UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Mariany Lopes da Costa Folly

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das folhas de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler (Salicaceae) frente a linhagens de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans.*

Governador Valadares

2018

Mariany Lopes da Costa Folly

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das folhas de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler (Salicaceae) frente a linhagens de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof.(a) Dra Karen Luise Lang
Co-orientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia

Governador Valadares

2018

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

Folly, Mariany Lopes da Costa.
Avaliação da atividade antifúngica in vitro das folhas de Xylosma ciliatifolia (Clos) Eichler (Salicaceae) frente a linhagens de Cryptococcus gattii e Cryptococcus neoformans. / Mariany Lopes da Costa Folly. -- 2018.
100 p.

Orientadora: Karen Luise Lang
Coorientadora: Maria Elena Lima Perez Garcia
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2018.

1. Cryptococcus . 2. Xylosma ciliatifolia. I. Lang, Karen Luise , orient. II. Lima Perez Garcia, Maria Elena, coorient. III. Título.

Mariany Lopes da Costa Folly

Avaliação de atividade antifúngica de *in vitro* das folhas de *Xylosma ciliatifolium* (Clos) Lichler (Salicaceae) frente a *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em 04 de 03 de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dra Karen Luise Lang - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Marliete Carvalho Costa

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Fábio Alessandro Pieri

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, por ser meu guia, minha luz e pela tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos não desanimando com as dificuldades. A ELE toda honra e toda a glória.

À minha orientadora Karen, pelos ensinamentos, pela constante dedicação e paciência empenhada a mim nesses anos de trabalho.

À prof. Gabriella que gentilmente nos prestou uma imensa colaboração, meu muito obrigada, sua participação foi primordial para o sucesso desse trabalho.

À banca examinadora que aceitou o convite.

Aos meus pais e irmão pelo apoio, por serem meu porto seguro, minha referência de vida. Dedico a vocês toda e qualquer vitória.

Ao meu marido Bruno obrigada pelo amor, carinho e paciência. Obrigada por entender minhas ausências e por estar sempre ao meu lado apoiando e motivando cada novo desafio.

À Thaís Silveira pela amizade e companhia. Obrigada por ser tão solícita com esse trabalho e pelo socorro nos momentos de sufoco.

Aos alunos Larissa, Maiara, Ana e Guilherme por toda ajuda e dedicação a esse trabalho.

Ao Prof. Jeferson pelo carinho, atenção e disponibilidade de sempre, seus ensinamentos foram essenciais. Ao Prof. Leonardo pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade. A todos os professores envolvidos na execução do trabalho e nas disciplinas ofertadas, obrigada por contribuir com nosso conhecimento.

Aos meus colegas de trabalho, Graziella, Duílio e Jenifer pela amizade e cumplicidade de sempre. Ao departamento de Ciências Básicas e da Vida em especial os professores da microbiologia pelo apoio e incentivo.

À UFJF pela oportunidade, por ser uma instituição que acredita e incentiva seus funcionários. E aos meus colegas de turma: Kátia, Kênia, Elaine, Lorena, Thaísa, Jenifer, Nilcemar e Thiago por fazerem com que essa jornada fosse mais leve e prazerosa. Conhecer vocês foi uma grata surpresa!

RESUMO

O constante aumento da incidência de doenças fúngicas oportunistas tem se tornado um importante problema de saúde pública, principalmente após o advento da SIDA quando o número de indivíduos imunocomprometidos aumentou drasticamente. A criptococose é uma importante micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, com estimativa global de um milhão de novos casos e aproximadamente 600.000 mortes por ano. As opções terapêuticas atuais de criptococose são restritas, tanto pelo aumento da resistência dessas leveduras frente aos fármacos utilizados quanto pela elevada toxicidade dos antifúngicos para o organismo humano sendo necessária a busca contínua por novas entidades químicas para o tratamento de infecções. Nesse contexto, os produtos naturais e derivados constituem uma fonte inestimável de substâncias com potencial biológico. *Xylosma ciliatifolia*, popularmente conhecida como sucará, é uma árvore semidecídua, nativa do Brasil, podendo também ser encontrada em outros países. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica das folhas de *X. ciliatifolia*, *in vitro*, frente à *C. gattii e C. neoformans*. Foi determinada a CIM do extrato etanólico e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e resíduo aquoso. A fração acetato de etila (FAXC) apresentou atividade promissora e foi selecionada para os ensaios subsequentes. Através do ensaio de atividade fungicida/fungistática observou-se que FAXC possui ação fungicida. No ensaio de interação com fluconazol e anfotericina B, *in vitro*, não foi observada interferência na ação dos fármacos e o ensaio de curva de morte demonstrou que FAXC apresenta um comportamento dose dependente. FAXC não alterou o valor de CIM na presença de sorbitol, indicando que sua ação possivelmente não se dá diretamente através de parede celular. Através da quantificação de ergosterol foi possível observar que FAXC interfere na biossíntese do esteroide, podendo esse ser um dos mecanismos de ação. Foi avaliada a produção de EROs e PRNs nas células fúngicas pela emissão de fluorescência e após tratamento com FAXC houve um aumento da produção de peroxinitrito, que causa danos celulares. Foram medidos os produtos da peroxidação lipídica como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde evidenciou-se a peroxidação lipídica nas membranas celulares fúngicas em uma maior concentração. O tamanho do diâmetro celular e cápsula de *Cryptococcus* foi avaliado através da comparação da contagem de células tratadas e não tratadas coradas com a tinta da índia. Após exposição à concentração equivalente à metade da CIM o diâmetro celular diminuiu sugerindo uma tentativa de defesa, mas não houve alteração no tamanho da cápsula. A carga da superfície celular foi avaliada por potencial zeta que também não demonstrou alteração. A interação entre FAXC e os fungos, avaliada por ITC, é provavelmente fraca como as interações não polares. Por fim, verificou-se pelo ensaio colorimétrico de MTT, que FAXC não apresenta citotoxicidade nas concentrações ativas, sendo esta dose dependente.

PALAVRA CHAVE: Atividade antifúngica, *Cryptococcus*, *Xylosma ciliatifolia*

ABSTRACT

The steady increase in the incidence of opportunistic fungal diseases has become a major public health problem, especially after the advent of AIDS when the number of immunocompromised individuals increased dramatically. Cryptococcosis is an important systemic mycosis caused by fungi of the genus *Cryptococcus*, with a global estimate of one million new cases and approximately 600,000 deaths per year. The current therapeutic options of cryptococcosis are restricted, both by the increase of the resistance of these yeasts to the drugs used and by the high toxicity of the antifungal to the human organism being necessary the continuous search for new chemical entities for the treatment of infections. In this context, natural products and derivatives are an invaluable source of substances with biological potential. *Xylosma ciliatifolia*, popularly known as Sucará, is a semi-deciduous tree, native to Brazil, and can also be found in other countries. The present work evaluated the antifungal activity of *X. ciliatifolia* leaves, in vitro, against *C. gattii* and *C. neoformans*. The MIC of the ethanolic extract and the fractions hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous residue were determined. The ethyl acetate fraction (FAXC) showed promising activity and was selected for subsequent trials. Through the fungistatic / fungistatic activity assay it was observed that FAXC has fungicidal action. In the interaction test with fluconazole and amphotericin B, in vitro, no interference was observed in the action of the drugs and the death curve assay demonstrated that FAXC shows a dose-dependent behavior. FAXC didn't change the MIC value in the presence of sorbitol, indicating that its action possibly don´t occur directly through the cell wall. Through the quantification of ergosterol it was possible to observe that FAXC interferes in the biosynthesis of the steroid, being this one of the mechanisms of action. The production of ROS and RNS in fungal cells was evaluated by the emission of fluorescence and after treatment with FAXC there was an increase in peroxynitrite production, which causes cell damage. Lipid peroxidation products were measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), where lipid peroxidation was evidenced in fungal cell membranes in a higher concentration. Cell size and capsule size of *Cryptococcus* was evaluated by comparing the count of treated and untreated cells stained with the India ink. After exposure to the concentration equivalent to half of the MIC, the cell diameter decreased suggesting a defense attempt, but there wasn't change in capsule size. Cell surface loading was evaluated by zeta potential, which also showed no change. The interaction between FAXC and fungi, as assessed by ITC, is probably weak as non-polar interactions. Finally, it was verified by the MTT colorimetric assay that FAXC didn't present cytotoxicity in the active concentrations, being this dose dependent.

KEYWORDS: Antifungal activity, *Cryptococcus*, *Xylosma ciliatifolia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Folhas, caule e árvore de *X. ciliatifolia*.....18
Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos secundários isolados das folhas de *X. longifolium* 19
Figura 3 –Estrutura química dos metabólitos secundários isolados de *X. longifolium, e X. ciliatifolia*.....20
Figura 4 – Colônias de *Cryptococcus* em ASD e células de *Cryptococcus* coradas pela tinta da índia.....23
Figura 5 – Processo de disseminação de *Cryptococcus* no hospedeiro 26
Figura 6 – Infecção e disseminação por *Cryptococcus*.....29
Figura 7 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE-MS de FAXC no modo positivo (A) negativo (B). Coluna: Rapid Resolution HD, Fase móvel: mistura de água e metanol modo gradiente, detector: ionização por eletrospray (ESI).....54
Figura 8 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE-MS-UV de FAXC no modo positivo (A) e negativo (B). Coluna: Rapid Resolution HD, Fase móvel: mistura de água e metanol, modo gradiente, detector: arranjo de fotodiodo em 280nm..... 55
Figura 9 – Espectros de FAXC em LC- MS modo negativo.....56
Figura 10 – Espectro FAXC LC-DAD modo negativo.....57
Figura 11 – Prováveis íons gerados a partir da fragmentação do ácido X-O-cafeoilquínico.....58
Figura 12 – Curva de morte de células de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com FAXC.....63
Figura 13 – Quantificação de ergosterol na membrana celular de linhagens de *C. gatti* e *C. neoformans* tratadas com FAXC.....65
Figura 14 – Representação esquemática da formação do sistema antioxidante.....66
Figura 15– Mensuração de peroxinitrito (PRN) produzidas por *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com FAXC.....67
Figura 16 – Mensuração de peroxinitrito (PRN) por *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com FAXC.....67
Figura 17 – Avaliação de FAXC sobre a peroxidação lipídica em células de *C. gattii* e *C. neoformans*.....68
Figura 18 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de *C. gattii* e *C. neoformans* quando tratados com FAXC.....70

Figura 19 – Efeito de FAXC sobre a superfície/volume celular de células de *C. gattii* e *C. neoformans*.....72
Figura 20 – Efeito de FAXC sobre o tamanho da cápsula de células de *C. gattii* e *C. neoformans*.....72
Figura 21 – Efeito de FAXC sobre a carga da membrana celular de *C. gattii* e *C. neoformans*.....73
Figura 22 – Avaliação da interação intermolecular entre *C. gattii* e *C. neoformans* com FAXC.....74
Figura 23 – Viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico após tratamento com diferentes concentrações de FAXC.....75
Figura 24 – Representação esquemática da célula criptococócica antes e após o tratamento com FAXC.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*.....40

Tabela 2 – Reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios.....41

Tabela 3 – Rendimento das frações obtido a partir do extrato etanólico de *Xylosma ciliatifolia*.....50

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. gattii* e *C. neoformans* das frações em hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FAXC), butanol (FB) e em água (FA) e extrato etanólico (EEXC) de *X. ciliatifolia*.....52

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) de FAXC e do extrato etanólico (EEXC), de anfotericina B (ANFb) e fluconazol (FLU) frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.....53

Tabela 6 – Dados dos espectros de massa obtido para os isômeros do tipo C2 e C3 durante a CLAE-MS.....59

Tabela 7– Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de FAXC e EEXC de *X. ciliatifolia* frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.....61

Tabela 8 – Avaliação da interação de FAXC com fluconazol (FLU) e anfotericina B (ANFb) frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.....62

Tabela 9 – Avaliação da interação de FAXC com sorbitol frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aox1	Oxidade alternativa
APP1	Proteína antifagocítica 1
ASD	Ágar Sabourand Dextrose
CAT	Catalase
Ccp1	Peroxidase de citocromo c
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Arranjo de fotodiodo
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluorescina
DHE	Deidroergosterol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas oxigênio
GalXM	Galactoxilomana
GXM	Glucuronoxilomanana
h	Horas
H_2O_2:	Peróxido de hidrogênio
ICIF	Concentração Inibitória Fracionária
IF	Intensidade de fluorescência
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IV	Índice de variação
LCR	Líquido cefalorraquidiano
Min	Minutos
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
$O2^-$	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PER	Peroxidase
PMBC	Células monunucleares sangue periférico

PZ	Potencial Zeta
Rho	Rodamina
SFB	Soro Fetal Bovino
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superoxidodismutases
SOD2	Superóxido manganês dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VI	Via intravenosa
VO	Via oral

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**.....13
2 **OBJETIVOS** 15
2.1 OBJETIVOS GERAIS 15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....15
3 **REVISÃO DE LITERATURA**.....16
3.1 PRODUTOS NATURAIS.....16
3.1.1 FAMÍLIA *Salicaceae*.....16
3.1.2 *Xylosma ciliatifolia*.....17
3.2 CRIPTOCOCOSE.....21
3.2.1 EPIDEMIOLOGIA.....23
3.2.2 ECOLOGIA.....25
3.2.3 PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO E INFECÇÃO.....25
3.2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA.....30
3.2.5 FORMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....31
3.2.6 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....38
4.1 MATERIAL VEGETAL.....38
4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....38
4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO.....38
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA.....38
4.5 LINHAGENS DE *Cryptococcus gatti* E *Cryptococcus neoformans* UTILIZADAS E DESENHO DO ESTUDO.....39
4.6 REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....40
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....41
4.8 AVALIAÇÃO AÇÃO FUNGICIDA/FUNGISTÁTICA.....42
4.9 INTERAÇÃO *in vitro* DA FRAÇÃO FAXC COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL.....43
4.10 CURVA DE MORTE.....43
4.11 INTERAÇÃO DE FAXC COM SORBITOL.....44
4.12 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL.....44

4.13 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO E PRN.....45
4.14 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....46
4.15 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO.....46
4.16 MEDIDAS DE DIÂMETRO CELULAR, TAMANHO DA CÁPSULA.....47
4.17 POTENCIAL ZETA.....47
4.18 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.....48
4.19 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZÓLIO (MTT).....48
4.19.1 OBTENÇÃO DO SANGUE MONONUCLEAR PERIFÉRICO.....48
4.19.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....49
4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....49
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....50
5.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....50
5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES *X. ciliatifolia*. 50
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DE FAXC 53
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DE FAXC 59
5.5 INTERAÇÃO *in vitro* DE FAXC COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL 61
5.6 CURVA DE MORTE.....62
5.7 INTERAÇÃO DE FAXC COM SORBITOL.....63
5.8 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL.....64
5.9 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO E PRN.....65
5.10 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....67
5.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....69
5.12 MEDIDAS DE DIÂMETRO CELULAR, TAMANHO DA CÁPSULA E POTENCIAL ZETA.....70
5.13 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.....73
5.14 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT.....74
5.15 PROVÁVEL EFEITO FUNGICIDA DE FAXC EM CÉLULAS DE *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*.....76
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....77
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....78

8. **REFERÊNCIAS**.....79
APÊNDICES.....95
ANEXOS 97

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento da incidência de doenças fúngicas oportunistas tem se tornado um importante problema de saúde pública, principalmente após o advento da SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) onde aumentou drasticamente o número de indivíduos imunocomprometidos. Esses indivíduos estão mais susceptíveis à aquisição destas infecções e a doença manifesta-se normalmente de maneira mais agressiva, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida (GULLO, 2012).

Dentre as infecções fúngicas invasivas mais frequentes destacam-se as causadas por *Candida sp.*, seguido por *Aspergillus sp.* e *Cryptococcus sp.* (GULLO, 2012). A criptococose é uma importante micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus* com estimativa global de um milhão de novos casos e aproximadamente 600.000 mortes por ano (COGLIATI, 2013).

A escolha da farmacoterapia para o tratamento de criptococoses é baseada na forma clínica da doença e no estado imunológico do hospedeiro (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006). Os fármacos mais utilizados devido à segurança e eficácia são a anfotericina B e os fungistáticos triazólicos: fluconazol, itraconazol, posoconazol e voriconazol (PERFECT et al., 2010; PAPPAS et al., 2009). As opções terapêuticas atuais são restritas, tanto pelo aumento da resistência dessas leveduras frente aos fármacos utilizados quanto pela elevada toxicidade dos antifúngicos para o organismo humano (CANUTO; RODERO, 2002; SILVA, 2014).

Devido ao crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente dos antifúngicos, há grande preocupação a respeito do aumento da prevalência de linhagens de *Cryptococcus sp.* não susceptíveis ao tratamento farmacológico disponível. Atualmente já são observados elevados percentuais de falha terapêutica dos fármacos triazólicos no tratamento da criptococose (CANUTO; RODERO, 2002; SANTOS 2015; BASSO JR et al., 2015).

Existem diversas estratégias e metodologias disponíveis para a descoberta de novos fármacos, sendo que os produtos naturais representam uma das alternativas de maior sucesso (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Alguns metabólitos secundários se mostram como valiosas matérias-primas na produção de diversos medicamentos, comprovando que a química de produtos naturais é uma importante ferramenta para a descoberta de novos fármacos (BURGOS, 2010).

Newman e Cragg (2016) em um estudo avaliando a origem dos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration) nos últimos 34 anos, apontam que dentre os 221

novos antimicrobianos aprovados nesse período, cerca de 67% (148) tem relação com produtos naturais. Esses fármacos foram obtidos diretamente, através de semissíntese ou ainda por síntese total, com grupo farmacofórico baseado em substâncias naturais, comprovando a importância dessa fonte para o desenvolvimento de fármacos.

Uma vez que os antifúngicos disponíveis atualmente não atendem às necessidade clínicas por completo, seja pelo desenvolvimento de resistência ou pela elevada toxicidade, faz-se necessária a busca contínua por novas entidades químicas para o tratamento de infecções. Nesse contexto, os produtos naturais e derivados constituem uma fonte inestimável de substâncias com potencial biológico.

Uma triagem da atividade antifúngica de 20 extratos de plantas nativas realizada recentemente no laboratório de Microbiologia da UFJF/GV identificou promissora atividade anticriptocócica para o extrato etanólico das folhas de *Xylosma ciliatifolia* (Salicaceae), árvore nativa tipicamente presente às margens de rios e lagos na Mata Atlântica, porém adaptada a outras regiões quentes e úmidas do país. Até o momento pouco se conhece sobre a constituição química e as atividades biológicas da espécie. A escassez de estudos e a atividade observada para as folhas de *X. ciliatifolia* fazem da planta uma fonte promissora de substâncias com atividade antifúngica.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antifúngica das folhas de *Xylosma ciliatifolia in vitro* frente à *Cryptococcus gattii e Cryptococcus neoformans.*

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter e fracionar o extrato etanólico de folhas de *X. ciliatifolia.*
- Caracterizar as substâncias majoritárias da fração mais ativa.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com todas as frações e extrato etanólico de *X. ciliatifolia.*
- Determinar o efeito fungicida ou fungistático, de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com a fração mais ativa de *X. ciliatifolia.*
- Determinar a curva de morte de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com a fração mais ativa de *X. ciliatifolia.*
- Avaliar a interação, *in vitro*, da fração mais ativa de *X. ciliatifolia* com anfotericina B e fluconazol;
- Avaliar a síntese de ergosterol de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com a fração mais ativa de *X. ciliatifolia.*
- Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxinitrito (PRN), em *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com a fração mais ativa de *X. ciliatifolia.*
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com a fração mais ativa de *X. ciliatifolia.*
- Avaliar a peroxidação lipídica nas células de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com fração mais ativa *X. ciliatifolia.*
- Avaliar o diâmetro celular, o tamanho da cápsula, e o potencial zeta da membrana celular de *C. gattii* e *C. neoformans* tratados com a fração mais ativa *X. ciliatifolia.*
- Avaliar a a interação intermolecular entre *C. gattii* e *C. neoformans* com a fração mais ativa *X. ciliatifolia.*
- Avaliar a citotoxicidade da fração mais ativa *X. ciliatifolia.*

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a civilização humana. Exemplo disso são os registros datados de 3000 a.C. na China que indicam a utilização de diversas ervas nos cuidados à saúde, alimentação e cosmética (FIRMO et al., 2011).

A química moderna deu início a uma nova era para o estudo e uso de produtos naturais. A química analítica e estrutural forneceu ferramentas para purificar vários compostos e para determinar suas estruturas, o que, por sua vez, auxiliou a compreensão de seus mecanismos de ação no corpo humano (JI et al., 2009).

Existem aproximadamente 250.000 espécies vegetais no mundo, sendo que a constituição química e o potencial biológico só são conhecidos para cerca de 10% das espécies. O Brasil, concentra uma flora muito rica estimada em cerca de 50 mil espécies de plantas das quais 43% são endêmicas, representando aproximadamente 20% da biodiversidade de espécies vegetais no mundo (PHILIPPSEN 2010, SANTOS et al., 2015).

A importância dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos se dá pela elevada diversidade estrutural e especificidade bioquímica encontradas (KOENH; CARTER, 2005; HARVEY, 2008). Vegetais e micro-organismos produzem diversas substâncias que não têm relação direta com a manutenção da vida organismo, mas de alguma forma garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação da espécie. Essas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários e sua síntese é proveniente da energia e matéria prima obtidas através dos metabólitos primários (SIMÕES et al., 2004).

Esse grupo de substâncias podem ser considerados como um conjunto de estruturas selecionadas pela evolução que interagem de forma específica com um grande número de alvos biológicos possibilitando uma multiplicidade de indicações terapêuticas KOENH; CARTER, 2005; HARVEY, 2008).

3.1.1 FAMÍLIA *Salicaceae*

A família *Salicaceae* era antes incluída por Eicher na ordem Amentaceae, composta apenas pelo gênero Salix e Populus. Através de análises moleculares, fitoquímicas e morfológicas foi possível evidenciar estreita relação entre *Salix* e *Populus* com gêneros

anteriormente inseridos na família Flacourtiaceae. A heterogênea família Flacourtiaceae foi então desmembrada, e seus membros foram inseridos em outras famílias, principalmente as *Salicaceae* e *Achariaceae*. A família *Salicaceae* é agora um grupo mais homogêneo de cerca de 55 gêneros em 1000 espécies (CRONK et al., 2015; WANG et al., 2017).

As árvores ou arbustos pertencentes à família *Salicaceae* são lenhosas de forma uniforme, com folhas simples, na maioria das vezes alternadas. As folhas possuem aspecto dentado, e as flores são discretas podendo faltar o perianto em alguns gêneros (CRONK et al, 2015).

3.1.2 *Xylosma ciliatifolia*

De acordo com Jaszczerski (1987) apud (PHILLIPSEN 2010), o gênero *Xylosma* tem sua denominação oriunda do grego, XYLON = madeira, lenho e OSMEN = cheiro, odor, aroma, perfume, que tem referência ao aroma do lenho da planta. O gênero *Xylosma* reúne mais de 100 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais da América, Ásia e Austrália. (PARVEEN; GHALIB, 2012; PHILIPPSEN 2010).

Xylosma ciliatifolia (FIGURA 1) popularmente conhecida como sucará, açucará ou espinho-de-judeu (PHILIPPSEN, 2013), é uma árvore semidecídua, nativa do Brasil, podendo ser encontrada em outros países como como Guiana, Venezuela (SOBRAL et al., 2006) Seus domínios fitogeográficos são preferencialmente regiões da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (REFLORA, 2017).

Segundo Marchiori (1997), a madeira de *X. ciliatifolia* é clara e rija e, devido ao seu pequeno diâmetro é utilizada como lenha ou na fabricação de utensílios, não havendo ainda relatos científicos sobre o uso medicinal da espécie.

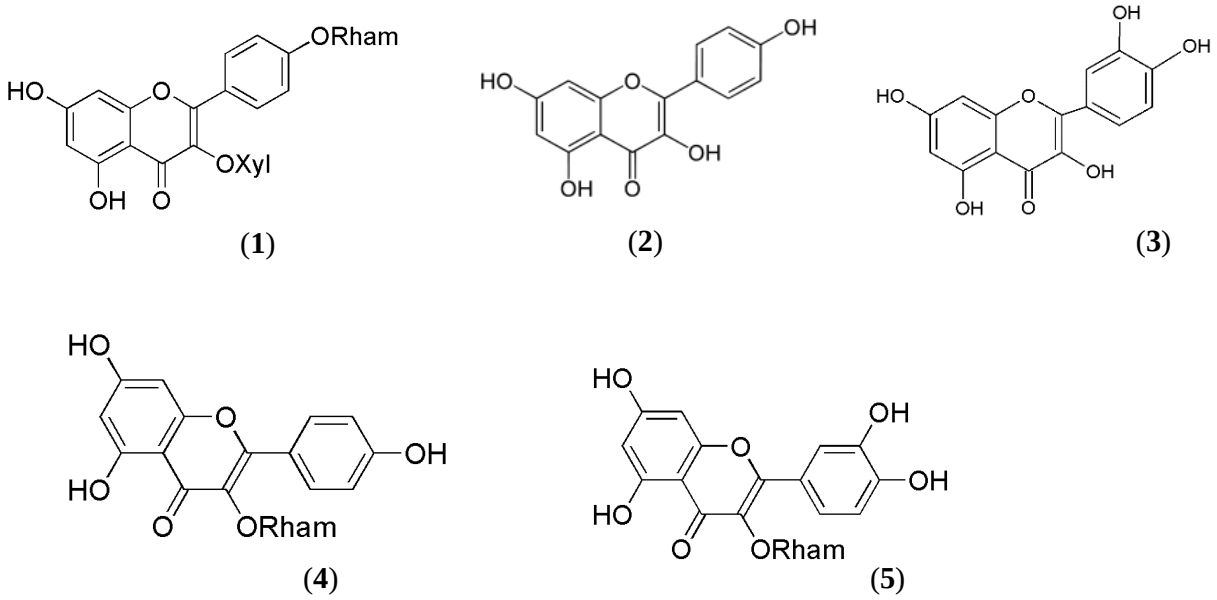
FIGURA 1: Folhas (A), tronco e espinhos (B) e árvore (C) de *Xylosma ciliatifolia*

Fonte: UFRGS, 2017.

A família *Salicaceae* possui diversas espécies de uso medicinal produtoras de um largo espectro de substâncias bioativas. Em estudo realizado por Mosaddik et al. (2004), os extratos de várias espécies da família, como *Casearia costulata*, *Casearia grewiifolia*, *Casearia grayi*, *Casearia multinervosa*, *Homalium brachbotrys*, *Homalium circumpinnatum*, *Scolopia braunii*, *Xylosma terrae-reginae* foram avaliados. As espécies *C. multinervosa* e *C. grayi* apresentaram promissora atividade antimicrobiana frente a linhagens de *Staphylococcus aureus*, *X. terrae-reginae* também mostrou atividade moderada contra *S. aureus* e *C. albicans* (MOSADDICK et al., 2004). Os resultados observados confirmam o constante interesse por plantas de família *Salicaceae* em pesquisas nas áreas médico-farmacêuticas.

No que se refere à constituição química, são poucos os estudos envolvendo o gênero *Xylosma.* Parveen e Ghalib (2012) isolaram e caracterizaram um novo flavonoide kaempferol-3β-xylopyranosideo-4'-α-rhamnosídeo (**1**) juntamente com alguns flavonoides já conhecidos como kaempferol (**2**), quercetina (**3**), kaempferol-3-rhamnosídeo (**4**), e quercetina-3-rhamnosídeo (**5**) a partir do extrato metanólico das folhas de *X. longifolium* (FIGURA 2).

