma solução inicial de cada amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter a concentração de 1000 µg/mL. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas utilizando o caldo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) – 1640 e, obteve-se concentrações finais de 100µg/mL a 0,195µg/mL. Após isso, 100 µL de cada concentração foram transferidos para a placa de microdiluição de 96 poços. Para cada experimento foi realizado um controle negativo contendo 200 µL de RPMI – 1640 e um controle positivo contendo 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL de inóculo fúngico, conforme descrito anteriormente. As microplacas foram incubadas a 35°C durante 72 horas e realizada a leitura visual dos resultados [14].

Foi considerada a CIM que inibiu 100% do crescimento fúngico. Para fins de comparação com um fármaco com reconhecida ação antifúngica, também foi realizado o teste de suscetibilidade inibitória mínima das 12 linhagens frente ao fluconazol, conforme descrito pelo protocolo M27-A3 da CLSI [14]. Para o fluconazol (FLC) foi considerada a CIM que inibiu 50% do crescimento fúngico, sendo determinada através de leitura visual e comparando com os controles de crescimento.

Teste de atividade fungicida/fungistática

Após a determinação da CIM, alíquotas de 100 µL foram removidas dos poços em que houve 100% de inibição do crescimento fúngico visivelmente, subcultivadas em ASD, incubadas a 35°C por 72 horas. As amostras foram cultivadas em duplicatas. A ação fungicida foi definida como a menor concentração onde não se observou visualmente crescimento de nenhuma colônia fúngica na placa de petri, após o período de incubação. Caso a CIM for igual a concentração fungicida/fungistática mínima (CFM), considera-se fungicida em uma relação de CIM:CFM de 1:1. Já a ação fungistática foi definida como aquela que, após incubação, obteve-se crescimento fúngico na relação de 2:1, sendo a concentração de inibição na CFM maior que a CIM [15].

Avaliação da citotoxicidade

O ensaio para avaliar a citotoxicidade do EEGG, da FHGG e do lupeol frente a macrófagos J774A.1 foi feito pelo método colorimétrico do MTT (corante

brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma, St, Louis, MO, USA) [16].

Os macrófagos J774A.1 foram cultivados em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 contendo 10% de soro bovino fetal, 0,5% de solução penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10.000 mg/mL, respectivamente) e 1% de aminoácidos essenciais. Depois de atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células inseridas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL para o experimento de viabilidade por MTT. Essas células foram incubadas em atmosfera úmida de 5 % de CO² a 37 °C [16].

A viabilidade dos macrófagos J774A.1 foi analisada pelo método colorimétrico do MTT. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura celular de macrófagos tratados com EEGG, FHGG, e lupeol nas seguintes concentrações: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25µg/mL, 5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,1 µg/mL foi descartado e 100 µL de RPMI-1640 foram inseridos em todos os poços, seguido de 10 µL de MTT (5 mg/mL). Essas placas foram então incubadas a 37 °C na estufa com 5% de CO². Após um período de 4 horas, a reação foi concluída com a remoção do meio de cultura e inserção de 100 µL de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca *Multiskan™ FC* Microplate Photometer no comprimento de onda de 570 nm [16]. Os dados obtidos foram adicionados e analisados no software Prism version 6.0 e realizada a plotagem dos gráficos da DL⁵⁰ para as amostras analisadas.

Resultados e discussão

Identificação do lupeol

Após os experimentos de triagem da CIM, a FHGG demonstrou melhor atividade antifúngica e foi submetida a CLV obtendo-se 21 frações, dentre essas, as frações 13, 14 e 15 por serem mais puras e apresentarem maior similaridade cromatográfica entre si, foram utilizadas na obtenção do lupeol, que foi escolhido para seguimento dos ensaios por ser a substância majoritária da FHGG [17]. O lupeol, apresentado na [figura 1](#) foi identificado através de espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN e por comparação com dados na literatura [17]. O lupeol é um triterpeno pentacíclico [18].

