



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Dissertação de Mestrado

**“ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SINTÉTICOS: ESTUDO DOS
MECANISMOS DE AÇÃO EM SISTEMA DE INFECÇÃO *IN*
VITRO EMPREGANDO CEPAS DE *Cryptococcus*”**

Fernanda Patrícia Gullo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**“ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SINTÉTICOS: ESTUDO DOS
MECANISMOS DE AÇÃO EM SISTEMA DE INFECÇÃO *IN*
VITRO EMPREGANDO CEPAS DE *Cryptococcus*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

Fernanda Patrícia Gullo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara, 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP. Recebeu o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do PADC-FCFAR e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCTif).

“Quando me amei de verdade, compreendi que em qualquer circunstância, eu estava no lugar certo, na hora certa, no momento exato.

E então, pude relaxar.

Hoje sei que isso tem nome... Auto-estima.

Quando me amei de verdade, pude perceber que minha angústia, meu sofrimento emocional, não passa de um sinal de que estou indo contra minhas verdades.

Hoje sei que isso é... Autenticidade.

Quando me amei de verdade, parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.

Hoje chamo isso de... Amadurecimento.

Quando me amei de verdade, comecei a perceber como é ofensivo tentar forçar alguma situação ou alguém apenas para realizar aquilo que desejo, mesmo sabendo que não é o momento ou a pessoa não está preparada, inclusive eu mesmo.

Hoje sei que o nome disso é... Respeito.

Quando me amei de verdade comecei a me livrar de tudo que não fosse saudável... Pessoas, tarefas, tudo e qualquer coisa que me pusesse para baixo. De início minha razão chamou essa atitude de egoísmo.

Hoje sei que se chama... Amor-próprio.

Quando me amei de verdade, deixei de temer o meu tempo livre e desisti de fazer grandes planos, abandonei os projetos megalômanos de futuro.

Hoje faço o que acho certo, o que gosto, quando quero e no meu próprio ritmo.

Hoje sei que isso é... Simplicidade.

Quando me amei de verdade, desisti de querer sempre ter razão e, com isso, errei muitas menos vezes.

Hoje descobri a... Humildade.

Quando me amei de verdade, desisti de ficar revivendo o passado e de preocupar com o futuro. Agora, me mantenho no presente, que é onde a vida acontece.

Hoje vivo um dia de cada vez. Isso é... Plenitude.

Quando me amei de verdade, percebi que minha mente pode me atormentar e me decepcionar. Mas quando a coloco a serviço do meu coração, ela se torna uma grande e valiosa aliada.

Tudo isso é... Saber viver!!!”

Charlie Chaplin

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida
com paixão, perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve.... A vida é muito
para ser insignificante”. (Charlie Chaplin)

DEDICATORIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Nivaldo** e **Fátima**, pelo amor incondicional, apoio, ensinamentos e por não medirem esforços nas realizações dos meus sonhos. Por acreditarem e me incentivarem em todos os momentos e de uma maneira forte e acolhedora e por estarem ao meu lado vencendo obstáculos e comemorando as vitórias. Vocês são exemplos e a base da minha vida. Amo vocês!

Ao meu namorado **Evandro**, pelo companheiro que é, por todo amor, por ter embarcado comigo em meus sonhos, não deixando que eu desistisse deles e por me fazer ser uma pessoa mais forte e cada vez melhor. Muito obrigada, por tudo, por estar cada dia ao meu lado e fazer de cada momento um momento especial. Amo você!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, pela saúde, pela família e força em todos os momentos de minha vida.

Aos **meus pais** por todo incentivo, dedicação, amor e confiança que depositam em mim.

Ao **Evandro**, pelos estímulos nos momentos difíceis, por todo carinho e companheirismo. Com certeza, você foi peça essencial para a conclusão deste trabalho fazendo dos meus sonhos os seus.

À **Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida**, muito obrigada pela confiança, orientação, dedicação, muito mais que orientadora, obrigada pela amizade, pelo exemplo de pessoa e profissional. Faltam palavras para agradecer pelo enorme conhecimento e bagagem que me ofereceu desde a graduação. Muito obrigada por tudo!

À **Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini**, muito obrigada pela oportunidade e confiança, por fazer parte da evolução do meu conhecimento científico, por toda ajuda e colaboração em todas as etapas deste trabalho e por ser exemplo de profissionalismo. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Christiane Pienna Soares**, pela participação e sugestões na banca de qualificação, assim como pelo enorme apoio para a realização e continuidade deste trabalho.

À **Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva**, agradeço as sugestões, correções e participação na banca de qualificação e por toda colaboração e parceria.

Ao **Prof. Dr. Luis Octávio Regasini**, muito obrigada pela participação na banca de defesa, por todo apoio, incentivo, por não medir esforços em ajudar, ensinar e melhorar nossos trabalhos. Com certeza sua participação foi essencial para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maristela Pereira** pela disponibilidade da participação e colaboração na banca de defesa.

Aos meus queridos amigos do **Laboratório de Micologia Clínica**, não tenho palavras para descrever o quanto vocês são importantes, somente fazendo parte dessa família para entender o quanto cada pessoa é especial e única. Agradeço, de coração, todos os dias que convivemos e iremos conviver, independente se o dia for um daqueles de muito trabalho ou de muitas risadas, ou então aqueles dias que parece que o universo conspira contra, nunca estamos sozinhos. E olha que passamos muitos momentos.... felizes, tristes, tensos, já choramos de saudade, viajamos, brincamos, crescemos, quebramos a cabeça, mas sempre juntos, isso é o mais importante. Gostaria muito de agradecer cada um em especial: **Jana, Fer Sangalli, Thais, Julhiany, Liliana, Haroldo, Caroline (Panta), Ana Carolina (Carol Tattoo), Patrícia (Laranja), Suélen, Tatiane, Jaqueline, Aline, Natália, Danielle, Luciana e Kaila**. Agradeço também aos alunos de iniciação científica **Warley e Vanessa** e as estagiárias **Tamires e Juliana**.

À **Rosângela**, muito obrigada por tudo, pela mãezona que você é, por todas as palavras acolhedoras, conselhos, por todo aprendizado e pela alegria leva por onde passa.

À **Rosemira, Marisinha, Bel e Eliana**, agradeço pela colaboração, convivência e pelas boas risadas.

Em especial agradeço ao **Sr. Torres** e ao **Valter**, muito obrigada pela colaboração, amizade, confiança e em compartilhar este trabalho. É com muito carinho que dedico esse trabalho a vocês e agradeço pelo exemplo de pessoas e profissionais que vocês são.

Às minhas queridas amigas **Giovana, Thais e Carol**, agradeço muito por todos os nossos momentos, por toda a ajuda nos momentos mais difíceis, pela nossa linda amizade, pelas boas risadas, pelos conselhos, carinho e companheirismo. Cada uma de vocês tem uma luz especial; muito obrigada por compartilhar comigo mais uma de minhas conquistas. Apesar da distância dos últimos tempos, nossa amizade só se fortalece. Vocês são muito importantes na minha vida. Amo vocês!

Com muito carinho, deixei esse agradecimento por último, **Nayla** sem você tudo teria sido muito mais difícil! Mais que uma amiga, minha irmã de coração, que a anos compartilha comigo todos momentos importantes. Quero te agradecer por estar sempre comigo. Muito obrigada pela amizade, carinho e por toda a ajuda desses anos todos, me sinto muito orgulhosa em ter você como parte da minha história. Amo você!

Agradeço ao meu amorzinho, **Miguel**, um anjo que ganhei como sobrinho. Obrigada por me lembrar que vale muito apenas viver. Amo você!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	Pag 1
1.1 Infecções fúngicas sistêmicas	Pag 1
1.2 Criptococose	Pag 2
1.3 Fatores de virulência	Pag 5
1.4 Ecologia e epidemiologia.....	Pag 6
1.5 Tratamento e resistência a antifúngicos	Pag 12
1.6 Antifúngicos de origem natural com atividade para <i>Cryptococcus</i> spp	Pag 16
1.7 <i>Maytenus ilicifolia</i>	Pag 17
1.8 Chalconas	Pag 18
2. JUSTIFICATIVA.....	Pag 20
3. OBJETIVOS.....	Pag 21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	Pag 22
4.1 Identificação dos isolados ambientais	Pag 22
4.1.1 Identificação bioquímica de <i>Cryptococcus</i> spp	Pag 22
4.1.2 Extração do DNA genômico de <i>Cryptococcus</i> spp.....	Pag 23
4.1.3 Identificação molecular de <i>Cryptococcus</i> spp pela reação de PCR/RFLP	Pag 24
4.2 Ativação de <i>Cryptococcus neoformans</i> ao vivo	Pag 25
4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	Pag 25
4.3.1 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	Pag 25
4.3.2 Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	Pag 27
4.4 Avaliação da eficiência saneante das substâncias por curva de morte.....	Pag 27
4.5 Cultura de células.....	Pag 29
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade	Pag 29
4.5.2 Ensaio de adesão às células humanas.....	Pag 30
4.5.3 Estudo da adesão de <i>C. neoformans</i> em células humanas por meio de imunofluorescência.....	Pag 31
5. RESULTADOS.....	Pag 33
5.1 Isolamento e identificação de <i>Cryptococcus</i> em amostras ambientais	Pag 33
5.2 Reativação de <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>in vivo</i>	Pag 41
5.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	Pag 42
5.4 Determinação da ação fungicida de maitenina e pristimerina.....	Pag 45
5.5 Ensaio de citotoxicidade.....	Pag 47

5.6 Ensaio de adesão celular	Pag 60
6. DISCUSSÃO	Pag 66
7. CONCLUSÕES	Pag 81
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	Pag 83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag 84
CAPÍTULO II	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura 1. Estruturas químicas das substâncias puras extraídas da planta <i>Maytenus ilicifolia</i> , pristimerina e maitenina.....	Pag. 18
Figura 2- Estruturas químicas das chalconas sintéticas utilizadas neste trabalho, 3' chalc, 2,3 chalc e 3,4 chalc	Pag. 19
Figura 3- Resultados das amostras positivas para <i>Cryptococcus</i> em amostras coletadas em locais públicos do Município de Araraquara.....	Pag. 33
Figura 4- Perfis de PCR-RFLP dos tipos moleculares das espécies <i>C. neoformans</i> (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e <i>C. gattii</i> (VGI, VGII, VGIII e VGIV). Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas).....	Pag. 40
Figura 5- Produto da reação de PCR-RFLP pelas enzimas de restrição <i>HhaI</i> e <i>SauI</i> . Perfil molecular de 54 isolados ambientais. Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas).....	Pag. 40
Figura 6- Microscopia óptica em aumento de 40 X da suspensão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90012 em salina 0,85 %, mostrando as alterações morfológicas após a infecção de camundongos BalbC. Leveduras antes da infecção <i>in vivo</i> (A); Leveduras após a infecção <i>in vivo</i> (B)	Pag. 41
Figura 7- Microscopia óptica em aumento de 40 X, mostrando infecção de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012 em tecidos de fígado (A) e pulmão (B) extraídos de camundongo BalbC.....	Pag. 42
Figura 8- Curva de morte de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> ATCC 90012 em relação ao tempo de contato (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h) com pristimerina (MF2,5) e maitenina (MJ2) e anfotericina B (AMB) usada como controle positivo.....	Pag. 46
Figura 9- Curva de morte do isolado ambiental de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (M16.2) em relação ao tempo de contato (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h) com pristimerina (MF2,5), maitenina (MJ2) e anfotericina B (AMB) usada como controle positivo	Pag. 46
Figura 10- Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células tumorais A549 (pneumócitos humanos tipo II), assim como, a doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.....	Pag. 49
Figura 11- Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células HepG2 (células de hepatoma humano) assim como, a doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.....	Pag. 50

Figura 12- Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células Vero (células de rim de macaco), assim como, a doxorubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos	Pag. 51
Figura 13- Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células NOK (queratinócitos normais de mucosa oral) assim como, a doxorubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.....	Pag. 52
Figura 14- Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células tumorais A549 (pneumócitos pulmonares tipo II)	Pag. 55
Figura 15- Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células HepG2 (células de hepatoma humano)	Pag. 56
Figura 16- Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células NOK (queratinócitos de mucosa oral)	Pag. 57
Figura 17- Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células V87 (células de glioma humano).....	Pag. 58
Figura 18- Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano).....	Pag. 59
Figura 19- Curva de adesão da levedura <i>C. neoformans</i> ATCC 90012 em células HepG2, V87, NOK e MRC-5 no intervalo de tempo de 0 a 48 horas.....	Pag.60
Figura 20- Imunofluorescência mostrando a adesão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90012 (verde) em células metabolizadoras HepG2, no período de 1 hora. A. Controle com células HepG2 na ausência de <i>Cryptococcus neoformans</i> – campo claro; B. Controle com células HepG2 na ausência de <i>C. neoformans</i> ; C. Células HepG2 infectadas com <i>C. neoformans</i> – campo claro; D. Células HepG2 infectadas com <i>C. neoformans</i>	Pag. 61
Figura 21- Imunofluorescência mostrando a adesão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90012 (verde) em fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), no tempo de 1 hora. A. Controle com células MRC-5 na ausência de <i>Cryptococcus neoformans</i> – campo claro; B. Controle com células MRC-5 na ausência de <i>C. neoformans</i> ; C. Células MRC-5 infectadas com <i>C. neoformans</i> – campo claro; D. Células MRC-5 infectadas com <i>C. neoformans</i>	Pag. 62
Figura 22- Imunofluorescência mostrando a adesão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90012 (verde) em queratinócitos normais de mucosa oral (NOK), no período de 1 hora. A. Controle com células na ausência de <i>Cryptococcus neoformans</i> – campo claro; B. Controle com células NOK na ausência de <i>C. neoformans</i> ; C. Células NOK infectadas com <i>C. neoformans</i> – campo claro; D. Células NOK infectadas com <i>C. neoformans</i>	Pag. 63

Figura 23- Imunofluorescência mostrando a adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 (verde) em células de glioma humano (V87), no período de 1 hora. **A.** Controle com células na ausência de *Cryptococcus neoformans* – campo claro; **B.** Controle com células V87 na ausência de *C. neoformans*; **C.** Células V87 infectadas com *C. neoformans* – campo claro; **D.** Células V87 infectadas com *C. neoformans*..... Pag. 64

Figura 24- Inibição da adesão de *Cryptococcus neoformans* células HepG2, V87, MRC-5 e NOK pelo tratamento com a chalcona 2,3-chalc (3,90 mg/L) nos tempo de 30 minutos, 1 hora e 2 horas..... Pag. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da identificação dos isolados positivos para <i>Cryptococcus</i> para a espécie <i>C. gattii</i> por meio da identificação pelo CGB	Pag. 34
Tabela 2. Identificação das espécies dos isolados ambientais positivos para <i>Cryptococcus</i> , através dos testes de assimilação de carbono (auxanograma) e teste de assimilação de nitrogênio.....	Pag. 37
Tabela 3. Atividade antifúngica de triterpenos quinonametídeos isolados de <i>Maytenus ilicifolia</i>	Pag. 42
Tabela 4. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), expressos em mg/L para as chalconas sintéticas contra as cepas <i>Cryptococcus</i>	Pag. 44
Tabela 5. Resultado da eficiência de desinfecção expressa em porcentagem de morte das cepas padrão <i>C. neoformans</i> (ATCC 90012) e do isolado ambiental de <i>C. neoformans</i> (M16.2) frente aos triterpenos (maitenina e pristimerina) e anfotericina B, no período de 1 a 24 horas.....	Pag. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

30R: isolado clínico de *Cryptococcus neoformans* resistente à fluconazol

5-FC: 5-fluorocitosina

A549: célula epitelial de adenocarcinoma de pulmão

AFR1: gene relacionado às drogas

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

AMB: anfotericina B

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATB: complexo antimicrobiano (estreptomicina, penicilina, gentamicina, anfotericina B)

ATCC: *American Type Culture Collection*

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

CFM: concentração fungicida mínima

CGB: meio L-canavalina glicina azul de bromotimol

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol (fluorocromo)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desorribonucleotídeo trifosfatado

E (%): eficiência em porcentagem

ED₅₀: documento descrição do ensaio de sensibilidade *in vitro*

ERG11: gene envolvido na produção de ergosterol nas células fúngicas

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FCZ: fluconazol

HAART: terapia antirretroviral altamente ativa

HepG2: célula epitelial de hepatoma humano

HhaI: enzima de restrição

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IC₅₀: concentração inibitória média (50%)

IFI: infecções fúngicas invasivas

LCR: líquido cefalorraquidiano

MATa: mating type a

Mating types: tipo de reprodução

MAT α : mating type α

MDR1: gene multidroga resistente

MF2.5: pristimerina

MJ2: maitenina

MOPS: tampão [ácido 3-(N- morfolino)-propanossulfônico]

MRC-5: fibroblasto normal de pulmão humano

MTT: brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

n₀: concentração inicial de fungos

n_f: concentração final de fungos após os métodos de desinfecção

NOK: célula oral normal imortalizada com o gene *h-tert*

°C: graus Celsius

PBS: tampão fosfato alcalino

PCR: reação em cadeia da polimerase

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos

RPMI: Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado

***Sau96I*:** enzima de restrição

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

T CD4: linfócitos

TBE: tampão de corrida para eletroforese

UFC: unidade formadora de colônias

URA5: gene importante para identificação de *Cryptococcus*

Vero: célula epitelial renal de macaco verde da África

YEPD: meio de cultura de extrato de levedura, peptona e dextrose

Capítulo I

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica e oportunista causada principalmente pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Entre as principais manifestações clínicas estão o desenvolvimento de meningite, encefalite, meningoencefalite e infecções pulmonares. Estima-se que mais de um milhão dos casos de criptococose ocorrem por ano em indivíduos HIV positivos, o que classifica esta doença como a terceira mais importante entre as infecções fúngicas sistêmicas. A ecologia deste gênero está diretamente relacionada ao meio ambiente, sendo a espécie *C. neoformans*, comumente encontrada em excretas secas de pombos (*Columbia livia*) e a espécie *C. gattii* é encontrada, principalmente, em plantas, como espécies de *Eucalyptus*. O tratamento da criptococose é realizado com os fármacos antifúngicos, anfotericina B e fluconazol, sendo este último de ação fungistática utilizado para tratamento de longo prazo, que apesar de eficiente, pode causar uma série de reações adversas e ainda desenvolvimento de resistência. Tendo em vista o difícil controle da levedura e o tratamento, este trabalho tem como objetivo principal, a pesquisa de substâncias naturais com alto potencial antifúngico com finalidade saneante e medicamentosa, combatendo a levedura em seu nicho ecológico natural e também atuando no combate à infecção no hospedeiro. Uma forma de diminuir os casos desta infecção é através do processo de desinfecção ambiental com produtos saneantes, os quais apresentam capacidade fungicida. Por meio do projeto Biota/FAPESP, foram selecionados dois triterpenóides quinonamétídeos extraídos de *Maytenus ilicifolia*, a maitenina e a pristimerina, as quais apresentaram potentes CIMs anti-*Cryptococcus*, mais de 90 % de eficiência na desinfecção e baixa toxicidade, o que revela que as substâncias podem ser protótipos promissores com atividade desinfetante. Ainda avaliamos uma série de moléculas sintéticas da família dos flavonoides designadas chalconas, para o desenvolvimento de protótipos antifúngicos para uso terapêutico humano. Oitenta e cinco por cento das chalconas apresentaram elevada ação fungistática contra isolados de *C. neoformans* de virulência acentuada e inibiu fortemente a adesão do fungo às células pulmonares e de glioma humano, com eficiência maior que 90 %. Além disso, não apresentaram citotoxicidade em 5 linhagens celulares diferentes relacionadas ao percurso deste possível protótipo. Estes dados revelam que as chalconas podem significar protótipos promissores com potente atividade anti-*Cryptococcus*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused mainly by opportunistic yeast *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Among the main clinical manifestations are the development of encephalitis, meningoencephalitis and pulmonar infections. It is estimated that more than one million cases of cryptococcosis occur per year in HIV positive individuals, which classifies the disease as the third among the most importante systemic fungal infections. The ecology of this genus is directly related to the environment. Specie *C. neoformans* is commonly found in dried excremento of pigeons (*Columbia livia*) and the species *C. gattii* is found primarily in plants such as *Eucalyptus* species. Cryptococcosis treatment is performed with the antifungal drugs amphotericin B and fluconazole, the later being of a fungistatic used to treat long-term, while effective, may cause a number of adverse reactions and also the development of resistance. Given the difficult control of the yeast and treatment, this work has as main objective, the research of natural substances with high potential antifungal drug with purpose and saneante, fighting yeast in their natural ecological niche and also acting in fighting infection in the host. One way to reduce the cases of infection is through the capacity fungicide. Through the Project BIOTA / FAPESP, we selected two quinonametides triterpenids extracted from *Maytenus ilicifolia*, the maitenin and pristimerin, which showed potente anti-*Cryptococcus* MICs, more than 90 % of the disinfection efficiency and low toxicity, indicating the the substances may be promising prototypes with disinfectant activity. Also were evaluated a number of synthetic molecules of the flavonoid Family designated chalcones, for prototyping antifungals for human therapeutic use. Eighty-five percent of chalcones presentaram high fugistatic against isolates of *C. neoformans* virulence markedly and strongly inhibited the adhesion the fungus and the cell lung human glioma, with greater than 90 % efficiency. In addition, showed no cytotoxicity at 5 different cell lines relating to this route can prototype. These data show that chalcones can mean promising prototypes with potent anti-*Cryptococcus* activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas sistêmicas

Nos últimos anos a incidência de micoses oportunistas tem aumentado em grande percentual, o que tornou este conjunto de doenças um importante problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial, diminuindo a qualidade e expectativa de vida. Com o aumento da incidência da AIDS, o problema se agrava, pois indivíduos imunocomprometidos estão mais susceptíveis à aquisição destas infecções e ainda, quando adquiridas, apresentam maior gravidade (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992; Maschmeyer e Haas, 2008; Sable, Strohmaier *et al.*, 2008).

Dentre as Infecções Fúngicas Invasivas (IFI) em países desenvolvidos, estão em primeiro lugar, as infecções ocorrentes por espécies de *Candida*, seguido por *Aspergillus* e *Cryptococcus* (Neofytos, Fishman *et al.*, 2010; Kriengkauykiat, Ito *et al.*, 2011). Tortorano e colaboradores (2012) em um estudo realizado na Itália, mostraram que em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI), as infecções mais incidentes foram em primeiro lugar candidíase, seguida de infecções causadas por fungos filamentosos e a criptococose (Tortorano, Dho *et al.*, 2012).

No Brasil, Zicker *et al.*, (2011) avaliaram a epidemiologia de IFI em pacientes transplantados de fígado, observando que 13 % dos pacientes apresentaram infecções fúngicas, sendo as mais comuns causadas por espécies do gênero *Candida* e *Aspergillus*, seguida de espécies de *Cryptococcus* (Zicker, Colombo *et al.*, 2011). Em 2009 um estudo epidemiológico das micoses sistêmicas no Brasil, relatou que entre os anos de 1996 a 2006 houveram 3.583 mortes causadas por micoses sistêmicas, sendo a principal causa de morte a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* relacionado aos pacientes imunocompetentes. Nas infecções relacionadas à indivíduos imunocomprometidos mais de 50 % dos casos de morte ocorreram por criptococose, seguido por candidíase e histoplasmosse (Prado, Silva *et al.*, 2009).

Existe um pequeno arsenal de fármacos antifúngicos, além disso muitos não são eficientes ou são altamente tóxicos. Ainda há o problema da resistência microbiana que tem crescido com o aumento dessas infecções (Girois, Chapuis *et al.*, 2006). Diante do aumento das infecções fúngicas causadas por cepas resistentes, é necessário desenvolver novas terapias efetivas para o tratamento,

assim como buscar novos alvos de expressão exclusiva em fungos (Perlin, Seto-Young *et al.*, 1997; Baixench, Aoun *et al.*, 2007).