FIGURA 2: Estrutura química dos metabólitos secundários isolados das folhas de *X. longifolium*



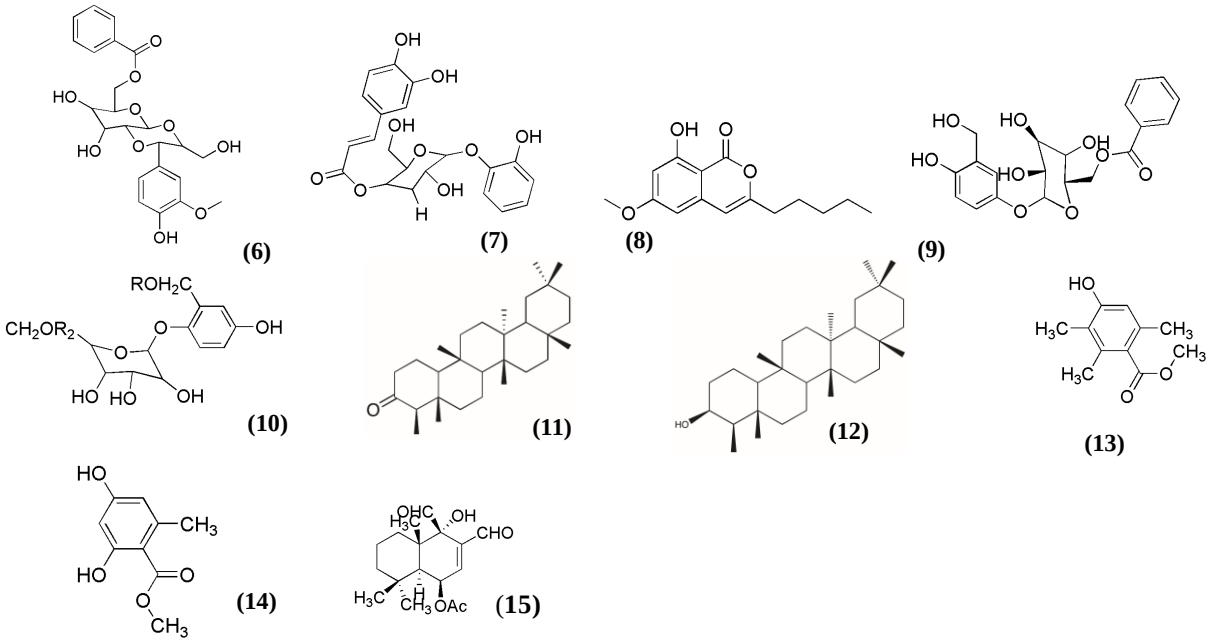
Algumas espécies como a *X. longifolium* possuem efeito antiespasmódico, narcótico e sedativo (DEVI; SINGH; SINGH, 2013). O extrato metanólico obtido de diferentes partes da *Xylosma terrae-reginae* apresentou atividade antioxidante em estudo realizado por Mossadik e colaboradores (2004) utilizando o método ABTS (2,2-azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfônico). O extrato metanólico das cascas de *X. terrae-reginae*, e das folhas de *X. congestum* apresentaram atividade antimicrobiana quando testados frente a linhagens de bactérias e fungos como *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* e *Candida albicans,* utilizando o ensaio de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (MOSSADIK et al., 2004).

Castro e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de plantas nativas do Brasil, dentre elas algumas espécies do gênero *Xylosma,* contra três bactérias que são patogênicas em peixes, *Streptococcus agalactiae, Aeromonas hydrophila, e Flavobacterium columnare,* utilizando também o ensaio CIM. O extrato metanólico de folhas de *Xylosma* sp. inibiu crescimento de *Flavobacterium columnare* em uma concentração *de* 375 μg/mL, considerada promissora.

Truong e colaboradores (2011) isolaram dois novos glicosídeos do extrato metanólico da casca e caule de *X. longifolium*: xylongosídeo A (**6**) e B (**7**) (FIGURA 3). Além desses foram isolados outros sete substâncias conhecidas: 8-hidroxi-6-metoxi-pentilisocumarina (**8**),

xylosmacina (**9**), álcool 2-(6-benzoil-β-d-glucopiranosiloxi)-7-(l,2,6-trihidroxi-5-oxociclohex-3-enoil)-5-hidroxibenzil (**10**), friedelina (**11**), epifriedelanol (**12**), ácido atrárico (**13**) e orisilato de metila (**14**) (FIGURA 3). Todas essas substâncias foram testadas, *in vitro*, frente à *Mycobacterium tuberculosis* e a substância (**7**) apresentou importante atividade, inibindo o crescimento do micro-organismo na concentração de 40 µg/mL no bioensaio anti-TB.

FIGURA 3: Estrutura química dos metabólitos secundários isolados de *X. longifolium, e X. ciliatifolia*



O efeito anti-dermatofítico das frações éter de petróleo, clorofórmio e metanol das cascas e folhas de *X. longifolium* foi investigado por Devi, Singh e Singh (2013) frente à sete linhagens de fungos dermatófitos. A atividade foi avaliada *in vitro* pelos métodos de difusão em ágar e CIM. Dentre as amostras testadas a melhor atividade foi observada para a fração metanólica das folhas de *X. longifolium* frente ao fungo *Trichophyton ajelloi*, com CIM de 140 µg/mL.

Phillipsen e colaboradores (2013) isolaram da fração hexano das cascas e raízes de *X. ciliatifolia* o sesquiterpeno ugandensidial (**15**) (FIGURA 3). A substância apresentou atividade antibacteriana frente à *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentando CIM de 62,5 µg/mL para ambos micro-organismos. Como descrito anteriormente, os dados na literatura sobre *X. ciliatifolia* são extremamente escassos, não havendo muitos relatos acerca da composição química e atividade biológica da espécie.

3.2 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é considerada a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central (SNC) e a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com SIDA (LIN, HEITMAN 2006; SHAPIRO; ROBINS; COWEN 2011). A doença é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, composto por aproximadamente 70 espécies, das quais *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, apresentam maior relevância clínica por possuírem capacidade de infectar e causar doenças em uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo o homem (HAGEN et al., 2015; MCMULLAN; SORRELL; CHEN, 2013).

Cryptococcus neoformans foi isolado pela primeira vez por Sanfelice, em 1894. Nesse mesmo ano, a criptococose teve a primeira descrição pelo patologista Otto Busse e o médico Abraham Buschke. No entanto, a doença só demonstrou relevância clínica e ameaça à saúde pública após o início de pandemia da SIDA, na década de 1980 (KOW-CHUNG et al., 2014; MAY et al., 2016).

Embora a criptococose seja uma doença que acomete na grande maioria pacientes imunocomprometidos, em meados de 1999 houve o primeiro surto da doença em indivíduos saudáveis, na América do Norte e Canadá, chamando a atenção para a capacidade de algumas linhagens de *Cryptococcus* atuarem como agentes patogênicos primários (MAY et al., 2016).

Inicialmente acreditava-se que o agente etiológico da criptococose fosse uma espécie anamórfica homogênea representada apenas por *Cryptococcus neoformans*, mas, em 1970, após estudos com base em parâmetros como distribuição geográfica, nichos ecológicos, epidemiologia, apresentação clínica e caracteres moleculares, *Cryptococcus neoformans var. gattii* foi reconhecido (COGLIATI, 2013; SORRELL, 2001). Em 1999, foi sugerido incluir uma variedade *grubii* para amostras do sorotipo A, com base em características clínicas, moleculares e biológicas (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999). As divergências genéticas culminaram com a proposta da separação em duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* (BOEKHOUT et al., 2001), conforme já havia sido proposto por Kwon-Chung (1976).

Atualmente *C. neoformans* apresenta duas variações: C. *neoformans* var. *neoformans* (com tipos moleculares VNI e VNII) e *C. neoformans* var. *grubii* (com os tipos moleculares VNII e VNIV) e incluiu os sorotipos A e D além de um híbrido AD (FERREIRA-PAIM et al., 2010; FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; TAPIA; CORREA, 2014). Já *C. gattii* foi classificado em quatro tipos moleculares distintos: VGI, VGII, VGIII e VGIV, e sorotipos B e C (COGLIATI 2013; LIN; PERLIN; XUE, 2012).

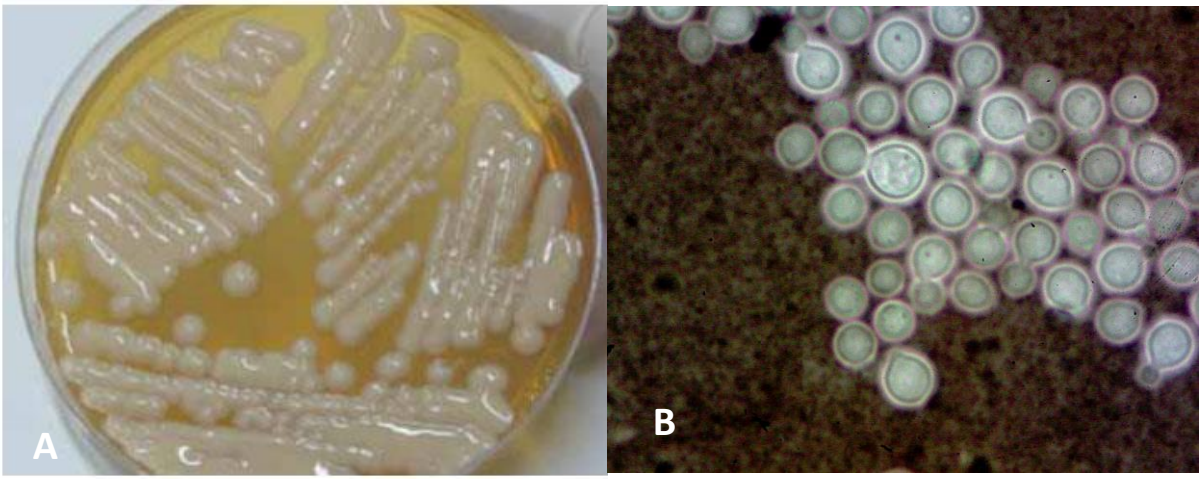
C. neoformans e *C. gattii* são as duas espécies atualmente compreendidas no complexo de espécies *C. gattii*/*C. neoformans.* Devido a estudos com métodos moleculares, nas últimas duas décadas alguns autores acreditam que há uma grande heterogeneidade genética entre esse complexo de espécies questionando essa estreita abrangência, e sugerindo que o complexo de espécies *C. gattii*/*C. neoformans* inclua sete genótipos haploides e quatro híbridos (HAGEN et al., 2015).

A espécie é conhecida no estado assexuado (anamorfo) e sexuado (teleomorfo), e recebe nomenclatura de acordo com esse estado. A fase telemorfa no gênero *Filobasidiella é* classificada como *Filobasidiella neoformans,* correspondendo à *C. neoformans* e *F. bacillispora* correspondendo à *C. gattii (*BOEKHOUT et al., 2001; KWON-CHUNG et al., 2014; KWON-CHUNG 1975).

C. neoformans e *C. gattii* pertencem ao filo basidiomiceto. São leveduras esféricas encapsuladas, com 5-10 μm (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001) haploides, heterotálicas e se reproduzem assexuadamente e sexuadamente. A reprodução assexuada é o modo mais rápido de aumento da população através da reprodução mitótica por brotamento (WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017). Já a reprodução sexuada se dá através do sistema de acoplamento bipolar de dois alelos alternativos, MATa e MATα, sendo a última encontrada na grande maioria dos isolados clínicos (KWON-CHUNG et al., 2014; KWON-CHUNG, BENNETT 1978). O acasalamento acontece quando as células haplóides se propagam assexuadamente por brotamento, e há o contato através de substratos das linhagens do tipo de acoplamento oposto (KWON-CHUNG et al., 2014; MCCLELLAND et al., 2004).

Macroscopicamente os agentes etiológicos da criptococose, *C. gatti* e *C. neoformans* apresentam-se como colônias lisas com aparência mucoide quando cultivadas em Ágar Sabouraund Dextrose (ASD) a 37ºC (FIGURA 4) (NEGRONI, 2012).

FIGURA 4: Colônias de *Cryptococcus* em ASD (A), células de *Cryptococcus* coradas pela tinta da índia



FONTE: (A) (NASSER; NASSER FILHO; VIEIRA, 2011); (B) Autoria própria.

3.2.1 EPIDEMIOLOGIA

A criptococose é considerada uma infecção com distribuição mundial, sendo uma das principais causas de infecções em pacientes imunocomprometidos. A doença afeta mais de um milhão de pessoas por ano em todo o mundo, levando a óbito mais de 600 mil pessoas anualmente (INGLIS et al., 2014; COGLIATI 2013).

Em países desenvolvidos, como Estados Unidos, o número de casos de criptococose vem diminuindo em pacientes com SIDA, principalmente pela alta disponibilidade de antirretrovirais potentes. Em 2010, nos EUA, a taxa de mortalidade de pacientes com SIDA por criptococose alcançava 12% (COGLIATI, 2013), enquanto em países em desenvolvimento 25% dos indivíduos com SIDA em estágio terminal desenvolvem a doença e 20% desses vão à óbito mesmo com tratamento intensivo. Sem tratamento a mortalidade pode atingir 100% dos indivíduos doentes (DROMER et al., 1996; DROMER et al., 2007; LORTHOLARY et al., 2006; MIRZA et al., 2003; PARK et al., 2009; ÚBEDA et al., 2016).

O maior número de casos de criptococose ocorre na África subsaariana, onde mais de 25 milhões de pessoas vivem com SIDA (KWON-CHUNG et al., 2014) e a mortalidade é estimada em 50% a 70% (COGLIATI 2013). Nas demais regiões da África, o número de infecções causadas por *C. neoformans* pode chegar a 30% nas infecções iniciais e até 40% das mortes atribuídas à HIV/SIDA. Desses indivíduos 4,3% apresentam criptococose extrapulmonar, afetando principalmente pele, próstata e olhos (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2014).

Na Índia, em estudo desenvolvido por Mukhopadhyay e colaboradores (2017), foram avaliados casos de criptococose no SNC diagnosticados no período de 2012 a 2015. Durante esse período foram identificados 199 pacientes, 179 com infecções causadas por *C. neoformans* e 20 com infecções causadas por por *C. gattii.* Dentre as infecções causadas por *C. gattii* 75% manifestavam meningite criptococócica e 25% criptococoma lesões com aspecto tumoral no SNC (MACHADO et al., 2015). Apenas 50% dos indivíduos infectados por *C. gattii* eram imunocomprometidos, demonstrando que o fungo pode provocar infecções graves no SNC tanto em indivíduos imunocomprometidos como em imunocompetentes.

Uma revisão sistemática com metanálise realizada por Cogliati (2013) analisou centenas de estudos epidemiológicos moleculares sobre criptococose publicados no PubMed. De um total de 68.811 mil isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, 2.518 foram relatados na Oceania, 7.922 isolados na América do Norte, 19.651 na Ásia, na África 19.753, 7.922 na Europa e na América central e do Sul foram isolados 10.548, sendo que 53% foram reportados no Brasil. Todos os tipos moleculares foram relatados no Brasil com exceção de VGIV, sendo a grande maioria pertencente ao tipo molecular VNI.

C. neoformans é o principal causador de criptococose humana nas regiões sul, sudeste e centro-oeste no Brasil, sendo o, sorotipo A o mais prevalente. Em contrapartida, *C. gattii* é endêmico nos estados do norte e nordeste como Amazonas, Bahia, Pernambuco, Piauí e Roraima apresentando predominantemente o tipo molecular VGII e afeta pacientes imunocompetentes, ao contrário dos demais estados do país (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; NISHIKAWA et al., 2003; MEZZARI et al., 2013; SANTOS et al., 2008). Nos estados do Piauí e Maranhão, 90% dos indivíduos com a doença tem sistema imunológico considerado normal e são infectados por *C. gattii* (MEZZARI et al., 2013).

A criptococose causada por *C. gattii* é expressivamente menos frequente a nível global do que a causada *C. neoformans*, sendo responsável por menos que 20% dos casos (KWON-CHUNG et al., 2014). Apesar da constante associação entre a infecção por *C. gattii* e indivíduos saudáveis, existem estudos que demonstram evidências crescentes da infecção por *C. gattii* em pacientes imunocomprometidos (WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017). Embora a SIDA seja um fator de risco para a infecção por *C. neoformans*, os fatores de risco para infecção por *C. gattii* são bem menos definidos, mas podem ser associados com linfopenia CD4, câncer, transplantes, uso de corticoesteróides e fármacos imunossupressores (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; CHEN et al., 2012).

3.2.2 ECOLOGIA

C. neoformans é um organismo cosmopolita comumente associado a certos nichos ambientais. Embora seu primeiro isolado tenha sido a partir de um suco de pêssego, as fontes saprófitas mais importantes no mundo são plantas, solo e excrementos de aves - apesar do fungo não fazer parte de sua microbiota (KWON-CHUNG et al., 2014; LIU et al., 2013). Apesar de haver uma relação ecológica consistente entre *C. neoformans* e espécies aviárias, a ligação precisa entre aves e o habitat natural criptococócito ainda não foi definida (KWON-CHUNG et al., 2014).

C. gattii tem sido relacionado a regiões de temperatura tropical e subtropical, no entanto, recentes surtos na ilha de Vancouver (Canadá) e no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos, alertam que a espécie está expandindo o seu alcance (KWON-CHUNG et al., 2014; WAGER et al., 2016). Já os nichos ambientais mais comuns de *C. gattii* são tradicionalmente espécies arbóreas, incluindo *Eucalyptus* sp (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; LIU; PERLIN; XUE, 2012). O mecanismo preciso que explica a preferência das espécies de *Cryptococcus* por esses nichos particulares ainda é desconhecido, mas alguns estudos demostraram que constituintes como o inositol, presente nas plantas, desempenham um papel importante na reprodução sexual das espécies de *Cryptococcus*, sugerindo que a afinidade do patógeno tem relação ao uso de componentes presentes nos nichos que são utilizados para seu desenvolvimento (LIU; PERLIN; XUE, 2012; XUE et al., 2007).

3.2.3 PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO E INFECÇÃO

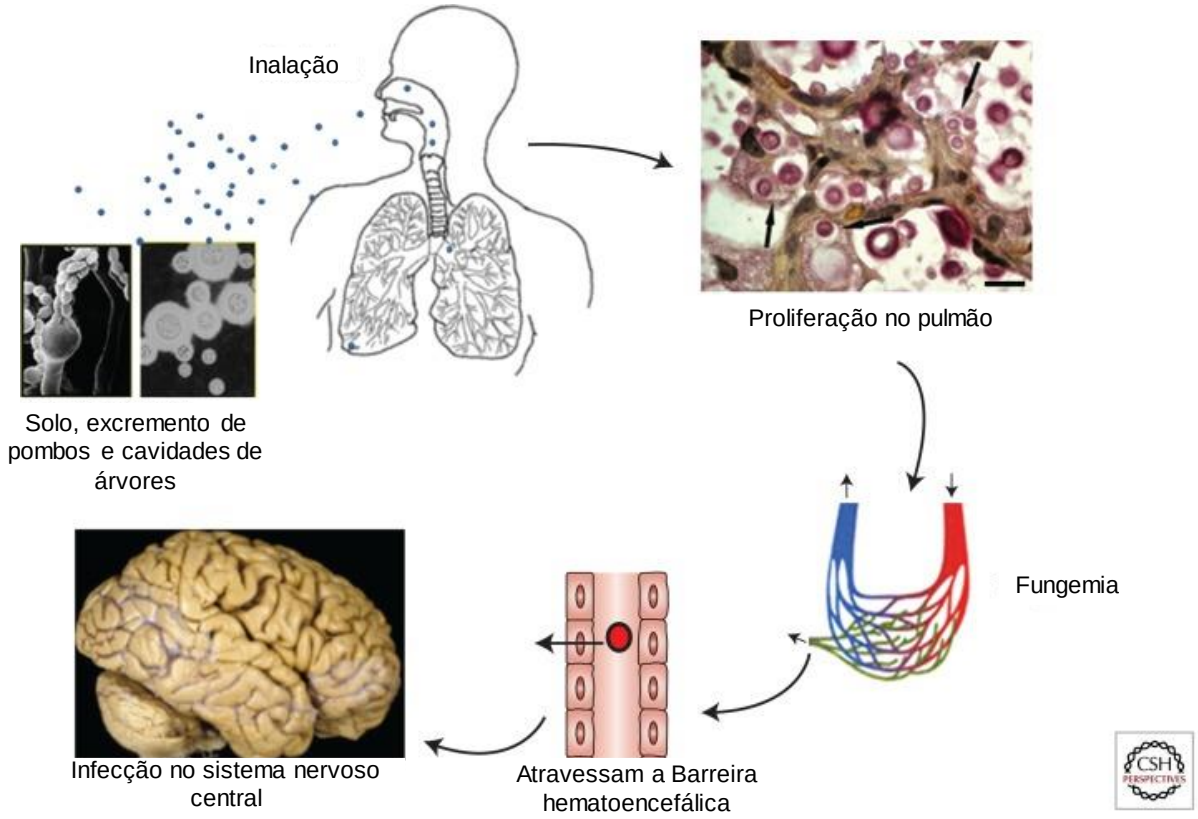
O processo de disseminação da criptococose não está totalmente elucidado. O surto de criptococose causada por *C. gattii*, em Vancouver, em 1999, trouxe alguns questionamentos acerca da dispersão do fungo, já que o mesmo era associado apenas a climas tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG; BENNETT 1984). Alguns autores sugerem que houve dispersão de *C. gattii* para países como Canadá e Estados Unidos devido à importação de madeiras como eucalipto, da Austrália (BYRNES et al., 2009; FRASER et al., 2005; PFEIFFER; ELLIS, 1991).

O processo de infecção da criptococose se inicia após a inalação de uma partícula infecciosa, seja um esporo ou uma célula de levedura dessecada (FIGURA 5). Os basidiosporos são mais prováveis de serem as partículas infecciosas pois além de menores,

são mais facilmente aerossolizados (GARCIA-HERMOSO; JANBON; DROMER, 1999; WICKES et al., 1996).

Em ambas as espécies o propágulo infeccioso é inalado para os pulmões com ajuda do movimento mucociliar, depositando-se no espaço alveolar nos pulmões (VELAGAPUDI et al., 2009). O fungo pode permanecer incubado no trato respiratório sem manifestar a doença, até que as condições do sistema imunológico do hospedeiro sejam propícias para se instaurar uma infecção (PARK e MEHRAD, 2009; WAGER et al., 2016).

FIGURA 5: Processo de disseminação de *Cryptococcus* no hospedeiro.



FONTE: (KWON-CHUNG et al., 2014).

Uma vez inaladas, as partículas infeciosas irão se deparar primeiramente com macrófagos alveolares, que são a primeira linha de defesa, no pulmão (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2011; MANSOUR; LEVITZ, 2002). Esses macrófagos podem exercer diversas ações sobre *C. neoformans* como fagocitose, sequestro de polissacarídeos, produção de citocinas e quimiocinas, além de agirem como células apresentadoras de antígenos (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2011). Segundo alguns autores, *C. neoformans* desenvolveu mecanismos que dificultam a fagocitose, seja através da cápsula, que impede a interação de receptores fagocíticos com epítopos da parede celular (SMALL; MITCHELL, 1989;

GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2011) ou pela secreção de proteínas inibidoras de fagocitose (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2011). No entanto, observa-se que, apesar da capacidade em resistir à internalização, a quantidade de *Cryptococcu*s fagocitada é elevada, sendo que o hospedeiro supera essa evasão através da opsonização do fungo ou pela interação direta da cápsula com os receptores fagocíticos (VECCHIARELLI et al., 1994; GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA 2011).

O contato da partícula da levedura com macrófago culmina com a resposta imune, que pode levar à erradicação do patógeno ou, na grande maioria dos casos, à restrição da infecção através da formação de granulomas (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Os granulomas poderão ficar em estado de latência até que as condições imunológicas do hospedeiro sejam propícias para desenvolvimento da infecção (SABIITI; MAY, 2012). Organismos intra e extracelulares como *C. neoformans* possuem mecanismos para sobreviver a ambientes hostis como dentro de fagócitos onde o pH é extremante baixo. Alguns autores sugerem que *Cryptococcus* se replicam preferencialmente em pH mais baixo e que possuem mecanismos para prejudicar o fagolissosoma (ALVAREZ et al., 2009; GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2011; LEVITZ et al., 1999), além de produzirem melanina e antioxidantes a fim de conter moléculas reativas (GILES et al., 2006; WILLIAMSON, 1994).

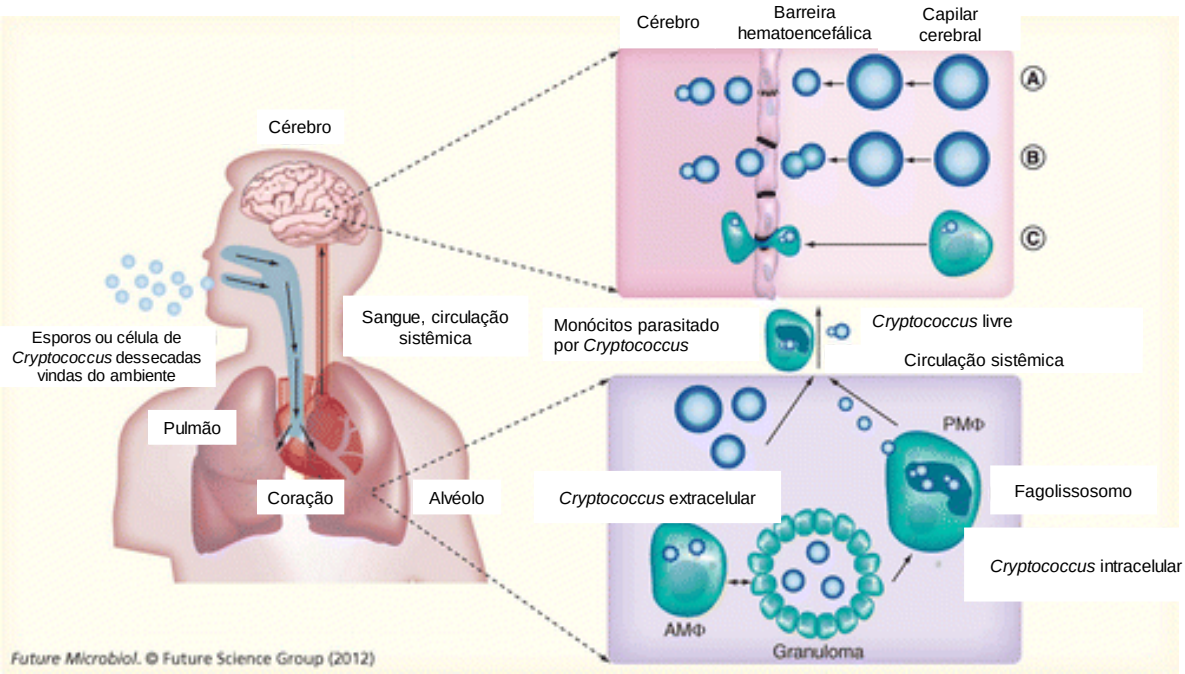
Concomitantemente a esses mecanismos, em exposição ao ambiente pulmonar, cerca de 20% das partículas da levedura podem aumentar o seu tamanho e modificar a sua morfologia para a forma titânica (OKAGAKI; NIELSEN, 2012). Acredita-se que esse aumento de tamanho confira vantagem ao micro-organismo no estágio inicial da infecção, durante sua interação com o hospedeiro, promovendo sua sobrevida, pois esse aumento dificulta a fagocitose e protege a célula da ação de fármacos e de radicais livres (ZARAGOZA et al., 2008; ZARAGOZA et al., 2010). Em contrapartida, a produção exagerada de células titânicas pode inibir a disseminação da criptococose para o SNC. Talvez seja esse o motivo de apenas uma parcela da população ser convertida a essa forma durante o processo infeccioso (OKAGAKI et al., 2010; OKAGAKI; NIELSEN, 2012).

