

## Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*

Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae)  
against *Cryptococcus neoformans*

Xisto Sena Passos<sup>1</sup>, Suzana da Costa Santos<sup>2</sup>, Pedro Henrique Ferri<sup>2</sup>,  
Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes<sup>1</sup>, Thaliana de Freitas Paula<sup>1</sup>,  
Ana Cristina Ferreira Garcia<sup>1</sup> e Maria do Rosário Rodrigues Silva<sup>1</sup>

**Resumo** A grande incidência de criptococose em decorrência do aumento crescente de indivíduos imunodeprimidos e os efeitos colaterais aos fármacos utilizados para o tratamento desta infecção, tem incentivado a pesquisa de novos agentes antifúngicos. Através da técnica de diluição em ágar, foi verificada a atividade antifúngica (in vitro) de diferentes constituintes de *Caryocar brasiliensis* sobre *Cryptococcus neoformans*. Verificou-se que a cera epicuticular retirada da folha, coletada em período de baixo índice pluviométrico (170,8mm de água), foi a parte mais ativa da planta, inibindo o crescimento de 91,3% (21/23) dos isolados de *Cryptococcus neoformans* em concentração  $\leq$  a 250 $\mu$ g/mL.

**Palavras-chaves:** *Caryocar brasiliensis*. Planta do Cerrado. *Cryptococcus neoformans*. Suscetibilidade in vitro.

**Abstract** The widespread occurrence of cryptococcosis mainly in immunocompromised patients and the side effects of available drugs which are effective against this mycosis have led investigators to search for new antimycotic agents. *Caryocar brasiliensis* derived compounds were investigated against *Cryptococcus neoformans* using the agar dilution method. Based on MIC values, the best results were obtained with a concentration of  $\leq$  250 $\mu$ g/mL of cuticular waxes of the *Caryocar brasiliensis* leaf collected during the dry period (170.8mm of precipitation) which inhibited the growth of 91.3% (21/23) *Cryptococcus neoformans* isolates.

**Key-words:** *Caryocar brasiliensis*. Cerrado plant. *Cryptococcus neoformans*. Antifungal activity.

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos<sup>5 16</sup>. A criptococose causada por *Cryptococcus neoformans* é considerada micose oportunista, freqüentemente diagnosticada produzindo lesões principalmente no sistema nervoso central em pacientes com AIDS<sup>9 11 23</sup>.

O tratamento da meningite criptocócica na fase aguda para pacientes imunocomprometidos bem como para imunocompetentes é feito normalmente utilizando-se anfotericina B ou anfotericina B associada a 5-

fluorocitosina. Para pacientes infectados pelo HIV utiliza-se inicialmente anfotericina B com ou sem 5-fluorocitosina seguido por uma terapia de manutenção com fluconazol<sup>18</sup>. Os efeitos colaterais verificados com estes antifúngicos fazem com que se busque alternativas ao tratamento desta micose<sup>6 10 22</sup>. Compostos com características antifúngica extraídos da vegetação nativa, que são encontrados em abundância no território brasileiro, poderiam constituir uma alternativa terapêutica<sup>2 4</sup>. *Caryocar brasiliensis* Camb (Caryocaraceae), que produz o fruto conhecido como pequi e distribuído amplamente nas regiões central e sudeste do Brasil<sup>3</sup> tem sido relatado

1. Instituto de PatologiaTropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2. Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Prof<sup>a</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva. IPTSP/UFG. Rua Delenda Rezende de Melo eq com 1<sup>a</sup> Avenida. Setor Universitário. Caixa Postal 131, 74605-050, Goiânia, GO.

Fone: 55 62 209-6127

e-mail rosario@iptsp.ufg.br.

Recebido para publicação em 15/1/2002.

por possuir atividade antifúngica. O óleo essencial das sementes desta planta mostra bioatividade em testes de suscetibilidade *in vitro* sobre isolados de *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*<sup>14</sup>.