1.2 Criptococose

Dentre as micoses sistêmicas e oportunistas, a criptococose se destaca pela sua importância clínica relacionada ao aumento da incidência de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que estes apresentam maior predisposição na infecção pelo agente (Severo, De Mattos Oliveira *et al.*, 1999). Em termos mundiais, de 3 a 14 % dos pacientes HIV positivos apresentam criptococose, sendo esta classificada como a terceira patologia mais prevalente em indivíduos com AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (Lanjewar, 2011). Entre os fatores de risco, os que mais se destacam são, os indivíduos com AIDS que representam mais de 78 % dos casos, seguido pelo uso prolongado de corticosteróides, doenças autoimunes, tumores sólidos, transplantes, diabetes mellito, doenças hepáticas e renais (Lizarazo, Linares *et al.*, 2007; Batista, Pierrotti *et al.*, 2011). Estudo realizado em 2011 mostra que 2,8% dos casos de criptococose está relacionado ao transplante renal (Castro-Ferreira, Carvalho *et al.*, 2011).

O agente causador da criptococose é uma levedura encapsulada, pertencente ao gênero *Cryptococcus*, à classe dos Blastomicetos e família Cryptococcaceae. Esta família engloba mais de 38 espécies, sendo que apenas duas são patogênicas ao homem, o *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (Leão, 1997; Kantarcioğlu, Boekhout *et al.*, 2007). Apesar de apenas essas duas espécies serem caracterizadas como patogênicas ao homem, há relatos na literatura de isolamentos de *C. laurentii* e *C. albidus* em pacientes com criptococose manifestante (Vlchkova-Lashkoska, Kamberova *et al.*, 2004; Dorneanu, Filip *et al.*, 2008; Binder e Lass-Flörl, 2011). Trabalhos recentes indicam que *C. albidus*, *C. magnus* e *C. laurentii* causam infecções em mamíferos como cães e gatos (Lester, Malik *et al.*, 2011).

O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por leveduras com cápsula polissacarídica composta por glucuronoxilomanana (90 %), galactoxilomana (7 %) e manoproteínas (3 %). Sua importância está no diagnóstico da infecção, pois está relacionada com a capacidade invasiva e patogênica da levedura, além de conferir resistência da levedura no ambiente e no hospedeiro, sendo classificada como um importante fator de virulência (Moyrand, Klaproth *et al.*, 2002; Levitz e Specht, 2006;

Grechi, Marinho-Carvalho *et al.*, 2011; Hull, 2011). Uma outra característica da cápsula polissacarídica é a diferenciação antigênica entre as espécies, uma vez que os antígenos presentes na cápsula, diferem as espécies de *Cryptococcus* em sorotipos. Os dois agentes mais comuns da criptococose, *C. neoformans* e *C. gattii*, são classificados em sorotipos. A espécie *C. neoformans* apresenta duas variedades, var. *grubii* e var. *neoformans* e três sorotipos (A, D e AD), uma vez que o sorotipo A corresponde a var. *grubii* e o sorotipo D a var. *neoformans* e o sorotipo AD é considerado híbrido. A espécie *C. gattii* não apresenta variedades, apenas os sorotipos B e C (Franzot, Hamdan *et al.*, 1997; Lengeler, Cox *et al.*, 2001; Nishikawa, Lazera *et al.*, 2003; Pappalardo e Melhem, 2003).

Além da classificação sorotípica das espécies de *Cryptococcus* há uma classificação molecular. Desde décadas passadas os avanços nos estudos moleculares refinaram a epidemiologia dos isolados de *Cryptococcus* no mundo. O primeiro estudo para a classificação dos tipos moleculares, foi realizado por meio da técnica de PCR-Fingerprinting, onde isolados clínicos, ambientais e animais foram divididos em oito tipos moleculares. A espécie *C. neoformans* var. *grubii* foi classificada como tipo molecular VNI e VNII, a variedade *neoformans* em VNIV e o VNIII foi classificado como híbrido enquanto *C. gattii* VGI, VGII, VGIII e VGIV. Em 2003, Meyer e colaboradores realizaram um estudo epidemiológico da distribuição dos tipos moleculares na América Latina e Espanha confirmando esta classificação por outra técnica molecular, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Meyer, Castañeda *et al.*, 2003) .

A infecção por *Cryptococcus* ocorre por meio da via respiratória, pela inalação da forma infectante, os basidiosporos, sendo assim a infecção pulmonar é classificada como infecção primária, a qual pode desenvolver-se em forma aguda, subaguda ou crônica da doença (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992; Leão, 1997). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pulmonar primária é similar a infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e *Histoplasma capsulatum*; sendo os sintomas leves, como tosse e falta de ar, facilmente confundidos com outras manifestações pulmonares (Goldman, Lee *et al.*, 2000).

A doença pode se manifestar de forma localizada ou disseminada, onde 70 % dos casos de criptococose estão associados a infecção do sistema nervoso central (SNC), principalmente em indivíduos HIV positivos. A levedura apresenta tropismo pelo SNC e tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, portanto, é

a forma mais comum e a mais grave da doença. No SNC pode acometer as meninges e se disseminar por meio do líquido cefalorraquidiano (LCR) causando manifestações, principalmente na forma de meningite; pode também causar lesões na massa encefálica levando a um quadro de encefalite e meningoencefalite, ou ainda, pode desenvolver abscesso (criptococomas), cujos sinais e sintomas são, cefaléia, sinais de meningite, febre, náuseas, vômitos e alterações mentais e visuais (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992; Pappalardo e Melhem, 2003; Jong, Wu *et al.*, 2008). Severo *et al.*, em (1999), realizaram um estudo na Austrália onde observaram que sete casos de criptococose cerebral, causado pela espécie *C. gattii* apresentavam as mesmas manifestações clínicas que a infecção pela espécie *C. neoformans*, sendo que as mais comuns apresentadas foram hidrocefalia e lesão focal cerebral (Severo, De Mattos Oliveira *et al.*, 1999).

Leimann e colaboradores (2008) mostraram que existe uma alta porcentagem dos casos de meningite criptococcica relacionada à infecção pelo vírus HIV no estado do Rio de Janeiro, confirmando a alta prevalência desta micose em indivíduos imunodeprimidos (Leimann e Koifman, 2008).

Outra forma de manifestação da doença é a infecção cutânea que pode ser manifestada através de pápulas, placas infiltradas, vesículas herpetiformes, nódulos, edemas, abscessos ou úlceras. Geralmente, as lesões aparecem como pedunculados, em forma de pápulas com seu centro umbilicado e a prevalência desta forma de manifestação atinge 15% dos pacientes com infecção sistêmica e 5 % dos pacientes com meningite criptococcica. Esta manifestação é considerada primária quando não é derivada de uma infecção sistêmica, sendo esta, uma forma rara da doença (Probst, Pongratz *et al.*, 2010). A infecção cutânea secundária ocorre quando há uma disseminação hematogênica, sendo comum em pacientes com AIDS (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992). Também envolve pacientes com linfomas, lúpus eritematoso sistêmico e indivíduos transplantados sob terapia imunossupressora (Miura, Kawakami *et al.*, 2010). Podem ocorrer manifestações em outros tecidos, como por exemplo, lesões oculares que causam edema de pupila, atrofia óptica e paralisia do nervo ocular, sendo a cegueira uma sequela permanente; infecções nos ossos e articulações, boca, esôfago, próstata, entre outras (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992).

Recentemente foram descritos quatro casos de endocardite criptocóccica por *C. neoformans* em pacientes imunocomprometidos, sendo que a infecção foi

confirmada por cultura positiva do sangue e altos títulos de antígenos no soro. Apesar da escassez dos casos e de pouco conhecimento neste tipo de infecção por *Cryptococcus* todos os casos foram tratados com sucesso sem intervenção cirúrgica (Alhaji e Sadikot, 2011). Outra rara manifestação da doença é a osteomielite criptocócica, a qual até hoje foram relatados apenas 47 casos entre os anos de 1975 e 2005. Os sintomas comuns desta manifestação são: dor, inchaço e elevação da temperatura do tecido que envolve o osso, no local onde a levedura se encontra. Qadir e colaboradores (2011) relataram um caso de osteomielite por *C. neoformans* em paciente imunocompetente (Qadir, Ali *et al.*, 2011).

1.3 Fatores de virulência

A cápsula polissacarídica apresenta a capacidade de alterar a ação dos macrófagos, assim confere proteção à célula fúngica e ainda apresenta altos níveis de antígenos específicos para *Cryptococcus*, que determinam a formação de imuno-complexos em pacientes HIV positivos; estes imuno-complexos impedem a atividade de anticorpos nas células fúngicas. Desta forma, os antígenos presentes na cápsula, além de impedir a ação dos macrófagos, podem bloquear a ação de células de defesa, como por exemplo, linfócitos T CD4, diminuindo a ação do sistema imune-humoral (Van Der Horst, Saag *et al.*, 1997).

Além da presença da cápsula polissacarídica, existem vários outros fatores de virulência no gênero *Cryptococcus*. A produção das enzimas fenoloxidase, fosfolipases e proteinases têm sido descritas com um importante papel na virulência (Pappalardo e Melhem, 2003). Em um estudo realizado por Pedroso e colaboradores (2007), foi comprovado que a identificação da produção de enzima fenoloxidase, a qual sintetiza o pigmento melanina (Pedroso, Da Costa *et al.*, 2007). Essa enzima protege a célula fúngica dos agentes oxidantes dos tecidos. A termotolerância, capacidade de sobrevivência e reprodução a 37 °C também confere a levedura uma resposta ao estresse (Odom, Muir *et al.*, 1997; Cruz, Fox *et al.*, 2001).

Um outro fator de virulência é a produção de melanina, a qual está presente em vários outros fungos. Acredita-se que a melanina é responsável pela proteção da célula fúngica contra o estresse oxidativo no momento da infecção. Outras funções estão atribuídas a melanina, como a proteção aos extremos de temperatura, a radiação ultravioleta, fagocitose e também parece estar envolvida na diminuição da sensibilidade aos fármacos antifúngicos, como por exemplo, a anfotericina B (Kwon-

Chung, Polacheck e Popkin, 1982; Rhodes, Polacheck *et al.*, 1982; Jacobson e Tinnell, 1993; Wang e Casadevall, 1994a; Wang e Casadevall, 1994b; Wang e Casadevall, 1994c; Rosas e Casadevall, 1997; Ikeda, Sugita *et al.*, 2003).

A enzima fosfolipase é também considerada um fator de virulência, pois auxilia na invasão tecidual do *C. neoformans*, pelo fato de agir na camada externa dos tecidos hidrolisando os fosfolipídeos. Além das fosfolipases, as proteinases também são enzimas importantes para a virulência, pois digerem as proteínas do tecido do hospedeiro como, por exemplo, o colágeno, assim como, as proteínas de importância imunológica como, anticorpos e proteínas do sistema complemento. Desta forma, facilita a adesão e a sobrevivência do patógeno nas superfícies mucosas (Chen, Blank *et al.*, 1996; Kurokawa, Sugizaki *et al.*, 1998). A urease é uma outra enzima importante que atua como fator de virulência, pois tem importante papel na alteração da função imunológica do hospedeiro. Cox *et al.*, (2001) demonstraram que esta enzima é importante para a sobrevivência da levedura em hospedeiros humanos (Cox, Mcdade *et al.*, 2001).

Pelo fato de *C. neoformans* ser um fungo heterotático, estudos genéticos foram realizados para melhor entendimento dos sorotipos, por meio dos *mating types*, uma vez que este fungo possui dois tipos sexuais, ou seja, dois alelos o *MATa* (*mating type a*) e o *MAT α* (*mating type α*), que são regiões genômicas as quais regulam o ciclo sexual da levedura, podendo se apresentar diferente em células com *mating types* opostos, o que possibilita ocorrer a reprodução sexuada entre essas células. O sorotipo D apresenta suas cepas diferenciadas em seu *mating type*, e de acordo com estudos realizados, as cepas que possuem o *MAT α* são mais virulentas que as que possuem o *MATa* (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992).

1.4 Ecologia e epidemiologia

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são encontradas em todos os continentes, exceto nas regiões polares, as quais não apresentam as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Habitam locais como solo, frutas, madeiras, tecidos, secreções e excreções humanas e de animais. *C. neoformans* (sorotipo A e D), apresentam distribuição universal, sendo prevalente em regiões de clima temperado e frio e em áreas urbanas (Nishikawa, Lazera *et al.*, 2003). No Brasil, alguns autores já confirmaram a prevalência dos sorotipos A e D nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, principalmente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, assim

como a relação que existe na infecção destas espécies em indivíduos imunodeprimidos (Severo, De Mattos Oliveira *et al.*, 1999).

Em termos mundiais, a infecção por *C. neoformans* é a mais prevalente, sendo relatada em diversos trabalhos a alta incidência de meningite criptocócica pelo sorotipo A e D, tipos moleculares VNI e VNII (Meyer, Castañeda *et al.*, 2003). No Vietnã, um estudo epidemiológico com isolados de 51 pacientes imunocompetentes e 100 de pacientes HIV positivos foram comparados e como conclusão foi verificado que o genótipo VNI (*C. neoformans* var. *grubii*) é o responsável pela maioria dos casos de meningite criptocócica no Vietnã e nos dois grupos de pacientes (Day, Hoang *et al.*, 2011). Estima-se que aproximadamente um milhão de casos de criptococose, por ano, estão associados ao HIV em todo o mundo (Perfect, Dismukes *et al.*, 2010). Com o avanço da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) ocorreu uma redução nos casos de criptococose, porém a incidência e mortalidade desta infecção ainda são elevadas (Lizarazo, Linares *et al.*, 2007).

Cryptococcus neoformans sorotipos A e D são comumente encontrados em excretas secas de pombos, uma vez que seus componentes, como altas concentrações de creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas, favorecem a adaptação desta levedura, permitindo a sobrevivência e desenvolvimento, podendo manter a viabilidade por até dois (Kwon-Chung, 1991). Há relatos da presença de *C. neoformans* em outros nichos, como troncos de árvores das espécies *Syzygium jabolatum*, *Senna multijuga*, *Theobroma cacao*, *Myroxylon pureiferum* (Nishikawa, Lazera *et al.*, 2003).

Apesar da ecologia deste microrganismo estar diretamente relacionada aos pombos, não há relatos de infecção nestes animais, isso pode ser explicado pela alta temperatura do organismo dessas aves, que apresenta temperatura entre 40 e 42 °C, impedindo a sobrevivência. Um estudo realizado em 1976, por Swinne-Desgain, mostrou a importância do papel dos pombos na epidemiologia e na disseminação da doença, uma vez que, muitos pombos carregam a levedura no ingluvío, permanecendo viável por até 86 dias (Swinne-Desgain, 1976). Em 2002, Filiu e colaboradores, relataram a presença de 46.000 propágulos viáveis de *C. neoformans* var. *neoformans* por grama de excrementos secos de pombos, o que indica a existência de fontes ambientais na forma de microfocos (Filiú, Wanke *et al.*, 2002). Rosário e colaboradores (2005), analisaram amostras de cloaca de pombos,

a fim de identificar a presença de *C. neoformans*; como resultado foi observado a presença da levedura em 1,8 % das amostras. Mais adiante, o mesmo autor realizou um estudo para confirmação da relação entre *C. neoformans* e pombos da espécie *Columba livia*, confirmando a importância dos pombos como reservatório de formas patogênicas de *C. neoformans* (Rosario, Hermoso De Mendoza *et al.*, 2005).

Já foram relatados outros nichos para *C. neoformans* como: poeira doméstica, excretas de aves de cativeiro (canários, periquitos, calopsitas) e fragmentos de árvores (Passoni, Wanke *et al.*, 1998; González-Hein, González-Hein *et al.*, 2010). Montenegro e Paula, em 2000, coletaram amostras de fezes de pombos e fragmentos de árvores em diferentes locais da cidade de São Paulo e 26,3 % dos isolados apresentaram-se positivo para a presença de *C. neoformans* var. *neoformans* (Montenegro e Paula, 2000).

A ecologia da espécie *C. gattii*, sorotipos B e C, diferem em alguns pontos do *C. neoformans*, pois acometem principalmente indivíduos imunocompetentes (Leão, 1997), porém, há relatos de casos de criptococose por *C. gattii* em pacientes HIV positivos que apresentaram manifestações semelhantes à infecção por *C. neoformans* var. *neoformans* (Severo, De Mattos Oliveira *et al.*, 1999). Recentemente Byrnes e colaboradores (2011), investigaram as infecções por *C. gattii* em indivíduos HIV positivos no sul da Califórnia e concluíram a presença desta espécie em pacientes imunocomprometidos e isolaram o tipo molecular VGIII, o qual é considerado raro, mostrando uma subdivisão molecular em VGIIIa e VGIIIb, sendo classificado VGIIIa como mais virulento e também concluíram que o tipo global VGIII é endêmico no sul da Califórnia e nas regiões vizinhas do México, sendo menos frequente em Oregon e Washington (Byrnes, Li *et al.*, 2011). Macdougall e colaboradores (2011) também mostraram as mudanças no conceito da infecção por *C. gattii* em indivíduos saudáveis, pois, apesar da maioria dos casos de criptococose por esta espécie, ocorrer nessas condições, os autores mostraram em seu trabalho que a infecção está associada a estados de imunossupressão induzida por vários fatores, como uso de corticosteróides orais e cânceres invasivos, bem como pelo enfraquecimento da função pulmonar resultante de infecções anteriores e tabagismo (Macdougall, Fyfe *et al.*, 2011). As regiões tropicais e subtropicais são onde mais comumente se encontra essa espécie, porém, alguns estudos indicam a presença de *C. gattii* em regiões não-tropicais, como no estudo de Byrnes e colaboradores em 2009, em que mostraram a presença da levedura no nordeste do Pacífico (Byrnes,

Bildfell *et al.*, 2009). No trabalho de Kidd e colaboradores (2004), os autores descreveram o surto em Vancouver (Canadá), sugerindo a adaptação de *C. gattii* (VGII) a ambientes de clima temperado (Kidd, Hagen *et al.*, 2004). A emergência das infecções por *C. gattii* em clima temperado, sugere uma possível adaptação ao clima, mostrando que pequena alteração nas condições do meio, permite a sobrevivência e propagação da levedura (Cdc, 2010). Esta espécie emergiu como um agente potencialmente letal no nordeste do Pacífico e América do Norte, entre os anos de 1999 e 2006, onde mais de 200 casos de infecções por *C. gattii* foram relatados em humanos e mais do dobro em animais domésticos (Randhawa, Kowshik *et al.*, 2008). Recentemente, Firacative e colaboradores (2011), isolaram pela primeira vez *C. gattii* de ambiente, na cidade de Cucutá na Colômbia embora a sua incidência seja alta, atingindo aproximadamente 77 % dos casos de criptococose o isolamento do fungo em árvores nessa região, nunca havia sido relatado (Firacative, Torres *et al.*, 2011).

O nicho ecológico de *C. gattii* está relacionado ao meio ambiente, principalmente à plantas como eucaliptos, a concentração dessas plantas está ao longo dos rios e também a associação das habitações de áreas rurais torna clara a relação com as zonas rurais (Chen, Sorrell *et al.*, 2000). Ellis e Pfeiffer, em 1990, desvendaram o nicho ecológico, pela associação da presença da levedura em plantas da espécie *Eucalyptus camaldulensis*, mais tarde, foi isolado *C. gattii* em outras espécies de eucaliptos (*E. tereticornis*, *E. rudis*, *E. gomphocephala* e *E. blakelyi*) (Ellis e Pfeiffer, 1990). Estudos brasileiros já demonstraram que *C. gattii* não estão associadas somente às espécies de eucaliptos, como também em outras árvores como, por exemplo, *Cassia grandis*, *Ficus* sp., *Moquilea tomentosa*, *Guettarda acreana* e *Mangira indica* (Montenegro e Paula, 2000; Dixit, Carroll *et al.*, 2009; Faria, Nascente *et al.*, 2010). Em outro estudo realizado por Kidd *et al.*, (2003), os autores mostraram a presença de *C. gattii* em fezes frescas de insetos da família Oecophoridae, sendo considerado um novo nicho para a levedura (Kidd, Sorrell *et al.*, 2003). Alguns estudos mostram o isolamento desta espécie em solo, ar, água e vegetação (Mak, Klinkenberg *et al.*, 2010).

A infecção por *C. gattii* é considerada endêmica no Brasil, principalmente no nordeste, onde 75% dos isolados pertencem ao sorotipo B (Nishikawa, Lazera *et al.*, 2003). Já os casos de infecção pelo sorotipo C têm sido pouco encontrados, sendo que apenas alguns casos tem sido relatados nos EUA, Europa, Colômbia, Argentina

e Brasil como descrito por Callejas *et al.*, (1998). Em estudo realizado por Ohkusu e colaboradores (2002), na cidade de São Paulo, foram analisados 84 isolados de *Cryptococcus*, desses isolados 75 foram classificados como *C. neoformans* var. *grubii* e somente oito como *C. gattii* (Callejas, Ordoñez *et al.*, 1998; Ohkusu, Tangonan *et al.*, 2002). Em outro estudo de isolamento e identificação, realizado por Fernandes *et al.*, 2000, no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia, apresentou como resultado um total de 50 isolados de pacientes com quadro de meningite criptocócica associada com a AIDS e foi observada a predominância de *C. neoformans*, uma vez que este esteve presente em 47 pacientes; já *C. gattii* foi identificado em apenas 5 pacientes (Fernandes, Costa *et al.*, 2000). Outro estudo epidemiológico realizado em 1999, na cidade de Belém (PA), foi relatado 19 casos de criptococose em crianças na faixa etária de 5 a 13 anos, sendo que em 9 casos foram identificados a espécie *C. gattii* e na cidade de Santa Maria (RS), o relato foi de somente 8 casos de criptococose em indivíduos portadores da HIV entre os anos de 1961 e 1995, sendo que apenas um caso foi por infecção pela espécie *C. gattii* em um indivíduo residente na área rural (Lopes, Costa *et al.*, 1997; Correa, Oliveira *et al.*, 1999). Recentemente, Martins e colaboradores (2011) avaliaram 63 casos de meningite criptocócica na região do Piauí e Maranhão e verificaram o avanço da infecção pela espécie *C. gattii* no meio norte brasileiro, mostrando que a distribuição geográfica desta espécie é muito mais ampla que a relatada em literatura (Martins, Wanke *et al.*, 2011).

Por meio da avaliação do aumento de *C. gattii* no nordeste do Pacífico entre os anos de 2004 e 2010, foram realizadas análises refinadas visando a identificação do tipo molecular VGII, uma vez que está associado ao surto nos EUA e Colômbia. Neste estudo, foi determinada uma subdivisão no tipo molecular VGII, sub classificando em VGIIa, VGIIb, VGIIc e VGII d (Cdc, 2010). No Brasil, foi relatada uma epidemia de criptococose por *C. gattii* VGII no estado do Pará, mostrando a adaptação da levedura em clima semi-árido do norte brasileiro (Santos, Meyer *et al.*, 2008).

A faixa etária de maior incidência de criptococose é entre 30 e 50 anos de idade, sendo os homens mais acometidos com cerca de 70 % dos casos diagnosticados. Apesar de muito rara pode ocorrer infecção em crianças pré-púberes. Correa e colaboradores (1999) mostraram que a infecção em crianças, principalmente nas imunocomprometidas, pode ser explicada pela migração da área

urbana para a área rural, onde o contato com a espécie *C. gattii* é maior (Correa, Oliveira *et al.*, 1999). Diversos estudos mostram a importante diversidade genética existente entre as cepas de *Cryptococcus* sp, o que indica a ocorrência de hibridismo na espécie, mostrando a possibilidade de encontrar uma infecção com mais de uma espécie (Boekhout, Theelen *et al.*, 2001; Igreja, Lazéra *et al.*, 2004).