Concentrações inibitórias mínimas (MIC)

A triagem do EEGG, suas frações (FHGG, FAGG, FDGG e FBGG) e a CEGG foi feita utilizando 1 linhagem de *C. neoformans* ATCC H99 (ATCC ® 208821 ™) e uma linhagem de *C. gattii* ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562 ™) e apresentaram resultados de CIM entre 50 e 100 µg/mL, visando a descoberta da fração que apresentasse melhor CIM, sendo possível observar melhores resultados para FHGG apresentados na [tabela 1](#).

Diversos trabalhos propõem o uso de produtos naturais como alternativa para o tratamento de doenças, inclusive a criptococose. Folly, 2018, avaliou a atividade antifúngica das folhas de *Xylosma ciliatifolia* frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, obtendo-se CIMs inferiores a 100 mg/L ^[16]. Além dessa, Junior, 2015 relatou que extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* (juazeiro), *Poincianella pyramidalis* (catingueira), *Aideroxylon obtusifolium* (quixabeira) e *Hymenaea courbaril* (jatobá) quando na concentração de 4 mg/mL apresenta a atividade antifúngica frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* utilizando o método de difusão em disco ^[19]. Dessa forma, ressalta-se a importância dos produtos naturais na busca por substâncias com atividade anticriptocócica.

O lupeol, extraído da fração n-hexano de *Garcinia gardneriana*, também foi isolado de várias espécies de plantas, como por exemplo: *Vitis vinífera* (uva), *Brassica oleracea* (repolho branco), *Fragaria x ananassa* (morango) e *Olea europaea* (azeitona), entre outras, sendo conhecido por ter efeito útil como agente preventivo e terapêutico contra doenças ^[20]. Além disso, segundo Ramadwa, 2021, a mistura de lupeol e β-amirina também demonstrou boa atividade contra *C. neoformans* e *C. albicans* com CIM de 16 µg/mL para ambos os fungos, apresentando assim, relevância em estudar a ação do lupeol frente às linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* ^[17].

Utilizando a FHGG e o lupeol foram feitos experimentos de CIM com um número maior de linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, obtendo-se valores iguais ou menores que 100 µg/mL da CIM, sendo esses resultados relevantes, uma vez que extratos que apresentam CIM <100µg/mL possuem um potencial antimicrobiano promissor conforme descrito por Simonetti, et al., 2016 ^[21].

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para a fração hexano, lupeol e o fluconazol, utilizando linhagens de *C. neoformans* e linhagens de *C. gattii* estão expostos na [tabela 2](#).

Concentrações fungicidas/fungistáticas mínimas (CFM)

Para os experimentos de atividade fungicida/fungistática (CFM) para linhagens de *C. neoformans* e linhagens de *C. gattii* demonstrados na tabela 3 foi observado que a FHGG apresentou ação fungicida frente à 3 linhagens de *C. neoformans* (ATCC 62066, ATCC H99 e ATCC WM629) devido a manterem inibição da CFM na mesma concentração da sua CIM, relação CIM:CFM 1:1 e ação fungistática para 3 linhagens (ATCC 28957, ATCC WM628 e ATCC WM626), devido a sua inibição da CFM ter ocorrido em concentração superior a CIM, relação CIM:CFM 2:1. A FHGG, apresentou ação fungicida apenas para uma linhagem de *C. gattii* (ATCC WM161) e fungistática para as outras 5 linhagens (ATCC 32068, ATCC WM179, ATCC R265, ATCC WM779 e ATCC WM178).

Para o lupeol foi observado sua ação fungicida em 3 linhagens de *C. neoformans* (ATCC 62066, ATCC WM628 e ATCC WM626) e em 3 linhagens (ATCC H99, ATCC WM629 e ATCC 28957) o lupeol apresentou ação fungistática, por exemplo, uma CIM de 12,5µg/mL do lupeol frente a *C. neoformans* (ATCC 28957) obteve-se uma CFM de 25 µg/mL. O lupeol apresentou ação fungicida apenas para uma linhagem de *C. gattii*, (ATCC WM779) e ação fungistática para as demais 5 linhagens.