Neste trabalho, foi descrita a atividade antifúngica das folhas (extrato bruto etanólico, fração acetato

de etila e cera epicuticular), dos dois principais componentes presentes no óleo essencial das sementes, além dos óleos fixos da amêndoa e da semente de *C. brasiliensis* sobre isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* e de *C. neoformans* var. *gattii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material botânico.** Espécimes de *C. brasiliensis* Camb foram coletadas de diferentes regiões do Brasil e períodos do ano. Os frutos maduros foram provenientes das cidades de São Gonçalo do Abaeté (Minas Gerais) e de Goiânia (Goiás), coletados no mês de dezembro de 1997 e dezembro de 1998, respectivamente. As folhas desta planta foram coletadas nas cidades de Paraúna e Goiânia (Goiás) em agosto de 1997 e em dezembro de 1998, respectivamente, enquanto a cera epicuticular das folhas foi obtida de espécimes coletados em Goiânia (S 16° 34'24"/ W 48° 56' 17"; 769m de altitude) nos meses de alta pluviosidade (março; 207,9mm de água) e baixa pluviosidade (outubro; 170,8mm de água). Todos os espécimes utilizados foram depositados no Herbarium da Universidade Federal de Goiás (UFG), Brasil.

**Extratos da planta.** As folhas de *C. brasiliensis* (0,35kg) foram secas em estufa com ventilação forçada (40°C), moídas em moinhos de facas até atingirem uma baixa granulometria e em seguida sofreram percolação a frio em etanol 96% (3 x 500mL), ao abrigo da luz e sob agitação durante 24 horas. Filtração do sobrenadante e evaporação do solvente à pressão reduzida conduziu ao extrato bruto etanólico, EBE (19,6g; 5,6% de rendimento). Parte do EBE (10g) foi submetido à partição líquido-líquido com éter etílico-água destilada (1:1v/v). Separação da fase orgânica, conduziu à fase aquosa livre de graxas e clorofilas. Posterior extração da fase aquosa com acetato de etila (3 x 100mL) e evaporação do solvente orgânico, conduziu à fração acetato de etila (0,36g). Para a obtenção da cera epicuticular, folhas verdes recém-coletadas (25g) foram percoladas em éter etílico (50mL) durante 30 segundos. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se apenas a cera da superfície epicuticular com rendimentos de 0,36% (89mg) e 0,39% (97,5mg), para os meses de março e outubro, respectivamente.

Os óleos fixos da semente e da amêndoa foram adquiridos comercialmente em Goiânia (Mercado Central), em fevereiro de 2000, enquanto os ésteres hexanoato de etila e octanoato de etila, foram adquiridos da Sigma Chemical Co (USA).

**Microrganismos.** Foram utilizados 23 isolados de *C. neoformans*, sendo 19 *C. neoformans* var. *neoformans* e 4 *C. neoformans* var. *gattii*, devidamente identificados no laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG. Todos os isolados foram obtidos de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), acometidos de meningite criptocócica, provenientes do Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás, Brasil. *C. neoformans* var. *neoformans* (CBS 132), foi usada como padrão. Todos os fungos estudados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose à temperatura ambiente (BBL, Beckton Dickinson Microbiology Systems, USA), para posterior avaliação de suscetibilidade.

**Teste de suscetibilidade antifúngica.** A atividade antifúngica foi realizada segundo a técnica de diluição em ágar, proposta por Alves & Cury<sup>1</sup>, modificada. Extrato bruto etanólico e sua fração acetato de etila, os óleos fixos da semente e da amêndoa, a cera da superfície epicuticular e os dois principais componentes dos óleos essenciais (hexanoato de etila e octanoato de etila) de *C. brasiliensis* (100mg) foram solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), diluídos ao dobro em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) (DIFCO) e, posteriormente distribuídos em placas de Petri contendo 20mL de ágar YNB de maneira que se obtivesse uma concentração que variasse de 1.000µg/mL a 15,6µg/mL. Três microlitros da suspensão das células preparadas em solução fisiológica estéril, homogeneizadas e ajustadas com espectrofotômetro em comprimento de onda de 530nm, de forma a obter 10<sup>6</sup> células/mL foram semeados com o auxílio de uma micropipetadora sobre o ágar em pontos equidistantes nas placas de Petri, contendo ágar YNB nas diferentes concentrações dos extratos. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida após incubação a 37°C por 72 horas foi definida como a menor concentração da amostra teste capaz de inibir completamente o crescimento visível do fungo. Paralelamente, utilizando-se a mesma técnica efetuou-se o teste de suscetibilidade de todos os isolados de *C. neoformans*, frente ao fluconazol (Pfizer). O fluconazol foi dissolvido em 1mL de água destilada, diluído ao dobro em caldo YNB e distribuído em 20mL de ágar YNB de tal modo que as concentrações variaram de 15,6µg/mL a 0,03µg/mL.