Em estudo realizado no período de 2000 e 2005 por Leal e colaboradores (2008), analisou-se casos de criptococose relacionando-os com as raças, gêneros, idade e fatores de riscos; dos 126 pacientes com meningite criptocócica, 77 % foram homens com faixa etária variável entre 30 e 39 anos e 95% eram portadores do HIV (Leal, Faganello *et al.*, 2008). Porém, Macdougall e colaboradores (2011) mostraram que não existe uma diferença estatística relacionada ao sexo para infecção por *C. gattii* e que as diferenças encontradas em diversos trabalhos pode ser fruto da exposição ambiental durante atividades profissionais ou de lazer (Macdougall, Fyfe *et al.*, 2011).

Um levantamento dos casos de criptococose realizado pela Vigilância Epidemiológica na região de Ribeirão Preto (SP) e Araraquara (SP) mostrou que a maior parte dos casos desta infecção está associada com a AIDS na maioria dos casos, sendo que a taxa de mortalidade nesta região varia na faixa de 33,3 a 80 % dos casos, conforme mostra estudo realizado por Barbieri e colaboradores (2001) (Barbieri, 2001). Já na região de Uberlândia (MG), estudos relataram que de 96 pacientes com criptococose e portadores de HIV fazendo uso da terapia adequada, mais de 72 % foram a óbito (Moreira, Ferreira *et al.*, 2006).

Alguns estudos brasileiros mostram que houve uma diminuição na incidência de infecções por *Cryptococcus* spp., mas apesar da diminuição do número de casos brasileiros, a criptococose ainda é considerada importante pela sua morbimortalidade e ainda é considerada a segunda infecção oportunista mais freqüente no Brasil conforme os dados apresentados pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2004 (Oliveira, Greco *et al.*, 2006). Apesar da literatura relatar a diminuição nos casos de criptococose, na prática clínica, a criptococose continua sendo diagnosticada em pacientes que não recebem a HAART, nos que não são aderentes a esta terapia ou então nos que apresentam falência do esquema antiretroviral (Pedezert, Vacarezza *et al.*, 2004).

1.5 Tratamento e resistência a antifúngicos

O fármaco de escolha para o tratamento inicial da criptococose é a anfotericina B. Porém esta apresenta hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. O esquema terapêutico consiste em utilizá-la como dose de ataque ou “padrão ouro” associado ao fluconazol. Usualmente, a terapia de escolha inicia-se com a anfotericina B administrada a 0,7 a 1 mg/Kg/dia durante duas semanas, seguido do uso de fluconazol na concentração de 400 a 800 mg/Kg/dia durante pelo menos dez semanas, sendo esta utilizada como dose de manutenção, o que pode gerar problemas de resistência devido ao longo tempo de uso (Jarvis, Dromer *et al.*, 2008; Sloan, Dlamini *et al.*, 2008).

Antigamente era utilizada a associação da anfotericina B com 5-fluorocitosina (5-FC), no entanto, este fármaco deixou de ser comercializada no Brasil. Atualmente a problemática da terapia antifúngica para esta patologia está relacionada à resistência dos isolados deste fungo à alguns fármacos, como por exemplo às drogas azólicas (Kontoyiannis e Lewis, 2002; Shao, Sheng *et al.*, 2007; Johnson, Espinel-Ingroff *et al.*, 2008; Guerrero e Fries, 2008; Silva, Rabelo *et al.*, 2008).

Anfotericina B é um polieno muito usado no tratamento de micoses sistêmicas. Sua ação está relacionada ao anel macrolídico, o qual apresenta característica hidrofóbica e se liga aos esteróis, principalmente ao ergosterol da membrana celular fúngica. A molécula também se liga ao colesterol da membrana plasmática humana, o que explica o potencial tóxico da anfotericina B. Com a ligação do fármaco ao ergosterol ocorre uma alteração na permeabilidade seletiva da célula fúngica permitindo a saída de nutrientes fundamentais para a célula como água, sais, açúcares e proteínas, causando assim uma deterioração metabólica e consequentemente morte celular. A administração da anfotericina B deve ocorrer por meio da via endovenosa e em forma de desoxicolato, pelo fato desta droga apresentar baixa absorção gastrointestinal (Sokol-Anderson, Brajtburg *et al.*, 1986). A toxicidade da anfotericina B está diretamente relacionada aos rins, pois diminui o fluxo glomerular em até 80 % causando uma vasoconstrição local. Também apresenta mielotoxicidade podendo causar anemia em decorrência de uma alteração na produção de eritropoetina por atuar diretamente na medula óssea (Catalán e Montejo, 2006).

O fluconazol é um composto azólico e tem ação inibitória sobre a lanosterol-14 α desmetilase, a qual é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol;

desta forma, interrompe a biossíntese do ergosterol, componente fúngico essencial para a formação da membrana plasmática celular. Comercialmente o fluconazol pode ser encontrado para a administração oral ou endovenosa, já que ele é facilmente absorvido e atinge concentrações plasmáticas altas (Trösken, Fischer *et al.*, 2006). É utilizado no tratamento de micoses superficiais e invasivas, no tratamento profilático e é bem tolerado pelo paciente, quando administrado em altas doses, porém, o grande problema do uso deste fármaco, assim como, o uso dos demais azóis, é o desenvolvimento de resistência das leveduras à essa classe de fármacos.

Outros fármacos utilizada no tratamento da criptococose é o itraconazol, azol que apresenta o mesmo mecanismo de ação que o fluconazol, alterando a membrana plasmática fúngica, sendo classificado como a segundo fármaco de escolha como dose de manutenção (Andriole, 1998).

Novos fármacos têm sido estudados a fim de melhorar a terapia antifúngica. A micafungina, futuramente, poderá substituir a anfotericina B com eficiência. Apesar de seu mecanismo de ação ainda não estar bem estabelecido, estudos indicam que provavelmente a micafungina tem ação mitocondrial e seus efeitos tóxicos renais são menores que o da anfotericina B (Espinell-Ingroff, 2009). Há também dados que demonstram um efeito sinérgico com a associação destes dois fármacos, o que se mostra benéfico, pois apresenta alta eficiência e menor toxicidade (Serena, Fernández-Torres *et al.*, 2005). Outra solução para a redução da toxicidade da anfotericina B vem sendo estudada, a sua incorporação em sistemas de carreadores lipídicos, os quais alteram a farmacocinética e a distribuição do fármaco nos tecidos (Gallis, Drew *et al.*, 1990; Clemons e Stevens, 1998). Os antifúngicos azólicos de nova geração apresentam mecanismo de ação semelhantes ao do fluconazol e dentre eles estão o voriconazol, posaconazol e o ravuconazol. Os ensaios *in vitro* tem demonstrado uma atividade potente desses azólicos contra *Cryptococcus* spp. (Illnait-Zaragozi, Martínez *et al.*, 2008). As equinocandinas apresentam a ação de inibir a síntese de β 1-3 glucana sintetase, devido ao seu mecanismo de ação, as equinocandinas não apresentam capacidade de inibição do desenvolvimento de *Cryptococcus* spp., já que esta levedura não apresenta uma quantidade significativa de β 1-3 glucana em sua parede (Abruzzo, Flattery *et al.*, 1997).

Perfect e colaboradores (2010), traçaram recomendações para o desenvolvimento da estratégia da terapia da criptococose para quatro grandes

grupos: os tratamentos específicos, o tratamento de meningoencefalite, complicações durante o tratamento, tratamento de outros tipos de manifestações e criptococose em situações especiais, sendo que para cada grupo foi traçado as condições de indivíduos portadores de HIV, transplantados e imunocompetentes. Em geral o estudo mostra uma grande variabilidade na posologia, tipos de azóis e manutenção da terapia. O fármaco indicado no tratamento primário é anfotericina B em associação à 5-FC por administração via intravenosa, variando a dose de acordo com cada caso, assim como o tempo de tratamento que varia entre 2 a 4 semanas. Uma outra proposta é a administração de um complexo lipídico de anfotericina B. Como dose de manutenção, é recomendado o uso de fluconazol, variando a dose conforme o caso, sendo que o período de tratamento pode variar de 8 semanas a 12 meses. Para os casos de reinfecção, é importante a determinação da sensibilidade *in vitro* dos isolados frente aos azóis e a partir desta informação deve ser estabelecido o tratamento. Para tratamento da criptococose pulmonar, há a possibilidade de substituição do fluconazol como dose de manutenção, por outros azóis, como itraconazol, posaconazol e voriconazol, assim como a associação destes antifúngicos com corticosteróides. Como terapia profilática para indivíduos imunocomprometidos é usado fluconazol, itraconazol ou mesmo a HAART. Visando o reduzido arsenal de fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose, há uma preocupação nos casos de reincidências e também na aquisição de resistência pelos isolados clínicos (Perfect, Dismukes *et al.*, 2010).

Existem vários estudos sobre a resistência de *Cryptococcus* aos fármacos. Entre os mecanismos de resistência até então estudados estão a super expressão do gene *MDR1* em cepas resistentes ao fluconazol e itraconazol, assim, a regulação na bomba de efluxo pode ser a resposta para a resistência adquirida ao fluconazol, e também o gene *AFR1* em cepas resistentes aos demais azóis (Morschhäuser, 2010). Outro mecanismo de resistência comumente encontrado para isolados clínicos de *C. neoformans* é a mutação pontual das proteínas alvo dos fármacos antifúngicos. Em estudos realizados em nosso laboratório, foram encontrados valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol elevados em isolados clínicos seriados com perfis genéticos idênticos os quais foram analisados pontualmente quanto à sequência do gene *ERG11*. O isolado resistente mostrou um ponto de mutação na sequência nucleotídica do gene, quando comparada à sequência do isolado sensível. Esta mutação após a análise da sequência traduzida

(idêntica a 1,4- α lanosterol desmetilase) revelou trocas de aminoácidos em *motifs* e em sítios ativos da proteína deduzida a partir do modelo de interação da proteína 1,4- α lanosterol desmetilase de *Aspergillus fumigatus* com antifúngicos azólicos conforme o proposto por Gollapudy *et al.*, (2004) (Gollapudy, Ajmani *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que as substituições de aminoácidos ocorridas nos locais de interação da proteína aos azóis, podem ter causado modificações estruturais, e as substituições dentro dos sítios ativos sugerem mudanças na afinidade da enzima. Este dado confirma a presença de mutação associada à resistência, causando modificações estruturais e de afinidade na proteína (Fusco-Almeida, 2005).

A partir do estudo realizado por Sheng e colaboradores (2009) foi possível interpretar as modificações ocorridas na enzima alvo de fluconazol do isolado 30 e elucidar sobre o mecanismo de resistência, decorrente das alterações estruturais da proteína (Sheng, Miao *et al.*, 2009). Recentemente Rossi (2011), avaliou a mutação encontrada em um isolado de *C. neoformans* var. *grubii*, de um paciente do estado do Rio de Janeiro (coleção do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara), isolado denominado 30R e obteve mutações nas posições P459L e P443L ainda não descritas nestes fungos (Rossi, 2011).

Em 2004, Raso e colaboradores, descreveram o surto de criptococose em aves no estado de São Paulo. Por meio deste estudo foram identificadas leveduras da espécie *C. gattii* em sete psitacídeos, sendo o primeiro relato de infecção nestas aves. Também foi verificado que os isolados apresentavam resistência ao fluconazol (concentração inibitória mínima de 64 $\mu\text{g/mL}$) (Raso, Werther *et al.*, 2004).

Em um estudo realizado por Drummond e colaboradores (2007), os pesquisadores mostraram o comportamento de cepas de *Cryptococcus* provenientes de isolados clínicos e de ambientais frente a compostos azólicos. Foi verificado que, pelo fato deste fungo ser cosmopolita há possibilidade de uma interferência direta do uso de fungicidas azólicos nas lavouras com o aumento da resistência aos fármacos azólicos, pois os isolados ambientais mostraram maior resistência a esses compostos (Drummond, Reimão *et al.*, 2007).

1.6 Antifúngicos de origem natural com atividade para *Cryptococcus* spp.

O estudo das plantas como alternativa para a descoberta de novos fármacos apresenta grande destaque, pois, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, seriam as melhores fontes de obtenção de uma imensa variedade de fármacos, além de beneficiar grande parte da população brasileira. O Brasil apresenta uma imensa biodiversidade e o uso de plantas é a primeira opção no tratamento para a população mais carente. A grande extensão territorial do país com diversidades climáticas e solos favorece a condição de desenvolvimento da exploração racional e sustentável de novos metabólitos de valor terapêutico. Desta forma, também seria possível desenvolver saneantes a partir de produtos naturais utilizando plantas, pois poderiam ser menos agressivos ao meio ambiente (Basso, Da Silva *et al.*, 2005; Rojas, Ochoa *et al.*, 2006; Cruz, Santos *et al.*, 2007).

Vários estudos relatam a atividade antifúngica de substâncias naturais contra *Cryptococcus* spp. Agüero e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de extratos de própolis frente a isolados de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. níger*, *Trichoplyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* e como resultado, obtiveram um valor de CIM variando entre 7,80 e 250 µg/mL. Os autores concluíram que a própolis mostrou-se interessante para o tratamento de doenças fúngicas (Agüero, Svetaz *et al.*, 2011). Em 2011, Pinto e colaboradores mostraram que derivados de xantonas apresentam-se como protótipos promissores para o desenvolvimento de novos antifúngicos contra cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. neoformans*, com o valor de CIM de 31,25 µg/mL para essas leveduras e para algumas espécies de dermatófitos, além de mostrar a interferência destas substâncias sobre a biossíntese de ergosterol. Alcalóides obtidos de *Stemona aphylla* foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* e antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A CIM dos alcalóides para *C. neoformans* variou entre 31,25 e 7,80 µg/mL (Sastrarui, Chaiyong *et al.*, 2011). O extrato metanólico e a fração aquosa de *Bohadschia vitiensis* (Semper) foram avaliados contra espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *Sporothrix schenckii* e alguns fungos filamentosos e as substâncias mostraram-se antifúngicos potentes (Lakshmi, Srivastava *et al.*, 2011).

Satheesh e colaboradores (2011), avaliaram a atividade antimicrobiana de um composto inibidor de protease isolado das folhas de *Coccinia grandis* (L.) Voigt, contra *C. neoformans* e *C. albicans* e o composto mostrou-se um excelente

candidato para desenvolvimento de antifúngicos (Satheesh e Murugan, 2011). Em outro estudo avaliou-se a atividade da curcumina isolada de raízes de *Curcuma longa* contra diversos fungos patogênicos, espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus* sp. Curcumina e seus derivados esses polifenóis mostraram-se mais potentes que o fluconazol (Martins, Da Silva *et al.*, 2009). Novos alcalóides extraídos das folhas de *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa* também mostraram atividade forte contra *C. neoformans* (Rahman, Samoylenko *et al.*, 2011).

1.7 *Maytenus ilicifolia*

Maytenus ilicifolia conhecida popularmente como “espinheira santa”, “cancerosa”, “cancorosa-de-sete-espinhos” e/ou “maiteno”, pertence a família Celastraceae (Lorenzi e Matos, 2002; Brandão, Kroon *et al.*, 2010). As plantas desta família são muito utilizadas na agricultura e medicina chinesa, assim como na tradicional medicina brasileira. Muitas das substâncias extraídas das plantas desta família apresentam atividades terapêuticas já comprovadas, como atividade repelente e inseticida, entre outras que ainda estão em estudos. Esta família é dividida em 55 gêneros e 850 espécies, com distribuição mundial, sendo mais encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Mabberley, 1997). Há mais de 30 anos vêm sendo estudados os metabólitos secundários das plantas do gênero *Maytenus* e tem demonstrado um amplo espectro de atividades biológicas, sendo a principal característica quimiotaxonômica a presença de triterpenóides, os quais em vários estudos mostraram atividade antitumoral, imunossupressora, inseticida e anti-HIV (Duan, Takaishi *et al.*, 2000; Deepa e Narmatha Bai, 2010).

A espécie *M. ilicifolia*, é uma árvore comumente encontradas na África e no Brasil. No Brasil, seu uso popular é altamente descrito desde a década de 20, sendo indicado ao combate da gastrite e dispepsias, além de apresentar ações tônicas, analgésicas, antisséptica, cicatrizantes, diuréticas e laxativas (Mossi, Cansian *et al.*, 2004). Os primeiros estudos da eficácia terapêutica de *M. ilicifolia* foram realizados em 1922 por um professor brasileiro que avaliou o uso da *M. ilicifolia* em pacientes portadores de úlcera gástrica (Ming, Castro *et al.*, 1998). Recentemente outro estudo mostrou a eficácia da atividade anti-ulcerativa, realizado por Cipriani em 2004 (Cipriani, Mellinger *et al.*, 2004).

Dentre as substâncias isoladas da *M. ilicifolia*, destacam-se a pristimerina e a maitenina. A pristimerina foi estudada por Costa e colaboradores (2008), o qual mostra que a pristimerina apresenta citotoxicidade seletiva às células tumorais, uma vez que ela reduz o número de células tumorais viáveis (Costa, Ferreira *et al.*, 2008). Desta forma foi comprovada a importância da pristimerina como uma substância com potencial anticancerígeno. No mesmo estudo foi verificado que a pristimerina tem um efeito antiproliferativo por inibição da síntese de DNA das células tumorais, assim como o potencial para indução da apoptose (Deepa e Narmatha Bai, 2010). Cipriani e colaboradores (2004), relatou a presença de um polímero (arabinogalactana) com atividade imunológica, o que pode explicar a melhora do uso da *M. ilicifolia* em tratamentos contra o câncer. Atividade antifúngica ainda não foi relatada na literatura científica (Cipriani, Mellinger *et al.*, 2004).

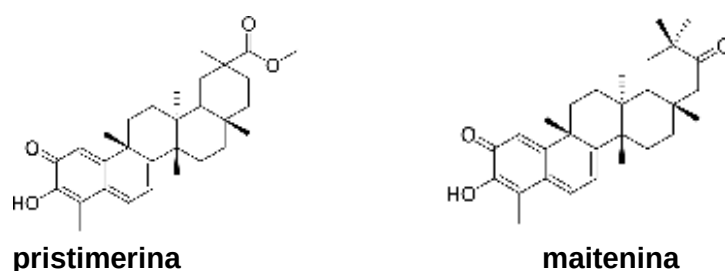


Figura 1. Estruturas químicas das substâncias puras extraídas da planta *Maytenus ilicifolia*, pristimerina e maitenina.

1.8 Chalconas

As chalconas são compostos classificados como fenóis de cadeia aberta, da família dos flavonóides, derivados de plantas. Destacam-se por apresentarem diversidade estrutural no reino vegetal e também grande variedade de atividades biológicas devido a presença de muitos compostos fisiologicamente ativos e por serem substratos para a realização de várias sínteses orgânicas (Simões, 2006; Brandão, Kroon *et al.*, 2010; Banday, Iqbal Zargar *et al.*, 2011; Katsori e Hadjipavlou-Litina, 2011). Brandão e colaboradores (2010) relataram em seu estudo a atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica das chalconas (Brandão, Kroon *et al.*, 2010). Vários estudos mostraram o seu potencial antimalárico, anti-leishmania, anti-HIV, antifúngico, anti-tuberculose e inibidores da tirosina quinase (Svetaz, Tapia *et al.*, 2004; Boeck, Bandeira Falcão *et al.*, 2006; Cheenpracha, Karalai *et al.*, 2006; Valla, Valla *et al.*, 2006; Yang, Shin *et al.*, 2007; Hara, Nakamura *et al.*, 2011; Barua,

Sarmah *et al.*, 2011). O potencial de redução do processo inflamatório desta substância foi demonstrado em vários estudos com chalconas derivadas de plantas dos gêneros *Glycyrrhiza* e *Alpinia* (Zingiberaceae) (Prasad, Phromnoi *et al.*, 2010). Alguns estudos relataram que chalconas isoladas de *Glycyrrhiza*, apresenta forte atividade contra o protozoário *Leishmania* sp por inibir a enzima fumarato redutase (Boeck, Bandeira Falcão *et al.*, 2006). Stevaz e colaboradores (2004) mostraram que há atividade de chalconas contra os fungos *Fusarium equiseti* e *Colletotrichum truncatum* quinase (Svetaz, Tapia *et al.*, 2004).

Park e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de chalconas no efeito da gripe pelo vírus da influenza e como resultado foi observado uma alta inibição do vírus, sendo um importante dado para desenvolvimento de derivados naturais contra o vírus (Park, Jeong *et al.*, 2011).

O potencial antifúngico e a atividade antitumoral de chalconas foi avaliado por Tavares e colaboradores (2011). Foi verificada a ação contra *Paracoccidoides brasiliensis*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e como resultado algumas chalconas apresentam uma atividade potente antifúngica para *P. brasiliensis* e *C. gattii*. Também foi observada atividade antitumoral, a qual foi avaliada nas linhagens tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma) e TK-10 (carcinoma renal) (Tavares, Johann *et al.*, 2011).

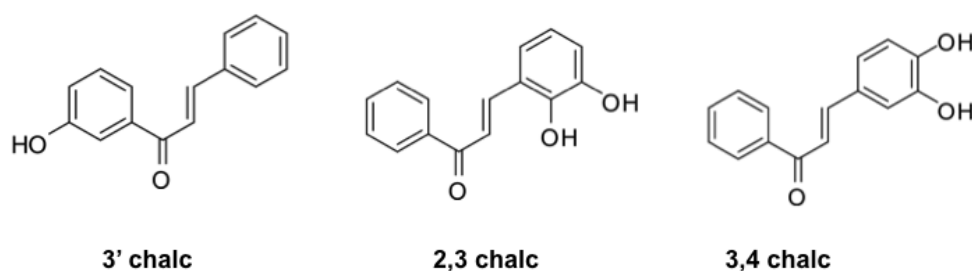


Figura 2. Estruturas químicas das chalconas sintéticas utilizadas neste trabalho, 3' chalc, 2,3 chalc e 3,4 chalc.

2. JUSTIFICATIVA

Avaliar a atividade antifúngica de substâncias de origem vegetal e sintéticas baseadas em modelos moleculares de fontes vegetais, determinando CIM e CFM, para prospecção de protótipos com finalidade saneante contra espécies patogênicas de *Cryptococcus* sp, isolados de ambientes relacionados ao seu nicho. Realizar a curva de morte do protótipo saneante determinando sua eficiência. Adicionalmente determinar a atividade antifúngica contra isolados clínicos resistentes, assim como avaliar o potencial de inibição de adesão da levedura em linhagens celulares relacionadas aos sítios de infecção (pneumócitos, gliomas e queratinócitos), bem como a citotoxicidade, avaliando o mecanismo de ação a fim de obter protótipo antifúngico medicamentoso.

3. OBJETIVOS

Realizar o isolamento e identificação bioquímica e molecular (RFLP) do gênero e espécie de *Cryptococcus* spp em excrementos de pombos do Município de Araraquara coletados pela Vigilância Epidemiológica de Araraquara para determinação do espectro de atividade do saneante.

Determinar o padrão de resposta de isolados ambientais e fármacos aos antifúngicos anfotericina B, e fluconazol por meio da metodologia de microdiluição adaptada do documento EDf7,1 do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), assim como determinar a atividade antifúngica específica das substâncias isoladas de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), maitenina e pristimerina, para verificação da CIM e CFM.

Verificar o potencial citotóxico das substâncias naturais em linhagens celulares A549 (pneumócitos humano tipo II), HepG2 (células de hepatoma humano), células Vero (células de rim de macaco verde) e NOK (queratinócitos normal de mucosa oral), MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano) e V87 (células de glioma humano).

Realizar a curva de morte com as moléculas maitenina e pristimerina usando como controle a anfotericina B frente à cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* e isolado ambiental de *Cryptococcus* mais prevalente, a fim de se verificar eficiência saneante específica.