Para o FLC, observou-se ação fungicida apenas contra uma linhagem de *C. neoformans* (ATCC WM626) e fungistática contra as outras 5 linhagens (ATCC WM629, ATCC WM628, ATCC H99, ATCC 28957 e ATCC 62066). O FLC apresentou ação fungistática para todas as 6 linhagens de *C. gattii*, também devido a suas inibições da CFM ter ocorrido em concentração superior a sua CIM. Conforme, Silva, 2008, a terapia prolongada com fluconazol tem sido associada ao desenvolvimento de cepas resistentes a este fármaco. Para isso, o itraconazol tem sido utilizado como alternativa, além da anfotericina B ser usada geralmente, como tratamento inicial da criptococose [22].

Análises da atividade fungicida/fungistática aparecem nos estudos de desenvolvimento de fármacos de maneira recorrente, Folly, 2018, avaliou essa atividade e sugeriu, de acordo com seus experimentos, que algumas frações extraídas de *Xylosma ciliatifolia* possuem ação fungicida, devido ao perfil de atividade antifúngica ser similar a CIM, demonstrando atividade próxima ao ponto de inibição de determinado micro-organismo [16].

A relação CIM:CFM é usada para analisar a origem da ação antimicrobiana frente a um patógeno [14]. Caso a concentração de inibição obtida no teste da CIM tiver crescimento após cultivo em ASD pode-se deduzir que essa fração possui ação fungistática. Mas, se não tiver crescimento, pode-se deduzir que ela tem ação fungicida. Além disso, para essa substância/fármaco ser considerada fungicida, a relação CIM:CFM do fungo precisa ser de 1:1 ou de no máximo 2:1. Para o presente estudo, foi utilizada a relação 1:1. Conforme esses dados é possível estimar se a amostra é fungicida, causando morte total, ou fungistático, inibindo sua proliferação [14,23].

A ação fungicida é desejável para os agentes antimicrobianos, isso porque a ação fungistática apenas inibe o crescimento do micro-organismo, deixando possibilidade de reinfecção. Dessa forma, agentes fungistáticos são menos interessantes clinicamente quando se pensa em desenvolver um fármaco antimicrobiano [24]. O FLC é um exemplo de agente fungistático, sendo raramente usado como monoterapia para tratar micoses sistêmicas, devido a elevada taxa de resistência a esse fármaco [25]. Dessa forma, é possível observar que as análises realizadas para FHGG e para o lupeol foram relevantes, porém para maioria das linhagens analisadas observou-se efeito fungistático, sendo interessante, por exemplo, a realização de mais experimentos para investigar melhor esse efeito.

Avaliação da citotoxicidade

Para os experimentos de avaliação do efeito citotóxico, realizados utilizando o ensaio de MTT, foi possível obter os resultados para as DL₅₀ da FHGG, do EEGG, bem como do lupeol. Como observado na figura 1, esses resultados demonstraram-se promissores, uma vez que de maneira geral, possuem valores da DL₅₀ maiores frente à macrófagos J774A.1 em relação as CIM frente aos microrganismos estudados, possivelmente, não promovendo um efeito tóxico de significância clínica para as células de macrófagos J774A.1, principalmente em relação aos resultados do lupeol.

De posse de dados de atividade biológica e informações sobre citotoxicidade é possível calcular o índice de seletividade (IS), um parâmetro que demonstra a relação entre eficácia e segurança de um extrato ou substância, e pode ser calculado através da divisão da DL₅₀ pela CIM. Uma substância antifúngica é considerada potencialmente segura quando o IS é igual ou maior

que 1, ressaltando que se maior for o IS, maior será a segurança da substância em questão [26]. O IS do lupeol, foi 4,22 mostrando segurança para o prosseguimento dos estudos de atividade anticriptocócica. A FHGG, apresentou IS de 1,09 demonstrando que $IS > 1$, porém com uma segurança muito baixa.

Com base em toda discussão, quando se relaciona os valores obtidos na CIM, nos experimentos da CFM e também nos resultados das DL_{50} nos testes de citotoxicidade, o lupeol se demonstrou promissor, isso porque a sua CIM de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ possui um valor significativo, sendo até 4 vezes abaixo da sua DL_{50} de 52,8 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusão

Foi possível estudar a atividade antifúngica das folhas de *Garcinia gardneriana*, sobretudo, utilizando para os ensaios o EEGG, suas frações, a CEGG e o lupeol, sendo que, esse último, apresentou melhores resultados.