## RESULTADOS

O extrato bruto etanólico das folhas de *C. brasiliensis* mostrou-se com atividade antifúngica sobre *C. neoformans* var. *neoformans*, sendo que 89,5% dos isolados foram inibidos em uma concentração menor

ou igual a 1.000µg/mL. A cera da superfície epicuticular das folhas, coletada no período de baixo índice pluviométrico (outubro), mostrou-se com maior atividade biológica do que a cera proveniente do mês com elevado

índice pluviométrico (março). A cera epicuticular das folhas de outubro inibiu o crescimento de 73,7% (14/19) dos isolados de *C. neoformans* var *neoformans* à uma concentração menor do que 250µg/mL, sendo que 42,1% (8/19) ocorreu à uma concentração de 15,6µg/mL.

A bioatividade dos óleos fixos da semente e da amêndoa de *C. brasiliensis* mostrou-se bastante elevada para *C. neoformans*. Todos os isolados foram inibidos por estes óleos a uma concentração de 1.000µg/mL, sendo que o óleo fixo da semente, o mais ativo, inibiu 21,1% dos isolados em uma concentração de 15,6µg/mL, enquanto o óleo fixo da amêndoa foi capaz de inibir 10,5% em uma concentração de 62,5µg/mL.

Os resultados da ação antifúngica da fração acetato de etila, obtida a partir do extrato bruto etanólico das folhas e dos dois componentes majoritários presentes nos óleos essenciais dos frutos de *C. brasiliensis* demonstraram que a fração acetato de etila possui elevada atividade antifúngica, apresentando CIM de

31,3µg/mL para 4 (21%) isolados e de 62,5µg/mL para 8 (42,1%), enquanto o hexanoato de etila apresentou o mais baixo potencial antifúngico, sendo capaz de inibir apenas 4 (15,8%) isolados de *C. neoformans* na concentração de 500µg/mL.

A análise de suscetibilidade *in vitro* com relação às duas variedades mostrou que *C. neoformans* var *gattii* apresentou-se com menor sensibilidade aos extratos de *C. brasiliensis* do que *C. neoformans* var *neoformans*. Os resultados de CIM do extratos bruto etanólico, das ceras, dos óleos fixos, da fração acetato de etila, de octanoato de etila e de hexanoato de etila para os isolados de *C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var *gattii* estão apresentados na Tabela 1.

A suscetibilidade dos isolados de *C. neoformans* ao agente antifúngico fluconazol apresentou valores de CIM variando de 15,6µg/mL a 1,95µg/mL. Verificou-se que 9 isolados de *C. neoformans* mostraram-se com CIM igual a 15,6µg/mL (Tabela 2).

Tabela 1 - Atividade antifúngica de *C. brasiliensis* sobre 23 isolados de *C. neoformans*.

<i>C. brasiliensis</i>	<i>C. neoformans</i>	Porcentagem acumulativa de inibição de <i>C. brasiliensis</i> em diferentes concentrações (µg/mL) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> .							
		15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000	>1000
Extrato bruto etanólico	var <i>neoformans</i> <sup>1</sup>	0	0	0	0	42,1	63,2	89,5	100,0
	var <i>gattii</i> <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
	CBS 132 <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	100,0	100,0	100,0
Cera epicuticular (março)	var <i>neoformans</i>	0	0	0	0	0	10,5	10,5	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
Cera epicuticular (outubro)	var <i>neoformans</i>	42,1	47,4	57,9	73,7	100,0	100,0	100,0	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	0	100,0	100,0	100,0
Óleo fixo da semente	var <i>neoformans</i>	21,1	21,1	21,1	21,1	36,9	73,7	100,0	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
Óleo fixo da amêndoa	var <i>neoformans</i>	0	0	10,5	10,5	21,0	57,8	100,0	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	100,0	100,0	100,0	100,0
Fração acetato de etila	var <i>neoformans</i>	0	21,0	63,1	78,9	84,2	84,2	89,5	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	25,0	50,0	100,0
	CBS 132	0	0	0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Octanoato de etila	var <i>neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	52,6	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	50,0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0
Hexanoato de etila	var <i>neoformans</i>	0	0	0	0	5,3	15,8	21,1	100,0
	var <i>gattii</i>	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	CBS 132	0	0	0	0	0	0	100,0	100,0

<sup>1</sup> número de isolados = 19; <sup>2</sup> número de isolados = 4; <sup>3</sup> cepa padrão de *C. neoformans* var *neoformans*.