Realizar os ensaios de verificação do potencial de inibição da adesão do fungo utilizando as chalconas sintéticas em sistemas de infecção (linhagens celulares infectadas com cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*).

Fornecer dados que orientem novos estudos biotecnológicos que tenham como objetivo viabilizar a produção de saneantes e novos fármacos antifúngicos, utilizando substâncias de plantas nativas de nosso bioma bem como substâncias sintéticas formuladas a partir de modelos estruturais naturais.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Identificação dos isolados ambientais

4.1.1 Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp

Para o isolamento e identificação de *Cryptococcus* em nichos ambientais, fezes de aves ou morcegos, os quais foram adequadamente coletados pela Vigilância Epidemiológica do Município de Araraquara; foi utilizada a metodologia descrita por Casali e colaboradores (2003) (Casali, Goulart *et al.*, 2003). Foram coletadas 87 amostras em diferentes localidades do município; de cada amostra foi pesado 1 g de fezes secas e diluídos em 10 mL de solução estéril de salina (0,85 %) contendo cloranfenicol na concentração de 0,05 g/L. A solução foi submetida a agitação em vórtex por 5 minutos, em seguida foi mantido em repouso por mais 5 minutos, para a decantação do material de não interesse e coletar o sobrenadante, o qual foi analisado.

As provas bioquímicas e morfológicas para a identificação das leveduras do gênero *Cryptococcus* foram: detecção das enzimas fenoloxidase e urease, microscopia óptica para visualização de cápsula polissacarídica das leveduras utilizando Tinta da China, assim como as provas bioquímicas por auxanogramas, para identificação das espécies *C. neoformans*, *C. gattii* e também as demais espécies de *Cryptococcus* spp.

O ensaio para análise da enzima fenoloxidase, o qual identifica o gênero *Cryptococcus*, foi realizado a partir da adição de 100 µL do sobrenadante da suspensão de fezes em salina em placas de Petri contendo ágar Níger. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e examinadas em intervalos de 7 a 14 dias. Após o crescimento das colônias, foram selecionadas as que apresentaram coloração marrom, já que esta cor é característica de colônias de *Cryptococcus* em ágar Níger; estas colônias foram examinadas ao microscópio óptico com Tinta da China, para identificação da cápsula polissacarídica e assim confirmar o gênero.

O ensaio da prova da urease, o qual também identifica o gênero *Cryptococcus* por meio da mudança da coloração do meio ágar Uréia de Christensen de amarelo para cor de rosa, foi realizado a partir do cultivo da levedura neste meio e após 48 horas de crescimento em temperatura ambiente, foi verificada

a produção da enzima urease através da mudança de coloração do meio, identificando assim o gênero *Cryptococcus*.

As amostras positivas para o gênero *Cryptococcus*, foram submetidas a análise com o meio L-canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). As amostras foram transferidas para tubos de cultura contendo o meio CGB, incubadas em temperatura ambiente durante 48 horas e em seguida foi realizada a leitura para a identificação da espécie patogênica por meio da alteração da cor do meio, sendo que a alteração da cor de amarelo para azul identifica a espécie *C. gattii*, já que somente esta espécie é resistente à canavalina e tem a capacidade de consumir a glicina do meio como fonte de carbono e nitrogênio, o que leva a alcalinização do meio e consequentemente sua mudança de cor (Kwon-Chung, Polacheck e Bennett, 1982; Min e Kwon-Chung, 1986; Nishikawa, Sant'anna *et al.*, 1996).

Para a identificação das espécies também foram realizadas as provas bioquímicas de assimilação de carbono (Auxanograma) e de nitrogênio, conforme a metodologia desenvolvida por Kurtzman & Fell (1998) em que a partir de cultivos prévios em placas de ágar Sabouraud com 48 horas de crescimento, uma suspensão celular de 10^8 células/mL foi preparada e adicionada nos meios C e N, fundidos previamente em uma proporção de 1:20. Após a solidificação, as fontes de carbono e nitrogênio foram distribuídas de forma equidistante nas placas contendo os meios C e N, respectivamente, e estas foram submetidas à incubação em temperatura de 25 °C e a leitura dos resultados foi feita após 48 a 72 horas. Os açúcares utilizados como fonte de carbono foram: glicose, galactose, lactose, melibiose, sacarose, maltose, rafinose, celobiose e inositol e como fonte de nitrogênio foi utilizado o nitrato de potássio, assim como a assimilação de D-prolina (Kwon-Chung, Kozel *et al.*, 1992). Desta forma os resultados das provas de assimilação de carbono e nitrogênio foram avaliados seguindo a tabela universal taxômica de Kurtzman & Fell (1998), assim é possível concluir a identificação das espécies dos isolados ambientais (Kurtzman e Fell, 1998)

4.1.1 Extração do DNA genômico de *Cryptococcus* em amostras ambientais

Após o isolamento e identificação dos isolados ambientais, foi realizada a extração do DNA das leveduras para posteriormente realizar a identificação molecular das espécies. A partir de culturas de 48 horas (30 °C) de *Cryptococcus* em ágar Sabouraud acrescido de 0,25 g/L de cloranfenicol, as leveduras foram

transferidas para o meio rico YEPD em caldo, acrescido de 2,9 % de NaCl (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de dextrose e 29 g/L de NaCl). Este cultivo permaneceu a 30 °C por 16 horas ou *overnight* sob agitação constante de 100 rpm. As culturas foram transferidas para tubos de 50 mL para prosseguir a extração do DNA genômico conforme (Möller, Bahnweg *et al.*, 1992).

Após extraído, o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. O DNA extraído também foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) durante 1 hora e 30 minutos a 80 volts. O gel foi corado com GelRed (Uniscience) e observado em luz ultravioleta e estocado à -20 °C.

4.1.3 Identificação molecular de *Cryptococcus* spp pela reação de PCR/RFLP

Foram utilizados os iniciadores para o gene *URA5*: *ura5f* (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e *ura5r* (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (Meyer, Castañeda *et al.*, 2003). Foram utilizadas concentrações de 50 pmol de cada sequência iniciadora e 25 ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de desoxinucleotídeos (0.22 mM de cada dNTP), tampão (1,65 mM MgCl₂, 55 mM KCl, Tris-HCl 22 mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (Invitrogen-Life Technologies). A quantidade final na reação de amplificação foi de 50 µL sendo utilizada água Milli-Q estéril. A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 61 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final a 72 °C por 7 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1,5% corado com gelRed (Uniscience).

O produto amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* por 3 horas em banho seco a 37 °C, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 3 % com tampão TBE 1 X durante 5 horas a 100 volts e corado com gelRed e observados a luz ultravioleta (Meyer, Castañeda *et al.*, 2003).

4.2 Ativação de *Cryptococcus neoformans* *in vivo*

A ativação de leveduras *in vivo* é importante para retomar os fatores de virulência da levedura, os quais são perdidos a cada repique. Foi realizada a ativação *in vivo* da cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* por meio da inoculação intraperitoneal de 1×10^6 células da levedura em PBS estéril. Foram utilizados quatro camundongos BalbC machos adquiridos comercialmente do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), da UNICAMP. Após três a sete dias da inoculação, os camundongos foram sacrificados de acordo com as exigências do Comitê de Ética e Pesquisa. Segundo Buissa-Filho (2008), as leveduras foram retirados por meio da retirada do pulmão, fígado e coração, os quais foram triturados e plaqueados em ágar Niger (Buissa-Filho, Puccia *et al.*, 2008). As placas de ágar Niger permaneceram em temperatura ambiente por 48 horas e em seguida foi verificado o crescimento de colônias marrons, característica de *Cryptococcus* spp; essas colônias foram repicadas em tubos com ágar Sabouraud para a realização dos ensaios de adesão.

Foram preparadas lâminas com o macerado dos órgãos os quais foram corados com tinta da china para a visualização de *Cryptococcus neoformans* por microscopia óptica em aumento de 40 X.

4.3 Avaliação da atividade antifúngica

4.3.1 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de sensibilidade dos isolados clínicos e ambientais foram realizados frente às substâncias isoladas de *Maytenus ilicifolia* tendo como controle positivo fluconazol, anfotericina B e o saneante hipoclorito de sódio 5 %. Para as chalconas sintéticas os controles para a determinação da CIM foram anfotericina B e fluconazol, e a atividade antifúngica dessas substâncias foram avaliadas frente aos isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* sensíveis e resistentes. Estes ensaios foram realizados segundo o documento EDef7,1 (EUCAST), 2008 com algumas adaptações. Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizado o meio RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico] pH 7,0 acrescido com 2 % de glicose, esterilizado por filtração e conservado a 4 °C.

Como controle do ensaio foi utilizada, a cepa ATCC 90012 de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, conforme recomendados pelos documentos normativos do CLSI (M27A2, 2002). Os fármacos antifúngicos utilizados foram obtidas dos fabricantes em forma de pó e a partir desse foram realizados cálculos, quanto às suas potências, seguindo as recomendações do documento. A solução de fluconazol (Sigma) que apresenta atividade fungistática, foi preparada partindo de uma solução estoque inicial com a diluição do fármaco em água destilada estéril, a fim de obter uma concentração de 5,12 g/mL; a partir desta solução, foram preparadas mais 10 soluções intermediárias que variaram entre 1,25 e 640 mg/L em água destilada conforme descrito no documento M27A2 do CLSI. Das soluções intermediárias foram feitas diluições em proporção 1:10 em meio RPMI, para assim se obter concentrações que variaram entre 0,125 e 64 mg/L, sendo estas as soluções de trabalho. Na leitura dos resultados do controle do fluconazol, as concentrações variaram entre 0,025 e 32 mg/L, pois com a adição do inóculo a concentração de trabalho foi reduzida em 50 %.

Já para o controle com anfotericina B (Sigma) foi realizada uma primeira diluição em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 1600 mg/L e a partir desta foram realizadas diluições intermediárias em DMSO, sendo estas as soluções mães, as quais serão mantidas a -20 °C. A partir da solução mãe, foram realizadas diluições na proporção 1:100 em meio RPMI, sendo que as diluições de trabalho varia entre 0,030 a 16,0 mg/L. A leitura dos resultados na placa, serão feitas nas diluições de 0,015 a 8,0 mg/L (CLSI, M27A2, 2002).

As duas substâncias naturais foram diluídas assepticamente em quantidades adequadas de DMSO e solubilizadas por agitação com o auxílio do vórtex. A faixa de concentração do extrato na avaliação da atividade antifúngica foi calculada, visando obter a variação das concentrações entre 0,48 a 250 mg/L (Scorzoni, Benaducci *et al.*, 2007).

As cepas para o ensaio foram mantidas em ágar Sabouraud, em temperatura ambiente por 48 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em salina 0,85 % estéril, sendo preparados em concentração de 2,5 a 5×10^6 UFC/mL. Todos os inóculos foram conferidos através da contagem de células em câmara de Neubauer. Em seguida, o inóculo foi diluído em meio RPMI em uma proporção de 1:100, para a obtenção de uma concentração que entre 2,5 a 5×10^4 UFC/mL, a qual foi distribuída em placas de 96 poços, sendo um volume de 100 µL nas fileiras de 2 a 12 onde estão as substâncias que se deseja avaliar a atividade antifúngica em concentrações a partir de diluição seriada. Desta forma, a concentração do inóculo

passou a ser 10^3 UFC/mL. O controle positivo (C +) do teste foi adicionado na fileira 12 com adição de 100 μ L do meio RPMI livre de droga e 100 μ L da suspensão de levedura. Também foi utilizado o controle de esterilidade do meio (C -) ou branco para a leitura espectrofotométrica, na fileira 1, onde foi adicionado somente 200 μ L do meio RPMI. As placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 e 37 °C sob agitação constante de 150rpm e a leitura ocorreu após um período de 48 horas, por meio de leitura visual com o revelador *Alamar Blue* (1:10) e da leitura por espectrofotometria a 490nm.

O saneante hipoclorito de sódio comumente usado para a desinfecção de ambientes encontra-se comercialmente em uma concentração de 2,5 %, o qual é diluído em uma proporção de 1:10 em água, desta forma, para o ensaio de determinação do CIM, o mesmo, foi analisado em diluições 1:10, partindo de uma concentração inicial na placa de 2,5 %. Contudo, na coluna 2 foi adicionado 100 μ L do hipoclorito de sódio a 5 % juntamente com 100 μ L do meio RPMI, sendo esta a concentração do hipoclorito comercialmente encontrado (2,5 %); a partir da coluna 3, foram realizadas diluições seriadas partindo de uma diluição 1:2 de hipoclorito de sódio em meio RPMI, desta diluição foi retirada uma alíquota de 22 μ L a qual foi adicionada a 88 μ L de RPMI completando assim, um volume de 110 μ L, a partir deste poço, foi retirado 10 μ L para as demais diluições seriadas. Portanto, no 2° poço a concentração encontra-se a 1/20 até $1/2 \times 10^{10}$. O controle negativo foi analisado na coluna 1 e o controle positivo na coluna 12.

4.3.2 Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

O ensaio para determinar a concentração inibitória mínima foi realizado com a finalidade analisar a ação da substância no crescimento celular, ou seja, determinar a menor concentração com ação fungicida. Para isso, após a leitura do resultado da CIM, cada concentração da microplaca de 96 poços foi transferida para placa com ágar Sabouraud; as placas foram incubada a 30°C e após 48 horas, foi feita a leitura visual observando o crescimento de colônias.

4.4 Avaliação da eficiência saneante das substâncias por curva de morte

O ensaio de curva de morte foi realizado seguindo a metodologia descrita por Klepser, Ernst *et al.*, 1998; Diniz, 2009; Sangalli-Leite, Scorzoni *et al.*, 2011 com

modificações. O ensaio foi realizado com a cepa clínica ATCC 90012 *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reativada em camundongo e com um isolado ambiental M16.2 previamente identificado como da espécie *C. neoformans* var. *grubii*. Foi avaliado o potencial de ação da anfotericina B e das substâncias naturais, maitenina e pristimerina. Este estudo estima a diminuição no número de leveduras viáveis ao longo do tempo, segundo Klepser e colaboradores (1998), ou ainda observar a viabilidade das células fúngicas e a interação entre o composto estudado e a levedura, conforme o descrito por Sangalli-Leite *et al.*, (2011).

Foi preparado o inóculo, após um cultivo de 48 horas em ágar Sabouraud, das leveduras em meio RPMI na concentração de 1×10^6 /mL, o qual foi conferido por meio da contagem em câmara de Neubauer. Em placas de 24 poços foram adicionados 500 μ L do inóculo e 500 μ L das substâncias antifúngicas, em uma concentração acima da CIM, para a maitenina usamos 7,81 mg/L e para a pristimerina, 15,62 mg/L, uma vez que essas foram as maiores concentrações para os todos os isolados.

O experimento cinético foi iniciado pela retirada de uma alíquota de 100 μ L da suspensão de células fúngicas em contato com as substâncias e plaqueado em ágar Sabouraud, sendo que o plaqueamento foi realizado nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Assim, avaliou-se a morte das leveduras em relação ao tempo de contato com as amostras teste. Após 48 horas à temperatura ambiente, foi avaliado o número unidades formadoras de colônias (UFC) e o resultado foi representado em um gráfico, sendo que no eixo y estão representados a porcentagem de morte das leveduras e no eixo x o tempo de contato em horas do fungo com amostra teste e assim será possível analisar o potencial fungicida ou eficiência da droga.

Avaliamos também a eficiência do método de desinfecção, em porcentagem, por meio do cálculo da taxa de morte da levedura frente à substância natural maitenina (7,81 mg/L), pristimerina (15,62 mg/L) e anfotericina B (0,25 mg/L) por meio do seguinte cálculo (Diniz, 2009):

$$E (\%) = \frac{n_0 - n_f}{n_0} \times 100 \quad \text{onde:}$$

E = eficiência, em porcentagem;

n_0 = Concentração inicial de fungos;

n_f = Concentração final de fungos após os métodos de desinfecção

4.5 Cultura de células

Nos ensaios de cultura celular foram utilizadas as linhagens celulares normais NOK (células orais normais imortalizadas com o gene *h-tert* doadas pelo Department of Medicine Harvard Medical School-Dr Karl Munger), células VERO (rim de macaco verde da África) e células MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) e para as linhagens tumorais A549 (células tumorais de pulmão), HepG2 (células de hepatoma humano) e V87 (células de glioma humano) obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células cultivadas em garrafas com o meio específico para cada linhagem, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SBF) e 2 % de antibiótico ATB (complexo estreptomicina, penicilina, gentamicina e anfotericina B), quando permitido. As células foram mantidas à temperatura de 36,5 °C com 5 % de CO₂, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS e tripsinizadas. Em seguida foi adicionado o meio de cultivo com 10 % SFB para neutralização da tripsina evitando danos às células. Com essa suspensão celular foram preparadas placas para os ensaios de citotoxicidade das substâncias antifúngicas e para ensaios de adesão.

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das substâncias foram preparadas placas de 96 poços com as células, contendo $2,5 \times 10^3$ a 5×10^4 células por poço. As placas foram incubadas a 36,5 °C com 5 % de CO₂, por 24 horas para a formação da monocamada celular (Husøy, Syversen *et al.*, 1993). A viabilidade celular foi estudada nas concentrações próximas da CIM, assim como a concentração onde apresentam 80 % de células vivas. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio do MTT (brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma), utilizado na concentração de 5 mg/mL, conforme (Mosmann, 1983) com algumas modificações.

A avaliação da viabilidade celular pelos métodos colorimétricos com sais tetrazólicos, como a reação com o sal de MTT, é determinada pela redução do sal em derivado azul de formazana, o qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial; desta forma, este método avalia de forma quantitativa a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (Denizot e Lang, 1986; Gerlier e Thomasset, 1986; Ferrari, Fornasiero *et al.*, 1990). O precipitado de formazana

apresenta coloração azul e com a adição de um solvente orgânico é possível sua intensidade a qual é proporcional à quantidade de células vivas (Denizot e Lang, 1986).

As substâncias foram avaliadas nas concentrações de 31,25 a 0,48 mg/L. As soluções foram preparadas partindo de uma solução estoque e foram diluídas no meio específico para cada linhagem celular nas placas previamente preparadas com as células. O meio de cultura foi retirado e foram adicionados, 100 µL de cada diluição de cada substância ou droga por poço. As placas foram incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ ao abrigo da luz por 24 horas; em seguida as soluções foram retiradas e adicionados 10 µL da solução de MTT; e novamente as placas foram incubadas a 37 °C por um período de 4 horas, conforme descrito Denizot e Lang, 1986 e Ferrari, Fornasiero *et al.*, 1990. Após o tempo de incubação foi observado formação de precipitado escuro nas concentrações onde as células encontravam-se vivas; a solução MTT foi retirada e foram adicionados 100µL de isopropanol para diluir o precipitado e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do meio de amarelo para violeta. Como controle positivo do teste foi utilizado, peróxido de hidrogênio e doxorubicina.

Foram realizadas as leituras espectrofotométricas das placas em leitor de microplacas ELISA (BioRad modelo 3550) com comprimento de onda de 570 nm. A percentagem de células viáveis através da fórmula abaixo:

$$\text{células viáveis \%} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo}$$

As análises de citotoxicidade foram realizadas em duplicata com três experimentos independentes. Também foi utilizado um controle negativo com células não tratadas, sendo esta leitura considerada um total de 100% de células vivas. Em contrapartida, foi realizado um teste para verificar se há reação das substâncias antifúngicas com o MTT, sendo este realizado em placas sem células, somente com as substâncias e com o MTT. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio com células; evitando assim que o resultado seja um falso-positivo (dados não mostrados).

4.5.2 Ensaio de adesão às células humanas

O estudo da adesão de *Cryptococcus neoformans* em células humanas, foi avaliado por meio de uma curva de adesão, a fim de estudar qual o tempo inicial da adesão da levedura em diferentes linhagens celulares, assim como estudar qual o

tempo em que ocorre a maior taxa de adesão, padronizando o melhor tempo para o estudo da mesma. Avaliamos a adesão da cepa de *C. neoformans* ATCC 90012, após a ativação *in vivo*, em células epiteliais NOK, células metabolizadoras HepG2, células do sistema nervoso central V87 e em células de pulmão MRC-5 nos tempos de 0, 1, 4, 8, 24, 48 horas.

O ensaio de adesão foi realizado em placas de 24 orifícios, contendo 1×10^5 células por poço, conforme (Sardi, Duque *et al.*, 2012). Após a formação da monocamada celular nas placas, foram adicionados 500 μ L de um inóculo de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL da levedura. As placas foram incubadas a 36,5 °C e 5 % de CO₂, pelos determinados tempos. Após cada tempo de incubação, as células foram lavadas, três vezes, com PBS estéril e em seguida, foram tripsinizadas e 100 μ L foram plaqueados em meio Sabouraud. Após 48 horas do plaqueamento, foram contadas as colônias de leveduras que cresceram nas placas, que correspondem ao número de leveduras aderidas às células. Foi traçada uma curva da padronização e determinando o melhor tempo para o estudo da adesão. Para o cálculo da porcentagem de adesão, consideramos que $2,5 \times 10^4$ de leveduras corresponde a 100 % de adesão, pois este é o número total de leveduras adicionadas às células.

A avaliação da inibição da adesão foi estudada com o tratamento da chalcona (2,3-chalc) na concentração de 3,90 mg/L, concentração esta com atividade fungistática. Realizamos o estudo com os tempos iniciais de 30 minutos, 1 hora e 2 horas de adesão, em duplicata. A chalcona e o inóculo foram adicionados concomitantemente e após os determinados tempos, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril, tripsinizadas e plaqueadas em ágar Sabouraud. Os resultados foram analisados em porcentagem em gráficos. Como controle do ensaio, foi realizado um ensaio de adesão sem o tratamento, sendo este considerado como 100 % de adesão.

4.5.3 Estudo da adesão de *C. neoformans* em células humanas por meio de imunofluorescência.

Foi realizado o estudo da adesão de *C. neoformans* em células NOK, MRC-5, V87 e HepG2 através de microscopia de imunofluorescência no equipamento *In Cell Analyser 2000* (GE Healthcare), o qual avalia, por meio de imagens de alta definição, o comportamento da levedura no processo de infecção celular.

Primeiramente foram preparadas as placas de 96 poços com $2,5 \times 10^4$ células/poço, sendo preparada uma placa para cada linhagem celular; essas placas foram incubadas para a formação da monocamada celular e em seguida foram adicionados 100 μ L do inóculo na concentração 1×10^6 UFC/mL de *C. neoformans* ATCC 90012. Avaliamos a adesão do *C. neoformans* nos tempos iniciais de 30 minutos, 1 hora e 2 horas, tendo em vista que a curva de adesão, realizada anteriormente, mostrou uma maior taxa de adesão no tempo de 1 hora. Desta forma, após a adição do inóculo nas placas, estas foram incubadas pelos determinados tempos e em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril e fixadas com 100 μ L de paraformaldeído 4 % estéril. Utilizamos como controle negativo poços contendo somente as células. Todo o ensaio foi realizado em duplicata.