Os testes realizados ajudaram a compreender que, principalmente a FHGG e o lupeol analisados tiveram resultados relevantes, tendo possivelmente ação antifúngica, obtendo uma CIM menor, quando comparados às suas respectivas DL_{50} , além de obter resultados relevantes na CFM, visando à ação fungicida por ser mais interessante clinicamente na descoberta de um fármaco.

Para conclusões mais profundas a respeito da atividade antifúngica das folhas de *G. gardneriana*, é preciso a realização de outros testes, como por exemplo, a quantificação de ergosterol das células tratadas com extrato, peroxidação lipídica das células, além da avaliação da curva de morte e mensuração do potencial Zeta que auxiliaram na caracterização do mecanismo de ação das amostras, sendo interessante a realização de um posterior estudo contendo esses testes.

Referências bibliográficas

1. Aguiar, Paula Augusta Dias Fogaça de et al. Epidemiologia da criptococose e a caracterização de *Cryptococcus neoformans* isolados em um hospital universitário brasileiro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 59 e13. 13 de abril de 2017. [Acesso 23 mai. 2020]. Disponível em: doi: [10.1590 / S1678-9946201759013].

2. Maziarz E. K., Perfect J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 30 179–206. [Acesso 27 mai. 2020]. Disponível em: [10.1016/j.idc.2015.10.006].
3. Diniz-Lima, I., da Rosa, PR, da Silva-Junior, EB et al. X-linked immunodeficient (XID) mice exhibit high susceptibility to *Cryptococcus gattii* infection. *Sci Rep* 11, 18397(2021). [Acesso 22 jan. 2022]. Disponível em [\[https://doi.org/10.1038/s41598-021-970419\]](https://doi.org/10.1038/s41598-021-970419).
4. Spadari, Cristina de Castro. Et al New Approaches for Cryptococcosis Treatment. *Microorganisms* 2020, 8(4),613. [Acesso 4 mai. 2020]. Disponível em: [\[https://doi.org/10.3390/microorganisms8040613\]](https://doi.org/10.3390/microorganisms8040613)
5. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis; na updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17 (8): 873-881.
6. Soares, Emanuel Alves. Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012). Dissertação de mestrado apresentada - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Fio cruz, Rio de janeiro, setembro de 2015.
7. Coutinho, Z. F. Morbimortalidade por paracoccidiodomicose no Brasil (1998- 2006). Rio de Janeiro. Tese de Doutorado – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arauoca/Fundação Oswaldo Cruz; Saúde Pública, 2011.
8. Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde. Fonte: MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. DATASUS2020. [Acesso 21 mar. 2022] Disponível em:[<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10br.de>].
9. Singulari, J. L. et al. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. *Front Cell Infect Microbiol eCollection* 2019. [Acesso 02 set. 2021] Disponível em: DOI: [10.3389/fcimb.2019.00419].

10. Newman, David J. e Gordon M. Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 2020. Mar 27;83(3):770-803. [Acesso 14 Ago. 2022]. Disponível em: [[10.1021/acs.jnatprod.9b01285](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285)].
11. Espirito Santo, B. L. S. et al. Medicinal Potential of *Garcinia* Species and Their Compounds. Derek J. McPhee *Molecules*, 25 (19), 4513; 2020. [Acesso 01 set 2021]. Disponível em: DOI: [[10.3390 / moléculas25194513](https://doi.org/10.3390/molecules25194513)].
12. Rocha, A. P. Tecnologia de sementes e mudas de *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi Recife – PE. (Tese de Doutorado) Universidade federal rural de Pernambuco departamento de ciência florestal programa de pós-graduação em ciências florestais.
13. Burgos, R. C. R. Detecção *in silico*, isolamento e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares antimaláricos e antioxidantes em galhos e folhas de *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae) 2010. (Dissertação de Mestrado em Química) Universidade Estadual Paulista Instituto de Química- Campus Araraquara.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
15. Obando, D. N., et al. Synthesis, antifungal, haemolytic and cytotoxic activities of a series of bis (alkylpyridinium) alkanes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 17 p. 6329-6339, Sep 2009.
16. Folly, L. M. et al. Evaluation of *in vitro* Antifungal Activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) Leaves Against *Cryptococcus spp.* *Front Microbiol.* 10: 3114. [Acesso 15 ago. 2022] Disponível em : [10.3389/fmicb.2019.03114](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03114)