É importante ressaltar que durante o processo de disseminação ocorrem mudanças morfológicas nas células do fungo, principalmente relacionadas à cápsula. Apesar da sua importância para sobrevivência do micro-organismo e resistência à infecção, há momentos durante o processo de disseminação em que um estado acapsular ou que apresente uma cápsula mínima é vantajoso para interação com células endoteliais, principalmente na fase hematogênica (CHANG et al., 2004; LEVITZ; DIBENEDETTO, 1989; STIE; BRUNI; FOX, 2009).

O desfecho da criptococose vai depender do estado imunológico do indivíduo infectado e do padrão de citocinas gerado em resposta ao patógeno. Caso o sistema imune do hospedeiro não consiga conter o fungo, a infecção pode causar pneumonia, se disseminar através da circulação sanguínea e atingir diversas partes do corpo, incluindo a pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, pulmões, próstata, trato urinário e SNC, provocando meningoencefalite, que em muitos casos pode levar o indivíduo a óbito (HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; KWON-CHUNG et al., 2014; LIU et al., 2012; POWDERLY, 1993; SAAG et al., 2000; SORRELL et al., 2016; VAN DER HORST et al., 1997; WAGER et al., 2016).

Após a infecção inicial nos pulmões, *Cryptococcus* se dissemina através da circulação por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Acredita-se que quando as células fagocíticas falham e não eliminam o patógeno, podem servir tanto como nicho para a replicação e proliferação fúngica como meio de transporte para alcançar a circulação sanguínea. Essa seria também uma das formas que permite ao fungo ultrapassar barreiras biológicas, como a hematoencefálica (BHE), através de um mecanismo conhecido como “cavalo de troia” (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; HANSONG et al., 2006; LIU et al., 2012).

FIGURA 6: Infecção e disseminação de *Cryptococcus*



Esporos ou a célula do fungo dessecada é inalada e coloniza os alvéolos nos pulmões. Indivíduos imunocompetentes formam granuloma pela fagocitose de *Cryptococcus* por macrófagos, podendo o fungo permanecer em estado de latência até que as condições imunológicas sejam favoráveis. Em imunocomprometidos o macrófago alveolar infectado serve de cavalo de tróia levando a disseminação na circulação sistêmica. As células de *Cryptococcus* extracelulares podem permanecer nos pulmões ou serem disseminados transcelularmente para a circulação sanguínea. Na circulação sanguínia, os *Cryptococcus* podem se associar a monócitos ou são transportados livremente para o leito capilar do cérebro. Possíveis formas de *Cryptococcus* atravessar a BHE: A) travessia paracelular entre células endoteliais, B) através da transcitose: ligação e internalização por células endoteliais microvasculares cerebrais e C) dentro de monócitos / macrófagos infectados (cavalo de Tróia).
Nota: AMΦ: macrófago alveolar; PMΦ: macrófago alveolar parasitado (CHARLIER et al., 2008; SABIITI; MAY, 2012; STIE; BRUNI; FOX, 2009; SHI et al., 2010; VELAGAPUDI et al., 2009).

A BHE é composta por células endoteliais intimamente associadas por junções apertadas e células perícitas que visam limitar a circulação e o acesso até o compartimento cerebral (CHARLIER et al., 2008). Alguns fagócitos, como monócitos podem atravessar essas barreiras de forma fisiológica, através do processo de rolamento, adesão e diapedese associado ao afrouxamento temporário das junções através de moléculas de adesão (CHARLIER et al., 2008; MASCHIO et al., 1999).

Outra forma de *Cryptococcus* ganhar a circulação sanguínea e ultrapassar a BHE seria através da forma transcelular onde o fungo atravessa diretamente os capilares endoteliais. (CHANG et al., 2004). Aternativamente, existe a forma paracelular (FIGURA 6), que ocorre após danos nas junções (SABIITI; MAY, 2012). Atravessando a BHE *Cryptococcus* está livre para infectar o SNC e causar uma das manifestações clínicas mais graves e com maior mortalidade, a meningoencefalite criptocócica (CHANG et al., 2004).

3.2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade de alguns micro-organismos se adaptarem a certas situações está associada a uma maior sobrevida em seu nicho ecológico. Essas adaptações incluem otimização de metabolismo, a condições de estresse, de interação com outros organismos e também de mudanças em sua morfologia, através do desenvolvimento de estruturas especializadas. Dentre essas estruturas podemos pontuar as cápsulas que exercem funções importantes na vida de micro-organismos, conferindo resistência a condições estressantes e um importante papel em sua interação com o meio ambiente. Apesar de ser mais frequente em bactérias, *Cryptococcus* tem nas cápsulas um dos seus principais instrumentos de virulência (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006; ZARAGOSA et al., 2010).

A cápsula de *Cryptococcus* é formada primariamente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM), que compreende 90 - 95% de seu peso e galactoxilomana (GalXM) que compõe 5 - 8% do peso. Além dos polissacarídeos, a cápsula possui proteínas que correspondem a menos de 1% do peso total (CHUN; BROWN; MADHANI, 2011). Os polissacarídeos presentes na cápsula têm ação supressora de fagocitose em diversas células imunes, incluindo macrófagos. GalXM e GXM podem induzir a apoptose através da via Fas/FasL. GalXM pode induzir a produção de óxido nítrico pelos fagócitos e existem relatos que GalXM induz produção de fator de necrose tumoral–alfa (TNF-α) e induz apoptose de células T, através da ativação da caspase-8 (PERICOLINI et al., 2006; VILLENA et al., 2008).

Outro mecanismo antifagocítico desenvolvido por *C. neoformans* relacionado à cápsula envolve a expressão de proteínas antifagocíticas como a proteína antifagocítica 1 (APP1). Essa proteína presente na superfície da cápsula pode ser secretada para o meio extracelular e se ligar no receptor da proteína CR2 e CR3 do sistema complemento (STANO et al., 2009).

Já foi demonstrado que cápsula possui a capacidade de mudar sua estrutura de acordo com a tensão no meio e durante o curso de uma infecção (CHERNIAK et al., 1995; ZARAGOZA et al., 2009). O tamanho da cápsula se encontra aumentado durante a colonização pulmonar, o qual se explica devido à alta oferta de CO_2 e baixa oferta de ferro presente no ambiente, estimulando seu crescimento (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

Estudos realizados por Zaragoza e colaboradores (2008) demonstraram que a cápsula, quando tem seu tamanho aumentado, pode diminuir o estresse oxidativo e ainda conferir resistência a peptídeos antimicrobianos e à anfotericina B.

Outro importante mecanismo que confere proteção ao fungo é a síntese de melanina, regulada pela enzima lacase. A melanina protege contra danos causados por luz UV, espécies reativas produzidas por fagócitos e contra temperaturas extremas (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). A produção de melanina tem sido relacionada à resistência a alguns fármacos, como anfotericina B (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; WANG; CASADEVALLL, 1994).

O gênero *Cryptococcus* conta ainda com um potente sistema enzimático antioxidante que protege o fungo da ação de fagócitos e também contra estresses ambientais. Esse sistema é representado principalmente pelas enzimas superóxidodismutases (SOD) representada pela SOD1 e SOD2, peroxidase de citocromo c (Ccp1) e oxidase alternativa (Aox1), que realizam papéis críticos na resistência ao estresse oxidativo (GILES et al., 2005).

Estudos onde houve deleção do gene que codifica a enzima superóxido manganês dismutase (SOD2), apontam que os micro-organismos sofreram consequências nocivas, comprometendo a viabilidade celular e sugerindo que SOD2 é um componente essencial do sistema de defesa antioxidante (GILLES et al., 2005). Uma característica necessária dos fungos patogênicos é a capacidade de crescer a 37 ° C. Segundo Giles e colaboradores (2005), o mecanismo que permite à *C. gattii* e *C. neoformans* resistir a essas temperaturas pode estar relacionado com à ação de SOD2 juntamente com outras enzimas.

Outro mecanismo que melhora a sobrevida de *C. gatttii* e *C. neoformans* é a presença de uma proteína chamada SRE1, homóloga à proteína reguladora de esteróis nos mamíferos, a qual, é ativada em baixos níveis de oxigênio e induz transcrição de genes para biossíntese de ergosterol e absorção de ferro, permitindo crescimento em um ambiente que limita os nutrientes (CHANG et al., 2007).

3.2.5 FORMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da criptococose podem se apresentar desde infestação pulmonar assintomática até uma infecção disseminada que pode atingir diversas partes do corpo (NEGRONI, 2012). Até pouco tempo atrás, acreditava-se que as manifestações clínicas nas infecções por *C. gattii* e *C. neoformans* eram muito parecidas, mas o surto no Canadá, em 1999, evidenciou que pode existir diferença entre as infecções, dependendo do agente

etiológico. Na criptococose associada a indivíduos imunocompetentes, causada principalmente por *C. gattii*, os indivíduos estão mais propensos a desenvolver criptococose pulmonar, apresentando nódulos e massas pulmonares como manifestações mais comuns (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; CHEN et al., 2000; KIERTIBURANAKUL et al., 2006; MITCHELL et al., 1995; PAPPAS, 2013; SPEED; DUNT, 1995). Já indivíduos imunocomprometidos tem uma maior taxa de infecção por *C. neoformans* (CHEN et al., 2000), apresentando acometimento extrapulmonar, com maior índice de hemoculturas positivas e menor número de células inflamatórias no líquido cefalorraquidiano, sugerindo que indivíduos com SIDA, apresentam uma carga de micro-organismo elevada e baixa resposta imunológica (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

3.2.5.1 Criptococose Pulmonar

Os pulmões - porta de entrada dos fungos, são também o sítio mais comuns de infecção. A criptococose pulmonar pode ser assintomática e sua diferenciação com as demais doenças pulmonares se dá devido à falta de resposta a medicamentos antibacterianos e antivirais, além de possuir uma evolução mais lenta (NEGRONI, 2012). A forma aguda da doença pode apresentar sintomas como febre, tosse produtiva, dor torácica e perda de peso. As apresentações radiográficas são variadas, sendo as anormalidades mais frequentes os nódulos pulmonares, únicos ou múltiplos. Achados radiográficos menos frequentes incluem derrames pleurais, linfadenopatia hilar, opacidades reticulonodulares difusas e lesões endobrônquicas resultantes da obstrução das vias aéreas com colapso pulmonar. Esses achados são semelhantes em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

Na forma crônica da doença, as manifestações podem ser semelhantes à tuberculose ou ao câncer de pulmão. Os indivíduos apresentam perda de peso, febre prolongada, anorexia, fadiga, tosse, escarro mucoso e mucopurulento (HUSTON; MODY, 2009; NEGRONI, 2012; SINGH et al., 2008). Quando diagnosticada a criptococose pulmonar é importante realizar uma hemocultura e uma punção lombar para verificar a possibilidade de disseminação, já que em indivíduos imunocomprometidos a taxa de disseminação pode chegar a 90% dos casos (NEGRONI, 2012).

Os exames laboratoriais demonstram frequentemente um aumento da taxa de sedimentação de eritrócitos, anemia, leucocitose e hipergamaglobulinemia policlonal. Também é realizada a pesquisa do antígeno capsular de *Cryptococcus* no soro, por

aglutinação de partículas de látex, que normalmente se apresenta positivo, sobretudo em indivíduos com SIDA (NEGRONI, 2012; CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; SINGH et al., 2008).

3.2.5.2 Criptococose no SNC

A doença criptocócica em seres humanos pode envolver diferentes órgãos. Apesar da via natural de infecção ser o pulmão, a manifestação clínica mais importante é a meningoencefalite, que pode apresentar evolução aguda, subaguda e crônica (FERREIRA et al., 2013; LIN; HEITMAN, 2006). Cerca de 90% dos pacientes imunocomprometidos, sobretudo os indivíduos com SIDA, desenvolvem meningoencefalite, que pode ser causada tanto por *C. gattii* quanto por *C. neoformans* (NEGRONI, 2012). Os principais sintomas incluem dor de cabeça, febre, vômito, convulsões, comprometimento da consciência, neuropatia craniana, letargia, perda de memória, sinais de irritação meníngea e coma (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

Em pacientes que não possuem SIDA a doença se apresenta de forma subaguda ou crônica, afetando os gânglios basais com formação de massa como uma meningomielorradiculite. Quando o indivíduo não apresenta imunodepressão grave o aparecimento da doença pode ser capcioso. Além dos sintomas já apresentados, podem ocorrer problemas visuais, paralisia dos nervos cranianos papiledema e coroidite (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; NEGRONI, 2012; PAPPAS, 2013).

Para diagnóstico da infecção no SNC são realizados exames citológicos no líquido cefalorraquidiano (LCR) que normalmente apresentam poucas alterações. Observa-se normalmente pouca elevação de proteínas, glicose normal, podendo haver leve pleocitose (NEGRONI, 2012). A detecção de lesões nodulares nos gânglios basais pode ser realizada através da ressonância magnética. É extremamente importante a realização rotineira desses exames em pacientes com convulsões ou paralisias, em indivíduos que apresentam hipertensão intracraniana ou quando existe suspeita de hipertensão intracraniana grave (NEGRONI, 2012; POWDERLY 1996).

O prognóstico da criptococose do SNC sem tratamento é a morte. A evolução da doença vai depender do estado imunológico do hospedeiro e da gravidade da pressão intracraniana (BAVA; ARECHAVALA; ROBLES, 1999; NEGRONI, 2012).

3.2.5.3 Criptococose Cutânea

A criptococose cutânea é uma forma clínica caracterizada por lesões na pele, podendo ser classificada como primária ou secundária. A infecção cutânea primária é caracterizada pela idenfificação de *Cryptococcus* em biópsia ou cultura proveniente de indivíduos que não apresentam doença disseminada. As lesões se apresentam principalmente como nódulos ou abscessos no local da penetração do fungo, mais raramente como linfangite e adenopatia e tem relação com traumas e atividades em áreas onde o fungo é prevalente (NEGRONI, 2012; TELLO et al., 2013). Já infecção a cutânea secundária ocorre devido à disseminação hematogênica do fungo, que ocorre em 10-20% dos índividuos infectados. A lesão inicial é geralmente uma pápula indolor podendo adquirir uma aparência acneiforme. As lesões são com frequência múltiplas e dispersas, localizadas em áreas expostas e não expostas do corpo, principalmente na cabeça e no pescoço (NEGRONI, 2012; TELLO et al., 2013).

3.2.5.4 Outras manifestações clínicas

A criptococose pode atingir qualquer parte do corpo através do processo de disseminação hematogênica, sendo conhecidas ocorrências urogenitais, lesões oculares (frequentes em pacientes com infecção de meninges) e lesões ósseas – que ocorrem em menos de 10% das formas disseminadas de criptococoses (NEGRONI, 2012; TELLO et al., 2013).

3.2.6 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O tratamento da criptococose está intimamente relacionado com a condição geral do paciente e suas manifestações clínicas (OLIVEIRA et al., 2014; PEREA; PATERSON, 2002). Atualmente um pequeno número de fármacos está disponível para tratamento da doença, com diferentes mecanismos e espectros de ação. Os mais utilizados são a anfotericina B, os antifúngicos azólicos e a flucitosina (PERFECT et al., 2010).

Estudos demonstram que a taxa de efetividade do tratamento com anfotericina B e com fármacos azólicos está entre 50 a 80%. Mesmo com o tratamento ainda existe uma prevalência elevada de óbitos de cerca de 20% (BENNETT et al., 1979; BRATTON et al., 2013; DROMER et al., 1996; VAN DER HORST et al., 1997).

A maioria dos antifúngicos disponíveis no mercado e na clínica tem relação com a biossíntese do ergosterol, o principal esterol das membranas celulares fúngicas, com estrutura análoga a do colesterol presente em mamíferos (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

A anfotericina B, um dos principais fármacos do tratamento da criptococose, apresenta ação primária baseada na alteração da permeabilidade celular da membrana fúngica. O fármaco se liga ao ergosterol, formando poros e ocasionando danos à membrana (FERREIRA et al., 2013). Além disso, anfotericina B causa danos oxidativos às membranas plasmáticas (LOEFFLER; STEVENS, 2003). O mecanismo de ação, apesar de efetivo, está associado aos efeitos tóxicos do fármaco, pois além de se ligar ao ergosterol do fungo ele se liga também aos esteróis da membrana plasmática humana, como o colesterol, levando o fármaco à apresentar diversos efeitos adversos como comprometimento da filtração glomerular e da função hepática, hipocalemia e hipomagnesemia, anemia, trombocitopenia, reações anafiláticas e neurotoxicidade (FERREIRA et al., 2013; LUPETTI et al., 2002; ODDS; BROWN; GOW, 2003; OLIVEIRA et al., 2014; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

Os azólicos são fármacos fungistáticos e tem ação na biossíntese de esteróis pela inibição da enzima esterol 14-α-desmetilase, resultando na depleção de ergosterol e no acúmulo de esteróis metilados tóxicos (FERREIRA et al., 2013; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). Ao contrário da anfotericina B, são bem tolerados e menos tóxicos, mas devido a constância na qual pacientes com SIDA utilizam esses fármacos para tratar infecções oportunistas, diversos fungos desenvolveram mecanismos de resistência, inclusive *Cryptococcus* (LUPETTI et al., 2002; HORSBURGH; KIRKPATRICK, 1983).

A flucitosina é outro importante fármaco utilizado no tratamento da criptococose. Seu mecanismo de ação consiste na conversão de flucitosina em fluorouracila dentro das células alvo. Dessa maneira o fármaco é incorporado ao RNA em formação, causando o término prematuro da cadeia e inibindo a síntese do DNA através da ação inibitória sobre a timidilato sintase (ODDS; BROWN; GOW, 2003). A flucitosina foi removida da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), em 2006, devido ao desenvolvimento rápido de resistência em monoterapia e à elevada incidência de efeitos colaterais (LIMA, 2014). Apesar de não ser utilizada no Brasil, o fármaco é amplamente utilizado em vários países por apresentar bons resultados em associação com a anfotericina B (LOYSE et al., 2013).

3.2.6.1 Mecanismos de resistência a fármacos antifúngicos

Resistência microbiana é o termo utilizado para descrever um fenômeno onde o antimicrobiano não consegue exercer sua ação sobre o micro-organismo (LOEFFLER; STEVENS, 2003). A resistência pode ser primária - quando o patógeno nunca foi exposto aquele medicamento, ou secundária - quando há exposição prévia ao fármaco. O surgimento de resistência tornou-se mais relevante quando as infecções oportunistas associadas a indivíduos imunocomprometidos emergiram, trazendo grande preocupação devidos à escassez de opções de tratamento, podendo se transformar em um sério problema (CANUTO; RODERO, 2002; LOEFFLER; STEVENS, 2003; LUPETTI et al., 2002).

A resistência secundária aos poliênicos, representados pela anfotericina B, já vem sendo descrita desde a década de 1980 (POWDERLY et al., 1988). O mecanismo exato da resistência não é conhecido, mas acredita-se que ocorra devido a uma significativa alteração da composição lipídica na membrana plasmática. Alguns trabalhos citam, por exemplo, uma diminuição da quantidade de ergosterol por falta de uma das enzimas responsáveis por converter o lanosterol em ergosterol, a $\Delta^{8,7}$ isomerase (KELLY et al., 1994; LUPETTI et al., 2002), diminuindo a interação entre o fármaco e a membrana plasmática, provavelmente devido à falta de sítio de ligação (HITCHCOCK et al., 1987; JOSEPH-HORNE et al., 1995; LOEFFLER; STEVENS, 2003).

Outro possível mecanismo de resistência dos poliênicos pode estar associado à alteração de β-1,3-glucanos na parede celular de fungos, levando a um aumento da estabilidade da parede celular, podendo influenciar a interação e ligação do fármaco à membrana plasmática do micro-organismo (GALE, 1986; LOEFFLER; STEVENS, 2003).

Dentre as classes de antifúngicos que apresentam resistência, a de maior relevância médica é a dos azólicos, sendo frequentemente descrita principalmente por indivíduos com SIDA. Atualmente se sabe que a resistência a azólicos se dá principalmente pela diminuição da concentração intracelular devido a pouca quantidade de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na membrana plasmática, mudando o perfil de barreira de membrana e dificultando a penetração do fármaco (LUPETI et al., 2002).

Outro mecanismo frequente está associado à alteração na enzima lanosterol 14α-demetilase codificada pelo gene *ERG11*, pois estudos demonstram que mutações nesse gene levam a alterações na ação dessa enzima e essa seria um dos mecanismos fúngicos de resistência aos fármacos azólicos (WHITE, 1997).

A superexpressão da enzima lanosterol 14-α-demetilase - alvo de ação dos azólicos, pode ser outro mecanismo de resistência ao fluconazol e ao itraconazol, já observado em uma linhagem de *C. glabrata*. O acúmulo da enzima pode resultar no aumento da biossíntese de ergosterol, prejudicando a ação de fármacos que agem nesse local (BOSSCHE et al., 1992).

A alteração do efeito do fármaco é outro mecanismo de resistência dos azólicos. Alguns estudos demonstraram que linhagens de *C. albicans* apresentaram uma quantidade até 17 vezes maior de mRNA que codifica CDR1 e de proteínas transportadoras *ATP Binding Cassette*, responsáveis pela redução do conteúdo de fluconazol dentro da célula fúngica (ALBERTSON et al., 1996).

Existem relatos de resistência à flucitosina por parte de algumas espécies de fungos, como *C. albicans*. Estudos sugerem que esses micro-organismos produzem variantes moleculares de enzimas responsáveis pela conversão de flucitosina à fluorouracila. No Brasil a flucitocina nao é usada devido ao rápido desenvolvimento de resistência principalmente quando usada em monoterapia (LUPETTI et al., 2002; FASOLI et al., 1990).

A principal abordagem para superar a resistência aos antifúngicos e melhorar estratégias terapêuticas atuais seria a descoberta de novos fármacos que possam proporcionar uma melhor atividade antifúngica e perfil farmacocinético (CANUTO; RODERO, 2002).

Com o aumento da incidência de infecções fúngicas tornou-se extremamente necessária uma nova geração de agentes antifúngicos. A maioria dos fármacos disponíveis apresenta efeitos tóxicos, além de ineficácia frente a fungos novos ou emergentes, além do rápido desenvolvimento da resistência (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

Apesar da evidente necessidade, a única classe de antifúngicos desenvolvida nas últimas décadas é a das equinocandinas (Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina, Aminocandina etc). No entanto, tais fármacos não possuem atividade antifúngica satisfatória frente a *Cryptococcus* (DENNING, 2003; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

A dificuldade no desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos tem relação com algumas similaridades entre os patógenos e hospedeiros, ambos eucariontes, que por compartilharem uma relação evolutiva próxima, tornam complexa a obtenção de agentes seletivos e isentos de toxicidade (SHAPIRO; ROBINS; COWEN, 2011).

Diante do apresentado, é evidente a importância da descoberta de novos fármacos para tratamento de infecções fúngicas. Nesse contexto, extratos vegetais apresentam-se como alternativas de sucesso na descoberta de novos fármacos utilizados no tratamento de tais tipos de infecções (BAKKALI et al., 2008; KUMARI et al., 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *X. ciliatifolia* foram coletadas no município de Governador Valadares, MG e identificadas pelo botânico Prof. Dr. Vinícius Antonio de Oliveira Dittrich (UFJF, Juiz de Fora, MG). Exsicatas foram confeccionadas e depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O material vegetal foi submetido a secagem em estufa de ar circulante e posteriormente triturado em moinho de facas. As folhas secas e pulverizadas foram submetidas à extração com etanol 96ºGL, por 5 dias. Após extração exaustiva o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob temperatura inferior a 60 ºC e pressão reduzida, para obtenção do extrato etanólico.

4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato etanólico foi dissolvido em água e submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Para tanto foram empregados *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob temperatura inferior a 60 ºC e pressão reduzida, para obtenção das frações correspondentes.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA.

A caracterização dos compostos majortitários da fração mais ativa foi realizada em parceria com a Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte, MG. A fração mais ativa, selecionada após triagem de atividade antifúngica conforme descrito a seguir, foi avaliada usando um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com os detectores de ionização por eletrospray (ESI) e arranjo de fotodiodos (DAD). O volume injetado da amostra foi de 5 µL por corrida. A análise teve duração de 27 min e *post time* de 2 min. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de *m/z* 0 a 1750 para cada um dos constituintes registrados nas análises cromatográficas no modo ESI (positivo/negativo). Os espectros de UV foram obtidos na faixa de 190 a 400 nm para cada um dos constituintes registrados nas análises

cromatográficas no modo DAD no comprimento de onda de 280nm. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (STUKER, 2012).

As eluições em gradiente foram realizadas sob um fluxo de 0,6 mL/min da fase móvel composta pela mistura de dois solventes, sendo um água ultrapura 100% (A) e o outro metanol 100% (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. As condições da eluição foram as seguintes: uma mistura de 85% solvente A e 15% solvente B nos primeiros 25 minutos; 5% solvente A e 95% de solvente B até 26,7 min; e 85% solvente A e 15% de solvente B até 27 min, o tempo final da corrida cromatográfica. A fase estacionária utilizada foi em coluna Rapid Resolution HD (2,1 x 50 mm x 1,8 µm) a temperatura da coluna a 40 ºC.

4.5 LINHAGENS DE *C. gatti* E *C. neoformans* UTILIZADAS E DESENHO DO ESTUDO

Para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de *X. ciliatifolia* frente a *Cryptococcus* foram utilizadas 12 linhagens de *C. gattii* e 10 linhagens de *C. neoformans* (TABELA 1). Todas as linhagens utilizadas pertencem à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia da UFMG e foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Microbiologia da UFJF/GV. Foi realizada primeiramente uma triagem onde foram testados o extrato etanólico (EEXC) e todas as frações de *X. ciliatifolia* frente às linhagens 23\10993 e 547\OTTI\94-PI-10 de *C. gattii* e ATCC 24067 e 96806, de *C. neoformans.* A fração acetato de etila (FAXC) apresentou melhor atividade e foi então utilizada nos demais testes. Para realizar os ensaios de CIM e ação fungicida/fungistática foi utilizada FAXC e EEXC, frente às linhagens apresentadas (TABELA 1). Para os demais ensaios foram utilizadas duas linhagens de *C. gatti*: ATCC 32608 e linhagem clínica L2701 e 2 linhagens de *C. neoformans*: ATCC 28957 e linhagem clínica H99.

TABELA 1: Linhagens de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans.*

C. gattii	***C. neoformans***
L28/02 (C)	LMM 820 (C)
23/10993 (C)	5396 (C)
196L/03(C)	96806 (C)
1913ER (C)	27JF (C)
L2701 (C)	H99 (C)
LMM818 (C)	WP (C)
29/10893 (C)	C-3-1 (A)
L2401 (C)	ATCC 28957
L 135/03 (C)	ATCC 24067
547/ OTTI/94-PI-10 (A)	ATCC 62066
ATCC 24065	
ATCC 32608	

Nota: C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection.

4.6 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios estão listados na Tabela 2.