Após a fixação das células, foi realizada a reação de imunofluorescência nas placas; desta forma, o paraformaldeído 4 % foi retirado, as células foram lavadas cinco vezes com PBS estéril e em seguida foi realizada a permeabilização com 100 μ L de Triton 0,25-0,5 % por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 100 μ L de 0,05 % de PBS-Tween 20 estéril por três vezes, a fim de aumentar a avidéz do anticorpo que irá marcar a levedura, em seguida, foram adicionados 100 μ L da solução de bloqueio IF e as placas foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Novamente as células foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 e foram adicionados 50 μ L de uma diluição 1:50 do anticorpo anti-Cryptococcus, com título maior que 1:1000, em PBS-Tween 20 e as placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Foi realizada a lavagem das células e adicionados 100 μ L do anti-IgG mouse + Alexa flúor 488 diluído em PBS-Tween 20, na proporção 1: 400 e as placas foram incubadas à 37 °C por 1 hora em proteção da luz. A lavagem das células foi realizada e foi acrescentado 100 μ L do fluorocromo DAPI 0,05 μ g/mL por 20 minutos, em seguida, ocorreu novamente a lavagem das células e foi adicionado 100 μ L de uma solução de paraformaldeído 1 %. Sob proteção da luz, as placas foram conservadas em geladeira até a leitura microscópica no *In Cell Analyser 2000 (GE Healthcare)*, no qual por meio da marcação realizada, analisou-se o núcleo das células pelo fluorocromo DAPI e a levedura pela marcação com o anticorpo, verificando o processo de adesão.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação de *Cryptococcus* em amostras ambientais

Das 87 amostras ambientais coletadas, 66,6 % (58) das amostras foram positivas para o gênero *Cryptococcus* quando analisadas por microscopia direta com Tinta da China, prova da urease e prova da fenoloxidase. De cada amostra foram analisadas uma ou mais colônias sugestivas, sendo codificadas, por questões éticas, quanto à localização da área infestada pela letra indicativa do local de coleta seguida pelo número da amostra coletada e pelo número indicativo da colônia. A relação dos locais de coleta com a positividade das amostras mostrou que 10,3 % (6) das amostras positivas foram coletadas em escolas de ensino infantil, 10,3 % (6) em parques, praças e ruas, 24,2 % (14) em barracões abandonados e 55,2 % (32) em hospitais ou proximidade dos mesmos, como mostra a **Figura 3**. As amostras positivas para o gênero foram testadas pelo meio do CGB para uma prévia identificação da espécie *C. gattii*, sendo os resultados expressos na **Tabela 1**. Considerando que mais de uma colônia de cada amostra foi testada por CGB, foram estudados 58 isolados das quais 20,7 % (12) de *C. gattii* e 79,3 % (46) foram características para *Cryptococcus* spp.

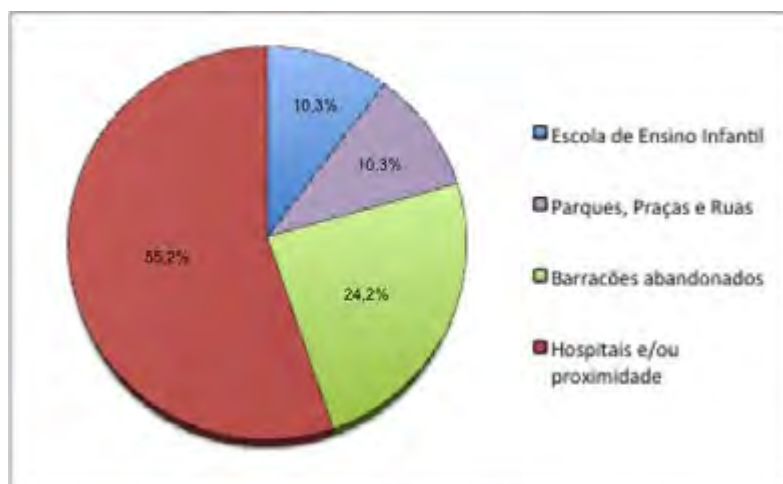


Figura 3. Resultados das amostras positivas para *Cryptococcus* em amostras coletadas em locais públicos do Município de Araraquara.

Tabela 1. Resultado da identificação dos isolados positivos para *Cryptococcus* para a espécie *C. gattii* por meio da identificação pelo CGB.

Localidade	Amostra	CGB	Espécie sugestiva
Escola Infantil	L 1.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Escola Infantil	L 1.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Escola Infantil	V 2.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Escola Infantil	V 3.5	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Escola Infantil	V 5.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Escola Infantil	S 5.2	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Parques e Ruas	B 3.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Parques e Ruas	B 3.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Parques e Ruas	B 3.5	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Parques e Ruas	B 5.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Parques e Ruas	B 5.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Parques e Ruas	PQ 1.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 10.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 12.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 12.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 14.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 15.4	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 16.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 16.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 16.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 16.4	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 18.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 21.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 21.2	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Barracões abandonados	M 23.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Barracões abandonados	M 28.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 2.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 2.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp

Localidade	Amostra	CGB	Espécie sugestiva
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.4	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.5	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.7	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.8	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.9	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 4.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 4.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 4.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 5.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 5.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 5.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.3	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.4	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.5	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.8	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 7.0	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 7.1	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 8.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 8.1	+ (positivo)	<i>Cryptococcus gattii</i>
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 8.2	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 10.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	Hp 15.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp
Hospitais e/ou Proximidades	SC 7.0	- (negativo)	<i>Cryptococcus</i> spp

Finalizando a identificação dos isolados ambientais pelas provas bioquímicas, foi realizado o ensaio de assimilação de carbono (auxanograma) e de nitrogênio. Através da análise dos resultados pela tabela de assimilação, não foi possível determinar as espécies de todos os isolados ambientais (**Tabela 2**), uma vez que estas serão posteriormente confirmadas por técnicas moleculares. Dos 58 isolados analisados, 3,5 % (2) foi identificada como *C. ater*, 1,7 % (1) como *C. laurentii*, 1,7 % (1) como *C. luteolus*, 5,2 % (3) como *C. gattii*, 17,2 % (10) como *C. neoformans* e 79,7 % (41) foi classificado como *Cryptococcus* spp, decorrente da dificuldade de identificação pela metodologia.

Tabela 2. Identificação das espécies dos isolados ambientais positivos para *Cryptococcus*, através dos testes de assimilação de carbono (auxanograma) e teste de assimilação de nitrogênio.

Amostra	Assimilação de carbono							Assimilação de nitrogênio			Espécies				
	Glicose	Galactose	Maltose	Lactose	Melibiose	Rafinose	Xilose	Inositol	Sacarose	Dulcitol		Trealose	Celobiose	KNO ₃	D-prolina
L 1.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
L 1.3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
V 2.3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
V 3.5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
V 5.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
S 5.2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	C. ater
B 3.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
B 3.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. laurentii
B 3.5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
B 5.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
B 5.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
PQ 1.3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. luteolus
M 12.1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
M 12.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
M 14.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
M 15.4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
M 16.1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. ater
M 16.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. gattii
M 16.3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. neoformans
M 16.4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. gattii
M 18.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
M 19.1	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	C. neoformans
M 21.1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
M 21.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. gattii
M 23.1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
M 28.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
HP 2.0	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 2.1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. neoformans
HP 3.0	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 3.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C. spp
HP 3.2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
HP 3.3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C. spp
HP 3.4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
HP 3.5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 3.7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. neoformans
HP 3.8	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
HP 3.9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 4.0	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 4.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	C. spp
HP 4.2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp
HP 5.1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C. spp

Analisando paralelamente os resultados do ensaio do CGB e da assimilação de carbono e nitrogênio, foi observado que as amostras positivas no teste de assimilação para *C. gattii* corresponderam com o CGB positivo, porém, alguns resultados positivos no CGB não foram identificados como *C. gattii* nos demais ensaios, uma vez que ocorreu positividade no CGB para as duas espécies identificadas como *C. ater* pelo auxanograma; dois isolados foram identificados como *C. gattii* pelo CGB, porém, pelo auxanograma, mostraram-se ser da espécie *C. neoformans*. Um isolado apresentou CGB negativo, mas pelo auxanograma foi identificado como *C. gattii*; em apenas dois isolados a positividade no CGB correspondeu à espécie *C. gattii* no auxanograma. A maioria foi classificada como *Cryptococcus* spp pelos métodos do CGB e auxanograma.

Foi realizada a extração de DNA de todos os isolados ambientais de *Cryptococcus* para a identificação molecular dos mesmos. Os produtos da extração do DNA foram analisados, quantificados e purificados quando necessário. Todas as amostras apresentaram bandas indicando a presença de DNA. O produto da amplificação do gene *URA5* mostrou a presença de uma única banda com massa molecular de cerca de 800 pb, sendo esta a banda esperada para o gene (dados não demonstrados). Em seguida, os produtos da PCR foram quantificados e submetidos à reação de restrição com as enzimas *Sau96I* e *HhaI* para a identificação molecular dos isolados, assim como foi realizado com os oito tipos moleculares (VNI, VNII, VNIII, VNIV e VGI, VGII, VGIII, VGIV) (**Figura 4**) com os quais foram comparados os resultados dos isolados ambientais. Quando comparados o peso molecular das bandas dos isolados com o peso molecular das cepas padrões, foi verificado que os 54 isolados ambientais, identificados previamente como sendo *C. neoformans*, *C. gattii* ou *C. spp*, apresentaram o mesmo perfil que o tipo molecular VNI, sendo classificados molecularmente como *C. neoformans* var. *grubii* (**Figura 5**).

Foi realizada uma correlação entre os resultados dos ensaios bioquímicos e moleculares. Apenas três isolados apresentaram resultados discrepantes entre as técnicas, uma vez que apresentou resultado positivo para *C. gattii* no auxanograma e *C. neoformans* na tipagem molecular, dez isolados apresentaram-se da espécie *C. neoformans* pelo auxanograma e pela tipagem molecular e os demais isolados apresentaram-se como *Cryptococcus* spp no auxanograma e foram identificados como o tipo molecular VNI.

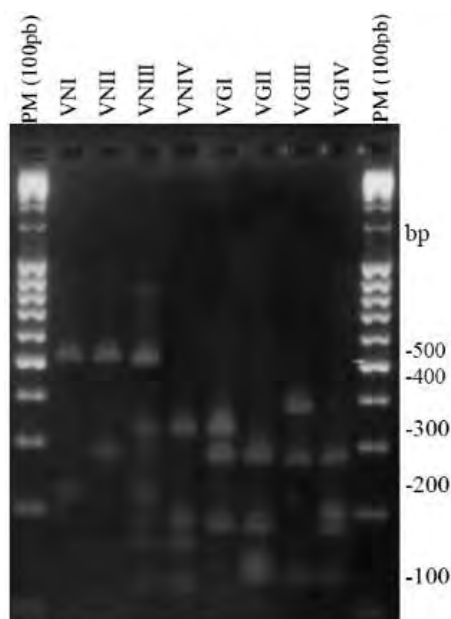


Figura 4. Perfis de PCR-RFLP dos tipos moleculares das espécies *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII e VGIV). Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas).

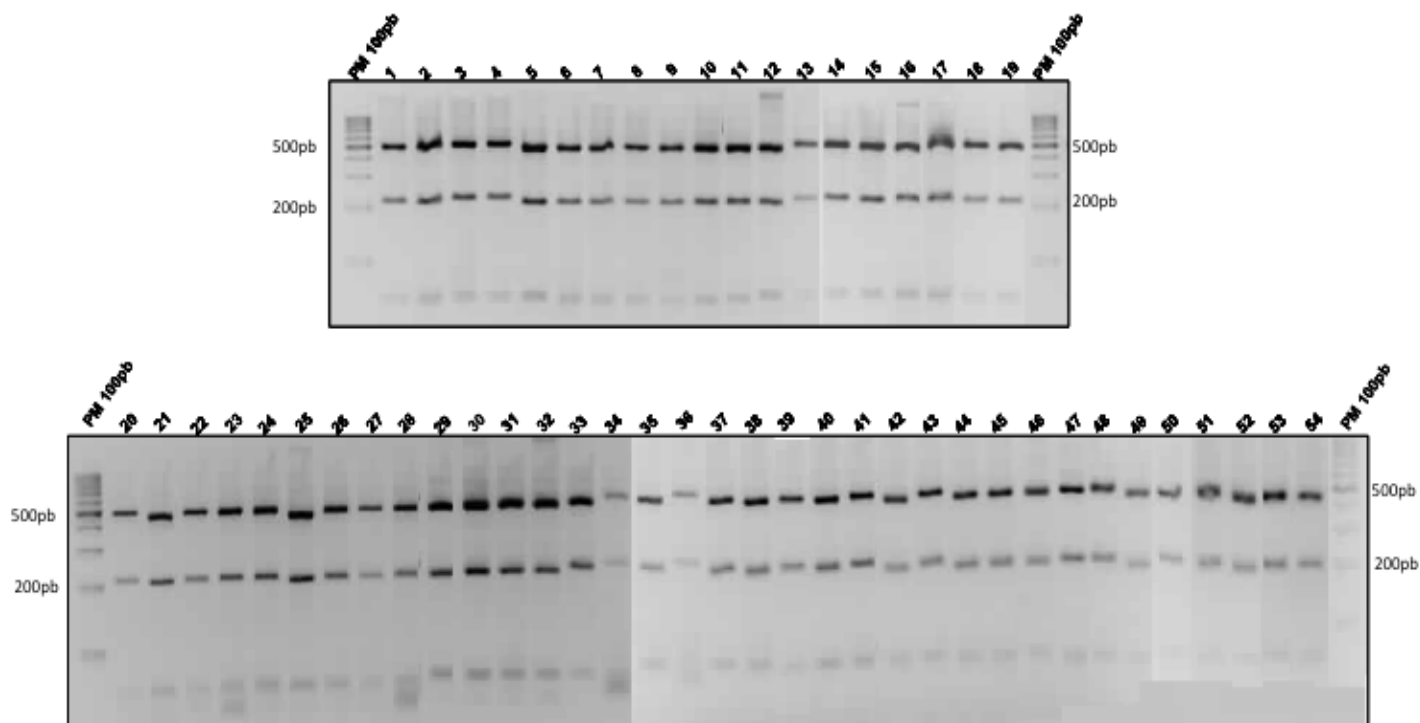


Figura 5. Produto da reação de PCR-RFLP pelas enzimas de restrição *HhaI* e *SauI*. Perfil molecular de 54 isolados ambientais. Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas).

A sequência das amostras dos isolados ambientais no gel de PCR-RFLP é: **1-** B3.4; **2-** B5.1; **3-** M12.1; **4-** M12.2; **5-** M14.1; **6-** V2.3; **7-** L1.2; **8-** L-1.3; **9-** HP2.0; **10-** HP2.1; **11-** HP3.2; **12-** HP3.5; **13-** HP3.8; **14-** HP5.3; **15-** HP6.1; **16-** HP8.0; **17-** HP3.4; **18-** HP5.2; **19-** M21.1; **20-** HP3.1; **21-** HP4.0; **22-** HP4.1; **23-** HP4.2; **24-** HP6.0; **25-** HP6.5; **26-** HP6.8; **27-** HP7.0; **28-** HP10.0; **29-** M15.4; **30-** M21.2; **31-** M28.2; **32-** V3.5; **33-** B3.1; **34-** SC7.0; **35-** HP5.1; **36-** V5.1; **37-** HP6.2; **38-** HP7.2; **39-** HP15.0; **40-** M18.1; **41-** M10.1; **42-** M23.1; **43-** M16.2; **44-** M16.3; **45-** M16.4; **46-** B5.2; **47-** HP3.0; **48-** HP3.3; **49-** HP3.7; **50-** HP3.9; **51-** HP6.3; **52-** HP6.4; **53-** HP8.1; **54-** HP8.2.

5.2 Reativação de *Cryptococcus neoformans* *in vivo*

Por meio da análise microscópica das lâminas coradas com Tinta da China avaliamos a morfologia da cepa ATCC 90012 após passagem *in vivo* e verificamos discreto aumento da cápsula polissacarídica após reisolamento conforme demonstrado na **Figura 6**. Verificou-se que após a infecção de camundongos com esta cepa, as leveduras apresentaram-se com alterações morfológicas significativas como o aumento do tamanho da célula e da cápsula polissacarídica em tecido de pulmão e fígado, após a infecção *in vivo*, conforme mostra a **Figura 7**.

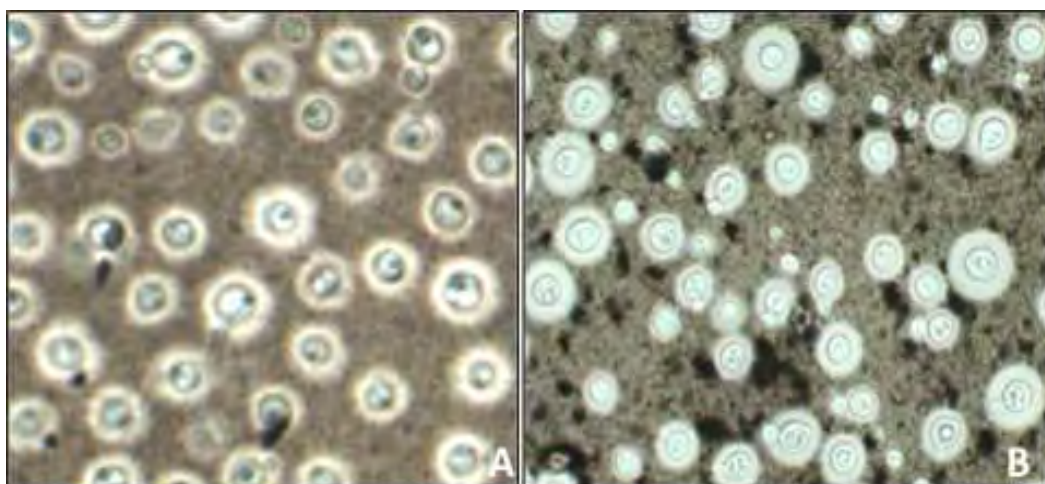


Figura 6. Microscopia óptica em aumento de 40 X da suspensão de *C. neoformans* ATCC 90012 em salina 0,85 %, mostrando as alterações morfológicas após a infecção de camundongos BalbC. Leveduras antes da infecção *in vivo* (A); Leveduras após a infecção *in vivo* (B).

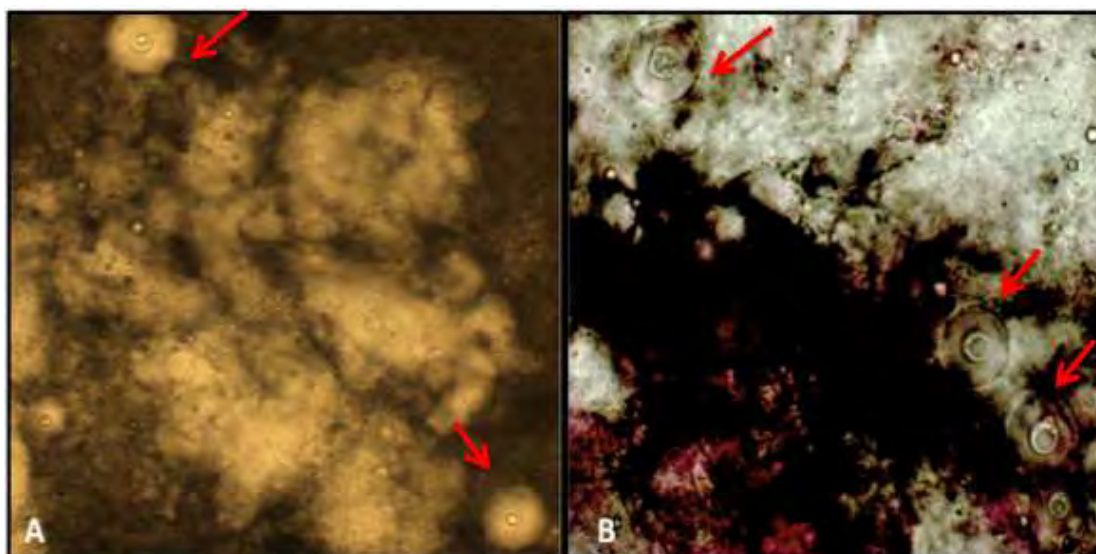


Figura 7. Microscopia óptica em aumento de 40 X, mostrando infecção de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 em tecidos de fígado (A) e pulmão (B) extraídos de camundongo BalbC.

5.3 Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica das substâncias *Maytenus ilicifolia* foi realizada com finalidade saneante, desta forma sua ação foi avaliada contra a cepa ATCC de *C. neoformans* 90012, o isolado clínico de *C. neoformans* (30R), o isolado animal de *C. gattii* (118) e seis isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, previamente identificados (M16.2; M16.3; M16.4; M21.1; V2.3; HP5.2). Como controle positivo do ensaio foram utilizados os fármacos, fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) e o saneante comercial, hipoclorito de sódio (NaClO) 2,5 %. A **Tabela 3** mostra os resultados das CIM, assim como a CFM, expressas em mg/L.

Tabela 3. Atividade antifúngica de triterpenos quinonametídeos isolados de *Maytenus ilicifolia*.

Subst/Droga	MJ2		MF2,5		AMB		FCZ		NaClO	
Isolados	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*
<i>C. neoformans</i> ATCC 90012	0,48	0,48	0,97	0,97	1,00	1,00	4,00	8,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
<i>C. neoformans</i> 30R	3,90	3,90	7,81	7,81	1,00	1,00	64,0	64,0	1/10 ⁵	1/10 ⁵
<i>C. gattii</i> 118	1,95	1,95	3,90	3,90	1,00	1,00	32,0	32,0	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado M16.2	0,48	0,48	7,81	7,81	1,00	1,00	4,00	4,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado M16.3	0,48	0,48	7,81	7,81	1,00	1,00	4,00	4,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado M16.4	0,48	0,48	15,62	15,62	1,00	1,00	8,00	8,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado M21.1	0,48	0,48	3,90	3,90	1,00	1,00	8,00	8,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado V2.3	0,97	0,97	3,90	3,90	2,00	2,00	8,00	8,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵
Isolado Hp5.2	0,48	0,48	3,90	3,90	2,00	2,00	8,00	8,00	1/10 ⁵	1/10 ⁵

* concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) estão expressas em mg/L; MJ2: maitenina; MF2,5: pristimerina; AMB: anfotericina B; FCZ: fluconazol; NaClO: hipoclorito de sódio

Analisando a atividade das substâncias de *M. ilicifolia*, a maitenina apresentou melhores resultados para a cepa ATCC 90012, com CIM de 0,48 mg/L; enquanto que para os isolados resistentes ao fluconazol, a maitenina mostrou ação potente com CIM variando entre 1,95 e 3,90 mg/L. Foi observado que os valores de CFM e de CIM das substâncias foram os mesmos, portanto foi constatada atividade fungicida. Já para a pristimerina, os resultados variaram de 3,90 a 7,81 mg/L para os isolados resistentes e para a cepa ATCC 90012, o resultado foi de 0,97 mg/L. Em relação ao fluconazol, a cepa ATCC mostrou-se sensível, porém os isolados resistentes *C. neoformans* 30R e *C. gattii* mostraram-se resistentes a esse fármaco, já para a anfotericina B todas as cepas mostraram-se sensíveis.

Na avaliação da sensibilidade dos isolados ambientais frente às substâncias, a maitenina apresentou CIM variando de 0,48 a 0,97 mg/L, enquanto a pristimerina, apresentou uma CIM entre 3,90 a 15,62 mg/L, portanto, a pristimerina mostrou-se menos ativa para os isolados ambientais que a maitenina. O comportamento dos isolados frente aos fármacos mostrou-se dentro dos valores esperados, sendo todos considerados sensíveis. Em relação ao hipoclorito de sódio, os resultados foram expressos em diluições consecutivas, partindo de uma diluição 1:10; desta forma obtivemos o mesmo resultado para todos os isolados ambientais, assim como para a cepa padrão ATCC 90012 e isolados clínicos, sendo o valor da CIM igual a $1/10^5$.