Tabela 2 - Atividade antifúngica de fluconazol sobre 23 isolados de *C. neoformans*.

<i>C. neoformans</i>	Porcentagem acumulativa de inibição de fluconazol em diferentes concentrações (µg/mL) sobre isolados de <i>C. neoformans</i>			
	1,95	3,9	7,8	15,6
<i>var neoformans</i> <sup>1</sup>	5,3	31,6	63,2	100,0
<i>var gattii</i> <sup>2</sup>	0	25,0	50,0	100,0
CBS 132 <sup>3</sup>	0	0	100,0	100,0

<sup>1</sup> número de isolados = 19

<sup>2</sup> número de isolados = 4

<sup>3</sup> cepa padrão de *C. neoformans var neoformans*

## DISCUSSÃO

Os resultados *in vitro* mostraram que *C. brasiliensis* apresenta potencial atividade antifúngica sobre os isolados de *C. neoformans*. Dos extratos, frações e compostos avaliados, verificou-se maior atividade antifúngica com a cera da superfície epicuticular coletada no mês de outubro, e da fração acetato de etila do extrato bruto etanólico das folhas. As diferenças quantitativas em relação às concentrações inibitórias observadas para *C. brasiliensis* podem ser justificadas pelos constituintes químicos presentes nos diferentes materiais botânicos analisados. A maior atividade antifúngica da cera epicuticular das folhas coletada no mês de outubro, quando comparada com a proveniente da coletada no mês de março (Tabela 1) sugere um mecanismo de defesa química da planta, principalmente em períodos de menor precipitação de água e maior predação por insetos. De fato, hidrocarbonetos de cadeia longa acumulados na cera foliar, atuam como os responsáveis pela dissuasão do comportamento forrageador de saúvas<sup>20</sup>, envolvendo-se também na resistência da planta a ataques de microrganismos<sup>17</sup>. Por outro lado, a maior atividade antifúngica do óleo fixo da semente comparado ao óleo fixo da amêndoa (Tabela 1), pode ser atribuída a composição química da primeira, constituída por ácidos graxos de natureza saturada, ausentes na amêndoa<sup>3</sup>. Já a resposta biológica apresentada pela fração acetato de etila do extrato bruto etanólico (Tabela 1) provavelmente encontra-se relacionada a sua composição química majoritariamente composta de taninos condensados (monômeros, dímeros e trímeros), flavonóides glicosilados e taninos hidrolisáveis, responsáveis pela ação antifúngica dessa mesma fração frente a outros fungos, como *P. brasiliensis*<sup>8</sup>.

Atividade biológica de outras plantas de uso na medicina popular tem sido observada para

*C. neoformans*. O óleo de *Piper angustifolium* apresentou CIM de 50µg/mL para um isolado de *C. neoformans*<sup>21</sup>. Trabalho realizado com berberina, o principal componente alcaloídico de *Xanthorrhiza simplicissima* mostrou que este composto possui excelente atividade sobre *C. neoformans*, apresentando uma CIM de 1,56µg/mL sobre este microrganismo<sup>12</sup>. O óleo da folha de *Eugenia dysenterica* mostrou potente ação inibitória sobre este fungo, havendo uma inibição em uma concentração de 250µg/mL<sup>7</sup>.

Os isolados de *C. neoformans var. gattii* utilizados neste trabalho apresentaram valores de CIM mais elevados do que os observados para *C. neoformans var. neoformans* para todos os extratos, frações e compostos avaliados. *C. neoformans var gattii* tem sido relatada principalmente, como causa de doença em pacientes não imunocomprometidos<sup>13 15 19</sup>.