17. Ramadwa, T. E. Et al Anthelmintic, antimycobacterial, antifungal, larvicidal and cytotoxic activities of acetone leaf extracts, fractions and isolated compounds from *Ptaeroxylon obliquum* (Rutaceae). *J Etnofarmacol.Epub* 2021.
18. Mello, Santos Mônica et al. Complemento baseado em Evid Alternat Med. 2014; 2014: 960258. Publicado online em 26 de maio de 2014. Disponível em: doi: [10.1155/2014/9602].
19. Junior, A. M. B. et al. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente à alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. *Rev. bras. plantas med.* 17 (1) Jan-Mar 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/11_177].
20. Javed, S., Mahmood, Z., Khan, KM et al. lupeol acetate as a potent antifungal compound Against opportunistic human and phytopathogenic mold *Macrophomina phaseolina*. *SciRep* 11, 8417(2021). Disponível em: [<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87725-7>].
21. Simonetti, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.1, p.9-18, 2016.
22. Silva, Paulo Roberto, et al. Susceptibilidade a antifúngicos entre variedade de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes de um hospital universitário. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 (2). Abr 2008. Disponível em: [<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000200005>].
23. Hafidh, R. R. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*, v. 5, n. 1, p.96-106, 16 ago. 2011. Bentham Science Publishers Ltda.
24. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, CL. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

25. Groll, A. H.; Piscitelli, S. C.; Walsh, T. J. Antifungal Pharmacodynamics: Concentration-Effect Relationships in Vitro and in Vivo. *Pharmacotherapy*, v. 21, n. 82, p.133-148, ago. 2001.

26. Adamu, M.; Naidoo, V.; Eloff, J. N. Some southern African plant species used to treat helminth infections in ethnoveterinary medicine have excellent antifungal activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, 2012. doi.org/10.1186/1472-6882-12-213

Tabelas

Tabela 1: Triagem das CIM do extrato etanólico de *G.gardneriana* (EEGG) e frações de *G. gardneriana* frente à linhagem de *C. neoformans* (ATCC H99 (ATCC ® 208821 TM) e à linhagem de *C.gattii* (ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562 TM)).

Extrato e frações	CIM(µg/mL)	
	<i>C.neoformans</i> ATCC H99	<i>C. gattii</i> ATCC WM161
EEGG	100 µg/mL	100 µg/mL
FHGG	50 µg/mL	50 µg/mL
FDGG	100 µg/mL	50 µg/mL
FAGG	100 µg/mL	100 µg/mL
FBGG	100 µg/mL	100 µg/mL
CEGG	100 µg/mL	100 µg/mL

Nota: Valores da CIM determinada através de experimentos em duplicatas. A CIM corresponde à fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* da respectiva linhagem. ATCC: American Type Culture Collection. Extrato etanólico de *G.gardneriana* (EEGG), fração hexano de *G.gardneriana* (FHGG), fração diclorometano de *G.gardneriana* (FDGG), fração acetato de etila de *G.gardneriana* (FAGG), fração butanol de *G.gardneriana* (FBGG) e cera epicuticular de *G.gardneriana* (CEGG).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) da fração hexano (FHGG), do lupeol e do fluconazol (FLC) frente às linhagens de *C. neoformans* e *C.gattii*.