TABELA 2: Reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios

Reagente/Meio de Cultura	**Marca**	**Equipamento**	**Modelo/Marca**
Ergosterol	Sigma–Aldrich®		
Diclormetano	Synth®	Centrífuga	Kasvi K14-1215
Anfotericina B	Sigma-Aldrich®	Centrífuga	modelo TJ-6, Beckman Instruments
Ácido tiobarbitúrico	Sigma-Aldrich®	Citômetro de fluxo	BD Accuri ™
Ácido clorídrico	Fluka®	Espectrofotômetro	Modelo 850Mi marca Analyser.
Ágar Sabouraud Dextrose	Himedia®	Fluorímetro	Luminescente Synergy 2, Biotek
Diacetato de 2´,7´-diclorofluorescina	Invitrogen®	HPLC	Agilent Infinity 1290
Acetato de etila	Synth®	Leitor tipo ELISA	Biochrom Asys Expert Plus
Ácido fosfórico	Merck®	Microcalorímetro	VP-ITC, Microcal LCC
Dimetilsulfóxido	Nuclear®	Microscópio óptico	Axioplan, Carl Zeiss
Butanol	Synth®	Potencial Zeta	Malvern Zetasizer Nano ZS
Caldo Sabouraund dextrose	Difco®	Vórtex	Modelo AP59 marca Phoenix Luferco
Fluconazol	Sigma-Aldrich®		
Hidróxido de potássio	Dinâmica®		
Hidróxido de sódio	Dinâmica®		
Hidroxitolueno butilado (BHT)	Synth®		
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich®		
MOPS			
MTT	Sigma-Aldrich®		
n- Hexano	Synth®		
n-heptano	Synth®		
Peróxido de hidrogênio	Alphatec®		
Rodamina	Sigma-Aldrich®		
RPMI – 1640	Sigma–Aldrich ®		
RPMI 1640 completo	Sigma-Aldrich®		
Sorbitol	Vetec®		
Zorbax Eclipse Plus	Agilent		

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e das frações de *X. ciliatifolia* foram avaliadas frente a linhagens de *C. gattii*, e *C. neoformans*, conforme proposto pelo documento M27-A3 do "*Clinical and Laboratory Standards Institute",* com modificações. (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas dos fungos e incubados a 35°C, por 48 h em tubos inclinados contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). A suspensão

fúngica foi preparada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. As suspensões foram homogeneizadas em vórtex, lidas no espectrofotômetro a 530 nm e ajustadas à transmitância de 77%, que corresponde à concentração de $1x10^6$ a $5x10^6$ UFC/mL. Em seguida, as amostras foram diluídas em RPMI – 1640 de modo a alcançar a concentração de $1x10^3$ a $5x10^3$ UFC/mL) (CLSI, 2008).

Para avaliar o CIM dos extratos e frações de *X. ciliatifolia*, uma solução inicial de cada amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em meio RPMI de modo a alcançar a concentração de 10 mg/mL. Em seguida foram feitas diluições seriadas de modo que as concentrações das amostras variassem de 128 mg/L a 0,25 mg/L. Posteriormente, alíquotas de 100 μL de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 orifícios. Para o controle de toxicidade do solvente foi utilizado o meio RPMI acrescido de DMSO, na concentração correspondente a cada experimento.

Para o CIM de fluconazol foi obtida uma solução inicial de concentração 1000 mg/L, solubilizada em água e dissolvida em RPMI. Posteriormente foram feitas diluições seriadas de modo que a concentração variasse de 128 mg/L a 0,25 mg/L. Em seguida alíquotas de 100 μL de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 orifícios.

Para o CIM de anfotericina B foi obtida uma solução inicial de concentração 500 mg/L solubilizada em água e dissolvida em RPMI. Posteriormente foram feitas diluições seriadas de modo que as concentrações das amostras variassem de 8 mg/L a 0,0015 mg/L. Em seguida alíquotas de 100 μL de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 orifícios. Como controle de crescimento e de esterilidade de todas as amostras, foi utilizado o meio RPMI.

A cada orifício teste e de controle de crescimento foram acrescentados 100 μL de inóculo fúngico. As placas foram incubadas por 72 horas, a 35°C. A leitura foi realizada visualmente (CLSI, 2008). A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico, exceto para o fluconazol, em que a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu 50% do crescimento. Os resultados foram expressos em mg/L e o experimento foi realizado em triplicata.

4.8 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGICIDA/FUNGISTÁTICA

As leveduras foram avaliadas quanto à ação fungicida ou fungistática. Alíquotas de 100 μL foram removidas dos orifícios nos quais não foi detectado crescimento visível na

CIM, subcultivadas em ASD e incubadas a 35°C. As amostras foram semeadas em placas de Petri em triplicata. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração das frações em que nenhuma colônia for observada após 72 horas de incubação (OBANDO et al., 2009).

4.9 INTERAÇÃO *IN VITRO* DA FRAÇÃO FAXC COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL

A fração FAXC de *X. ciliatifolia* foi avaliada quanto à atividade em combinação com o fluconazol e anfotericina B. Dez diluições seriadas da fração e sete diluições dos fármacos foram preparadas utilizando os mesmos solventes do teste da CIM. Alíquotas de 50 µL de cada diluição das amostras foram adicionadas aos orifícios de uma placa de 96 orifícios, na orientação horizontal e alíquotas de 50 µL da diluição de cada um dos fármacos foram adicionadas em orientação vertical, de modo que a placa contivesse várias combinações de concentrações das amostras (ODDS, 2003).

Em seguida cada poço foi inoculado com 100µL do inóculo preparado conforme descrito no teste de CIM e as placas incubadas a 35°C, por 72 horas. A leitura foi realizada visualmente. A interação das amostras com o agente antifúngico foi expressa como a soma do índice da concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente. A CIF de cada agente é calculada como a CIM desse agente em combinação, dividido pela CIM do agente sozinho. O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) será calculado pela soma dos CIFs:

$$ICIF = CIFA + CIFB = \frac{C_A^{comb}}{CIM_A^{individual}} + \frac{C_B^{comb}}{CIM_B^{individual}}$$

Onde $CIM_A^{individual}$ e $CIMB^{individual}$ são as CIMs das amostras A e B quando agindo sozinhas e C_A^{comb} e C_B^{comb} referem-se às combinações. O ICIF pode ser interpretado como sinérgico quando for ≤0,5; sem interação quando 0,5 < ICIF < 4,0 e como antagonista quando > 4,0 (SANTOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

4.10 CURVA DE MORTE

As culturas com as linhagens ATCC 32062 e ATCC 28957 foram subcultivadas em tubos contendo ASD por 48 h e o inóculo foi obtido conforme descrito no experimento CIM.

Os testes foram preparados em placas de microdiluição de 96 orifícios contendo concentrações variadas de FAXC em que foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico. Para cada experimento, foi realizado um controle negativo constituído de 200 µL de meio RPMI e um controle positivo constituído de 100 µL de inóculo e 100 µL de meio RPMI. As placas foram incubadas a 35 °C, por 72 horas e durante este período foram realizadas leituras em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Nos intervalos pré-determinados, foram removidas alíquotas de 100 µL de cada poço e feito o plaqueamento em placas de Petri contendo meio ASD e incubadas a 35°C, por 72 horas. Após o período de incubação, as colônias foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) e foi elaborada a curva de morte em função do número de UFC recuperadas ao longo do tempo (SANTOS et al., 2012). Todos os testes foram realizados em duplicatas.

4.11 INTERAÇÃO DE FAXC COM SORBITOL

Para determinar se a fração FAXC interfere com a integridade da parede celular fúngica foi realizado o teste de proteção utilizando sorbitol (CARRASCO et al., 2012). Para isso, foi determinada a CIM da fração na presença do sorbitol, utilizando placas de microdiluição de 96 orifícios, de maneira semelhante ao descrito no tópico 4.7.

Em cada orifício da placa, foram adicionados 50 µL do meio líquido RPMI com sorbitol previamente adicionado. Posteriormente, foi adicionado 50 µL da solução de FAXC preparada conforme a descrição no tópico 4.7 e dispensados nas colunas da placa em concentrações que variaram de 16 mg/L até 0,003 mg/L obtidas através de diluição seriada. O sorbitol foi utilizado a uma concentração final de 0,8 M em cada poço. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo dos fungos em todos os orifícios, exceto controle de esterilidade. Foi realizado um controle de crescimento, adicionando 100 µL do inóculo fúngico e mais 100 µL de meio RPMI e sorbitol (0,8 M). Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do RPMI em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram incubadas a 35°C por até 7 dias para realização da leitura visual. Todos os testes foram realizados em duplicata para cada linhagem.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

Os esteroides intracelulares totais foram extraídos a fim de avaliar a síntese de ergosterol, componente da parede celular fúngica, conforme descrito por Breivik e Owades

em 1957, com pequenas modificações. *C. neoformans* e *C. gattii* foram plaqueados em ASD e levados a estufa 35º C por 48 horas, após esse período uma colônia isolada proveniente dessa cultura foi inoculada em 50 mL de caldo Sabouraund dextrose. Paralelamente foram preparadas soluções com a concentração de FAXC equivalente ao CIM e 2 x o CIM das linhagens testadas, além de preparar um controle positivo com um conhecido inibidor da síntese de ergosterol, o fluconazol a 64 mg/L. O caldo Sabouraund dextrose contendo o inóculo foi suplementado com as referidas concentrações de FAXC ou fluconazol e essas culturas foram levadas a estufa por 16 horas, a 35 ºC. Um controle de crescimento sem tratamento também foi realizado. As células de fase estacionária foram colhidas por centrifugação a 2.700 rpm durante 5 min e lavadas com água destilada estéril. O peso líquido úmido do pellet foi determinado. Na sequência foi adicionado 3 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 25% a cada pellet e estas foram levadas ao vórtex por 1 minuto. As suspensões de células foram transferidas para tubos falcon estéreis e incubadas em banho maria, a 85 °C, durante 1 h. Após a incubação, os esteroides foram extraídos por adição de uma mistura de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de n-heptano seguido de homogeneização vigorosa no vórtex durante 3 minutos. A fase orgânica foi retirada para leitura em espectrofotômetro em 232 e 200 nm. A curva de calibração com ergosterol padronizado foi construída e usada para calcular a quantidade de ergosterol (OLSSON; RUNDQUIST; BRUNK, 1987; SANTOS et al., 2012). Em todos os casos (ergosterol presente nos fungos ou no padrão) a absorbância foi o resultado da subtração da absorbância obtida em 282 nm e absorbância obtida em 232 nm. O ergosterol e o 24(28) dihidroergosterol (DHE), um intermediário da via da biossíntese de ergosterol, juntos absorvem energia em 282nm, enquanto somente o DHE mostra intensa absorção em 232nm. Os resultados foram expressos em mg /L*g^{-1} e o peso respresenta o significado de três experimentos independentes.

4.13 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO E PRN

A mensuração da produção de EROs (Espécies reativas de oxigênio) e PRN (peroxinitrito) foi realizada em parceria com o Laboratório de Microbiologia da UFMG. Quantidades endógenas de EROs e PRNs foram mensuradas utilizando o ensaio fluorométrico com sondas específicas (FERREIRA et al., 2013). As células dos fungos *C. gattii* e *C. neoformans* cultivadas em ASD (35° C durante 72 h), foram tratadas com FAXC ou peróxido de hidrogênio (controle positivo), durante 1 h e 24 h em RPMI sem vermelho de fenol. Incubou-se com a 10 μM de diacetato de 2´,7´-diclorofluorescina para quantificação de ERO e

10 μM dihidrorodamina para quantificação de PRN (sonda fluorescente). Também foi realizado um controle de crescimento com os fungos sem o tratamento FAXC. A fluorescência foi medida com um Fluorímetro usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 500 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência ± SEM. Os testes foram realizados em triplicata.

4.14 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As células de *C. gattii* e *C. neoformans* foram tratadas com a fração FAXC de maneira semelhante ao ensaio de quantificação de ergosterol (item 4.11), nas mesmas concentrações, exceto o controle positivo que nesse ensaio foi o peróxido de hidrogênio a 5%. Os produtos da peroxidação lipídica foram medidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (FERREIRA et al., 2013). O sedimento foi homogeneizado com 1000 μL em ácido fosfórico a 1,1% gelado. Foram misturados 400 μL do homogenato com 400 μL de ácido tiobarbitúrico a 1% preparado em 50 mM de hidróxido de sódio contendo 0,1 mM de hidroxitolueno butilado e 200 μL de ácido fosfórico a 7% (todas as soluções foram mantidas em gelo durante a manipulação). Posteriormente, as amostras (pH 1,5) foram aquecidas durante 60 minutos a 98 ° C e adicionados 1500 μL de butanol. A mistura foi homogenizada vigorosamente utilizando vórtex e centrifugada durante 5 min a 2000 rpm. Separou-se a camada orgânica que foi medida em um leitor tipo ELISA. A solução de ácido tiobarbitúrico foi substituída por ácido clorídrico 3 mM nos controles. Os resultados foram expressos em mg/L*g-1, representando três experimentos independentes.

4.15 MENSURAÇÃO DA ESTABILIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

O ensaio de mensuração da estabilidade do potencial de membrana mitocondrial foi realizado em parceria com o Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA no Maranhão. O ensaio de citometria de fluxo empregou a sonda fluorescente rodamina (Rho) (RONOT et al., 1986) para determinação do potencial da membrana mitocondrial. As células de cada linhagem foram ressuspensa a uma densidade de 1 x 10^6 células/mL em 500 μL em meio RPMI suplementado com MOPS. Adicionou-se FAXC na concentração de 1 x CIM, e as células foram incubadas durante 12 h, a 37 ° C. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão PBS (pH 7,2) sob centrifugação a 6000 rpm durante 10 min. Após a

lavagem, o pellet de células foi ressuspenso em PBS (500 µL) e marcadas com Rho (10 µg/mL no escuro durante 10 min). Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS. As células foram ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo. Um total de 10.000 eventos foram analisados para cada amostra. As alterações na intensidade fluorescente de Rho foram quantificadas utilizando o índice de variação (IV) obtido pela equação (MT-MC)/MC, onde MC é a média de intensidade fluorescente de controle e MT a média das células tratadas. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência (IF).

4.16 MEDIDAS DE DIÂMETRO CELULAR, TAMANHO DA CÁPSULA

As células de leveduras foram cultivadas em meio ASD suplementado com 0,5 x CIM de FAXC e levados a estufa 35º por 48 h. Após esse período as colônias foram suspensas em tinta da Índia e posteriormente visualizadas com um microscópio óptico. O tamanho total da célula foi definido como o diâmetro da célula completa, incluindo a cápsula. Para obter o tamanho da cápsula foi subtraído o tamanho total da célula pelo diâmetro do corpo da célula. A cápsula e o diâmetro de pelo menos 100 células foram medidos usando o software ImageJ 1.40 g (http://rsb.info.nih.gov/ij/; National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD) (ARAUJO et al., 2012). As medidas finais foram apresentadas como proporção do tamanho da cápsula em relação ao diâmetro celular e a relação superfície/volume foi calculada usando a fórmula 3/ r , onde r é o raio (FERREIRA et al., 2015).

4.17 POTENCIAL ZETA

Para avaliar o potencial Zeta (PZ) de FAXC sobre a superfície celular das leveduras foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. Para a realização do teste foram repicadas linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* em placas de Petri suplementadas com 0,5 x CIM de FAXC diluído em ASD (ALVES et al., 2017). Os inóculos foram diluídos em 2 mL de solução salina estéril, na escala 0,5 Mac Farland. O PZ foi determinado pela técnica de micro-eletroforese laser Doppler, em ângulo de dispersão de 173º, usando um capilar dobrado de célula celular (DPS1060). Os valores de PZ foram calculados como a média de dez

medidas independentes, cada uma obtida pela média de 50 contagens (NOSANCHUK et al., 1999).

4.18 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Os ensaios de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados usando um microcalorímetro a 25°C, após a calibração elétrica e química prévia. Todas as soluções empregadas no experimento foram previamente utilizadas sob vácuo (140 mbar) durante 8 min. Cada experimento de titulação consistiu em 51 injeções sucessivas de 5 μL de FAXC a 10 mg/mL em uma câmara contendo 1,5 mL de suspensão fúngica contendo *C. neoformans* ou suspensão de *C. gattii* a $1x10^6$ UFC/mL. A primeira injeção de 1 mL foi descartada para eliminar os efeitos de difusão do material da seringa para a câmara calorimétrica. O tempo de injeção foi de 2 segundos e o intervalo entre as injeções foi de 240 segundos (ABRAHAM et al., 2005, RAUDINO; SARPIETRO; PANNUZZO, 2011).

4.19 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZÓLIO (MTT)

4.19.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora e teve aprovação dia 10 de julho de 2017 (número do parecer: 2.215.172 em anexo). Os voluntários que doaram o sangue periférico assinaram um consentimento informado por escrito no momento da doação. A população do estudo foi composta por 4 indivíduos adultos pertencentes à comunidade acadêmica da UFJF/GV, com idade entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos, que não fazem uso contínuo de medicamentos. Foram excluídos do processo os indivíduos que recusassem participação, menores de 18 anos e maiores de 50 anos de idade, bem como fumantes, consumidores frequentes de álcool, portadores de doenças crônicas e pessoas que utilizaram medicamentos 48 h antes da coleta de sangue.

Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico, foi realizada uma coleta de aproximadamente 8 mL de sangue periférico de cada voluntário, por punção venosa, utilizando seringas descartáveis e estéreis. Após a coleta, o sangue foi imediatamente transferido para tubo de coleta heparinizado e gentilmente homogeneizado. Desta amostra de sangue, 5 mL foram transferidos para tubo cônico contendo 5 mL de Histopaque-1077. O

material foi centrifugado e após a centrifugação houve a separação dos componentes sanguíneos e então foi coletado o anel de células mononucleadas. A este anel foi adicionado 3 mL de meio RPMI completo, composto por RPMI-1640, glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 24 mM, HEPES 20 mM, 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (10000 U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de estreptomicina). As células mononucleadas foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico (SARMA et al., 2007).

4.19.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), foi utilizado para determinação da viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humanas. Em uma placa de 96 orifícios foi adicionado 100 µL de suspensão celular de células mononucleares do sangue na densidade de 1x 10^6 células/mL. Após 24 h de incubação, a 37º C, em estufa de CO_2, foram adicionados mais 100 µl de diferentes concentrações de FAXC que partiram de 512 µg/mL até 4 µg/mL dissolvidas em meio RPMI. As placas foram incubadas em estufa de CO_2, a 37º C, por mais 24h. Foi realizado um controle negativo - sem tratamento com FAXC, apenas as células e o meio RPMI e um controle positivo – onde as células foram tratadas com uma solução 250 mM de peróxido de hidrogênio. Após esse período, 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado a todas as cavidades da placa, sendo esta incubada por 4 h. Após o período de incubação, o meio + MTT foi cuidadosamente removido de todas as cavidades, e adicionados 100 µL de DMSO, para solubilização da formazana. As placas foram suavemente agitadas, a temperatura ambiente, por 5-10 min, e lidas a 570 nm em leitor tipo ELISA. Os resultados foram gerados a partir de quatro experimentos independentes. Para as análises dos dados, foi realizada a subtração do valor de absorção do controle em branco de todos os outros valores. Após isso os valores foram transformados em porcentagem de viabilidade de acordo com o controle. Esses dados foram então inseridos no software GraphPad Prism version 7.0. onde foram construídos os gráficos. A interpretação dos resultados foi feita por comparação entre os valores de absorbância obtidos nos orifícios tratados com FAXC e os obtidos no controle sem tratamento.

4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism version 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O tipo de análise estatística foi determinado após a avaliação da normalidade dos dados. Para as amostras com distribuição normal foi utilizado o Teste T e ANOVA e Mann Whitney e Kruskall-Wallis para os com distribuição não normal. Para as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p>0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

A partir de 340,0 g de folhas secas de *X. ciliatifolia*, foram obtidos 68,2g do extrato etanólico, o que equivale a um rendimento de extração 20,06%. O extrato etanólico, após ressuspensão em solução hidroalcóolica, foi particionado com solventes de polaridade crescente, dando origem às frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, respectivamente (TABELA 3).

TABELA 3: Rendimento das frações obtido a partir do extrato etanólico de *X. ciliatifolia*.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	13,96	20,46
Diclorometano	2,925	4,28
Acetato de Etila	8,194	12,01
Butanol	5,989	8,78
Aquosa	0,8438	1,23

5.2 DETERMINAÇÃO DA CIM DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES *X. ciliatifolia*

A CIM de *X. ciliatifolia* frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* foram determinadas por teste de microdiluição em placa de 96 orifícios, como proposto pela CLSI (2008). A princípio foi realizada uma triagem onde foram testadas todas as frações de *X. ciliatifolia* (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquosa) e o extrato etanólico frente a duas linhagens de *C. gattii* (23/10993; 547/OTTI/94-PI-10) e duas de *C. neoformans* (ATCC 24067; 96806). Diante dos resultados observados (TABELA 4) optou-se por utilizar a fração acetato de etila (FAXC) na sequência do estudo pois além de apresentar resultados promissores, obteve-se um rendimento relativamente maior para FAXC, além de se tratar de uma fração com polaridade intermediária, característica que facilita o estudo fitoquímico. Dessa maneira, FAXC foi testada, juntamente com o extrato etanólico, frente a 22 linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* (TABELA 1) e os resultados estão expressos na Tabela 5.

As concentrações de FAXC que inibiram o crescimento de ambas as espécies de *Cryptococcus* variaram de 16 mg/L a 0,5 mg/L. A CIM observada para FAXC apresentou concentrações semelhantes e em algumas linhagens até menores que o fluconazol, um dos principais fármacos utilizados na terapia de criptococose. De acordo com Rios e Recio (2005), extratos com CIMs inferiores a 100 mg/L podem ser considerados fontes promissoras de substâncias com atividade antimicrobiana, abrindo novas possibilidade para a descoberta de moléculas ativas para o tratamento de infecções fúngicas.

Como já descrito anteriormente, o esquema terapêutico para tratamento de criptococose é bem limitado, tendo como representantes principais a anfotericina B e fármacos azólicos, como o fluconazol. Outro obstáculo na terapia da criptococose tem relação com a toxicidade, principalmente da anfotericina B como já citado anteriormente. Afim de diminuir esses efeitos tóxicos, a anfotericina B foi encapsulada com lipossomas e complexada com lipídios, mas essas preparações são substancialmente caras e não possuem os mesmos efeitos da anfotericina B pura (GRUSZECKI et al., 2003; BLAU; FAUSER, 2000; OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, o aumento do surgimento de resistência a antifúngicos trouxe a necessidade do descobrimento de novos agentes fungicidas.

Nessas perspectivas, há uma demanda crescente de agentes antifúngicos novos e eficazes, justificando a busca intensa de novos medicamentos de várias fontes, incluindo produtos naturais. As plantas medicinais contêm diversidade de constituintes que servem para protegê-las contra agentes patogênicos. Sabe-se que metabólitos de produtos naturais têm

importância histórica no tratamento de várias doenças e muitos serviram como protótipo para o desenvolvimento de um elevado número de fármacos utilizados atualmente (NJANJE et al., 2017).

Na literatura os relatos sobre *X. ciliatifolia* de forma geral são escassos Philipssen e colaboladores (2013) realizaram estudo químico das cascas e raízes de *X. ciliatifolia* e testaram atividade biológica frente a algumas bactérias, mas o estudo nas folhas frente a espécies de *Cryptococcus* é inédito.

Diversos trabalhos propõem o uso de produtos naturais como alternativa para o tratamento de doenças, inclusive à criptococose. Oliveira e colaboradores (2014) testaram a atividade do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* frente a amostras clínicas de algumas leveduras oportunistas como *Cryptococcus* e encontraram CIM de 102 mg/L. Outro estudo que testou atividade frente a *Cryptococcus* foi o de Cáceres e colaboradores (2012), utilizando o extrato etanólico de *Smilax domingensis*, que apresentou uma CIM de 500 mg/L. Em trabalho realizado por Mozaddik e colaboradores (2004), *X. terrae-reginae* e *Xylosma sp.* apresentaram atividade antifúngica frente a algumas espécies de *Candida*, com CIM menor que 5mg/mL. No presente trabalho FAXC apresentou atividade antifúngica promissora em ambas as espécies testadas, em especial as linhagens de *C. gattii*, espécie que pode se comportar como agente primário de infecção. FAXC apresentou CIM de até 0,125mg/L frente a *Cryptococcus*, valores bem promissores visto que apresentam o mesmo valor de CIM de alguns fármacos disponíveis para tratamento de criptococose, frente a algumas linhagens.

TABELA 4: Concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. gattii* e *C. neoformans* das frações em hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FAXC), butanol (FB) em água (FA) e extrato etanólico (EEXC) de *X. ciliatifolia.*

Linhagens		**CIM (mg/L)**					
		FH	**FD**	**FAXC**	**FB**	**FA**	**EEXC**
C. gattii	**23/10993 (C)**	2	<0,25	<0,25	<0,25	2	8
	547/OTTI/94-PI-10 (A)	32	2	0,5	0,5	8	32
C. neoformans	**ATCC 24067**	8	<0,25	< 0,25	<0,25	2	8
	96806 (C)	8	0,5	<0,25	<0,25	1	8

Nota: Valores de CIM determinada em três experimentos independentes. A CIM representa a concentração da fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection.

TABELA 5: Concentração inibitória mínima (CIM) de FAXC do extrato etanólico (EEXC), de anfotericina B (ANFb), e fluconazol (FLU) frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.

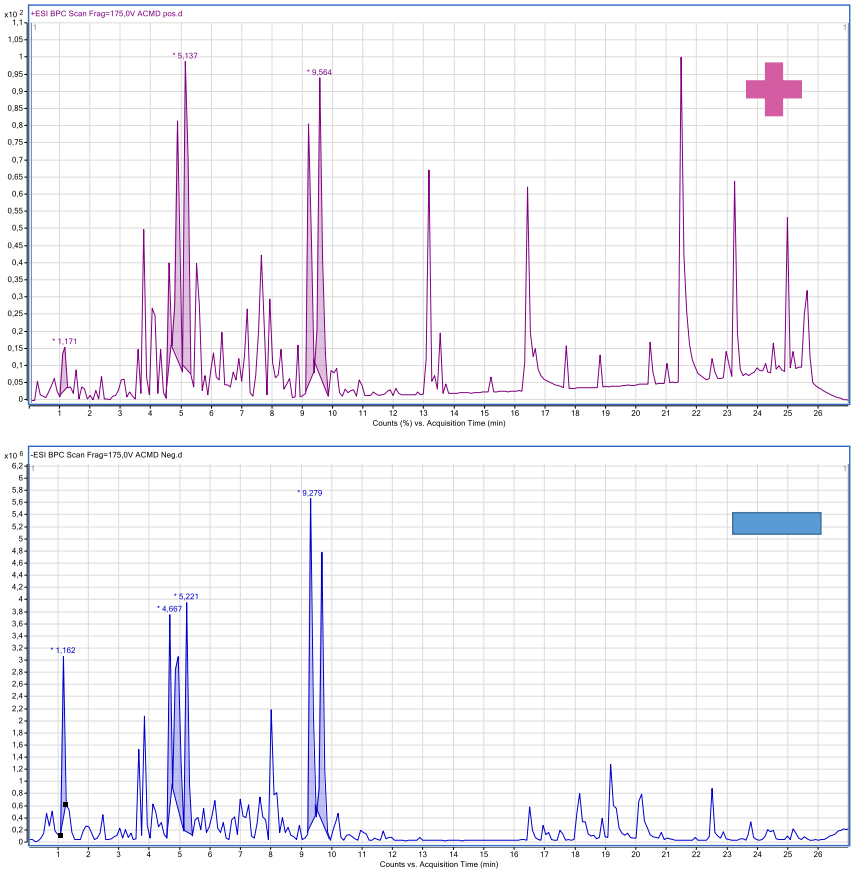
Linhagens		CIM (mg/L)			
		EEXC	**FAXC**	**FLU**	**ANFb**
C. gattii	**ATCC 24065**	32	8	2	0,125
	ATCC 32068	32	4	2	0,60
	L135/03 (C)	16	4	8	0,25
	L28/02 (C)	16	4	4	0,125
	23/10993 (C)	8	0,5	16	0,50
	196L/03 (C)	32	1	8	0,125
	1913ER (C)	32	4	16	0,50
	547/OTTI/94-PI-10 (A)	32	2	16	0,50
	L27/01 (C)	32	8	8	0,125
	LMM818 (C)	64	2	8	0,50
	29/10893 (C)	32	0,125	4	0,125
	L24/01 (C)	16	8	8	0,50
	Méd. geométrica	25,39	2,13	6,72	0,25
	Méd. aritmética	28,66	3,42	8,33	0,32
C. neoformans	**ATCC 28957**	32	4	2	0,25
	ATCC 24067	8	1	4	0,5
	ATCC 62066	32	8	2	0,25
	LMM 820 (C)	32	8	2	0,5
	C-3-1 (A)	32	4	4	1
	WP (C)	32	8	8	0,5
	5396 (C)	64	16	1	0,5
	96806 (C)	8	0,5	8	0,5
	27JF (C)	64	8	2	0,5
	H99(C)	32	4	4	0,5
	Méd. geométrica	27,85	4,28	3,03	0,46
	Méd. aritmética	33,6	6,15	3,7	0,5

Nota: Valores de CIM determinada em três experimentos independentes. A CIM representa a concentração da fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DE FAXC

Na figura 7 estão apresentados os perfis cromatográficos do FAXC utilizando o detector de ionização por eletrospray (ESI) nos modos positivo e negativo.