A análise comparativa entre fluconazol e a cera epicuticular coletada no mês de outubro que mostrou-se a mais ativa, não forneceu resultados similares. A cera inibiu 8 isolados na concentração de 15,6µg/mL enquanto que o fluconazol foi capaz de inibir todos os isolados de *C. neoformans* nesta mesma concentração. Diante destes resultados verificou-se que a atividade antifúngica expressa pelo fluconazol foi superior a cera, no entanto, fluconazol apresentou CIM de 15,6µg/mL para 9 (13%) isolados (Tabela 2).

A grande incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumenta a importância da procura e descoberta de compostos terapêuticos alternativos. A atividade antifúngica de *C. brasiliensis* para *C. neoformans* observada neste trabalho, pode abrir perspectivas no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/PCOP, FUNAPE/UFMG pelo suporte financeiro e ao CNPq/PIBIC/UFMG pelos bolsistas A.C.F Garcia e T.F. Paula.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves SH, Cury AE. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos polienicos. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 34:251-254, 1992.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TS, Smânia EF, Smânia Jr A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95:367-373, 2000.

3. Araujo FD. A review of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) - An economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. *Economy Botany* 49: 40-48, 1995.
4. Cabrera AL, Klein RM. Compostas. Tribo: Vernoniae. In: Reitz. *Revista Flora Ilustrada Catarinense*. Itajai-SC. Imprensa Oficial do Estado de Santa Catarina 3: 224-408, 1980.
5. Canton E, Viudes A, Pemán. J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:51-55, 2001.
6. Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:2-5, 2001.
7. Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião LM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Sales BHN, Silva MRR. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology* 72:111-117, 2000.
8. Guimarães DO, Ribeiro JP, Santos SC, Ferri PH, Garcia ACF, Pires JS, Castro ACM, Silva MRR, Ferreira HD. Atividade antifúngica de taninos de *Caryocar brasiliensis* Camb. In: *Resumos da V Jornada Paulista de Plantas Mediciniais*, Botucatu, p. 158, 2001.
9. Gumbo T, Hakim JG, Mielke J, Siwji S, Just-Nubling G, Ismail A. *Cryptococcus myelitis*: atypical presentation of a common infection. *Clinical Infectious Diseases* 32:1235-1236, 2001.
10. Kulberg BJ. Trends in immunotherapy of fungal infections. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 16:51-55, 1997.
11. Negroni R, Arechavala A, Robles AM, Bianchi M, Bava A, Helou S. Revisión clínica y evolución terapéutica de pacientes con criptococosis asociada al sida. *Revista Iberoamericana de Micología* 12:12-15, 1995.
12. Okunade AL, Hufford CD, Richardson MD, Peterson JR, Clark AM. Antimicrobial properties of alkaloids from *Xanthorhiza simplicissima*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83:404-406, 1994.
13. Passoni LFC. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infectious. *Revista Iberoamericana de Micología* 16:77-81,1999.
14. Passos XS, Costa M, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos AA, Ferri PH, Santos SC, Silva MRR. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma capsulatum*. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia* 60:71, 2001.
15. Rozenbaum R, Gonçalves AJR, Wanke B, Vieira W. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a brasilian AIDS patient. *Mycopathologia* 112:33-34, 1990.
16. Rubin RH. Infectious disease complications of renal transplantation. *Kidney International* 44:221-236, 1993.
17. Schoonhoven LM, Jeremy T, Van Loon JJA. *Insect-Plant Biology from Physiology to Evolution*. Chapman & Hall, London, 1998.
18. Sheelan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:40-79,1999.
19. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases* 21:28-34, 1995.
20. Sugayama RL, Salatino A. Influence of leaf epicuticular waxes from cerrado species on substrate selection by *Atta sexden rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 63-69, 1995.
21. Tirillini B, Velasquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Medica* 62:372-373. 1996.
22. Vanden-Bossche H. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:44-49, 1997.
23. Vander-der Host CM, Saag CM, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill J, Sobel JD, Johnson PC, Tuazon CV, Kerkering T, Moskovitz BL, Powderly WG, Dismukes WE. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycosis Study Group AIDS Clinical Trials Group. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medical* 337:15-21, 1997.