Também foram avaliadas 15 chalconas com finalidade de desenvolvimento de um protótipo de medicamento antifúngico. As chalconas foram testadas contra as cepas ATCC de *C. neoformans* 90012, o isolado clínico resistente 30R, o isolado animal resistente 118 de *C. gattii* 118 e os isolados sensíveis S26 e S27. Como controle do ensaio foram utilizadas os fármacos fluconazol e anfotericina B. A **Tabela 4**, mostra os resultados da CIM e CFM, onde se destacam as seguintes chalconas, 3,4-chalc com uma variação de CIM de 3,90 a 7,81 mg/L e faixa de CFM entre 7,81 a 31,25 mg/L; 2,3-chalc com variação de CIM de 1,95 a 7,81 mg/L e CFM entre 3,9 e 7,81 mg/L; a 3'-chalc, com CIM na faixa de 1,95 a 7,81 mg/L e CFM entre 7,81 a 15,62 mg/L (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), expressos em mg/L para as chalconas sintéticas contra as cepas *Cryptococcus*.

Chalcona	<i>C. neoformans</i> S26	<i>C. neoformans</i> S27	<i>C. neoformans</i> ATCC 90012	<i>C. neoformans</i> 30R	<i>C. gattii</i> 118
	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM*
Chalcona	3,90	15,62	3,90	15,62	7,81
2'-chalc	15,62	15,62	31,25	31,25	31,25
3'-chalc	1,95	7,81	3,90	15,62	3,90
4'-chlac	7,81	15,62	15,62	31,25	3,90
2',4'-chalc	15,62	31,25	31,25	62,50	31,25
3',5'-chalc	31,25	31,25	62,50	62,50	62,50
Flavona	15,62	15,62	31,25	62,50	31,25
6-Flavona	31,25	31,25	15,62	125	31,25
Isoflavona	>250	>250	>250	>250	>250
3'G-chalc	31,25	31,25	>250	31,25	31,25
2-chlalc	7,81	7,81	125	7,81	15,62
3,4-chalc	3,90	7,81	31,25	7,81	15,62
2,3-chalc	1,95	3,90	7,81	3,90	7,81
3-chalc	7,81	15,62	7,81	31,25	31,25
2,5-chalc	7,81	7,81	15,62	31,25	15,62

5.4 Determinação da ação fungicida de maitenina e pristimerina

Devido ao maior potencial de citotoxicidade e a atividade fungicida dos triterpenos da *M. ilicifolia*, foi determinado, o estudo destas para a atividade saneante. Para avaliar a eficácia da atividade das substâncias naturais, foi realizado o ensaio de curva de morte versus tempo. Utilizamos como controle positivo anfotericina B e avaliamos a eficácia da atividade antifúngica frente à cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* var. *grubii* ativada *in vivo* e ao isolado ambiental M16.2 da espécie *C. neoformans* var. *grubii*. Neste ensaio foi possível verificar o percentual de células mortas em relação ao tempo. Em uma hora mais de 80 % das células fúngicas da cepa ATCC 90012 encontram-se mortas com o tratamento com anfotericina B (AMB) e com a maitenina (MJ2). No tempo de 2 horas observamos que AMB eliminou 100 % das leveduras, enquanto que a MJ2 atingiu esta taxa de morte em um tempo e 4 horas. Somente após 8 horas, a MF2,5 atinge uma porcentagem de 60 % de morte, porém até 24 horas não foi possível observar mais de 80 % de morte (**Figura 8**). O isolado ambiental de *C. neoformans* var. *grubii* (M16.2) apresentou um comportamento diferente ao da cepa ATCC, mostrando-se mais resistente à AMB e aos triterpenos. Somente no tempo de 8 horas, foi possível observar uma porcentagem de morte das células fúngicas de aproximadamente 80 %, quando tratadas com AMB; no entanto, somente em 12 horas atingiu-se 100 % de morte celular. Entretanto, para MJ2, em 4 horas ocorreu morte celular em aproximadamente 70 % das leveduras e somente após 8 horas atingiu 100 % de morte. O isolado ambiental também mostrou um comportamento diferente quando tratado com a MF2,5. Somente em 24 horas observamos 80 % de morte das leveduras (**Figura 9**). Com relação à eficiência da desinfecção, os resultados mostraram que a MJ2 apresentou resultados mais eficientes tanto para a cepa ATCC 90012 quanto para o isolado ambiental M16.2. Com uma hora de contato, observou-se uma taxa de morte de 88 % e 51,8 % para a cepa ATCC 90012 e isolado M16.2, respectivamente. A MF2,5 teve um resultado inferior quando comparado com a MJ2, sendo que em 1 hora houve apenas 1 % de fungos mortos para a cepa ATCC 90012 e 23,6 % para o isolado ambiental M16.2 (**Tabela 5**).

Foi observado que a MJ2 apresentou um comportamento semelhante ao da AMB tanto para a cepa ATCC 90012 quanto para o isolado ambiental M16.2. Observamos que em 8 horas, aproximadamente 100 % de células fúngicas estavam mortas tanto para o tratamento com MJ2 quanto para AMB para a cepa ATCC 90012. E para o isolado M16.2 atingiu 100 % de morte em 12 horas.

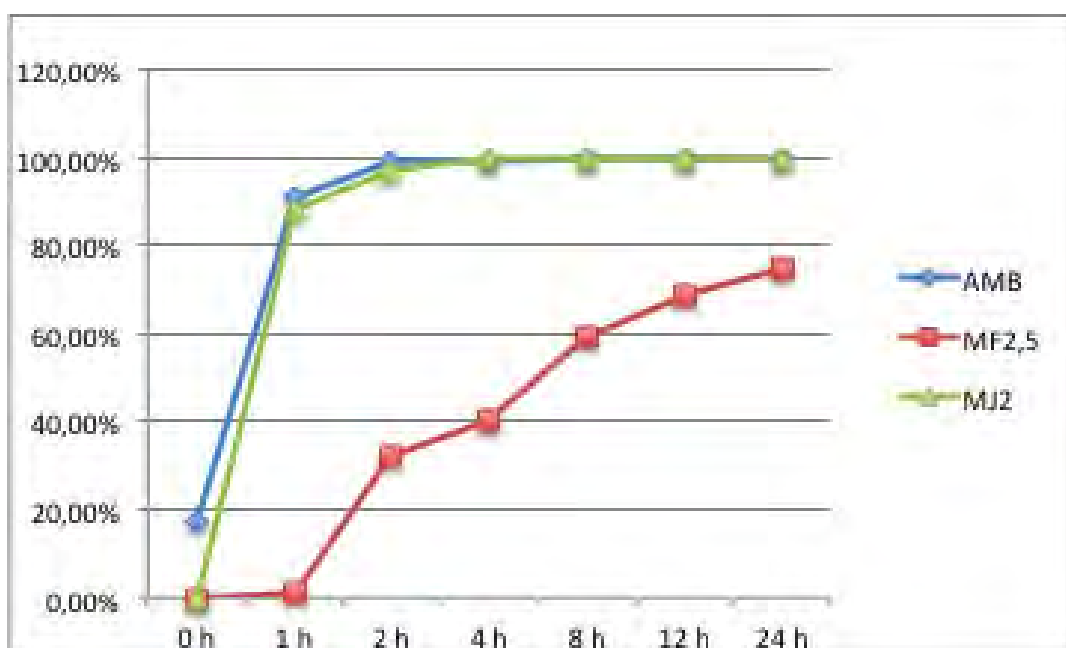


Figura 8. Curva de morte de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90012 em relação ao tempo de contato (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h) com pristimerina (MF2,5) e maitenina (MJ2) e anfotericina B (AMB) usada como controle positivo.

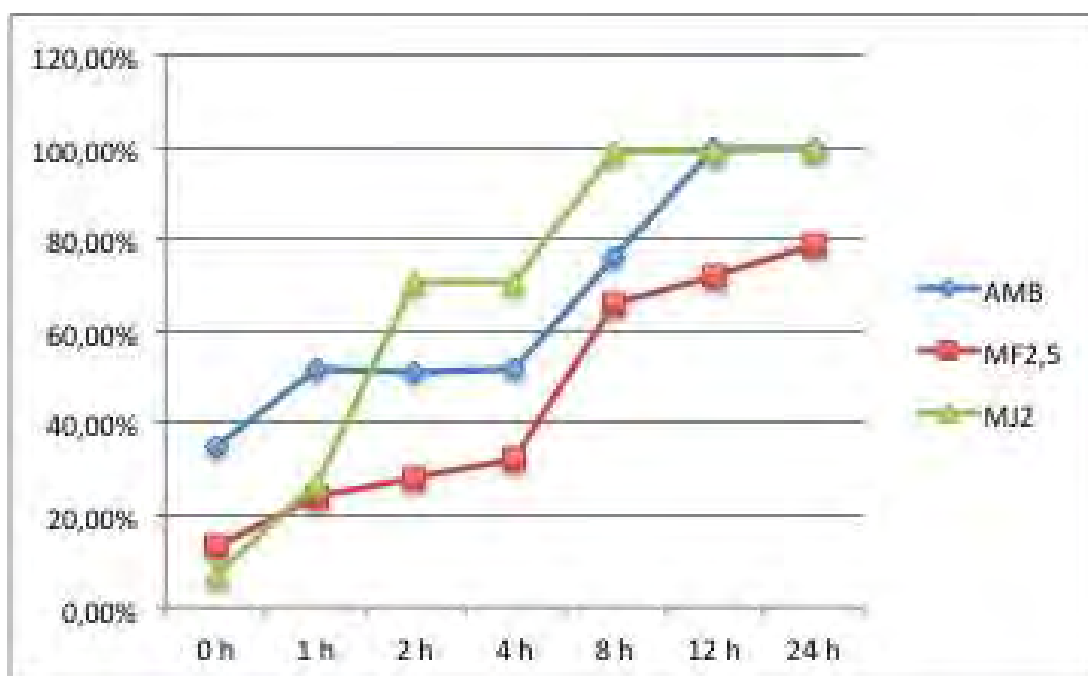


Figura 9. Curva de morte do isolado ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (M16.2) em relação ao tempo de contato (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h) com pristimerina (MF2,5), maitenina (MJ2) e anfotericina B (AMB) usada como controle positivo.

Tabela 5. Resultado da eficiência de desinfecção expressa em porcentagem de morte das cepas padrão *C. neoformans* (ATCC 90012) e do isolado ambiental de *C. neoformans* (M16.2) frente aos triterpenos (maitenina e pristimerina) e anfotericina B, no período de 1 a 24 horas.

Cepas/Isolados	Substância	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
ATCC 90012	Maitenina	88,0 %	97,3 %	99,0 %	99,9 %	100,0 %	100,0 %
	Pristimerina	1,00 %	32,3 %	40,2 %	59,0 %	68,8 %	75,0 %
	Anfotericina B	91,0 %	98,3 %	99,1 %	99,9 %	99,9 %	100,0 %
M16.2	Maitenina	51,8 %	70,8 %	70,8 %	98,8 %	99,6 %	100,0 %
	Pristimerina	23,6 %	28,3 %	31,6 %	65,5 %	72,4 %	78,7 %
	Anfotericina B	51,8 %	51,0 %	51,8 %	76,0 %	100,0 %	100,0 %

5.5 Ensaio de citotoxicidade

As substâncias foram testadas quanto a sua toxicidade celular em diferentes linhagens, sendo realizado em triplicata de dois lotes de cultivos da mesma linhagem em experimentos independentes. A citotoxicidade foi avaliada pela metodologia do MTT em linhagens celulares A549 (pneumócitos humanos tipo II), HepG2 (células de hepatoma humano), Vero (células de rim de macaco verde da África) e para as células normais NOK (queratinócitos de mucosa oral). No teste de verificação da reação das amostras com o sal tetrazólio (MTT) não observamos interações entre as substâncias; desta forma, verificamos que a metodologia não produz resultados falso-positivo (dados não demonstrados).

Quando as substâncias naturais, maitenina e pristimerina de *M. ilicifolia* foram testadas em células tumorais (A549), foi possível observar que na faixa de 7,81 a 0,48 mg/L (faixa da CIM capaz de eliminar 100 % das leveduras) as células apresentaram valores maiores que 50 % de viabilidade (**Figura 10**). A maitenina apresentou menor citotoxicidade que a pristimerina, já que manteve 80 % de viabilidade celular em 0,97 mg/L e a pristimerina a 0,48 mg/L. O peróxido de hidrogênio, utilizado como um dos controles positivos do ensaio, mostrou-se mais adequado (30 % de viabilidade celular). Portanto na faixa da CIM as duas substâncias apresentaram baixa citotoxicidade.

Em células HepG2, as duas substâncias apresentaram menor citotoxicidade quando comparadas às células A549, ou seja, na faixa da CIM a viabilidade celular variou de 70 a 100 %. A pristimerina mostrou-se menos citotóxica, uma vez que na CIM de 7,81 mg/L obteve-se o índice maior que 80 %, enquanto que a maitenina, nesta CIM a viabilidade foi menor que 80 % (**Figura 11**).

A citotoxicidade das substâncias para células Vero, quando aplicadas as faixas de CIM (7,81 a 0,48 mg/L) foi maior. Foi possível observar que maitenina foi menos tóxica para estas células. A maitenina apresentou 90 % de viabilidade celular na concentração de 0,48 mg/L, enquanto que, nesta mesma concentração, a pristimerina mostrou 60 % de células vivas. O melhor controle positivo foi o peróxido de hidrogênio por apresentar maior toxicidade com menos de 50 % de células viáveis (**Figura 12**). Em queratinócitos (NOK), todas as concentrações testadas mostraram uma viabilidade celular maior que 80 %, sendo esta a linhagem celular que as substâncias tiveram a menor citotoxicidade. As duas substâncias apresentaram 100 % de células vivas na concentração de 7,81 mg/L (**Figura 13**).

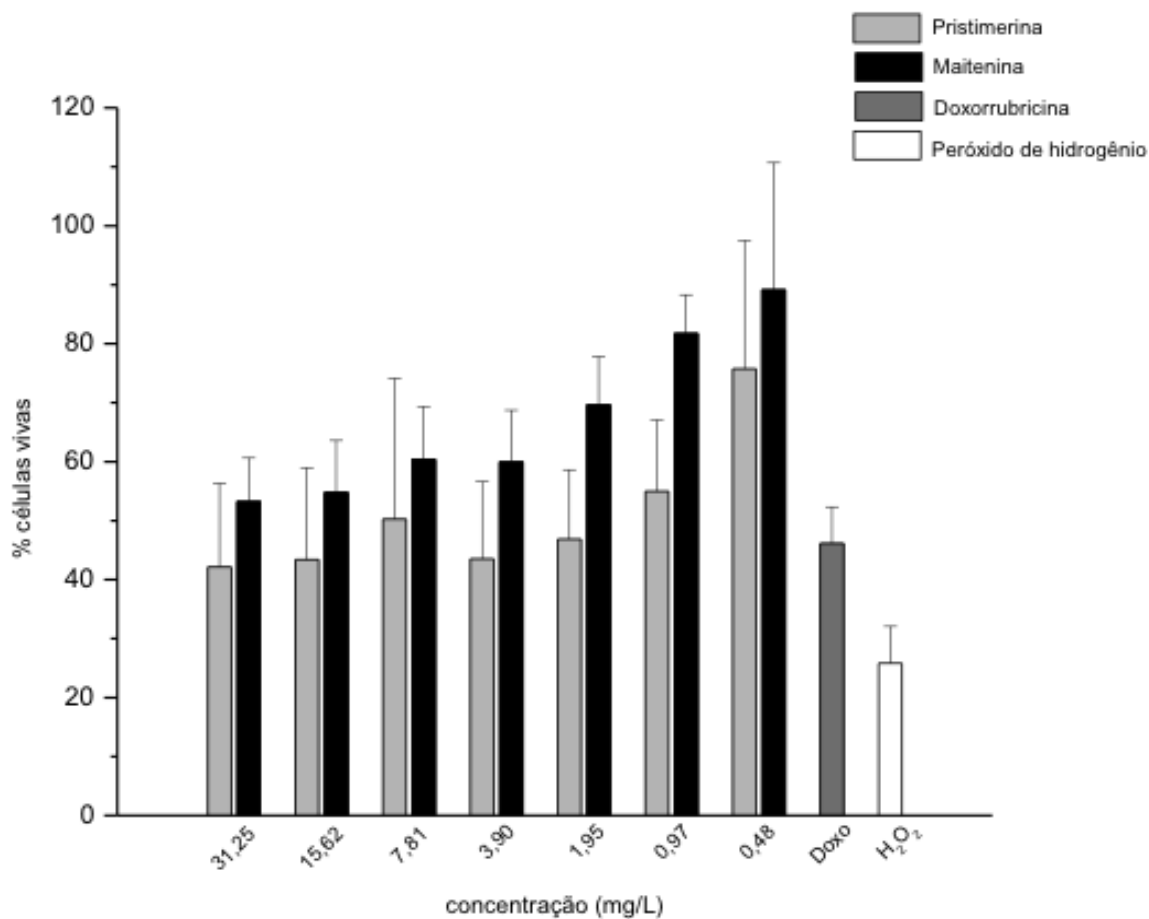


Figura 10. Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células tumorais A549 (pneumócitos humanos tipo II), assim como, a doxorubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.

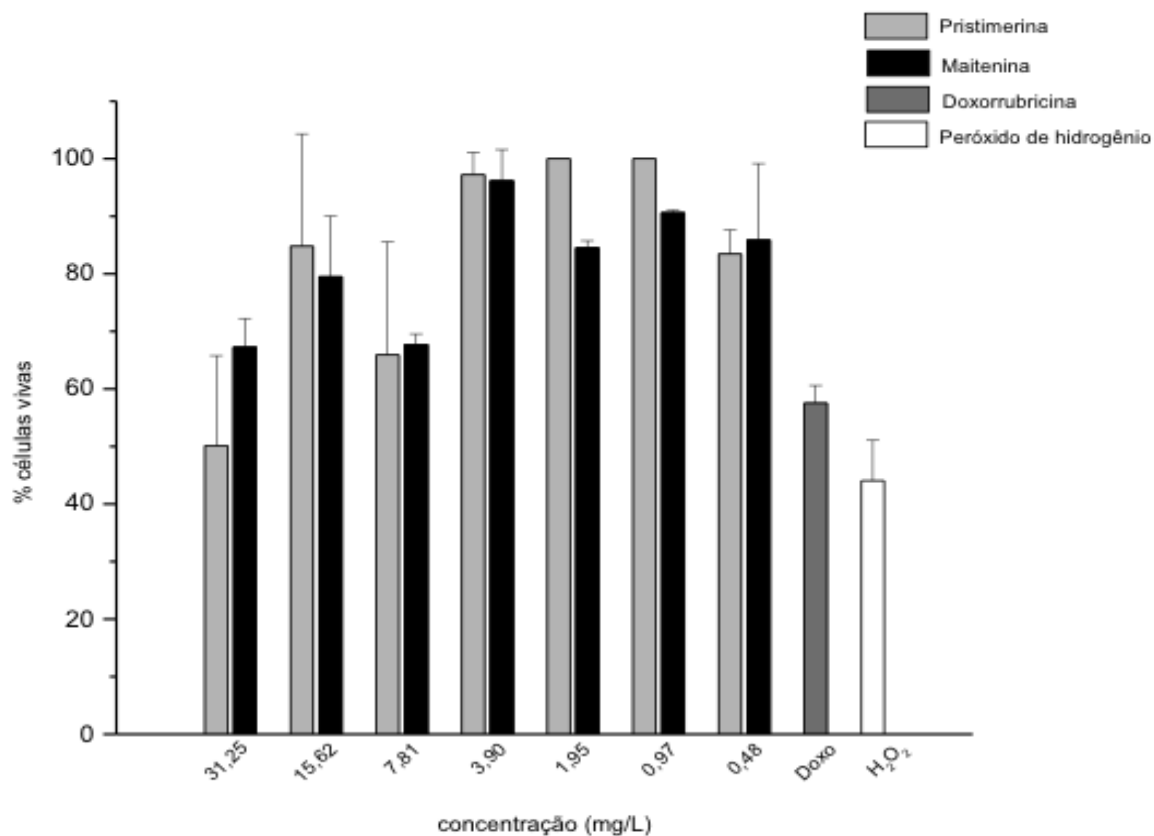


Figura 11. Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células HepG2 (células de hepatoma humano) assim como, a doxorubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.

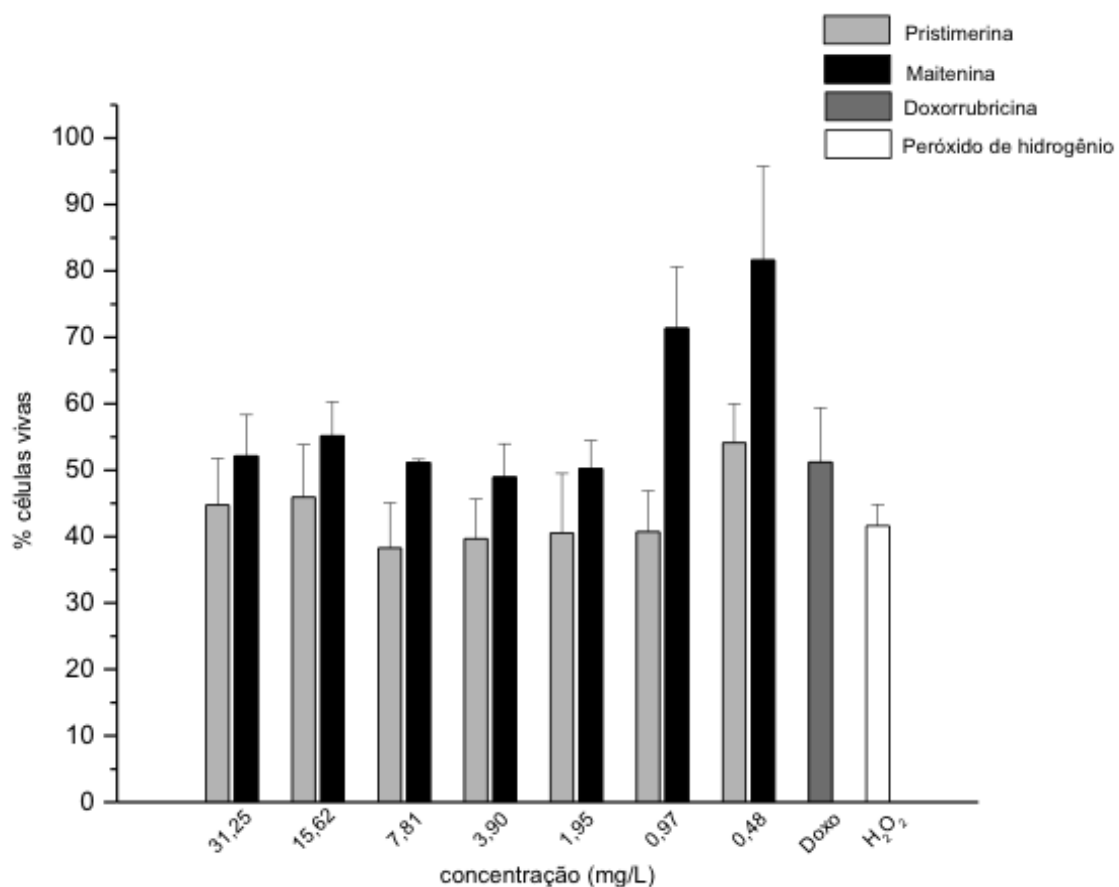


Figura 12. Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células Vero (células de rim de macaco), assim como, a doxorubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.