FIGURA 7: Perfil cromatográfico obtido por CLAE-MS da fração acetato de etila (FAXC) no modo positivo (A) e negativo (B). Coluna: Rapid Resolution HD, fase móvel: A) água ultrapura e B) metanol, no modo gradiente detector: ionização por eletrospray (ESI).

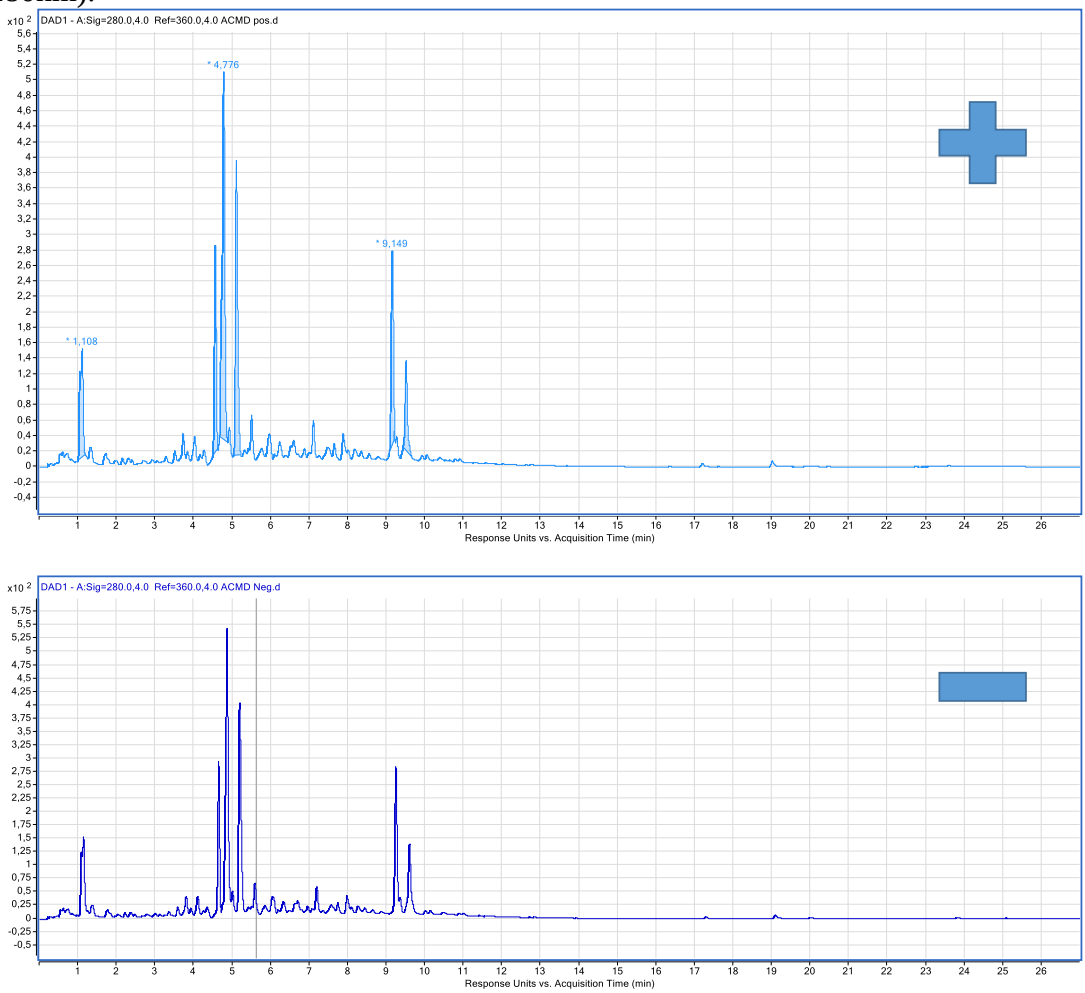


Nota: “+”= Modo positivo; “-”= Modo negativo.

Ao compararmos os cromatogramas da figura 7, podemos observar que no modo positivo foi possível visualizar um maior número de constituintes para amostra. Isso pode ser justificado pela associação de sódio às moléculas neutras durante o processo de ionização, formando assim as espécies do tipo $[M+Na]^+$.

Na figura 8 estão apresentados os perfis cromatográficos do FAXC nas mesmas condições da figura anterior registrado pelo detector de arranjo de fotodiodo (DAD) no comprimento de onda de 280 nm. A escolha desse comprimento de onda se deve ao fato de ser normalmente utilizado para caracterizar compostos fenólicos (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Estudos com extratos/frações de plantas apontam que tais substâncias podem ser as responsáveis pela atividade antifúngica observada (BARROS et al., 2013; MORAIS-BRAGA et al., 2017; TEMPESTI et al., 2011; VASHISTH et al., 2013).

FIGURA 8**:** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-MS-UV da fração acetato de etila (FAXC) no modo no modo positivo (A) e negativo (B). Coluna: Rapid Resolution HD, fase móvel: A) água ultrapura e B) metanol, no modo gradiente detector: arranjo de fotodiodo 280nm).



Nota: “+”= Modo positivo; “-”= Modo negativo.

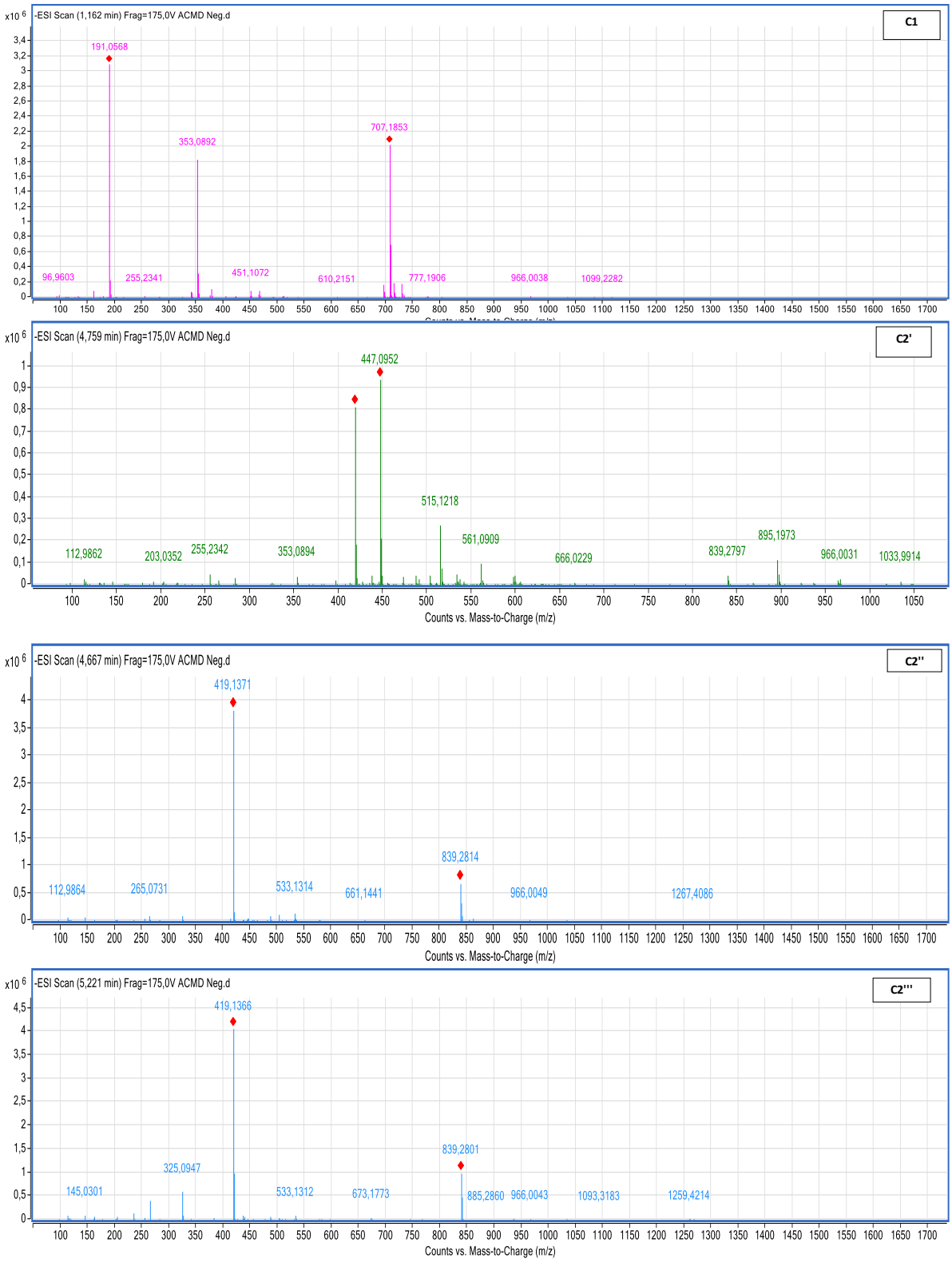
Nessa situação observa-se que não há uma diferença significativa no perfil observado para o modo negativo e positivo. Estão presentes seis picos com tempo de retenção na faixa de 1,014 - 1,156; 4,514 - 4,603; 4,688 - 4,832; 5,057 - 5,179; 9,097 - 9,202 e 9,450 - 9,591 min no modo positivo e ligeiramente maiores no modo negativo.

Observamos também que apesar do grande número de constituintes registrados pelo detector ESI, no detector DAD no referido comprimento de onda existe no mínimo seis constituintes majoritários com picos semelhantes em ambos os modos.

Ao compararmos os dados dos espectros de massas e UV obtidos os constituintes nas seis regiões do cromatograma, foi possível notar que pelo menos três deles apresentam fórmula molecular distinta que serão a partir de agora designados como **C1**, **C2** e **C3** e os isômeros configuracionais serão designados como “ ' ”, “ '' ” ou “ ''' ”.

Nas figuras 9 e 10 estão apresentados os espectros de massas e os de UV no modo negativo, respectivamente. Nos anexos estão apresentados os espectros de massas e os de UV no modo positivo.

FIGURA 9: Espectros de FAXC em LC- MS modo negativo



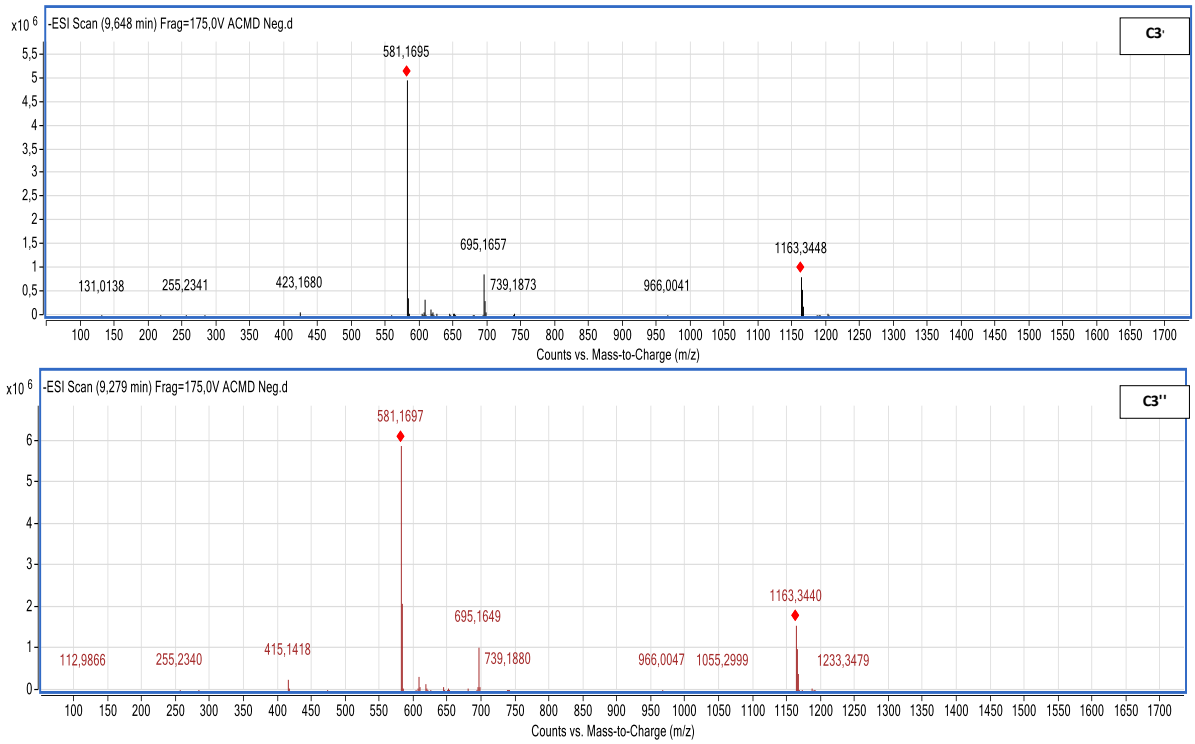
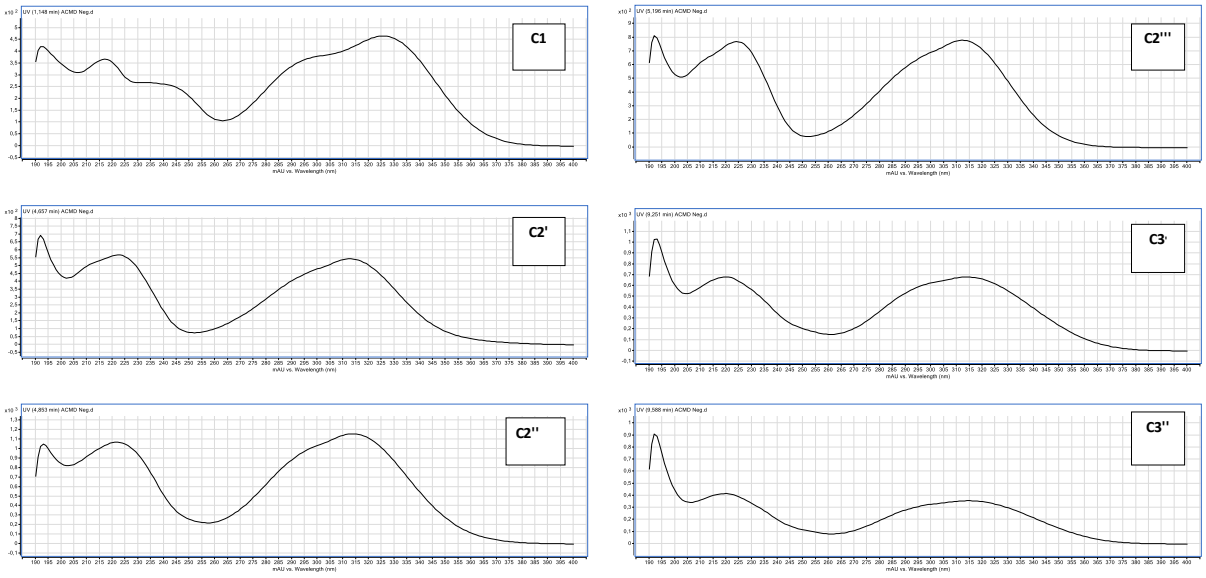


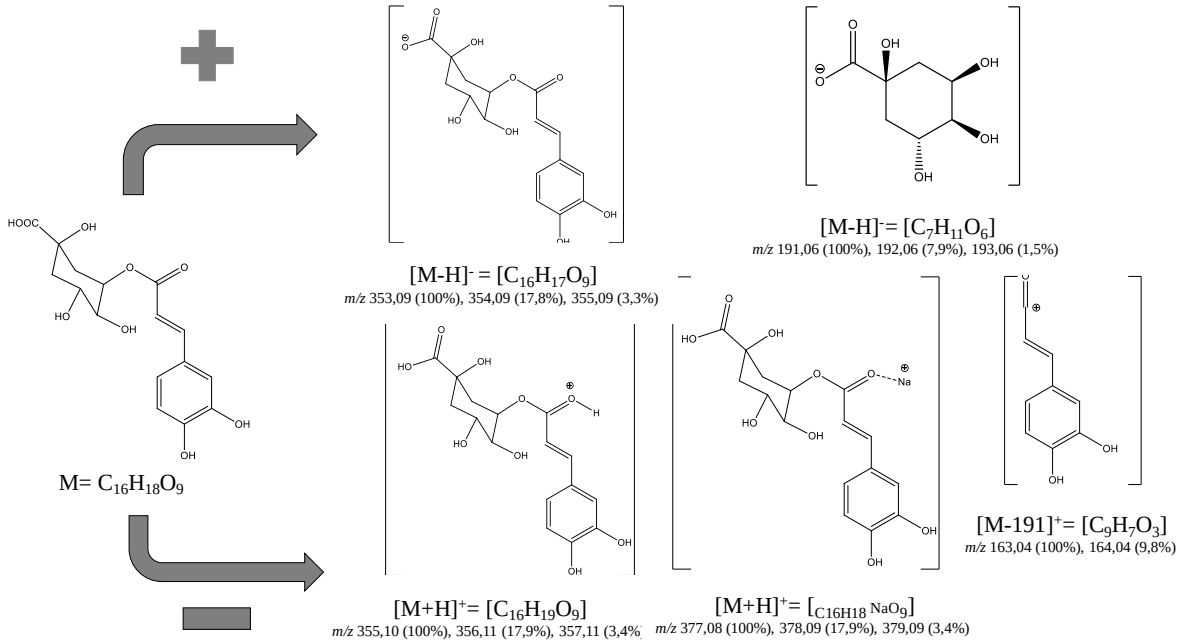
FIGURA 10: Espectro FAXC LC-DAD modo negativo



A partir da análise do espectro de massas e UV comparadas com dados da literatura (STUKER, 2012) é possível sugerir que C1 seja um derivado de ácido clorogênico, especificadamente um ácido X-O-cafeoilquínico. No espectro de massas de C1 no modo negativo foram observados os picos *m/z* 353,0892, 191,0568 e 707,1853, atribuído, respectivamente, aos íons $[M-H]^-$ - fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$; $[M-163]^-$ - fórmula molecular $C_7H_{11}O_6$, relativo a uma mólecula de ácido quínico desprotonado; e $[2M-H]^-$ -

fórmula molecular $C_{32}H_{35}O_{18}$, um dímero do X-O- cafeoilquínico desprotonado.. No modo positivo foram observados os picos *m/z* 355,1147, 377,0973, 163,0437 e 731,2069, atribuídos aos íons $[M+H]^+$ - fórmula molecular $C_{16}H_{19}O_9$; $[M+Na]^+$ - fórmula molecular $C_{16}H_{18}NaO_9$, a molécula sodiada; $[M-191]^+$ - formula molecular $C_9H_7O_3$, um íon derivado do ácido caféico; e $[2M+Na]^+$ um dímero da molécula sodiada, respectivamente. Alguns desses íons foram observados no trabalho de Stuker (2012) durante o isolamento do composto ácido 3,4-dicafeoilquínico obtido a partir da fração aquosa acetato de etila obtida das folhas de *Pluchea sagittalis*. Além disso, o perfil do espectro na região do ultravioleta obtido para C1 é muito semelhante ao obtido para o ácido clorogênico (STUKER, 2012).

FIGURA 11: Prováveis íons gerados a partir da fragmentação do ácido X-O- cafeoilquínico.



Para os compostos do tipo C2 e C3 não foi possível atribuir uma provável estrutura química, contudo com as informações obtidas podemos sugerir que estes compostos apesar de apresentarem um espectro na região ultravioleta semelhantes entre si e ao composto C1, sugerindo a presença de um grupo cromóforo fenólico, nenhum dos fragmentos observados para as espécies C2 e C3 foi semelhante aos íons detectados no espectro de massas de C1. Isso sugere que C2 e C3 não sejam derivados de ácido clorogênico, mas sim compostos de outra classe de compostos fenólicos. Os três compostos do tipo C2 devem se tratar de isômeros configuracionais pois seus espectros de massas no modo positivo e negativo exibem a presença de picos de razão *m/z* muito semelhantes. O mesmo comportamento foi

apresentado pelos isômeros de C3, porém novamente sem nenhuma relação com os isômeros do tipo C2. Na tabela 6 estão apresentados os picos de *m/z* para os isômeros de C2 e C3.

TABELA 6: Dados dos espectros de massa obtido para os isômeros do tipo C2 e C3 durante a CLAE-MS

Composto	Modo	T_r (min)	Íons
C2´	Negativo	4,667	419, 1371 (pico base); 839,2814
	Positivo	4,584	443,1472 (pico base); 421,1646; 863,3069; 147,0484
C2´´	Negativo	4,759	419,1366; 447,0952 (pico base); 515,1218; 839,2797; 895,1973
	Positivo	4,860	443,1482 (pico base); 863,3065; 147,0484
C2´´´	Negativo	5,221	419,1366 (pico base); 839,2801
	Positivo	5,137	443,1467 (pico base); 147,0484; 863,3075
C3´	Negativo	9,279	581,1697 (pico base); 695,1649; 1163,3440.
	Positivo	9,195	605,1869 (pico base); 1187,3832
C3``	Negativo	9,648	581,1695 (pico base); 695,1657; 1163, 3448
	Positivo	9,564	605,1875 (pico base); 1187, 3834

Nota: $T_{r=}$ Tempo de retenção.

5.4 DETERMINAÇÃO DE CFM

Para compreender o modo de ação de FAXC realizou-se o teste de determinação de CFM (Concentração fungicida mínima). A relação CIM:CFM é utilizado para avaliar a natureza do efeito antimicrobiano frente a determinado patógeno (CLSI, 2009).

A CFM é considerada como a menor concentração necessária para causar a redução de 99,9% de unidades formadoras de colônias (UFCs) do inóculo inicial (ERNST et al., 1996). A partir desses dados é possível presumir se a substância/fármaco é fungicida, ou seja, causa a morte dos fungos através de mecanismos que são vitais para sua sobrevivência, ou se tem ação fungistática, inibindo o desenvolvimento microbiano dificultando sua proliferação no meio e deixando a cargo de uma atuação externa para sua eliminação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Se na concentração de inibição obtida no ensaio CIM houver crescimento após subcultivo em ASD pode-se sugerir que a fração tem ação fungistática. Caso não houver crescimento posterior, pode-se sugerir que ela possui ação fungicida. Para que a substância/fármaco seja considerada fungicida, a relação CIM:CFM de um fungo deve ser 1:1 ou no máximo 2:1 (CLSI, 2009; HAFIDH et al., 2011).

Os resultados apresentados sugerem que FAXC e EEXC têm ação fungicida, pois o perfil de atividade antifúngica foi similar à CIM, exercendo atividade próxima ao ponto de inibição do respectivo micro-organismo, conforme é possível observar na Tabela 7.

O modo de ação fungicida é desejável para os agentes antimicrobianos, principalmente no tratamento de indivíduos imunocomprometidos. Isso se explica porque os agentes fungistáticos apenas inibem o desenvolvimento do fungo não os eliminando, os tornando assim clinicamente menos interessantes que os fungicidas (BAUMGART, 2014).

Fungistáticos como a flucitosina e fluconazol raramente são utilizados como monoterapia no tratamento de micoses sistêmicas, isso porque grande parte dos fungos desenvolvem mecanismos de resistência e esse fármaco (GROLL; PISCITELLI; WALSH, 2001). Segundo White, Marr e Bowden (1998) um dos muitos fatores relacionados à resistência a fármacos pelos fungos, pode estar relacionado ao efeito fungistático.

TABELA 7: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de FAXC e extrato etanólico (EEXC) de *X. ciliatifolia* frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans.*

Linhagens		CIM(mg/L)		CFM(mg/L)	
		EEXC	**FAXC**	**EEXC**	**FAXC**
C. gattii	**ATCC 24065**	32	8	32	8
	ATCC 32068	32	4	32	4
	L135/03 (C)	16	4	16	16
	L28/02 (C)	16	4	16	8
	23/10993 (C)	8	0,5	8	0,5
	196L/03 (C)	32	1	32	2
	1913ER (C)	32	4	32	4
	547/OTTI/94-PI-10 (A)	32	2	32	4
	L27/01 (C)	32	8	32	16
	LMM818 (C)	64	2	64	4
	29/10893 (C)	32	0,125	32	0,125
	L24/01 (C)	16	8	16	16
C. neoformans	**ATCC 28957**	32	4	32	4
	ATCC 24067	8	1	16	4
	ATCC 62066	32	8	32	8
	LMM 820 (C)	32	8	32	16
	C-3-1 (A)	32	4	32	8
	WP (C)	32	8	32	8
	5396 (C)	64	16	64	16
	96806 (C)	8	0,5	16	1
	27JF (C)	64	8	64	8
	H99 (C)	32	4	32	4

Nota: A CIM representa a concentração da fração capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. CFM: menor concentração necessária para causar a redução de 99,9% de unidade formadora de colônia. C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection.

5.5 INTERAÇÃO *in vitro* DE FAXC COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL

O efeito antifúngico da FAXC foi avaliado em combinação com fluconazol e anfotericina B, através do método de microdiluição de *checkerboard* que proporciona uma matriz de todas as possíveis combinações de fármacos. Nesse teste foram avaliadas duas linhagens de *C. gattii* (ATCC 32608 e 2701) e duas linhagens de *C. neoformans* (ATCC 28957 e H99).

Para ter sua combinação considerada sinérgica, o valor de ICIF tem que se enquadrar entre 0,5 a 1. Valores de 1 a 4 são considerados indiferentes, e acima de 4 são classificados como antagonistas (SANTOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2013). O resultado de ICIF obtido foi o mesmo para todas as espécies e linhagens testadas, apresentando valores que se

enquadram indiferentes (TABELA 8). Isso sugere, inicialmente, que a administração da FAXC concomitante os antifúngicos fluconazol e anfotericina B, fármacos utilizados no tratamento de criptococose, não iria interferir na ação dos mesmos. Os resultados são promissores, pois além de FAXC possuir uma potente atividade antimicrobiana, não causa interferência na ação dos principais fármacos utilizados no tratamento da criptococose.