CIM(µg/mL)

Linhagens	FHGG	lupeol	FLC
<i>C. neoformans</i>			
ATCC 28957 (ATCC ® 28957 TM)	12,5 µg/mL	12,5 µg/mL	1 µg/mL
ATCC 62066 (ATCC ® 62066 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	2 µg/mL
ATCC H99 (ATCC ® 208821 TM)	50 µg/mL	25 µg/mL	2 µg/mL
ATCC WM628 (ATCC ® MYA-4566 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM629 (ATCC ® MYA-4567 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM626 (ATCC ® MYA-4565 TM)	25 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
Média geométrica	39,5 µg/mL	39,5 µg/mL	2,8 µg/mL
<i>C. gattii</i>			
ATCC 32068 (ATCC ® 32068 TM)	50 µg/mL	25 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM179 (ATCC ® MYA-4560 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562 TM)	100 µg/mL	50 µg/mL	2 µg/mL
ATCC R265 (ATCC ® MYA-4093 TM)	25 µg/mL	12,5 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM779 (ATCC ® MYA-4563 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM178 (ATCC ® MYA-4561 TM)	25 µg/mL	25 µg/mL	8 µg/mL
Média geométrica	50 µg/mL	35,4 µg/mL	5µg/mL

Nota: Valores da CIM determinada através de experimentos em duplicatas. A CIM corresponde a fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* da respectiva linhagem ATCC: American Type Culture Collection.

Tabela 3: Resultado das Concentração fungicida mínima (CFM) para fração Hexano (FHGG), lupeol e fluconazol (FLC) frente às linhagens de *C. neoformans* e às linhagens de *C. gattii*.

Linhagens	CFM(µg/mL)		
	FHGG	lupeol	FLC
<i>C. neoformans</i>			
ATCC 28957 (ATCC ® 28957 TM)	25 µg/mL	25 µg/mL	2 µg/mL
ATCC 62066 (ATCC ® 62066 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
ATCC H99 (ATCC ® 208821 TM)	50 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
ATCC WM628 (ATCC ® MYA-4566 TM)	100 µg/mL	50 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM629 (ATCC ® MYA-4567 TM)	50 µg/mL	100 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM626 (ATCC ® MYA-4565 TM)	100 µg/mL	50 µg/mL	4 µg/mL
Média geométrica	62,5 µg/mL	54,1 µg/mL	4,6 µg/mL
<i>C. gattii</i>			

ATCC 32068 (ATCC ® 32068™)	100 µg/mL	50 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM179 (ATCC ® MYA-4560™)	100 µg/mL	100 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562™)	100 µg/mL	100 µg/mL	4 µg/mL
ATCC R265 (ATCC ® MYA-4093™)	100 µg/mL	25 µg/mL	8 µg/mL
ATCC WM779 (ATCC ® MYA-4563™)	100 µg/mL	50 µg/mL	16 µg/mL
ATCC WM178 (ATCC ® MYA-4561™)	50 µg/mL	50 µg/mL	16 µg/mL
Média geométrica	91,6 µg/mL	62,5 µg/mL	10 µg/mL

Nota: Os valores da CFM determinada foram feitos através de experimentos em duplicatas. A CFM representa a fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* da respectiva linhagem após realização da CIM, com nova incubação por 72 horas a 35°C. ATCC: American Type Culture Collection.

Figuras

Quadro 1:

Linhagens de <i>C. neoformans</i>	Genótipo/sorotipo	Origem
ATCC 28957 (ATCC ® 28957™)	ND/Sorotipo D	Clínica; lesão óssea humana
ATCC 62066 (ATCC ® 62066™)	ND/Sorotipo A	Clínica; França
ATCC H99 (ATCC ® 208821™)	VN I / A	Clínica; Nova York
ATCC WM628 (ATCC ® MYA-4566™)	VN III / AD	Clínica; Austrália
ATCC WM629 (ATCC ® MYA-4567™)	VN IV / D	Clínica; Austrália
ATCC WM626 (ATCC ® MYA-4565™)	VN II / A	Clínica; Austrália
Linhagens de <i>C. gattii</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
ATCC 32068 (ATCC ® 32608™)	VG III / C	Clínica; Califórnia
ATCC WM179 (ATCC ® MYA-4560™)	VG I / B	Clínica; Austrália
ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562™)	VG III / B	Ambiental; San Diego
ATCC R265 (ATCC ® MYA-4093™)	VG IIa / B	Clínica; Canadá
ATCC WM779 (ATCC ® MYA-4563™)	VG IV / C	Veterinária; África do Sul
ATCC WM178 (ATCC ® MYA-4561™)	VG II / B	Clínica; Austrália

Linhagens de *Cryptococcus neoformans* e de *Cryptococcus gattii* usadas nos experimentos, identificadas com seu genótipo e sorotipo, bem como seu local de origem; NOTA: ATCC: American Type Culture Collection; ND: Não determinado.