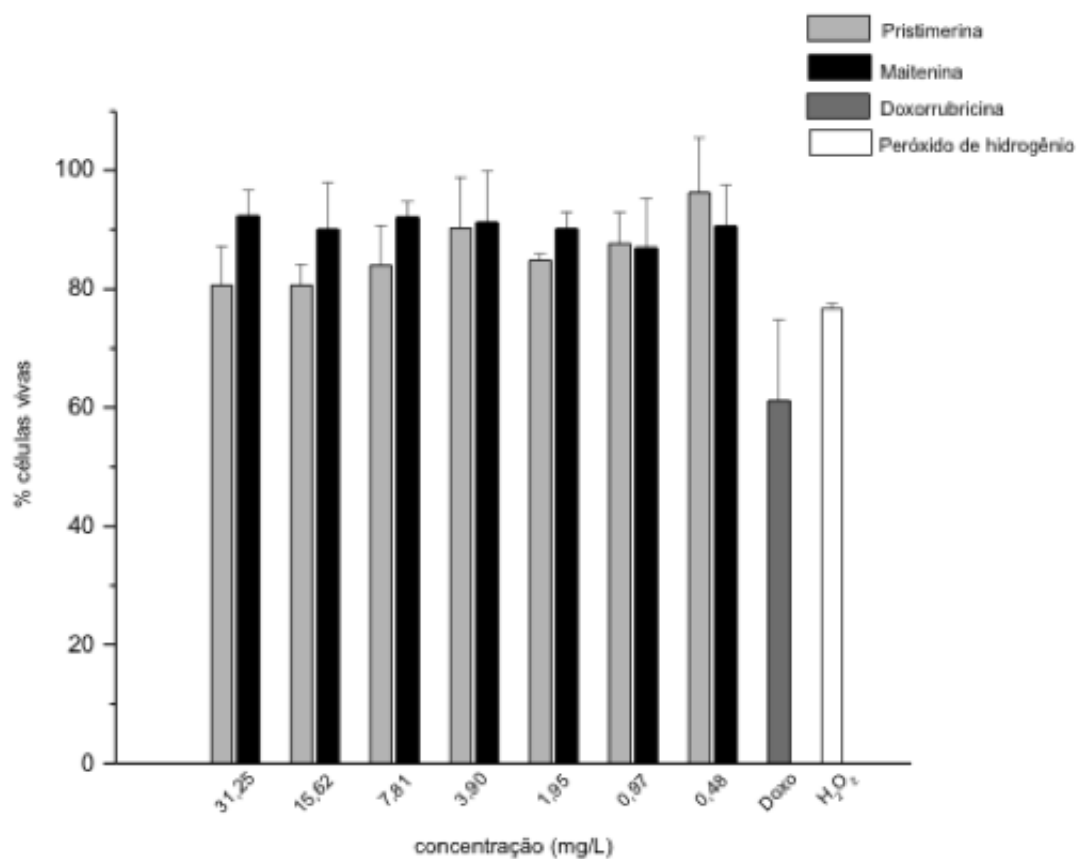


Figura 13. Gráfico representativo da citotoxicidade da maitenina e pristimerina em células NOK (queratinócitos normais de mucosa oral) assim como, a doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controles positivos.

Diante da atividade antifúngica e dos resultados da CIM das chalconas, foram escolhidas três substâncias que apresentaram os melhores valores de CIM para a realização do ensaio de citotoxicidade. As chalconas foram testadas pela metodologia do MTT para a linhagem celular tumoral A549 (pneumócitos humanos tipo II), HepG2 (células de hepatoma humano) e V87 (células de glioma humano) e para as células normais NOK (queratinócitos de mucosa oral) e MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano).

A **Figura 14**, representa o resultado das chalconas, 2,3-chalc, 3'-chalc e 3,4-chalc em células A549. Na faixa de CIM de 1,95 a 7,81 mg/L para a 2,3-chalc a viabilidade variou de 70 a 80 %, enquanto que na mesma faixa de CIM a 3'-chalc (1,95 a 7,81 mg/L) mostrou menor viabilidade celular variando de 20 a 65 % de células vivas. Na faixa de CIM para 3,4-chalc (3,90 a 7,81 mg/L) apresentou viabilidade entre 65 a 75 %. A faixa de CFM para 2,3-chalc variou de 3,90 a 7,81 mg/L, nesta concentração a viabilidade celular variou de 65 a 75 %, enquanto que na faixa de CFM para 3'-chalc (7,81 a 15,62 mg/L) mostrou-se mais a citotóxica entre as substâncias, com 25 % de viabilidade celular. Por fim, na faixa de CFM para 3,4-chalc (7,81 a 31,25 mg/L) apresentou 40 a 65 % de células vivas (**Figura 14**).

Em células hepáticas HepG2, foi observado que a substância 2,3-chalc na faixa de CIM para atividade fungistática entre 1,95 a 7,81 mg/L os valores de viabilidade celular ficaram em torno de 50 % a 100 % de viabilidade; já 3'-chalc na faixa da CIM (1,95 a 7,81 mg/L) com atividade fungistática a viabilidade celular variou de 60 a 95 %. A substância 3,4-chalc também apresentou mais de 80 % de células viáveis nas concentrações com atividade fungistática (3,90 a 7,81 mg/L). Para a CFM que apresentou atividade fungicida para a 2,3 chalc (3,90 a 7,81mg/L) a viabilidade celular manteve-se entre 45 a 90 %, já para a chalcona 3'-chalc (7,81 a 15,62 mg/L) manteve aproximadamente 65 % de células vivas e a chalcona 3,4-chalc com CFM variando de 7,81 a 31,25 mg/L a viabilidade celular ficou em torno de 65 a 95 % (**Figura 15**). Em células NOK, para as três chalconas testadas, todas as concentrações com atividade fungistática ou fungicida os valores de viabilidade celular ficaram em torno de 60 %. A 2,3 chalc tanto para a CIM com atividade fungistática quanto para fungicida (1,95 a 7,81 mg/L) a viabilidade chegou a 90 % (**Figura 16**).

Não observamos citotoxicidade das três chalconas na linhagem celular V87 (células de glioma humano). A 2,3-chalc apresentou viabilidade celular de mais de 80 % em todas as concentrações testadas e mesmo observamos para a faixa de CFM, a chalcona 3'-chalc mostrou, na faixa da CIM (1,95 a 7,81 mg/L), uma faixa de viabilidade celular variando de 60 % a 80 % de células vivas, aproximadamente. A 3,4-chalc (CIM igual a 3,90 a 7,81 mg/L), apresentou viabilidade celular entre 70 e 80 % (**Figura 17**). Em células MRC-5, também não observamos citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, quando tratadas com a 2,3-chalc, apresentaram 100 % de células vivas; com 3'-chalc, foi observado que na faixa da CIM (1,95 a 7,81 mg/L) apresentaram viabilidade celular na faixa de 70 a 90 % e por fim, quando as células foram tratadas com 3,4-chalc, observamos que nessa faixa da CIM (3,90 a 7,81 mg/L), a viabilidade variou entre 70 a 80 %. Nas CFMs das três chalconas observamos um percentual de viabilidade celular semelhante ao da faixa de CIM (**Figura 18**).

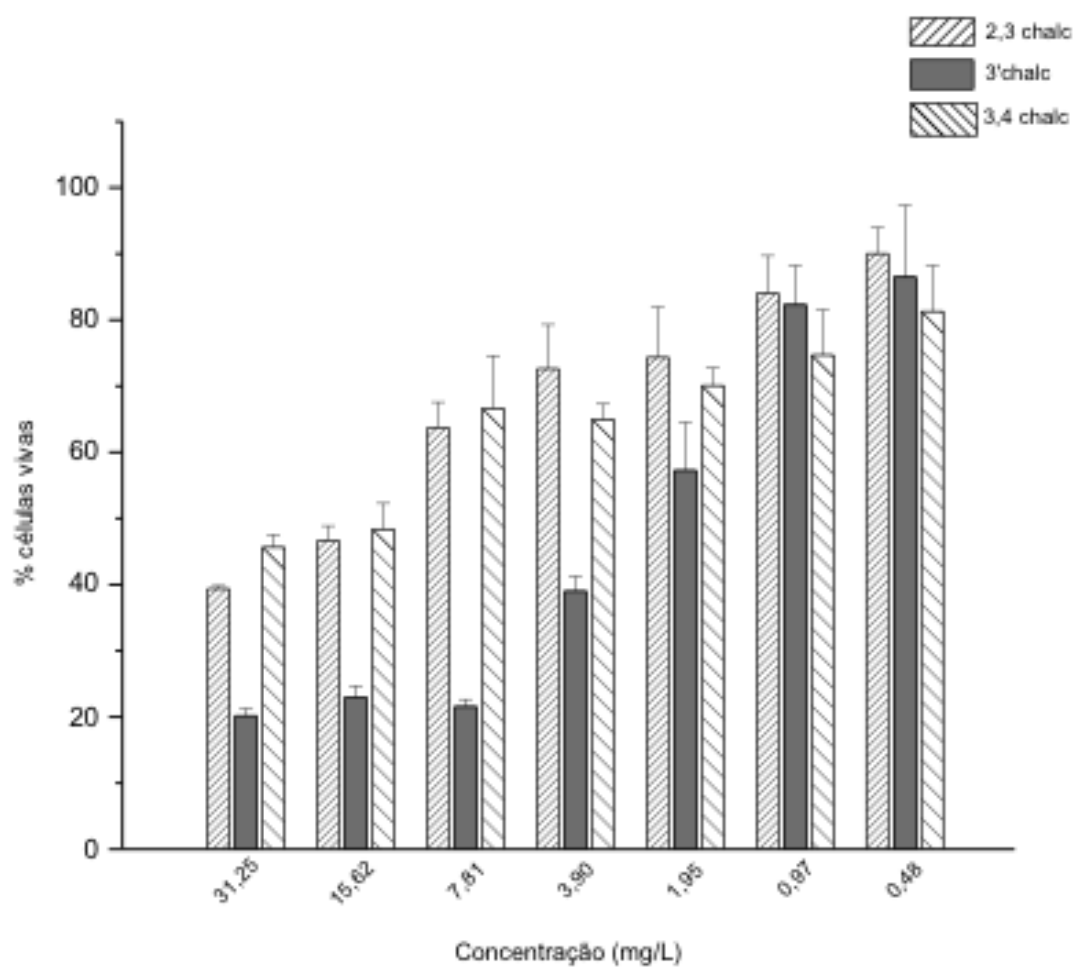


Figura 14. Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células tumorais A549 (pneumócitos pulmonares tipo II).

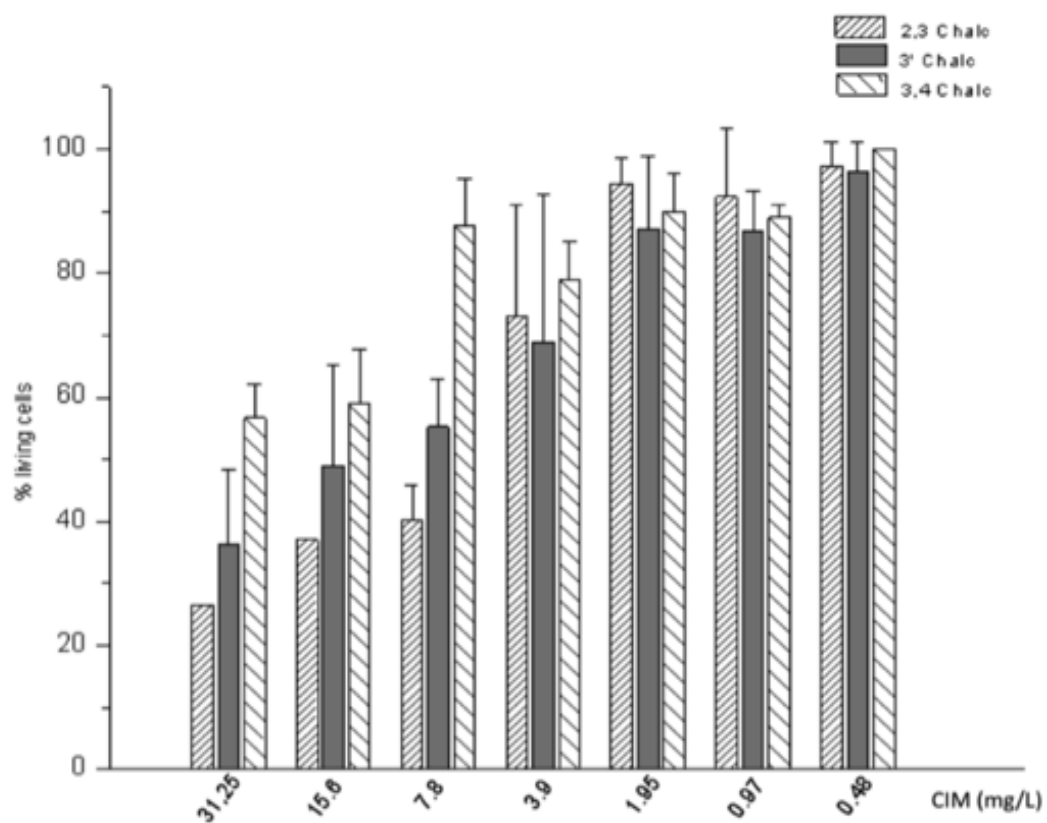


Figura 15. Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células HepG2 (células de hepatoma humano).

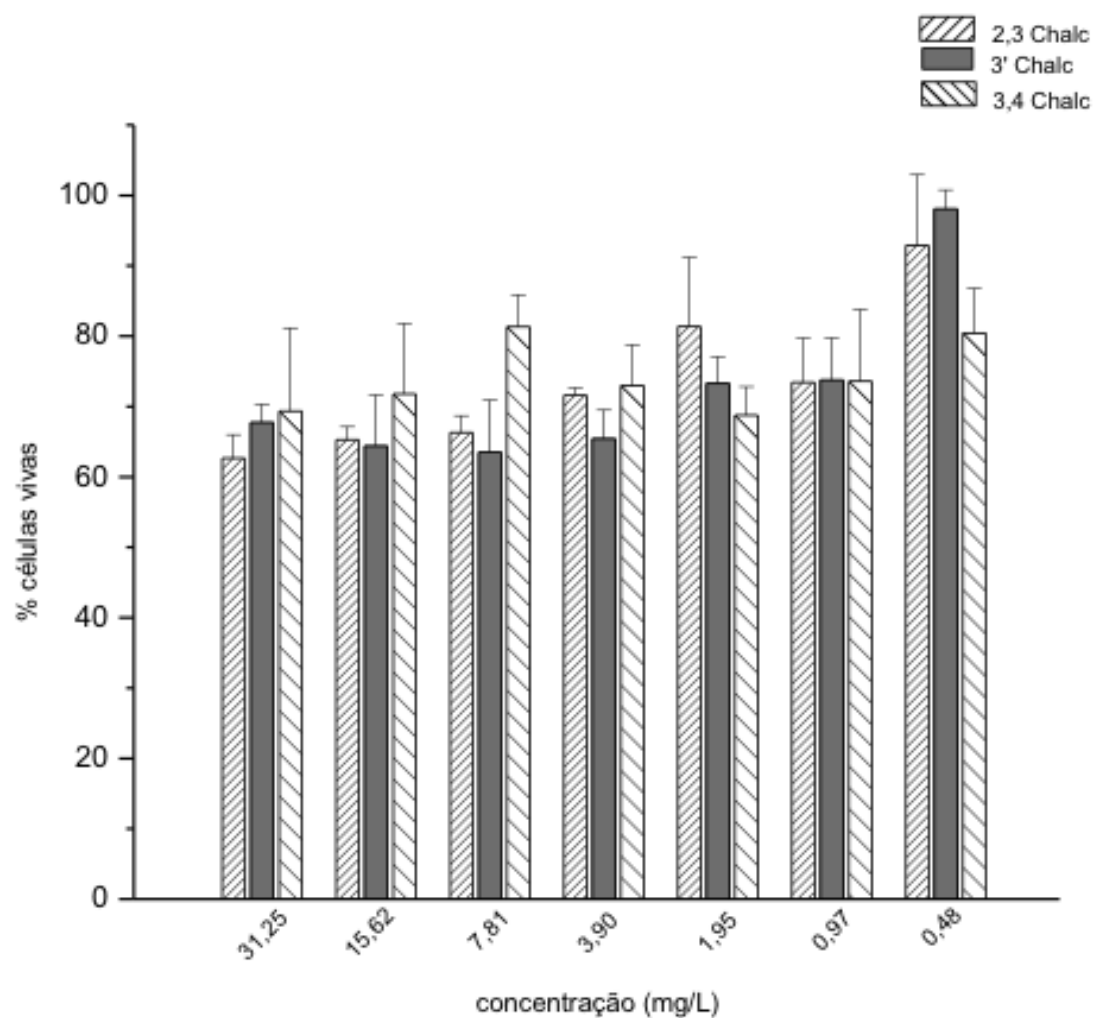


Figura 16. Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células NOK (queratinócitos de mucosa oral).

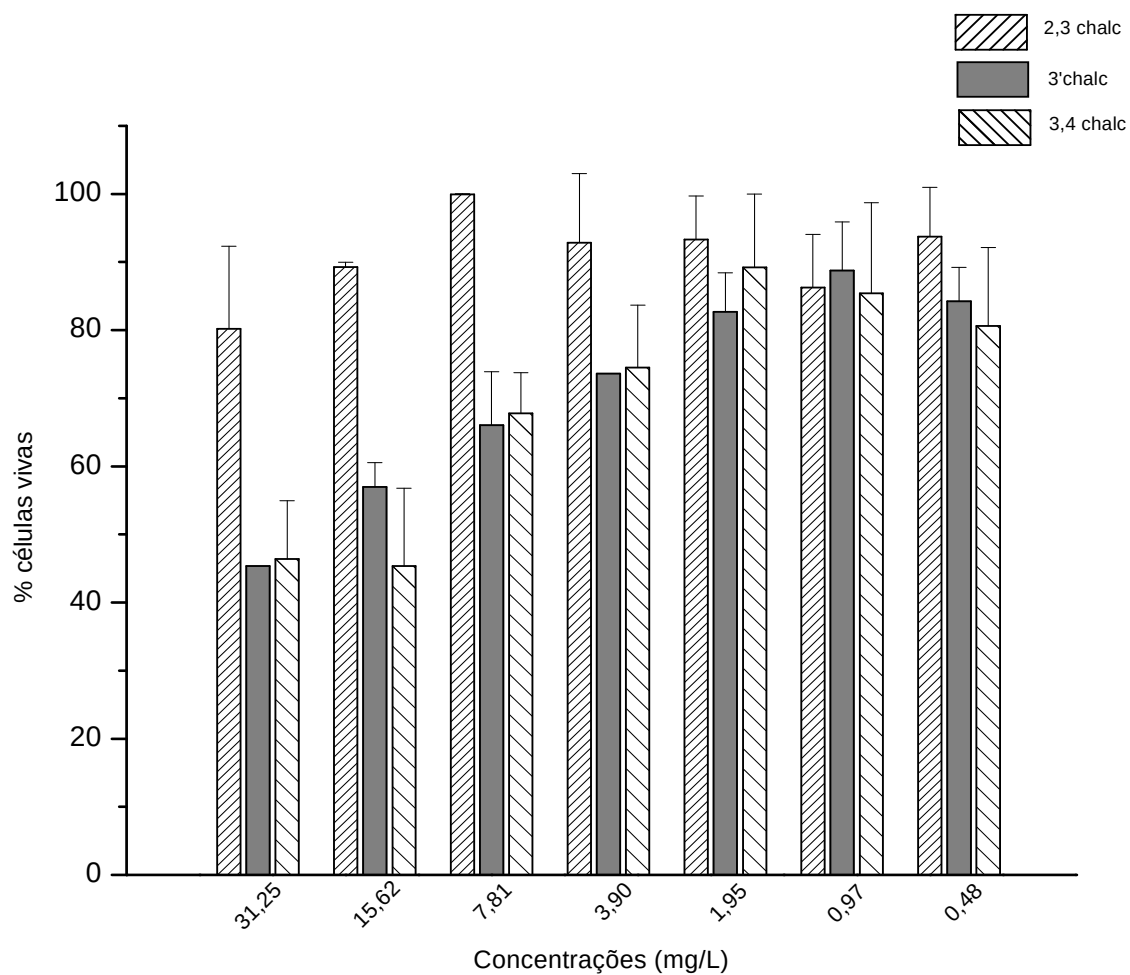


Figura 17. Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células V87 (células de glioma humano).

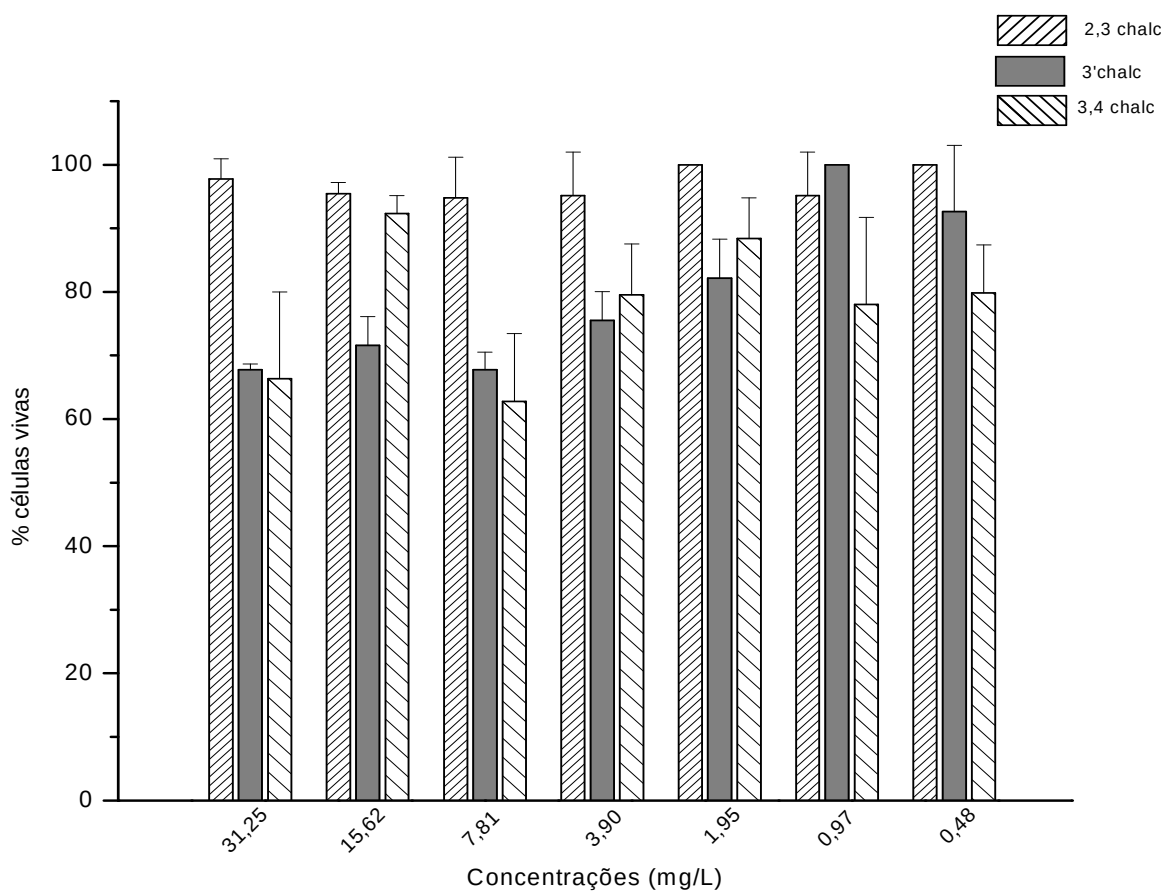


Figura 18. Gráfico representativo da citotoxicidade de chalconas sintéticas em células MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano).

Comparando as chalconas com as substâncias de *M. ilicifolia*, foi observado que as chalconas apresentam menor toxicidade celular, desta forma, foi determinado que os ensaios voltados à pesquisa por novos protótipos para fármacos antifúngicos e os ensaios para determinação do mecanismo de ação serão realizados com estas substâncias e a maitenina e pristimerina serão utilizadas para os estudos de atividade saneante.

5.6 Ensaio de adesão celular

Por meio da padronização do tempo de adesão, foi determinado que no tempo de 1 hora ocorre a maior taxa de adesão na maioria das linhagens celulares testadas (V87, NOK, HepG2), sendo considerado este, um tempo otimizado para estudar os mecanismos de adesão e de ação de substâncias antifúngicas. A linhagem MRC-5 apresentou maior adesão no tempo de 4 horas, portanto os ensaios para esta linhagem foram realizados neste tempo. Observamos também, que a linhagem HepG2 apresentou dois tempos com adesão significativa (1 h e 8 h) (Figura 19).