TABELA 8**:** Avaliação de FAXC com fluconazol (FLU) e anfotericina B (ANFb) frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans.*

Linhagens		**CIM(mg/L)**		**CIM(mg/L)**	
		FAXC + FLU ICIF	**Interação**	**FAXC + ANFb ICIF**	**Interação**
C. gattii	**ATCC 32068**	2	Indiferente	2	Indiferente
C. neoformans	**L27/01 (C)**	2	Indiferente	2	Indiferente
	ATCC 28957	2	Indiferente	2	Indiferente
	W99(C)	2	Indiferente	2	Indiferente

Nota: C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection; CIM: concentração inibitória mínima; FAXC: fração acetato de eitla de *X. ciliatifolia*; ICIF: índice de concentração inibitória fracionária.

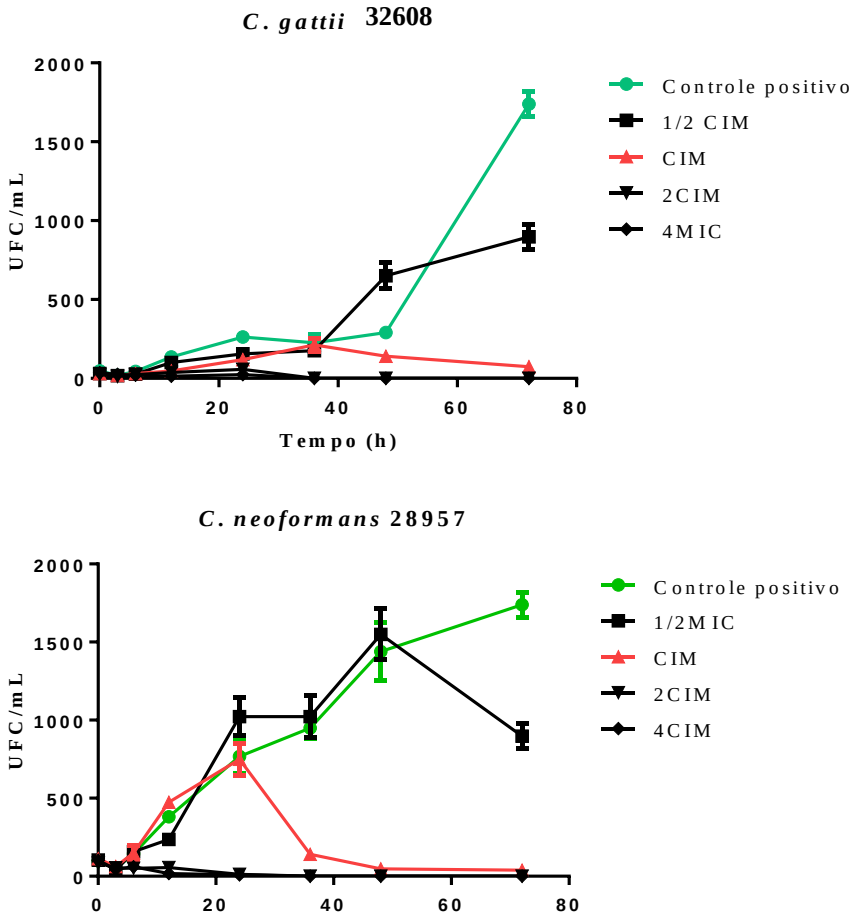
5.6 CURVA DE MORTE

Com base na curva de morte é possível avaliar a atividade antifúngica da fração em razão do tempo, além de algumas informações farmacodinâmicas como relação entre concentração, efeito e efeito pós-antibiótico (KLEPSER et al., 1998).

Os resultados obtidos através do ensaio curva de morte mostraram que as duas espécies, *C. gattii*, e *C. neoformans*, apresentaram tempos de ação fungicida diferentes (FIGURA 12). Na concentração que representa metade do CIM houve uma curva ascendente em ambas as espécies embora menor que o grupo controle, sugerindo que o número de UFC caiu, embora ainda houvesse crescimento mesmo após 72 horas. *C. gattii*, quando exposto à concentração de CIM de FAXC, apresentou um modesto crescimento cessando totalmente o número de colônias cerca de 70 horas após a incubação inicial. Já *C. neoformans*, na mesma concentração, apresentou um pico de crescimento por volta de 24 horas, regredindo o número de colônias até cessar totalmente em 50 horas de incubação.

Foi possível observar que quanto maior a concentração de FAXC menor foi o tempo de morte de ambas as espécies, sugerindo que a fração exerça uma relação de dose resposta. É importante ressaltar que os estudos *in vitro* apresentam apenas um indicativo de um potencial efeito, pois não representam de forma fidedigna um organismo complexo (KEELE et al., 2001) sendo necessária a realização de estudos em animais para confirmar essa hipótese.

FIGURA 12: Curva de morte de células de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com a FAXC de *X. ciliatifolia*.



Nota: Resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC) em razão do tempo. Cada símbolo representa a média das porcentagens de crescimento. Resultados obtidos em triplicata.
UFC: unidade formadora de colônia, h: horas, CIM: concentração inibitória mínima, ½ CIM: metade da concentração mínima inibitória, 2CIM: equivalente a 2x a concentração inibitória mínima, e 4x concentração inibitória mínima.

5.7 INTERAÇÃO DE FAXC COM SORBITOL

Após avaliada a atividade antifúngica, foram realizadas algumas análises afim de tentar compreender qual o mecanismo da atividade antifúngica observada para FAXC. Nesse sentido foi realizado o teste de sorbitol, que se baseia na propriedade do sorbitol de estabilizar o protoplasto fúngico. A parede celular é uma estrutura que garante aos fungos proteção ao protoplasma frente a choques osmóticos externos, possui propriedades de comunicação celular e ainda é responsável por definir o crescimento celular (BOWMAN; FREE, 2006). Caso uma substância cause algum dano à parede celular fúngica, na presença de um suporte

osmótico a CIM apresentará um valor maior (ESCALANTE et al., 2008). Nesse estudo comparamos a CIM apresentada após tratamento com FAXC com FAXC e sorbitol 0,8M (TABELA 9). Observamos que a CIM de nenhuma das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* testadas foi alterada na presença de sorbitol, sugerindo que a FAXC não age diretamente na parede celular.

TABELA 9: Avaliação da interação de FAXC com sorbitol frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans.*

Linhagens		**CIM(mg/L)**	
		FAXC	**FAXC + Sorbitol**
C. gattii	**ATCC 32068**	4	4
	L27/01 (C)	8	8
C. neoformans	**ATCC 28957**	4	4
	W99(C)	4	4

Nota: C: isolados clínicos; ATCC: American Type Culture Collection;

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

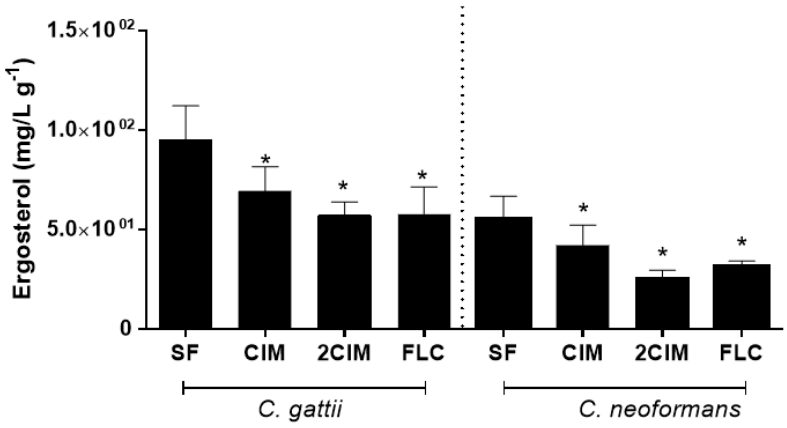
O ensaio de quantificação de ergosterol avalia a ação de FAXC sobre a síntese de ergosterol, principal esteroide da membrana celular fúngica. A preservação da membrana celular como barreira de permeabilidade é fundamental para a sobrevivência celular e a mesma é alvo de ação de diversos fármacos, como fluconazol e anfotericina B (LUPETTI et al 2002).

Os resultados observados mostraram que a síntese de ergosterol de *C. gattii* e *C. neoformans* diminuiu após tratamento com FAXC (FIGURA 13), apresentando significância estatística em ambas as concentrações, equivalente ao CIM e duas vezes o CIM. Os dados sugerem que FAXC interfere na via de biossíntese de ergosterol, podendo esse ser um dos mecanismos no qual exerce sua ação. Alguns trabalhos apresentaram resultados semelhantes utilizando fenil aldeído e propanóides frente a espécies de *Candida* spp. (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013) e também com a exposição ao óleo de cravo-da-índia (PINTO et al., 2009).

A estrutura celular fúngica se assemelha muito com a de seres humanos. A principal diferença se relaciona à presença de ergosterol nas membranas celulares do fungo em substituição ao colesterol, presente nas membranas celulares de mamíferos (HUNG et al., 2016). Dessa maneira, as diferenças estruturais permitem que a interferência na síntese de

ergosterol seja interessante devido à seletividade. Além da função estrutural, o ergosterol é importante para manutenção da fluidez, assimetria, integridade da membrana e para o bom funcionamento das enzimas ligadas à membrana, assegurando assim a viabilidade de várias funções celulares (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013).

FIGURA 13**:** Quantificação de ergosterol na membrana celular de linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com FAXC de *X. ciliatifolia*.



Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação dos níveis de ergosterol expressos em mg/L de três experimentos independentes realizados em triplicata. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico Mann-Whitney SR: Sem a fração, CIM: Concentração inibitória mínima, 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima, FLC: fluconazol.

5.9 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO E PRN

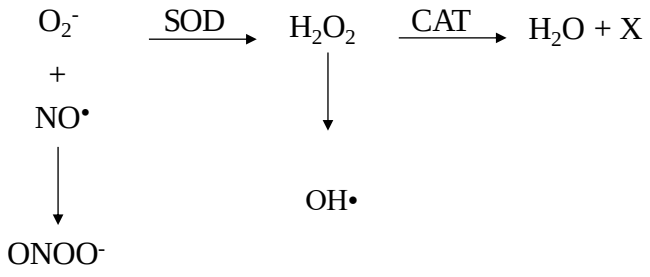
A fim de verificar se FAXC induz estresse oxidativo e nitrosativo nas espécies e linhagens de *Cryptococcus* testadas, foi mensurada a produção de ERO (espécies reativas de oxigênio) e PRN (peróxinitrito) através da emissão de fluorescência.

Em condições normais, o oxigênio molecular produto da cadeia respiratória é captado nas mitocôndrias e convertido em H_2O pela ação de enzimas do sistema citocromo oxidase. O estresse oxidativo acontece quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a ação dos sistemas de defesa antioxidante, levando a danos celulares (FERNANDES, 2017). As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são responsáveis por catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio a oxigênio molécular e água (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

As EROs que desencadeiam o estresse oxidativo, são representadas principalmente pelo ânion superóxido (O_2^-) pelo radical hidroxila ($OH^\bullet$) e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

(KIM et al., 2014). Peroxinitrito ($ONOO^-$), é um dos principais representantes das espécies reativas de nitrogênio que é formado a partir da reação de óxido nítrico, e superóxido em proporção quase equimolar (FIGURA 14) (VIRÁG et al., 2003).

FIGURA 14: Representação esquemática da formação do sistema antioxidante.



Nota: $O2^-$: ânion superóxido; OH• radical hidroxila; H_2O_2: peróxido de hidrogênio; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; $ONOO^-$: peroxinitrito.

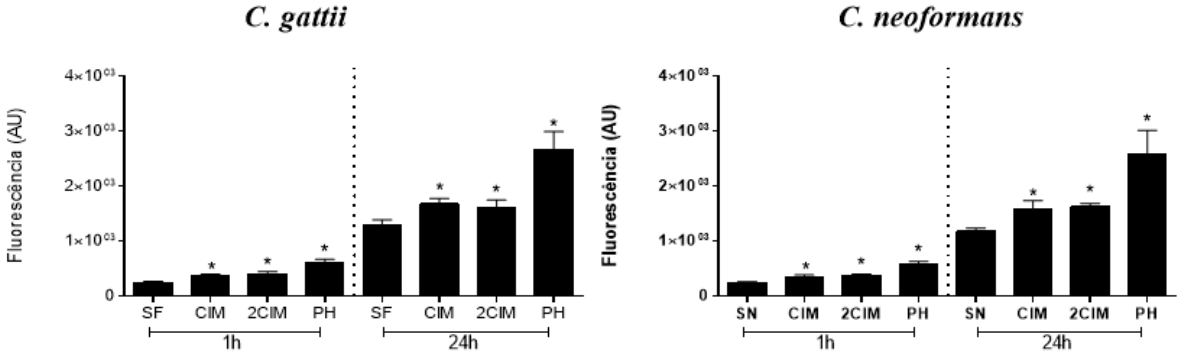
Os resultados demonstraram que as espécies de *Cryptococcus* tratadas com FAXC, apresentaram aumento na quantidade intracelular de PRN (FIGURA 15) induzindo um aumento de peroxinitrito não dependente de concentração, que apresentou maiores intensidades após 24h de tratamento. Em contrapartida, não houve aumento da produção intracelular de EROs nas espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com FAXC nem em concentrações maiores, nem em um maior período de tratamento como pode ser observada na Figura 16, pois a emissão de fluorescência nas espécies tratadas com FAXC foi menor que a emissão do controle. Uma hipótese para o resultado observado é que talvez haja uma grande demanda de O_2^- para a formação de $ONOO^-$, (FIGURA 14) aumentando PRN e não permitindo que os níveis de ERO se elevem.

O peroxinitrito é um potente indutor de morte celular mesmo sendo uma espécie de curta duração (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). Ainda que o peroxinitrito não apresente elétrons desemparelhados, não se comportando como um radical livre por natureza química, é um poderoso oxidante que manifesta uma imensa gama de efeitos prejudiciais aos tecidos, incluindo a peroxidação lipídica e a inativação de enzimas entre outros efeitos na célula (VIRÁG et al., 2003). Esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual FAXC exerce sua atividade fungicida. Sabe-se que um antimicrobiano pode apresentar mais de um mecanismo de ação, como a anfotericina B e o itraconazol por exemplo, que tem ação na síntese de ergosterol e também provocam estresse oxidativo nos fungos sensíveis

(SHEKHOVA; KNIEMEYER; BRAKHAGE, 2017; FERREIRA et al., 2013; GUIRAO-ABAD et al., 2017).

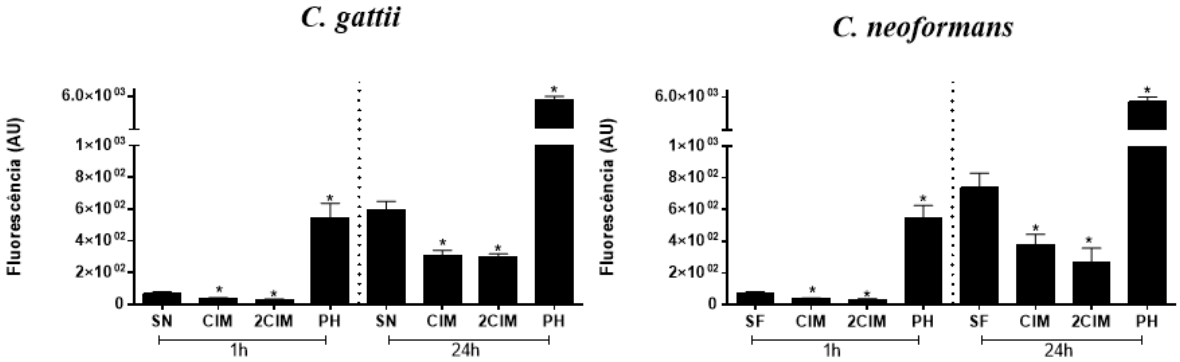
Peralta e colaboradores (2015) testaram o efeito de um flavonoide prenilado 2′,4′-dihidroxi-5′-(1‴,1‴-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (8PP) de *Dalea elegans* frente a biofilmes de *Candida albicans* e observaram que a substância gerou estresse nitrosativo no fungo, causando a diminuição dos biofilmes, relacionando esse resultado ao mecanismo de ação antifúngica.

FIGURA 15: Mensuração de peroxinitrito (PRN) produzidas por *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com FAXC de *X. ciliatifolia.*



Notas: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação da fluorescência no λ500nm expressos em intensidade de fluorescência (UA) de três experimentos independentes realizados em triplicata *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico ANOVA. SF: Sem a fração, CIM: Concentração inibitória mínima, 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima, PH: peróxido de hidrogênio.

FIGURA 16: Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas por *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com FAXC..



Notas: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação da fluorescência no λ500nm expressos em intensidade de fluorescência (UA) de três experimentos independentes realizados em triplicata *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração).. Teste estatístico ANOVA. SF: Sem a fração, CIM: Concentração inibitória mínima, 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima, PH: peróxido de hidrogênio.

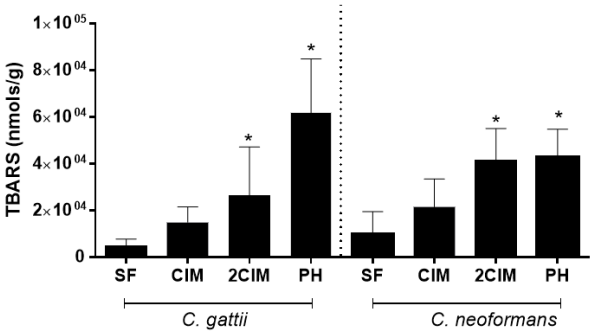
5.10 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Diante dos resultados de indução de geração de peroxinitrito por FAXC, avaliou-se a peroxidação lipídica das membranas celulares. Para isso, foi utilizado o teste que avalia as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um biomarcador comumente utilizado para mensurar a peroxidação lipídica (ESTERBAUER, 1993). A peroxidação lipídica é uma degradação oxidativa de lipídeos desencadeada por radicais livres que sequestram elétrons dos ácidos graxos poliinsaturados presente nas membranas biológicas, ocasionando uma alteração da permeabilidade, fluidez e consequentemente perda da integridade das mesmas, resultando em dano celular (ALVES et al., 2017; FRANÇA et al., 2013).

Os resultados encontrados nos experimentos evidenciaram um dano crescente nas membranas das espécies de *Cryptococcus* testadas. O envolvimento de peróxidos lipídicos e seus produtos levam à deformidade estrutural e funcional da membrana. A acumulação de TBARS aumentou consideravelmente nas membranas citoplasmáticas a uma concentração correspondente a 2 vezes o CIM em células de *Cryptococcus* tratadas com FAXC (FIGURA 17), representando dano lipídico.

Estando bem estabelecido que a peroxidação lipídica é mediada por radicais livres (ALVES et al., 2017; FERREIRA et al., 2013), foi suposto que este efeito pode estar relacionado a PRNs e o dano às membranas associada à morte celular. O fato de necessitar de uma maior concentração de FAXC pode estar relacionado com a falta de aumento da produção de EROs, pois apesar do O_2^- apresentar baixa capacidade de oxidação e H_2O_2 não ser considerado um radical livre verdadeiro, o radical OH• é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (LIOCHEV, 2013). Além disso, como já demonstrado nesse estudo, FAXC apresentou *in vitro* uma relação dose dependente, portanto supõe-se que isso também justifique uma maior concentração para provocar peroxidação lipídica nas membranas das espécies de *Cryptococcus* testadas.

FIGURA 17: Avaliação de FAXC sobre a peroxidação lipídica em células *C. gattii* e *C. neoformans.*



Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação da peroxidação lipídica expressos em nmol/g de três experimentos independentes realizados em triplicata. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico Mann-Whitney SR: Sem a fração, CIM: Concentração inibitória mínima, 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima, PH: peróxido de hidrogênio.

5.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

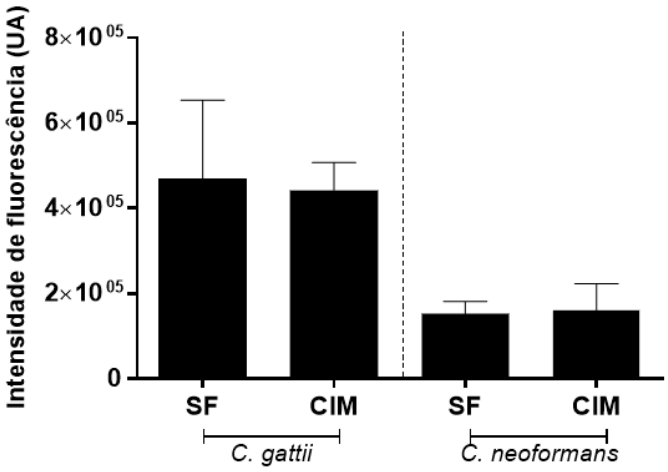
Além de produzir PRNs e causar peroxidação lipídica, é possível que FAXC cause danos à membrana mitocondrial de *C. gattii* e *C. neoformans.* A principal função das mitocôndrias é a produção de energia por respiração oxidativa, que acontece pelo ciclo do ácido tricarboxílico e através da cadeia de transporte de elétrons (KIM et al., 2014). Existe a possibilidade de que, quando expostas à FAXC, as funções mitocondriais possam ser afetadas, já que são locais prováveis para a iniciação da apoptose induzida por peroxinitrito (VIRÁG et al., 2003).

Para confirmar essa hipótese, avaliou-se o potencial de membrana, através da mensuração de estabilidade por emissão de fluorescência. Foram expostas à FAXC um grupo de células de *Cryptococcus* tratadas com o corante catiônico Rho 123. Esse corante é altamente permeável à membrana celular, sendo rapidamente absorvido pela mitocôndria, emitindo alta fluorescência em células normais. Já em células que estejam em apoptose, especificamente pela via intrínseca ou mitocondrial, a mitocôndria sofre alterações no potencial transmembrânico, ocorrendo efluxo do corante para fora da organela, havendo uma menor emissão de fluorescência (TRAGANOS, DARZYNKIEWICZ, 1994).

Os resultados encontrados demonstraram que não houve dano à permeabilidade da membrana mitocondrial, pois a emissão de fluorescência foi a mesma emitida pelo controle de crescimento (FIGURA 18). Diante desses dados, pontuamos a importância da realização de mais experimentos - como avaliação das enzimas antioxidantes SOD e PER (que se encontra

em andamento) (SOARES et al., 2010), pois estes podem indicar se há uma maior atividade enzimática em resposta às PRN produzidas. Esses ensaios explicariam se a ausência de dano à permeabilidade da mitocôndria ocorre por aumento da atividade do sistema antioxidante ou ainda direcionar para outros testes que verifiquem outras perturbações na mitocôndria. No estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (2015) houve uma maior resistência ao estresse oxidativo das células de *Cryptococcus* heterorresistentes em contato com itraconazol. Esse comportamento poderia estar relacionado com uma maior expressão de enzimas antioxidantes como a SOD, para a qual foi demonstrada uma maior atividade.

FIGURA 18: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com FAXC.



Cada barra representa a média + desvio padrão da quantificação da fluorescência expressos em intensidade de fluorescência (UA) de três experimentos independentes realizados em triplicata *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico Teste T. SF: Sem a fração, CIM: Concentração inibitória mínima.

5.12 MEDIDAS DE DIÂMETRO CELULAR, TAMANHO DA CÁPSULA E POTENCIAL ZETA

Para avaliar o comportamento das células de *Cryptococcus* frente ao estresse provocado por FAXC, as leveduras foram expostas a uma concentração equivalente à metade da CIM, ou seja, uma concentração sub-inibitória. Verificou-se que houve alteração da morfologia da célula com a diminuição do tamanho celular (FIGURA 19). Já no tamanho da cápsula não houve alterações (FIGURA 20). *C. neoformans* e *C. gattii,* quando exposto a fármacos como anfotericina B, itraconazol e fluconazol apresentaram uma diminuição do tamanho celular e de cápsula (NOSANCHUK ET AL., 1999; FERREIRA et al., 2015). É possível que a exposição de *Cryptococcus* à FAXC leve a um estresse que induz mudanças na

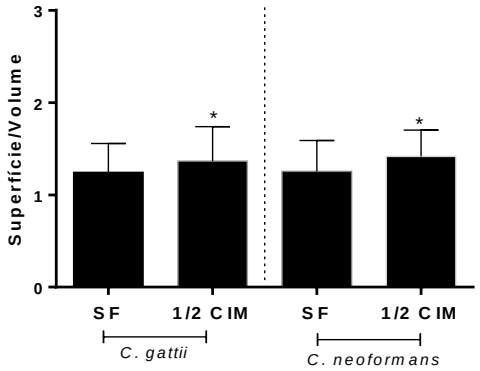
expressão gênica que, consequentemente, resulta em alteração no tamanho da célula (NOSANCHUK et al., 1999). Fármacos como itraconazol promovem estresse oxidativo nas células de *Cryptococcus* e para se proteger desse estresse, acredita-se que a célula do fungo diminuia seu diâmetro e cápsula (FERREIRA et al., 2015; MADINGAN et al., 2011). As vantagens de apresentar um tamanho menor para a célula são significativas, pois sendo menores suportam uma maior taxa de troca de nutrientes por volume celular comparadas com as células de maior tamanho. Sendo assim, uma quantidade de recursos menor permitirá evolução de uma maior população de células pequenas (ALVES et al., 2017; FERREIRA et al., 2015; MAXSON et al., 2007).

Com relação ao tamanho da cápsula, são descritos alguns resultados contraditórios em experimentos com fármacos como terbinafina, itraconazol e fluconazol, frente às espécies de *Cryptococcus*, utilizando metodologia similar (FERREIRA et al., 2015; GUERRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Sob condições de estresse ou de limitação de nutrientes a relação cápsula e diâmetro celular pode ser inversamente proporcional. Dessa maneira, sugere-se que para responder e se defender do estresse provocado por FAXC o tamanho da cápsula foi mantido e fatores transcricionais atuaram para a diminuição do tamanho celular. Alguns estudos demonstraram que a cápsula é utilizada como defesa às espécies reativas produzidas pelo hospedeiro, sugerindo que esse fosse um dos mecanismos de resistência intracelular (ZARAGOSA et al., 2008). Sugere-se que esse talvez possa ser o mecanismo utilizado para defesa frente às espécies nitrosativas provocadas por FAXC. Foi avaliado também se houve alteração da carga da superfície de *C. gattii* e *C. neoformans* após o tratamento com FAXC. Os fatores que conferem carga negativa à superfície célular são principalmente a presença de melanina e da cápsula polissacarídica, devido à presença de seu componente majoritário, o ácido glicurônico (NOSANCHUK; CASADEVALL 1997).

Os resultados obtidos nesse experimento não demonstraram alteração da carga da superfície das linhagens testadas (FIGURA 21), pois as voltagens (m/V) foram praticamente as mesmas nos fungos com e sem o tratamento. Esse resultado pode estar associado principalmente ao tamanho da cápsula após a exposição à FAXC, que não alterou seu tamanho comparado ao controle de crescimento. Como não houve redução significativa dos níveis de ácido glicurônico, consequentemente não houve alteração de carga da superfície celular de *C. gattii* e *C. neoformans*. Essa hipótese foi sugerida porque para que os fungos sintetizem melanina, fator que também altera a carga da superfície celular, seria necessário seu cultivo em meios de cultura que possua substratos fenólicos (NOSANCHUK; CASADEVALL 1997), fato que não aconteceu nesse trabalho. Alguns estudos demonstraram

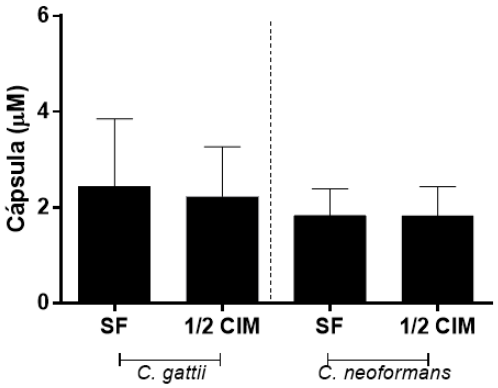
que após uma situação de estresse, onde houve uma redução da cápsula de *Cryptococcus* houve também uma diminuição da carga negativa (ALVES et al., 2017; SANTOS et al., 2014).