Figura 1:

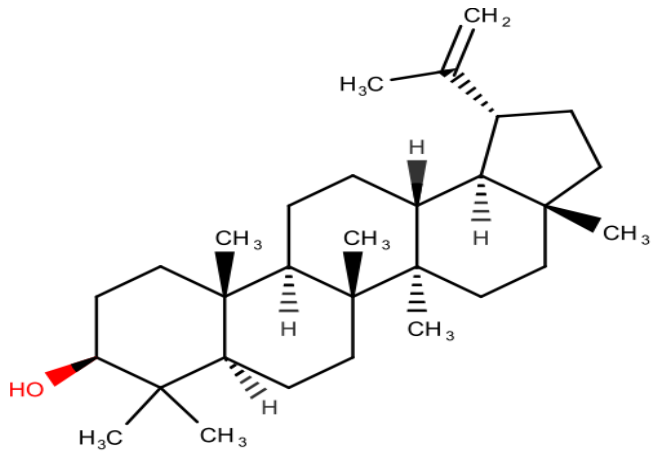
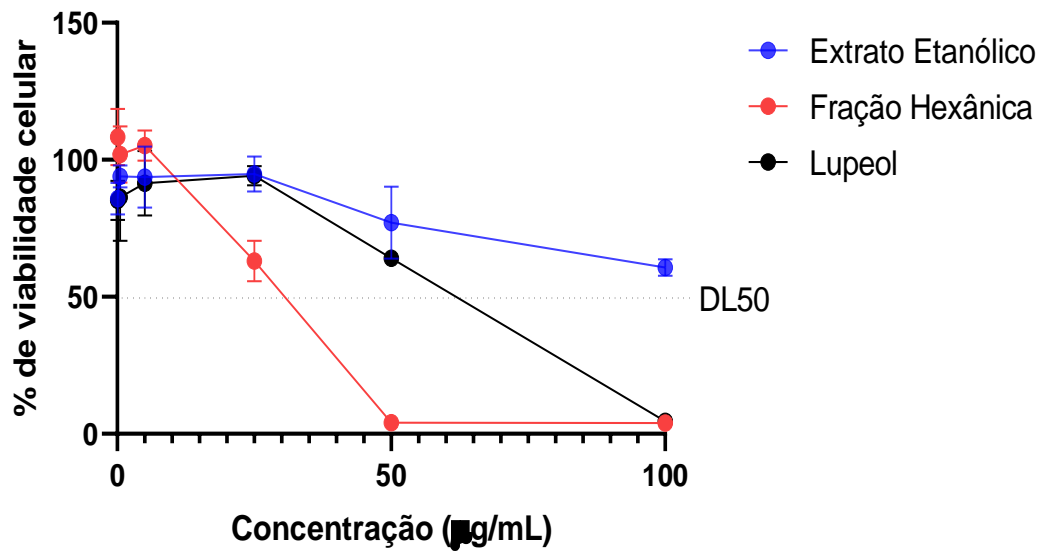


Figura do autor – lupeol.

Figura 2: Avaliação da DL₅₀ do extrato etanólico, da fração hexano e do lupeol expressos em µg/mL frente à macrófagos J774A.1



Nota: A DL⁵⁰ representa a dose necessária para matar 50% da população em teste. Os valores da DL⁵⁰ apresentados para o extrato etanólico, para fração hexano e para o lupeol, estão corados de azul, vermelho e preto, respectivamente. A menor DL⁵⁰ foi para o lupeol, de 52,8 µg/mL.

Fonte de financiamento

Esse projeto contou com a bolsa da FAPEMIG, número 46803, programa BICUFJF.

Conflito de Interesse

Não há conflito de interesse.