FIGURA 19: Efeito de FAXC sobre a superfície/volume celular de células de *C. gattii* e *C. neoformans.*



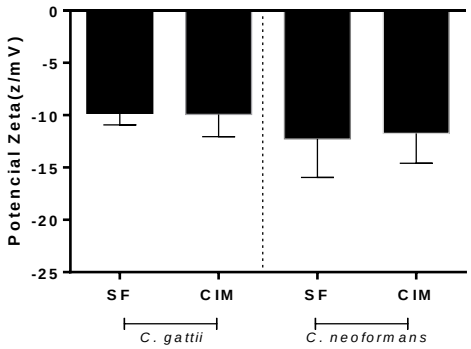
Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da superfície/volume celular expresso em µm de 100 células. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico Teste T não pareado. SF: sem fração, ½ CIM valor correspondente a metade concentração inibitória mínima.

FIGURA 20: Efeito de FAXC sobre o tamanho da cápsula de células de *C. gattii* e *C. neoformans.*



Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da cápsula expresso em µm de 100 células. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração) teste estatístico Teste T não pareado. SF: sem fração, CIM valor da concentração inibitória mínima.

FIGURA 21: Efeito de FAXC sobre a carga da membrana celular de *C. gattii* e *C. neoformans.*



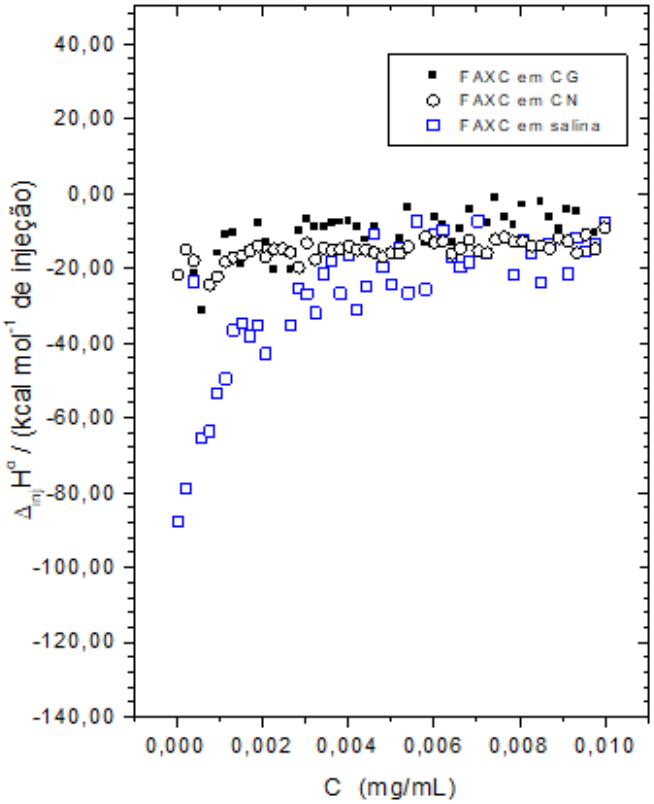
Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da medida do potencial zeta expresso em mV. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem a fração). Teste estatístico: Teste T não pareado. SF: sem fração, CIM valor da concentração inibitória mínima.

5.13 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Para avaliar a natureza química da interação existente entre FAXC e *Cryptococcus* utilizamos o método de Calorimetria de titulação isotérmica (ITC). O experimento tem como objetivo medir diretamente o calor liberado ou absorvido durante um evento de interação biomolecular (MAGESTE, 2009). A técnica consiste no equilíbrio térmico de dois compartimentos, um para a amostra a ser testada e outra para o padrão de referência. Essas soluções inseridas nesses compartimentos se misturam e interagem entre si envolvendo processos termodinâmicos, com o rompimento e formação de ligações gerando uma variação da temperatura que é altamente controlada. A diferença de potencial elétrico é então mensurada permitindo determinar a quantidade de energia que foi liberada ou absorvida no processo (VELOSO, 2014).

Na literatura é bem estabelecido que ligações fortes, como as covalentes, possuem uma potência energética alta, chegando a 85 kcal/mol. Outras interações consideradas fortes são as eletrostáticas e as ligações de hidrogênio, que possuem uma energia que varia de 1,0 a 10 kcal/mol, de maneira que a formação dessas interações leva a um aumento da entalpia. Já as interações mais fracas como dipolo-dipolo e Van der Walls são interações que possuem baixas energias, não alcançando 1,0 Kcal/mol e consequentemente geram uma baixa entalpia de ligação (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Os resultados observados apresentaram uma força fraca de interação intermolecular entre FAXC e as células de *Cryptococcus* testadas (FIGURA 22), sugerindo com base nas informações descritas, que essa interação acontece através de ligações que gerem baixas entalpias como as interações não polares.

FIGURA 22: Avaliação da interação intermolecular entre *C. gattii* e *C. neoformans* com FAXC de *X. ciliatifolia.*



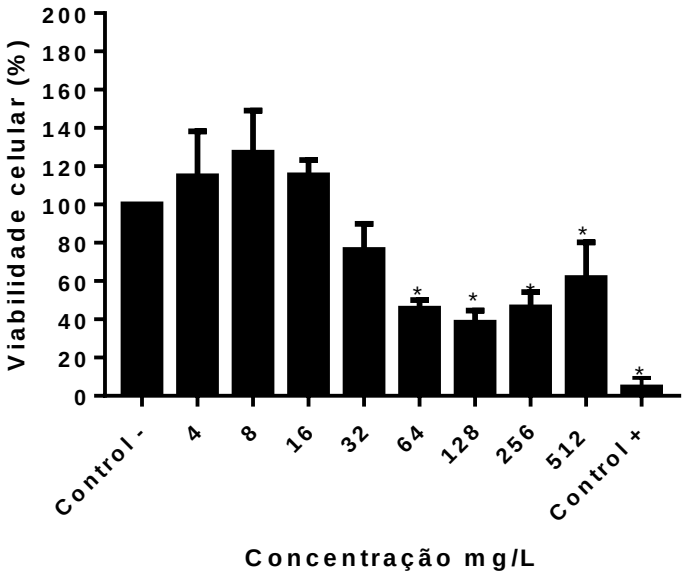
Nota: Medida da variação da entalpia envolvida nas interações moleculares entre *C. gattii* e *C. neoformans* frente a FAXC na concentração de 10mg/ml. FAXC: fração acetato de etila de *X. ciliatifolia*, CG: *C. gattii*, CN: *C. neoformans.*

5.14 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO MTT

A citotoxicidade de FAXC foi avaliada através do método de viabilidade colorimétrica do MTT. Esse ensaio é baseado na redução do MTT em cristais de formazana através de reações de enzimas mitocondriais e citosólicas que estão operacionais em células viáveis (GANOT et al., 2013). A realização de testes de citotoxicidade é de suma importância em estágios iniciais da pesquisa por possíveis candidatos a fármacos, visto que é fundamental que além de possuir uma boa ação, os candidatos não provoquem efeitos tóxicos a células normais do organismo (MELO et al., 2000). Além disso, esses testes garantem parâmetros e delineamento de limites de concentração para testes posteriores mais específicos como os testes de genotoxicidade, por exemplo (EISENBRAND et al., 2002).

As células mononucleares de sangue periférico, foram incubadas em concentrações crescentes de FAXC (4 mg/L a 512 mg/L) que conduziram a um aumento da citoxicidade (FIGURA 23), ou seja, a citotoxicidade de FAXC é concentração dependente.

FIGURA 23: Viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico após tratamento com diferentes concentrações de FAXC.



Nota: Cada barra representa a média + desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular expressos em % de quatro experimentos independentes realizados em triplicata considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. *: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (control -). Teste estatístico Kruskal Wallis. Control-: onde não houve tratamento, contendo apenas meio RPMI 1640 e células; Control + onde foi tratado com peróxido de hidrogênio.

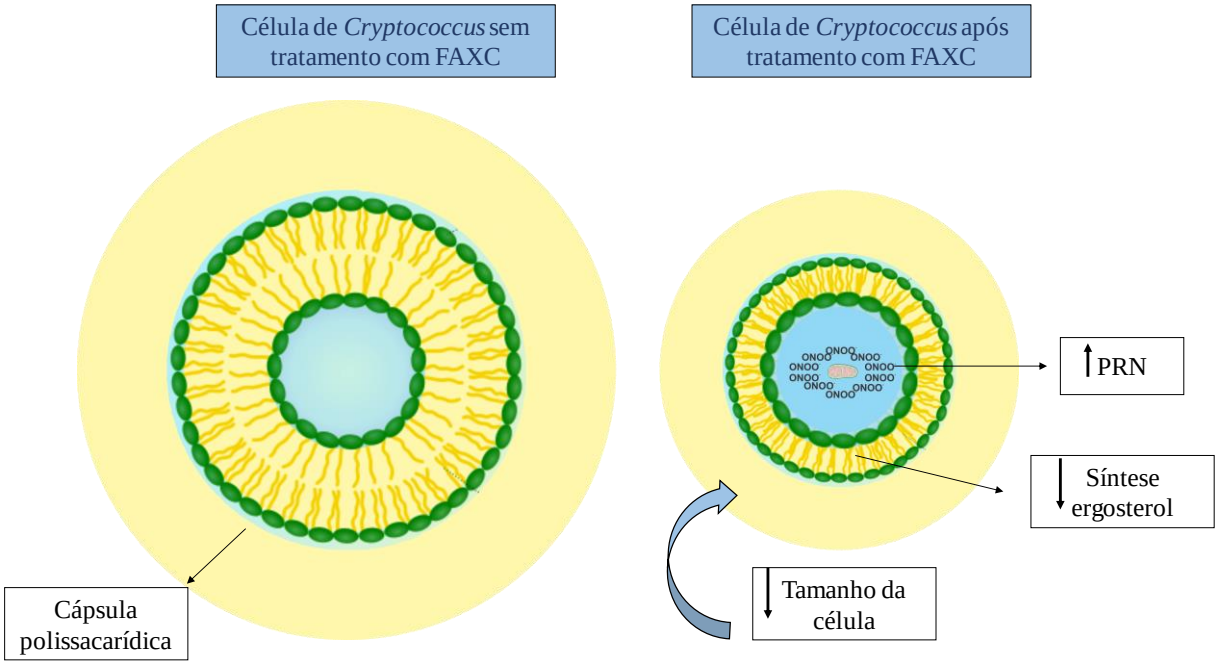
Os dados obtidos através do ensaio de citotoxicidade demonstraram que a partir da concentração 64 mg/L não houve significância estatística comparada ao controle negativo (onde não houve tratamento nas células mononucleares humanas). Esses resultados sugerem que a partir da concentração 32 mg/L houve uma perda significativa da viabilidade celular. É importante destacar que a ação antifúngica de FAXC ocorreu em uma concentração não citotóxica em todas as linhagens testadas, apresentando até a concentração 32 mg/L uma viabilidade celular ≥ 80%, valor esse considerado por alguns autores como não tóxico (ARAÚJO et al., 2015). Em contrapartida, nas demais concentrações houve uma queda significativa da viabilidade celular. O comportamento apresentado nesse trabalho foi também observado em outros estudos, onde a concentração que apresentou atividade biológica, não exibiu citotoxicidade (KAPEWANGOLO et al., 2017). Ressalta-se que o ensaio MTT sozinho não é capaz de definir um perfil citotóxico, mas demonstra a

necessidade e apresenta alguns parâmentros para a realização de mais testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

5.15 PROVÁVEL EFEITO FUNGICIDA DE FAXC EM CÉLULAS DE *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans.*

As análises realizadas para compreender o mecanismo de ação de FAXC apresentaram resultados importantes, e apesar de não elucidá-lo completamente, direcionam a realização de novos experimentos para esse fim. Os resultados apontam que FAXC tem efeito fungicida, que provavelmente se dá pela diminuição da síntese de ergosterol e indução da produção de peroxinitrito (FIGURA 24). Ainda, como resposta ao estresse gerado, a célula diminui seu tamanho.

FIGURA 24: Representação esquemática da célula criptococócica antes e após o tratamento com FAXC



Nota: PRN: peroxinitrito, FAXC: fração acetato de etila de *Xylosma ciliatifolia.*

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente trabalho descreve pela primeira vez a atividade antifúngica *in vitro* das folhas de *X. ciliatifolia* frente a linhagens de *C. gattii e C. neoformans.* Foram testadas 5 frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas da espécie, sendo a fração acetato de etila (FAXC) a que apresentou melhor atividade nos ensaios preliminares de CIM.

- A análise do perfil cromatográfico de FAXC sugere que a fração apresenta em sua constituição majoritariamente substâncias fenólicas.

- FAXC demonstrou ação fungicida - característica positiva e desejada em um antimicrobiano.

- Através do ensaio curva de morte FAXC apresentou atividade dose dependente.

- Não foram observadas alterações na ação de fármacos antifúngicos utilizados no tratamento de criptococose e outras doenças fúngicas em ensaios que avaliam tal interferência.

- FAXC não alterou a permeabilidade de membrana mitocondrial de *C. gattii e C. neoformans.*

- FAXC diminui a síntese de ergosterol e induziu a produção de PRN, podendo esses serem responsáveis pela peroxidação lipídica nas membranas celulares de *Cryptococcus* em maiores concentrações.

- Houveram alterações morfológicas em células criptocócicas, resultado de adaptação às condições ambientais hostis, como a pressão causada por FAXC. Não houve diminuição da cápsula nem alteração da carga da superfície das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com FAXC.

- A avaliação preliminar de citotoxicidade de FAXC frente a células humanas apontou ausência de toxicidade para a concentração ativa.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O isolamento dos componentes de FAXC já se encontra em andamento para identificação dos metabólitos responsáveis pela atividade biológica observada.

O isolamento da(s) substância(s) ativa(s) pode contribuir também para diminuir os índices de toxicidade, considerando que a fração obtida de um extrato é uma mistura complexa de vários compostos orgânicos.

Serão necessários a realização de mais ensaios que avaliem a toxicidade de FAXC para confirmar a segurança pelo efeito antifúngico observado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, T. et al. Isothermal Titration Calorimetry Studies of the Binding of a Rationally Designed Analogue of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S to Phospholipid Bilayer Membranes†. **Biochemistry,** v. 44, n. 6, p.2103-2112, fev. 2005.

ALBERTSON, G. D. et al. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrob Agents Chemother.,** v. 12, n. 40, p.2835-2841, dez. 1996.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology,** v. 16, n. 21, p.2161-2165, nov. 2006.

ALVAREZ, M. et al. The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. **Bmc Microbiology,** v. 9, n. 1, p.51-60, 2009.

ALVES, J. C. O. et al. Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus*. **Frontiers In Microbiology,** v. 8, p.2419-2424, 7 dez. 2017.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. FLAVONOIDS **Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Ranton: Taylor & Francis Group, 2006.

ARAUJO, Glauber de S. et al. Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. **Plos One,** v. 7, n. 1, p.29561, 12 jan. 2012.

ARAÚJO, S. S. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 170, p.16-19, jul. 2015.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology,** v. 46, n. 2, p.446-475, fev. 2008.

BARREIRO, E. J; BOLSANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova,** v. 32, n. 3, p. 679-688, Abr 2009.

BARROS, L. et al. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. **Industrial Crops And Products,** v. 41, p.41-45, jan. 2013.

BASSO JR., L. R., et al. Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**v.70, p.1396-1407, Jan 2015.

BAUMGART, A. M. K. **Avaliação do potencial antimicrobiano das espécies vegetais cipura paludosa e chenopodium ambrosioides**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2014.

BAVA, A.J; ARECHAVALA, A.I; ROBLES, A.M. Pronóstico de la criptococosis asociadas al SIDA a través de algunas pruebas de laboratorio. **Rev Argent Infectol,** n. 12, p.3-7, 1999.

BENNETT, J. E. et al. A Comparison of Amphotericin B Alone and Combined with Flucytosine in the Treatment of Cryptoccal Meningitis. **New England Journal Of Medicine,** [s.l.], v. 301, n. 3, p.126-131, 19 jul. 1979. Journal of Medicine

BERG, J. M; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L. Biochemistry. 5. ed. New York: **W H Freeman,** 2002.

BLAU, I. W.; FAUSER, A. A..Review of comparative studies between conventional and liposomal amphotericin B (AmbisomeR) in neutropenic patients with fever of unknown origin and patients with systemic mycosis. **Mycoses,** v. 43, n. 9-10, p.325-332, 2 out. 2000. Wiley-Blackwell.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology,** v. 147, n. 4, p.891-907, 1 abr. 2001. Microbiology Society.

BOSSCHE, H V. et al. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob Agents Chemother.,** v. 12, n. 36, p.2602-2610, dez. 1992.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays,** v. 28, n. 8, p.799-808, 2006.

BRATTON, E. W. et al. Approaches to Antifungal Therapies and Their Effectiveness among Patients with Cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 6, n. 57, p.2485-2495, jun. 2013

BREIVIK, O. N.; OWADES, J. L. - Spectrophotometric semimicrodetermination of ergosterol in yeast. J. agric. **Food Chem**., 5: 360-363, 1957

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).** Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química Araraquara 2010.

BYRNES, E. J. et al. First Reported Case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: Implications for Travel-Associated Acquisition of an Emerging Pathogen. **Plos One,** v. 4, n. 6, p.5851-5862, 10 jun. 2009.

CÁCERES, A. et al. Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on Smilax domingensis in Guatemala. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 22, n. 2, p.239-248, abr. 2012.

CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infectious Diseases,** v. 2, n. 9, p. 550-563, Sep 2002

CARRASCO, H. et al. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, v. 17, n. 12, p.1002-1024, 19 jan. 2012.

CASTRO, S.B.R; LEAL, C.A.G.; FREIRE, F.R.; CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil agaist fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:756-760 2008.

CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. **Infect Immun,** v. 9, n. 72, p.4985-4995, set. 2004.

CHANG, Y. C. et al. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology,** v. 64, n. 3, p.614-629, maio 2007.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection And Immunity,** v. 77, n. 1, p.120-127, 20 out. 2008.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Diseases Clinical of North American,** v. 20, n. 3, p. 507–544, Sep 2006.

CHERNIAK R.; MORRIS, L. C.; BELAY ,T.; SPITZER, E. D.; CASADEVALL A. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. **Infect Immun**. 1995 May;63(5):1899–1905.

CHEN, S. C.-a. et al. Clinical Manifestations of Cryptococcus gattii Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. **Clinical Infectious Diseases,** v. 55, n. 6, p.789-798, 5 jun. 2012.

CHEN, S. et al. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases,** v. 31, n. 2, p.499-508, ago. 2000.

CHEN, S. C..; MEYER, W.; SORRELL, T. C.. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 27, n. 4, p.980-1024, out. 2014.

CHUN, C. D.; BROWN, J. C..; MADHANI, H. D. A Major Role for Capsule-Independent Phagocytosis-Inhibitory Mechanisms in Mammalian Infection by *Cryptococcus neoformans*. **Cell Host & Microbe,** v. 9, n. 3, p.243-251, mar. 2011.

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.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, CLSI document M07-A8. 8th. **Clinical and Laboratory Standards Institute** Wayne, PA, 2009.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease,** v. 9, n. 1, p.219-238, 24 jan. 2014.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica** 2013; 2013: 675213.

CORTI, M et al. Magnetic resonance imaging findings in AIDS patients with central nervous system cryptococcosis. **Revista Iberoamericana de Micologia,** v. 25, n. 4, p.211-214, 2008.

CRONK, Q. C. B.; NEEDHAM, I.; RUDALL, P. J. Evolution of Catkins: Inflorescence Morphology of Selected Salicaceae in an Evolutionary and Developmental Context. **Front Plant Sci.** 2015; 6: 1030.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità,** v. 4, n. 43, p.348-361, 2007.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet,** v. 362, n. 9390, p.1142-1151, out. 2003

DEVI, W. R; SINGH, B.; SINGH, C. B. Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos. **BMC Complement Altern Med**. V.13: P.155 2013.

DROMER, F. et al. Comparison of the Efficacy of Amphotericin B and Fluconazole in the Treatment of Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus-Negative Patients: Retrospective Analysis of 83 Cases. **Clinical Infectious Diseases,** v. 22, n. 2, p.154-160, 1 maio 1996. Oxford University Press (OUP).

DROMER, F. et al. Epidemiology of Cryptococcosis in France: A 9-Year Survey (1985-1993). **Clinical Infectious Diseases,** v. 23, n. 1, p.82-90, 1 jul. 1996.

DROMER, F. et al. Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study. **Plos Medicine,** v. 4, n. 2, p.297-308, 6 fev. 2007.

ERNST, M.E. et al. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagn. Micr Infec. Dis**., v.26, n.3-4, p.125-131, 1996.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from Phytolacca tetramera Hauman. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 71, n. 10, p.1720-1725, 24 out. 2008.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **Am J Clin Nutr,** Si, v. 5, n. 57, p.779-785, 1993.

EISENBRAND, G et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology,** [s.l.], v. 40, n. 2-3, p.193-236, fev. 2002.

FASOLI, M. O. F et al. 19F nuclear magnetic resonance study of fluoropyrimidine metabolism in strains of Candida glabrata with specific defects in pyrimidine metabolism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 10, n. 34, p.1996-2006, 1990.

FERNANDES, R. R. **ANÁLISE PROTEÔMICA DE Paracoccidioides brasiliensis DURANTE ESTRESSE OXIDATIVO.** 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Góias, Goiânia, 2017.

FERREIRA, G. F.; et al. "The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*." **J Antimicrob Chemother** 68 (8):1801-11 2013.

FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 59, n. 8, p.4600-4609, 26 maio 2015.

FERREIRA-PAIM, K. et al. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycoses,** v. 54, n. 5, p.294-300, 19 maio 2010.

FIRMO, W. C., A.; et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq**., v. 18, n. especial, dez. 2011.

FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p.1360-1364, out. 2005.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans var. grubii: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates**. J Clin Microbiol**., v. 3, n. 37, p.838-840, mar. 1999.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Ge Jornal Português de Gastrenterologia,** v. 20, n. 5, p.199-206, set. 2013.

GALE, E. F.. Nature and development of phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*. **Microb Physiol.,** n. 27, p.277-320, 1986.

GANOT, N. et al. Anticancer Metal Complexes: Synthesis and Cytotoxicity Evaluation by the MTT Assay. **Journal of Visualized Experiments,** n. 81, p.50767, 10 nov. 2013.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological Evidence for Dormant *Cryptococcus neoformans* Infection. **J Clin Microbiol,** v. 10, n. 37, p.3204-3209, out. 1999

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **Fems Immunology & Medical Microbiology,** v. 64, n. 2, p.147-161, 10 out. 2011.

GILES, S. S. et al. *Cryptococcus neoformans* Mitochondrial Superoxide Dismutase: an Essential Link between Antioxidant Function and High-Temperature Growth. **Eukaryotic Cell,** v. 4, n. 1, p.46-54, 1 jan. 2005.

GILES, S. S. et al. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. **Eukaryotic Cell,** v. 5, n. 9, p.1447-1459, 1 set. 2006.

GRANGER, D L; PERFECT, J R; DURACK, D T. Virulence of *Cryptococcus neoformans.* Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **Journal of Clinical Investigation,** v. 76, n. 2, p.508-516, 1 ago. 1985.

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.

GRUSZECKI, W. I. et al. Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. **Cell Mol Biol Lett.,** v. 1, n. 8, p.161-170, 2003.

GUERRA, C. R. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p.582-590, ago. 2012.

GUIRAO-ABAD, J. P. et al. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology,** v. 307, n. 4-5, p.241-248, jun. 2017.

GULLO, F. P. Antifúngicos Naturais e Sintéticos: **Estudo dos Mecanismos de Ação em Sistema de Infecção i*n vitro* Empregando Cepas de *Cryptococcus***.2012.140 F.Dissertação (Mestrado Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2012.

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.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics And Biology,** v. 78, p.16-48, maio 2015.

HANSONG, M. A. et al. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. **Current Biology,** v. 16, n. 21, p.2156-2160, nov. 2006. Elsevier BV

HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. **Drug Discovery Today** Volume 13, Numbers 19/20 October 2008.

HITCHCOCK, C. A. et al. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol.,** v. 1, n. 25, p.29-37, fev. 1987

HORSBURGH, C. R.; KIRKPATRICK, C. H.. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: Experience with twenty-one patients. **The American Journal of Medicine,** v. 74, n. 1, p.23-29, jan. 1983.

HUNG, W. et al. Comparative Study of the Condensing Effects of Ergosterol and Cholesterol. **Biophysical Journal,** v. 110, n. 9, p.2026-2033, maio 2016.

HUSAIN, S; WAGENER, M M; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerg Infect Dis.,** Si, v. 3, n. 7, p.375-381, maio/jun. 2001.

HUSTON, S. M.; MODY, C. H.. Cryptococcosis: An Emerging Respiratory Mycosis. **Clinics In Chest Medicine,** v. 30, n. 2, p.253-264, jun. 2009

INGLIS, D. O.; SKRZYPEK, M. S.; LIAW, E.; MOKTALI, V.; SHERLOCK, G.; STAIICH, J. E. Literature-Based Gene Curation and Proposed Genetic Nomenclature for *Cryptococcus.* **Eukaryot Cell.** 2014 Jul; 13(7): 878–883.

JI, H. F.; LI, X. G.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Rep.** 2009 Mar; 10(3): 194–200.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.,** v. 7, n. 39, p.1526-1529, jul. 1995.

KAPEWANGOLO, P. et al. Triterpenoids from Ocimum labiatum Activates Latent HIV-1 Expression In Vitro: Potential for Use in Adjuvant Therapy. **Molecules,** n. 10, p.1703-1703, out. 2017.

KEELE, D. J. et al. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and Cryptococcus neoformans using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 41, n. 3, p.121-126, nov. 2001.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol Δ8→7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **Fems Microbiology Letters,** v. 1-2, n. 122, p.39-42, 15 set. 1994.

KELLY, S. L. et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. **Febs Lett.,** v. 2, n. 400, p.80-82, 2 jan. 1997.

KIERTIBURANAKUL, S. et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. **International Journal of Infectious Diseases,** v. 10, n. 1, p.72-78, jan. 2006.

KHAN, M. S.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **Amb Express,** v. 3, n. 1, p.54-59, 2013.

KIM, J. H. et al. A Vanillin Derivative Causes Mitochondrial Dysfunction and Triggers Oxidative Stress in *Cryptococcus neoformans*. **Plos One,** v. 9, n. 2, p.89122, 20 fev. 2014

KLEPSER, M. E. et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 5, n. 42, p.1207-1212, maio 1998.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery**. Nat Rev Drug Discov** 4: 206–220, 2005.

KWON-CHUNG, K. J.. A new genus, filobasidiella, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia,** v. 6, n. 67, p.1197-1200, nov. 1975.

KWON-CHUNG, K J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia.** v. 4, n. 68, p.821-833, jul./ago. 1976.

KWON-CHUNG, K J; BENNETT, J e. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Am J Epidemiol.,** v. 4, n. 108, p.208-212, out. 1978.

KWON-CHUNG, K J; BENNETT, J e. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am J Epidemiol.,** v. 1, n. 120, p.123-130, jul. 1984.

KWON-CHUNG, K. J. et al., *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis **Cold Spring Harb Perspect Med** v. 4 2014: 019760

KUMARI, P. et al. Antifungal and Anti-Biofilm Activity of Essential Oil Active Components against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. **Frontiers in Microbiology,** v. 8, p.2161-2175, 7 nov. 2017.

KWON-CHUNG, K J; BENNETT, J e. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am J Epidemiol.,** v. 1, n. 120, p.123-130, jul. 1984.

LEVITZ, S M; DIBENEDETTO, D J. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology,** v. 2, n. 142, p.659-665, 15 jan. 1989.

LEVITZ, S. M. et al. *Cryptococcus neoformans* Resides in an Acidic Phagolysosome of Human Macrophages. **American Society for Microbiology,** v. 2, n. 67, p.885-890, 1999.

LIMA, F. R. **Espécies de *Cryptococcus* obtidas de isolados clínicos e ambientais da cidade de Campinas-SP: genotipagem e avaliação da suscetibilidade in vitro frente a agentes antifúngicos isolados e em diferentes combinações**. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p.69-105, out. 2006.

LIOCHEV, S. I.. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 60, p.1-4, jul. 2013.

LIU, T B; PERLIN, D S; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence,** v. 2, n. 3, p.173-181, mar./abr. 2012.

LIU, T. et al. Brain Inositol Is a Novel Stimulator for Promoting *Cryptococcus* Penetration of the Blood-Brain Barrier. **Plos Pathogens,** v. 9, n. 4, e1003247, 4 abr. 2013. Public Library of Science (PLoS).

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. **Clinical Infection Disease**, v.36 (supp1), p.S31-S41, 2003.

LORTHOLARY, O. et al. Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. **Aids,** v. 20, n. 17, p.2183-2191, nov. 2006

LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 68, n. 11, p.2435-2444, 20 jun. 2013. Oxford University Press (OUP).

LUPETTI, A. et al., Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine,** v. 8, n. 2, p.76-81, 1 fev. 2002

MACHADO, M. et al. Criptococoma cerebral e pulmonar em paciente imunocompetente: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery,** v. 34, n. 04, p.335-337, 2 out. 2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms.** 11. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2011.

MAGESTE, A. B. **Aplicação da microcalorimetria e do espalhamento de raios-x a baixos ângulos no estudo da interação poli (óxido de etileno) e dodecil sulfato de sódio: efeito de cosolutos iônicos.** 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MANSOUR, M. K; LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. **Current Opinion In Microbiology,** v. 5, n. 4, p.359-365, ago. 2002.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das Angiospermas – Das Magnoliáceas às Flacurtiáceas.** Santa Maria: UFSM, 1997.

MASCHIO, A. et al. Leukocyte Recruitment in the Cerebrospinal Fluid of Mice with Experimental Meningitis Is Inhibited by an Antibody to Junctional Adhesion Molecule (Jam). **The Journal of Experimental Medicine,** v. 190, n. 9, p.1351-1356, 1 nov. 1999.

MAXSON, M. E. et al. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal Genetics and Biology,** v. 44, n. 3, p.180-186, mar. 2007.

MAY, R. C.; et al *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**. 2016 Feb; 14(2): 106–117.

MCCLELLAND, C. M et al. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans.* **Trends in Microbiology,** v. 12, n. 5, p.208-212, maio 2004.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A.. Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes. **Infection and Immunity,** v. 74, n. 3, p.1500-1504, 22 fev. 2006.

MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiology,** v. 8, n. 12, p.1613-1631, dez. 2013.

MELO, P.S; et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *in vitro* **Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-543, 2000.

MEZZARI, A. et al. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **J Infect Control,** v. 3, n. 2, p.135-139, 2013.

MIRZA, S. A. et al. The Changing Epidemiology of Cryptococcosis: An Update from Population-Based Active Surveillance in 2 Large Metropolitan Areas, 1992–2000. **Clinical Infectious Diseases,** v. 36, n. 6, p.789-794, 15 mar. 2003

MITCHELL, D. H. et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: Influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infectious Diseases,** v. 3, n. 20, p.611-616, mar. 1995.

MORAIS-BRAGA, M. F.B. et al. Phenolic composition and medicinal usage of Psidium guajava Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence?. **Saudi Journal of Biological Sciences,** v. 24, n. 2, p.302-313, fev. 2017.

MOSADDIK, M. A.; et al. Screening of some Australian *Flacourtiaceae* species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine** Volume 11, Issue 5, P. 461–466, 2004

MUKHOPADHYAY, S. L. et al. Central nervous system infection due to *Cryptococcus gattii* sensu lato in India: Analysis of clinical features, molecular profile and antifungal susceptibility. **Mycoses,** v. 60, n. 11, p.749-757, 23 jul. 2017

NASSER, N.; NASSER FILHO, N.; VIEIRA, A. G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 86, n. 6, p.1178-1180, dez. 2011.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.**Journal Nature Productis**, v. 79, n. 3, p 629–661, 2016.

NISHIKAWA M.M., et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol** 2003 Jan; 41(1):73-7.

NJANJE, I. et al. Defatting of acetone leaf extract of *Acacia karroo* (Hayne) enhances its hypoglycaemic potential. **Bmc Complementary and Alternative Medicine,** v. 17, n. 1, p.1-2, 23 out. 2017.

NOSANCHUK, J. D.; et al. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. **Antimicrob Agents Chemother** 43 (2):233-9 1999.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin and monoclonal antibody binding. **Infect Immun**, v 65(5):1836-41. maio 1997.

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.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology,** v. 11, n. 6, p.272-279, jun. 2003.

ODDS, F. C.. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 52, n. 1, p.1-1, 12 jun. 2003.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. **Plos Pathogens,** v. 6, n. 6, p.1000953-1, 17 jun. 2010.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan Cells Confer Protection from Phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* Infections. **Eukaryotic Cell,** v. 11, n. 6, p.820-826, 27 abr. 2012.

OLIVEIRA, L. F. S. et al. Antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* strains and genotoxicity assessment in human leukocyte cells of *Euphorbia tirucalli* L. **Braz J Microbiol,** v. 4, n. 45, p.1349-1355, 4 mar. 2014.

OLSSON, M; RUNDQUIST, I; BRUNK, U. Flow cytofluorometry of lysosomal acridine orange uptake by living cultured cells. Effect of trypsinization and starvation. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand** A., v. 4, n. 95, p.159-165, 1987.

PAPPAS, P. G., et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Infectious Diseases Society of America**.Clinical Infectious Diseases,** v. 48, n. 5, p. 503–535. Mar 2009.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-hiv-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association,** n. 124, p.61-76, 2013.

PARK, S. J.; MEHRAD, B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 22, n. 4, p.535-551, 1 out. 2009. American Society for Microbiology.

PARK, B. J et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids,** v. 23, n. 4, p.525-530, fev. 2009.

PARVEEN, M; GHALIB, R. M. Flavonoids and Antimicrobial Activity of Leaves of *Xylosma Longifolium.* **J. Chil. Chem. Soc**. vol.57 no.1 mar. 2012

PERALTA, M. A. et al. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. **Phytomedicine,** v. 22, n. 11, p.975-980, out. 2015.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F.. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. **Clinical Infectious Diseases,** v. 35, n. 9, p.1073-1080, nov. 2002.

PERFECT, J. R., et al Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 Update by the infectious. **Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases,** v.50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010.

PERICOLINI, E. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cellular Microbiology,** v. 8, n. 2, p.267-275, fev. 2006.

PFEIFFER, T.; ELLIS, D. Environmental Isolation of *Cryptococcus neoformans/gattii* from California. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 4, p.929-930, 1 abr. 1991.

PHILIPPSEN, A. F **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler, Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato).**2010. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Parané, Curitiba 2010.

PHILIPPSEN, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana das cascas das raízes de Xylosma ciliatifolia (Clos) Eichler (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**.V.18 N.2 P.258-267, 2013.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida, Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology,** v. 58, n. 11, p.1454-1462, 9 jul. 2009.

POWDERLY, W. G., Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clin Infect Dis.,** Si, v. 5, n. 17, p.837-842, nov. 1993.

RAUDINO, A.; SARPIETRO, M.; PANNUZZO, M. The thermodynamics of simple biomembrane mimetic systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences,** v. 3, n. 1, p.15-38, 2011.

REFLORA (Org.). **Flora do Brasil.** 2017. disponível em: http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB14394. Acesso em 18 de outubro de 2017, 14:44.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 100, n. 1-2, p.80-84, ago. 2005.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Systemic Fungal Infections in Patients with human inmunodeficiency virus. **Actas Dermo-sifiliográficas** (english Edition), v. 105, n. 1, p.5-17, jan. 2014

RONOT, X.; et al. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biology of the cell** Volume 57, Issue 1 1986 Pages 1–7

SAAG, M. S et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.,** v. 4, n. 30, p.708-710, 20 abr. 2000.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology,** v. 7, n. 11, p.1297-1313, nov. 2012.

SANTOS, A. T. B.; ARAÚJO, T. F. S.; SILVA, L. C. N.; et al Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Front Microbiol.** 2015; 6: 13**.**

SANTOS, J. R. A. et al. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 56, n. 5, p.2553-2558, 30 jan. 2012. American Society for Microbiology.

SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **Plos One,** v. 9, n. 11, p.1-14, 13 nov. 2014.

SANTOS, W. R. A. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 103, n. 8, p.813-818, dez. 2008.

SARMA, M. et al. Synthesis and antiproliferative activity of some novel derivatives of diospyrin, a plant-derived naphthoquinonoid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.3672-3677, 1 jun. 2007.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 75, n. 2, p.213-267, 1 jun. 2011.

SHEKHOVA, E.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A. Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy,** v. 61, n. 11, p.00978-17, 28 ago. 2017.

SINGH, N. et al. Pulmonary Cryptococcosis in Solid Organ Transplant Recipients: Clinical Relevance of Serum Cryptococcal Antigen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p.12-18, 15 jan. 2008.

SILVA, K. P. **Avaliação da atividade antifúngica e mecanismo de ação de compostos naturais e sintéticos em leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*.** 2014. 74 F. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2014.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p.1683-1693, 3 maio 2010.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento 5ª edição, **Editora da UFRGS**, Florianópolis, Porto Alegre, 1102p. 2004.

SMALL, J M; MITCHELL, T G. Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Infect Immun.,** v. 12, n. 57, p.3751-3756, dez. 1989.

SOARES, B. M. et al. *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation. **Photochemistry and Photobiology,** v. 87, n. 2, p.357-364, 17 dez. 2010.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J.A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, RS. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: RiMA: Novo Ambiente, 2006. 350 p.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology,** n. 39, p.155-168, 2001.

SORRELL, T. C. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between Cryptococcus neoformans var. grubii strain H99 and Cryptococcus gattii strain R265. **Microbes and Infection,** v. 18, n. 1, p.57-67, jan. 2016. Elsevier BV.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with thetwo varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Infectious Diseases,** Si, v. 1, n. 21, p.28-32, jul. 1995.

STANO, P. et al. App1: An Antiphagocytic Protein That Binds to Complement Receptors 3 and 21. **J Immunol.,** v. 1, n. 182, p.84-91, 01 jan. 2009.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences,** v. 98, n. 26, p.15245-15250, 11 dez. 2001

STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-Associated Plasminogen Binding of *Cryptococcus neoformans* Promotes Extracellular Matrix Invasion. **Plos One,** v. 4, n. 6, p.5780-5780, 3 jun. 2009.

STUKER, C. Z. **Prospecção fitoquímica e atividade biológica de plantas medicinais da família Asteracea do bioma Pampa.** 2012. 224 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R.. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery,** v. 6, n. 8, p.662-680, ago. 2007. Springer Nature.

TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TAPIA, C.; CORREA, N. Género *Cryptococcus*. **Revista Chilena de Infectología,** v. 31, n. 6, p.719-720, dez. 2014. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT).

TELLO, M. et al. Criptococosis. **Revista médica Risaralda Pereira**, v. 19, n. 2, p. 147-153, Jul 2013.

TEMPESTI, T. C. et al. Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on Candida albicans. **Medicinal Chemistry Research,** v. 21, n. 9, p.2217-2222, 19 jul. 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., **Porto Alegre: Artmed**, 2010.

TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell stainig with acridine orange differentites leukocyte subpopulation. **Method in Cell Biology**, vol 41, 1994.

TRUONG, B. N. et al. Chemical constituents from *Xylosma longifolia* and their anti-tubercular activity. **Phytochemistry Letters,** v. 4, n. 3, p.250-253, set. 2011.

ÚBEDA, A. C. et al. Meningoencefalitis criptocócica. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad en la era pre - y pos-TARGA. **Medicina Clínica,** v. 146, n. 9, p.397-401, maio 2016.

UFRGS. **Flora digital.** 2017. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12832>. Acesso em: 15 out. 2017.

VAN DER HORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N Engl J Med.,** v. 1, n. 337, p.15-21, 3 jul. 1997

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 46, n. 11, p.3394-3400, 1 nov. 2002.

VASHISTH, P. et al. Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers,** v. 28, n. 6, p.652-665, 8 set. 2013.

VECCHIARELLI, A. et al. Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology,** v. 11, n. 2, p.130-137, ago. 1994.

VELAGAPUDI, R. et al. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection And Immunity,** v. 77, n. 10, p.4345-4355, 20 jul. 2009

VELOSO, A. C. G. **Termodinâmica de interação intermolecular entre nanoblenda de polidiacetileno-copolímero tribloco e surfactantes iônicos**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

VILLENA, S. N. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology,** v. 10, n. 6, p.1274-1285, jun. 2008.

VIRÁG, L. et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology Letters,** v. 140-141, p.113-124, abr. 2003

WANG, M.; LI, C.; LU, S. Origin and evolution of *MIR1444* genes in Salicaceae. **Sci Rep**. 2017; 7: 39740.

XUE, C et al. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe.,** v. 4, n. 1, p.263-273, 14 jul. 2007.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology,** v. 10, n. 10, p.2043-2057, out. 2008.

ZARAGOZA, Oscar et al. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans.* **Advances In Applied Microbiology**, p.133-216, 2009.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. **Plos Pathogens,** v. 6, n. 6, p.1000945-1000959, 17 jun. 2010.

WAGER, C. M. L. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Frontiers In Microbiology,** v. 7, p.1-2, 9 fev. 2016. Frontiers Media SA.

WANG', Y.; CASADEVALLL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in Presence of L-Dopa Decreases Its Susceptibility to Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 11, n. 38, p.2648-2650, nov. 1994.

WATKINS, R. A.; KING, J. S.; JOHNSTON, S. A. Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. **Microorganisms,** v. 4, n. 5, p.65-76, 2017.

WICKES, B. L. et al. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans:* Association with the a-mating type. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** Usa, v. 93, p.7327-7331, jul. 1996

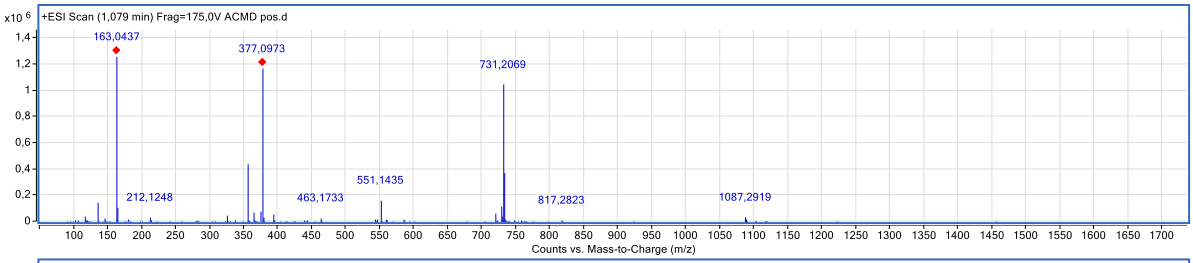
WILLIAMSON, P. R. Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a Laccase. **Journal of Bacteriology**, v. 3, n. 176, p.656-664, fev. 1994.

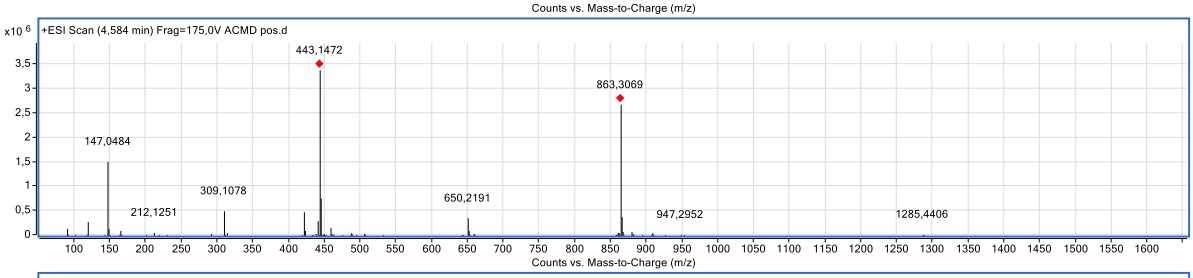
WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A.. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clin Microbiol Rev.,** v. 2, n. 11, p.382-402, abr. 1998.

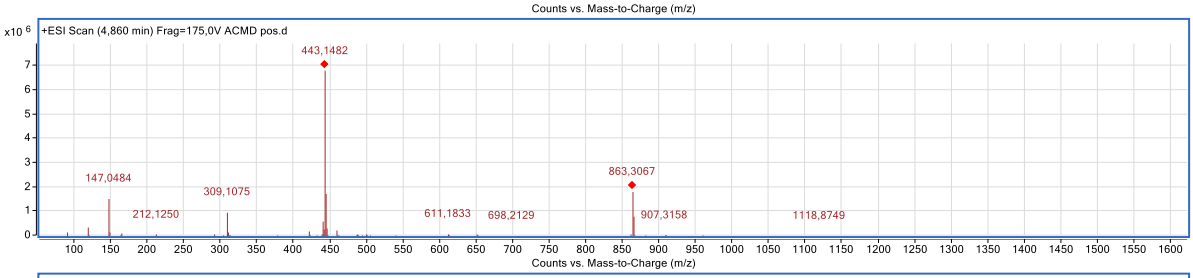
WHITE, T. C.. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.,** v. 7, n. 41, p.1488-1494, jul. 1997.

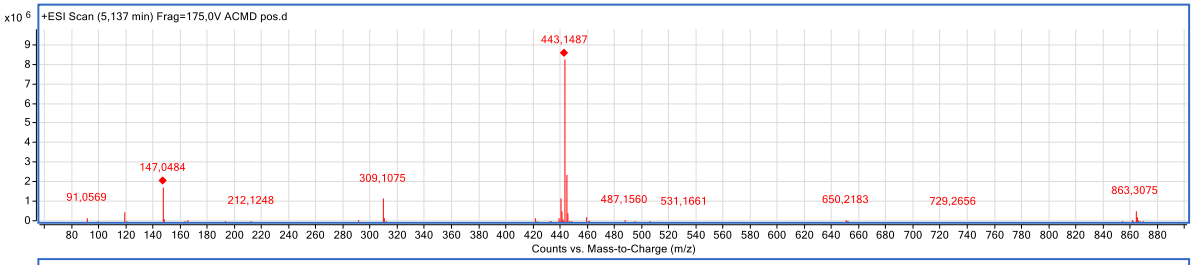
APENDICES:

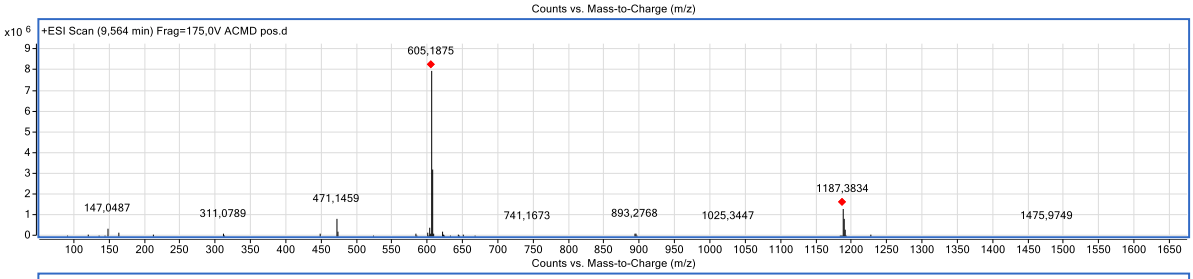
Cromatogramas modo positivo CLAE-LS, e CLAE-LS-UV respectivamente

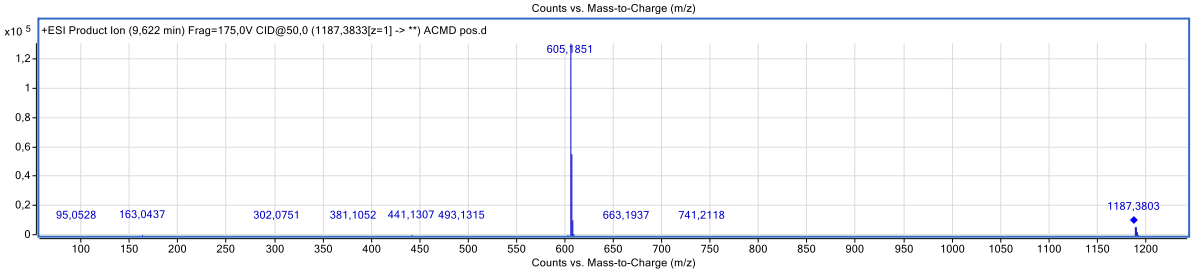


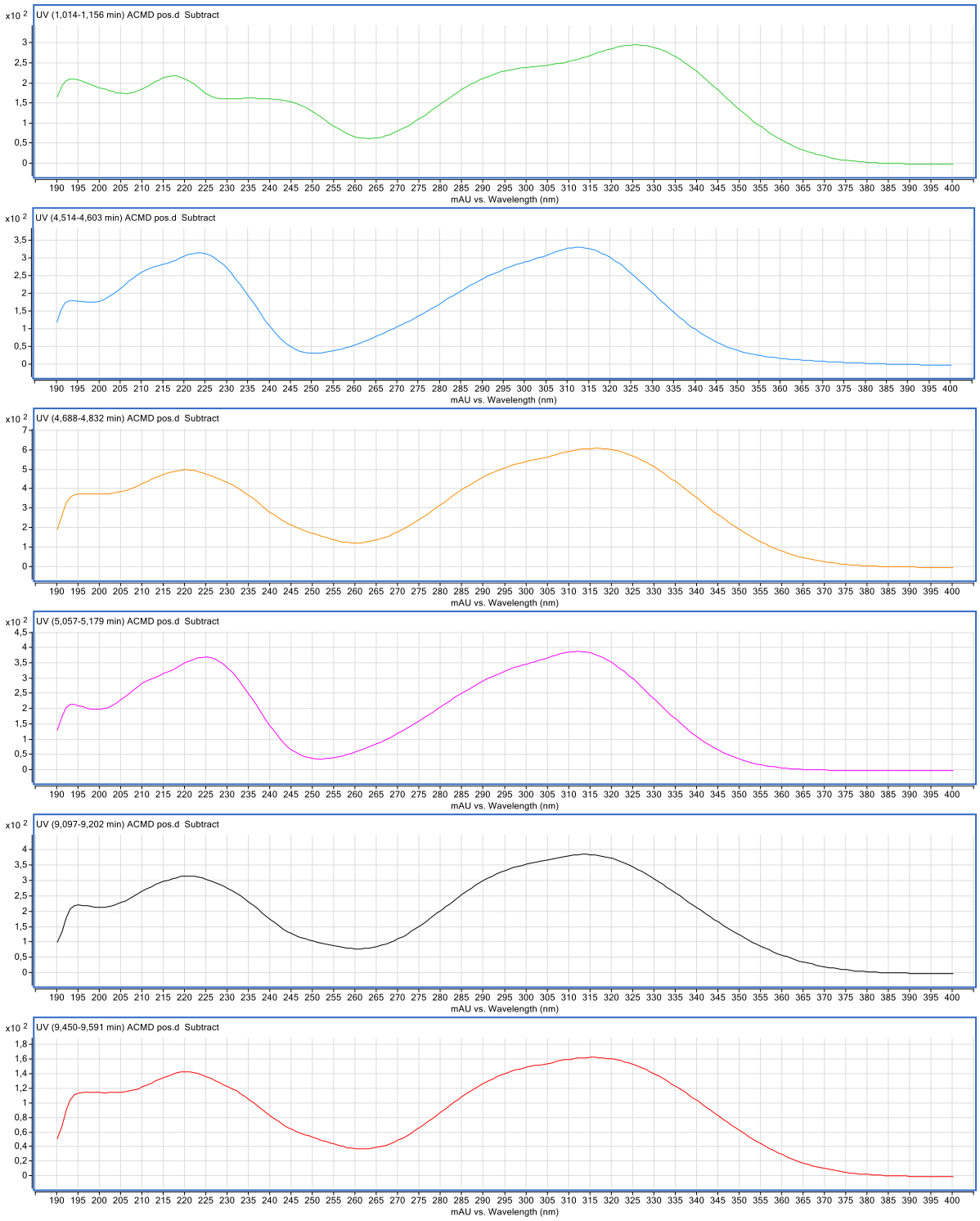











UV (1,014-1,156 min) ACMD pos.d Subtract
UV (4,514-4,603 min) ACMD pos.d Subtract
UV (4,688-4,832 min) ACMD pos.d Subtract
UV (5,057-5,179 min) ACMD pos.d Subtract
UV (9,097-9,202 min) ACMD pos.d Subtract
UV (9,450-9,591 min) ACMD pos.d Subtract
x10 2
mAU vs. Wavelength (nm)

ANEXOS

Aceite do Comitê de Ética em pesquisa para obtenção das células mononucleares humanas.

UFJF - UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos de genotoxicidade in vitro da planta Xylosma ciliatifolia (Clos) Eichler (Salicaceae)

Pesquisador: Leonardo Meneghin Mendonça

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70972117.0.0000.5147

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.215.172

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto esta detalhada de forma objetiva e descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4. X

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios descritos em conformidade com a natureza e propósitos da pesquisa. O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa e benefícios esperados estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios estão de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida,com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes,assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades,garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa,contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens:IV letra b; IV.3 letras a,b,d,e,f,g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

Recomendações:

1- No campo "Hipótese" , rever a frase

" A exposição humana à planta Xylosma ciliatifolia, ou à extratos de partes dessa planta ?????, causar danos à saúde humana". A frase está sem sentido.

2- No campo Objetivo Secundário, os itens listados são contribuições, resultados esperados da pesquisa. Objetivos devem ser alcançados por meio da metodologia proposta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em

pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS, segundo este relator, aguardando a análise do Colegiado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_951872.pdf	10/07/2017 08:32:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio_Mariany.pdf	10/07/2017 08:22:05	Leonardo Meneghin Mendonça	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Mariany.pdf	10/07/2017 08:20:47	Leonardo Meneghin Mendonça	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_Infraestrutura_biorrepositorio_Mariany.pdf	10/07/2017 08:18:56	Leonardo Meneghin Mendonça	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP_Mariany.pdf	10/07/2017 08:17:29	Leonardo Meneghin Mendonça	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

JUIZ DE FORA, 11 de Agosto de 2017

Assinado por:
Patrícia Aparecida Fontes Vieira
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br