Entre as células testadas, verificamos que *C. neoformans* adere em maior porcentagem em células do sistema nervoso central (V87) e em menor taxa em fibroblastos humanos normais (MRC-5).

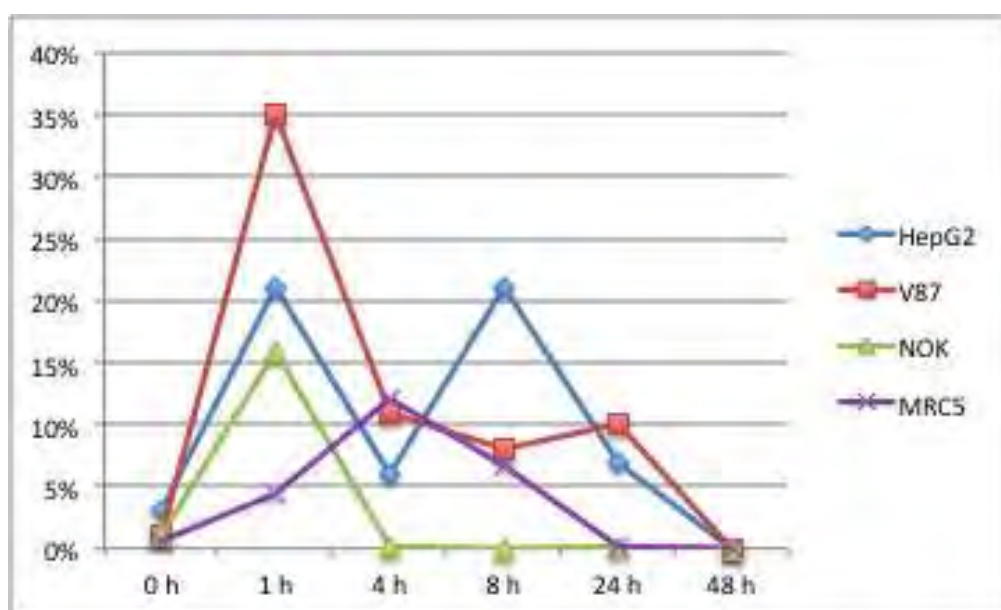


Figura 19. Curva de adesão da levedura *C. neoformans* ATCC 90012 em células HepG2, V87, NOK e MRC-5 no intervalo de tempo de 0 a 48 horas.

Através da análise da adesão por imunofluorescência, observamos que no tempo de 1 hora, *C. neoformans* encontravam-se aderidos nas células, conforme mostram as **Figuras 20 a 23**.

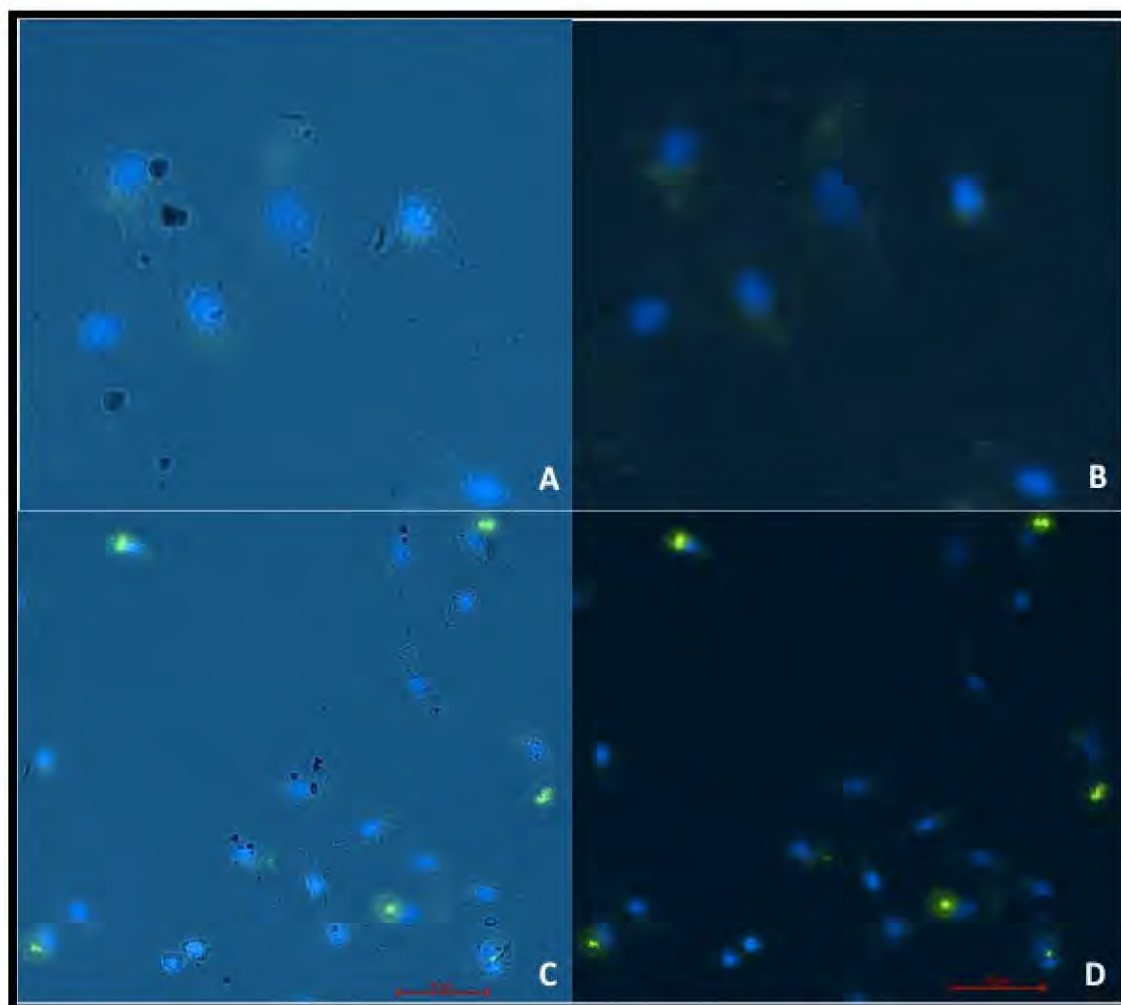


Figura 20. Imunofluorescência mostrando a adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 (verde) em células metabolizadoras HepG2, no período de 1 hora. **A.** Controle com células HepG2 na ausência de *Cryptococcus neoformans* – campo claro; **B.** Controle com células HepG2 na ausência de *C. neoformans*; **C.** Células HepG2 infectadas com *C. neoformans* – campo claro; **D.** Células HepG2 infectadas com *C. neoformans*.

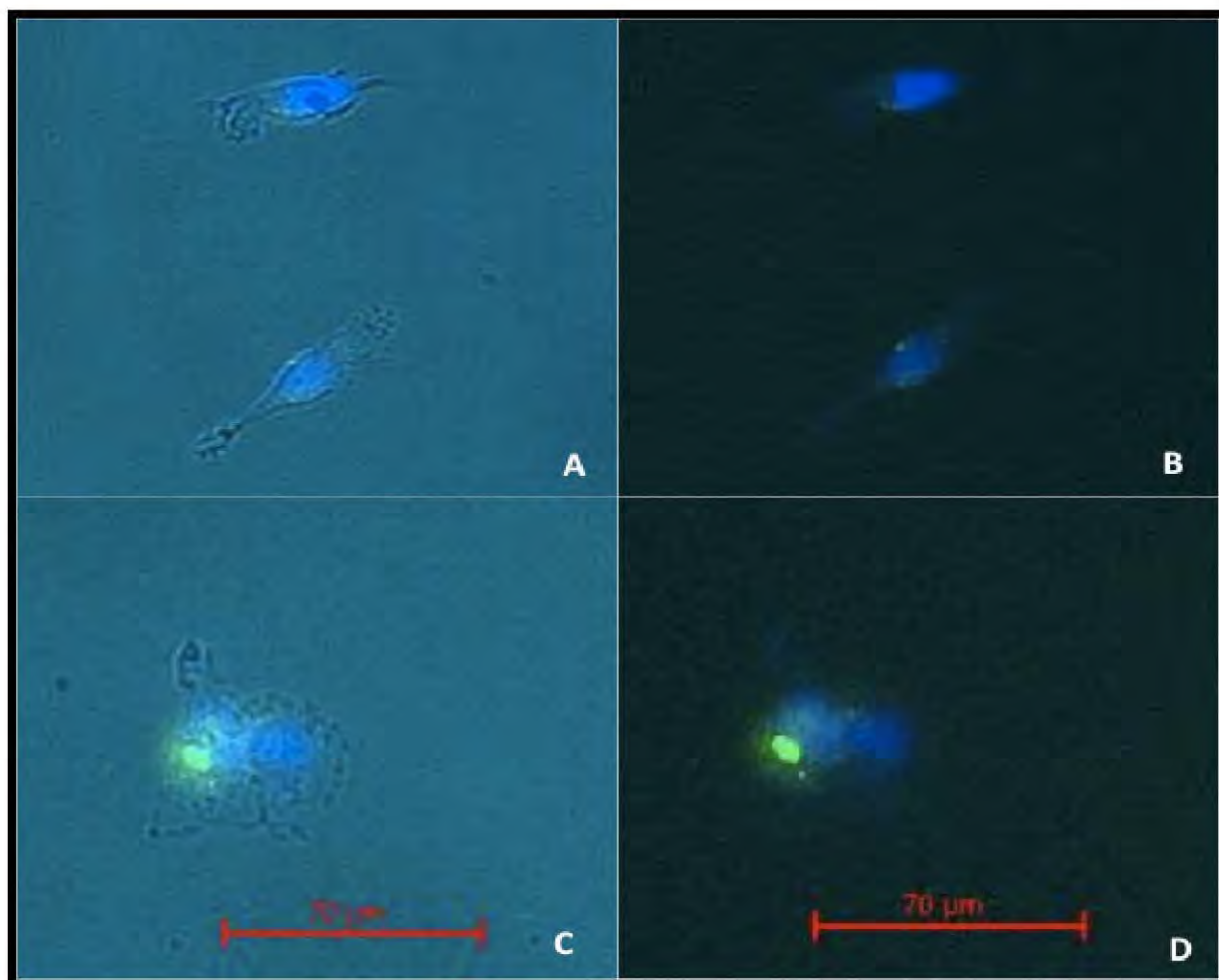


Figura 21. Imunofluorescência mostrando a adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 (verde) em fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), no tempo de 1 hora. **A.** Controle com células MRC-5 na ausência de *Cryptococcus neoformans* – campo claro; **B.** Controle com células MRC-5 na ausência de *C. neoformans*; **C.** Células MRC-5 infectadas com *C. neoformans* – campo claro; **D.** Células MRC-5 infectadas com *C. neoformans*.

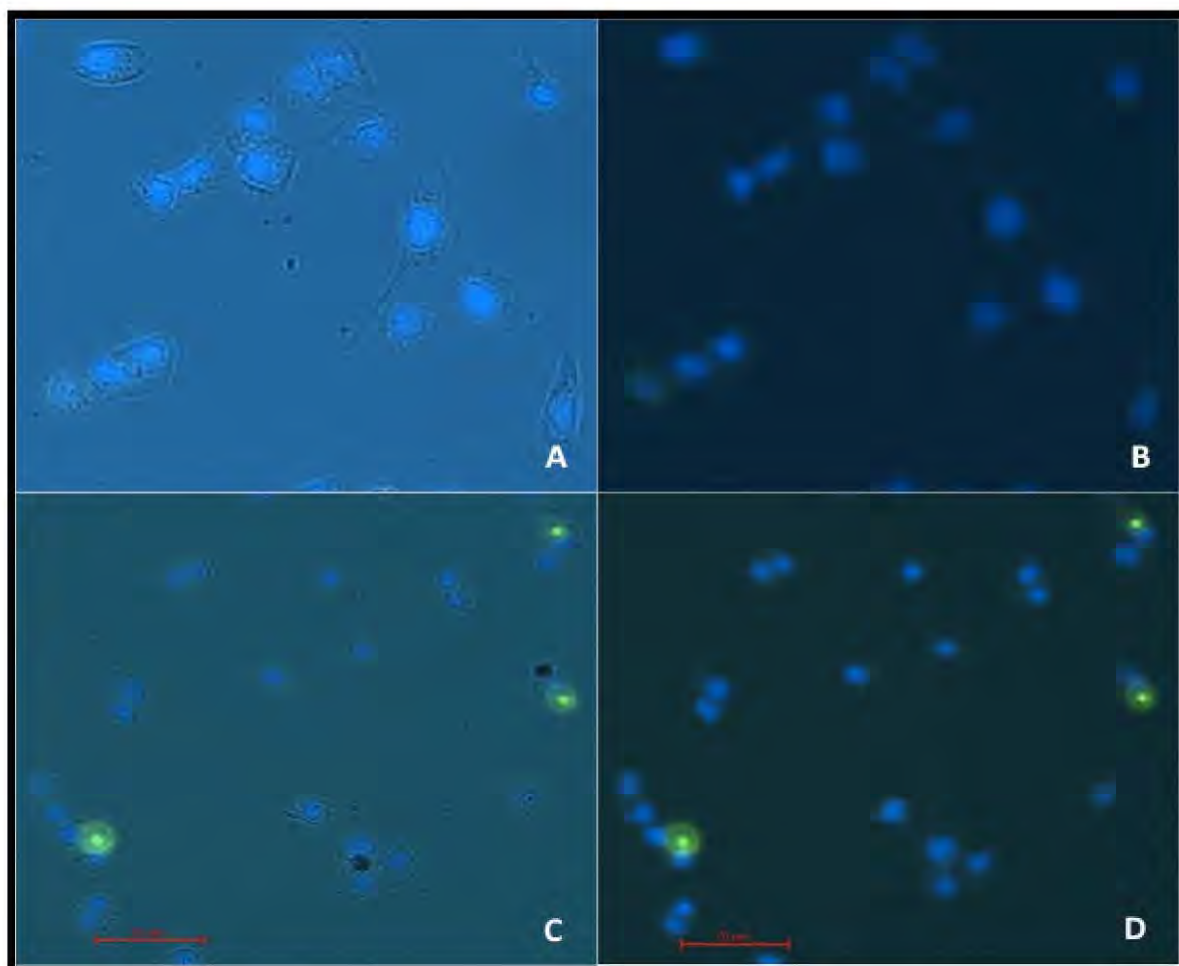


Figura 22. Imunofluorescência mostrando a adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 (verde) em queratinócitos normais de mucosa oral (NOK), no período de 1 hora. **A.** Controle com células na ausência de *Cryptococcus neoformans* – campo claro; **B.** Controle com células NOK na ausência de *C. neoformans*; **C.** Células NOK infectadas com *C. neoformans* – campo claro; **D.** Células NOK infectadas com *C. neoformans*.

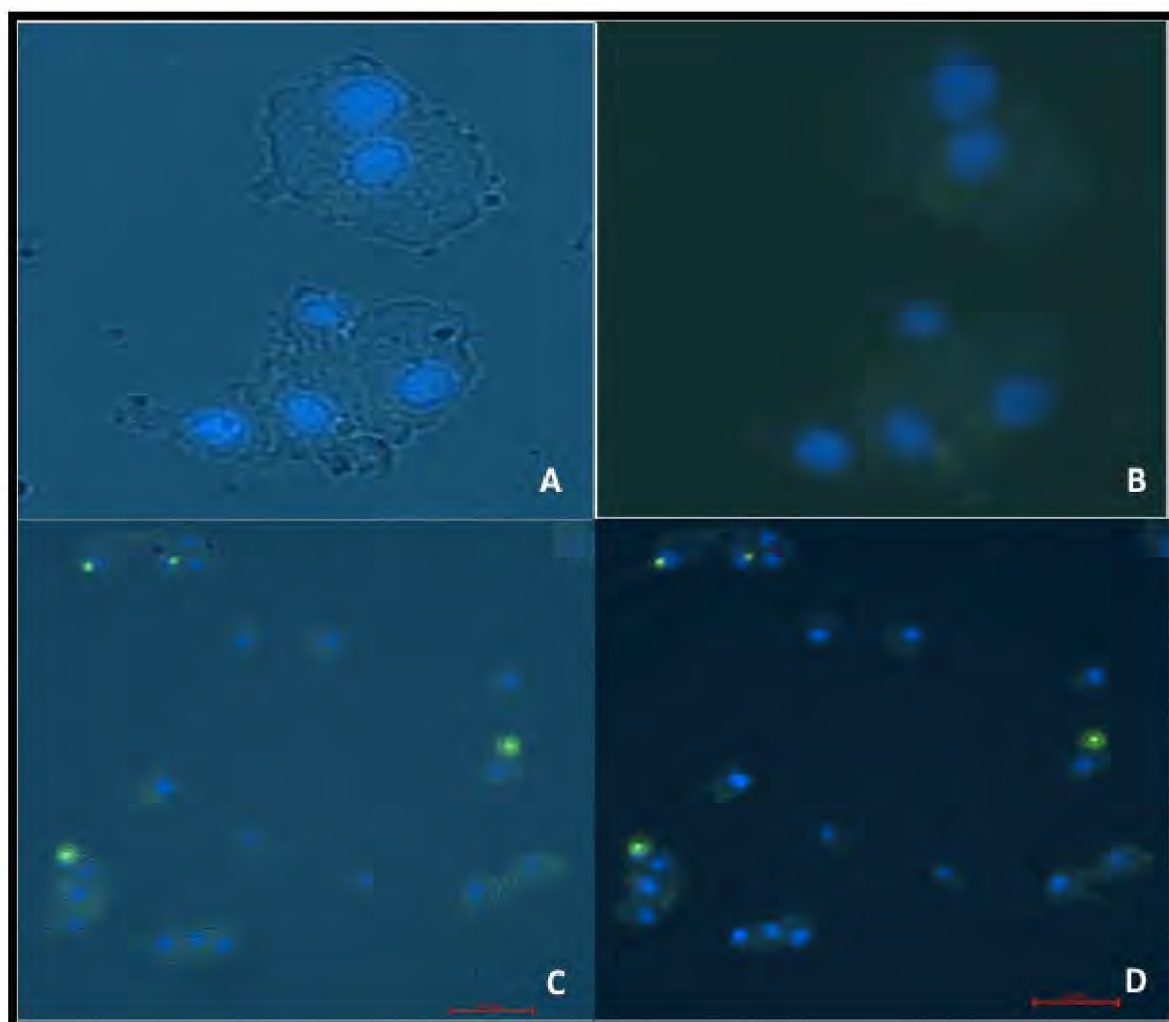


Figura 23. Imunofluorescência mostrando a adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 (verde) em células de glioma humano (V87), no período de 1 hora. **A.** Controle com células na ausência de *Cryptococcus neoformans* – campo claro; **B.** Controle com células V87 na ausência de *C. neoformans*; **C.** Células V87 infectadas com *C. neoformans* – campo claro; **D.** Células V87 infectadas com *C. neoformans*.

A chalcona (2,3-chalc) na concentração de 3,90 mg/L, concentração que não apresenta atividade fungicida, apresentou atividade de inibição da adesão de *C. neoformans* em todas as linhagens celulares testadas nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas (**Figura 24**). Foi possível observar uma alta redução na adesão em todas as células testadas. Em HepG2, foi verificada uma redução de 50 % na adesão em 30 minutos de tratamento, em 1 hora, observamos uma redução de 78,4 % e no tempo de 2 horas, 88,4 % de inibição da adesão. Já em células V87, verificamos uma maior taxa de inibição da adesão pela 2,3-chalc, sendo que em 30 minutos de tratamento encontramos uma taxa de inibição de adesão de 52,4 %, em 1 hora essa taxa aumentou para 97 % a qual permaneceu no tempo seguinte. Em MRC-5, observamos uma redução de 50 % na adesão em 30 minutos de tratamento, sendo que em 1 e 2 horas esse valor atingiu 97 % e 96,4 % de inibição da adesão, respectivamente. Entretanto, para células NOK, a redução da adesão em 30 minutos também foi de 50 %, porém nos tempos seguintes, não observou-se uma forte redução na inibição da adesão como nas demais linhagens, sendo que em 1 hora ocorreu inibição em 58,8 % e em 2 horas, 68,4 %.

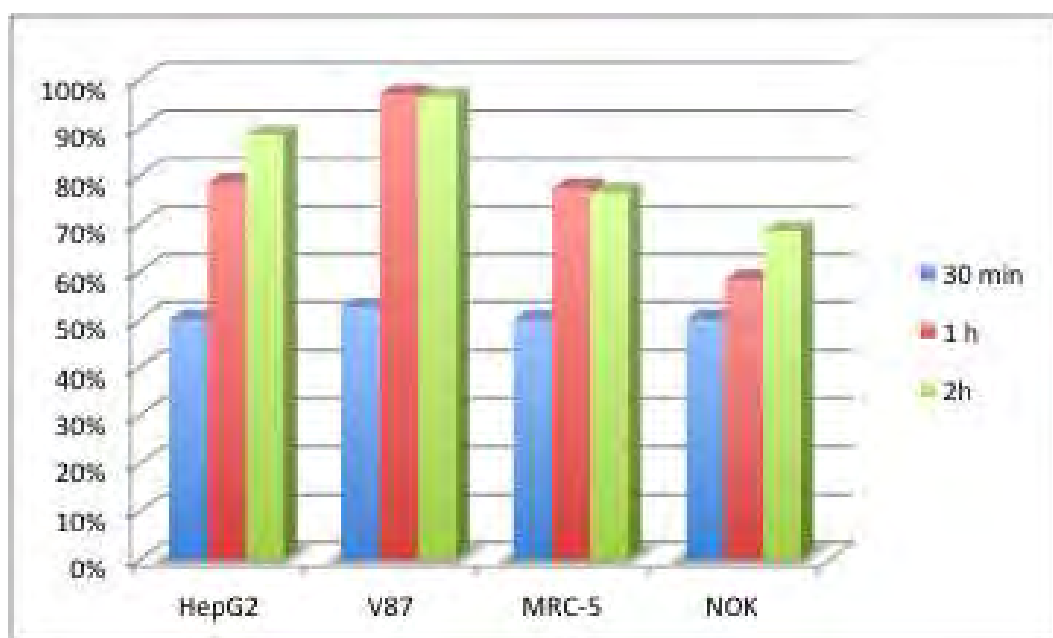


Figura 24. Inibição da adesão de *Cryptococcus neoformans* células HepG2, V87, MRC-5 e NOK pelo tratamento com a chalcona 2,3-chalc (3,90 mg/L) nos tempo de 30 minutos, 1 hora e 2 horas.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a incidência das infecções fúngicas tem aumentado em grande percentual, principalmente quando associadas aos indivíduos imunocomprometidos (Warkentien e Crum-Cianflone, 2010). Entre as infecções fúngicas sistêmicas, a criptococose se destaca como a terceira infecção mais prevalente em todo o mundo e quando associado à indivíduos imunocomprometidos, atinge o primeiro lugar dentre as infecções sistêmicas, acometendo mais de 70 % dos casos (Prado, Silva *et al.*, 2009; Tortorano, Dho *et al.*, 2012).

Entre as 38 espécies de *Cryptococcus*, *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como os principais causadores de infecções em humanos e estão diretamente relacionados ao meio ambiente, uma vez que, os principais nichos ecológicos da espécie *C. neoformans* são fezes secas de pássaros, como pombos urbanos e aves domésticas. Na Índia, Grover e colaboradores (2007) avaliaram a presença de *C. neoformans* em diversas espécies de árvores e solos contaminados com excretas de pombos, e puderam constatar que esta espécie pode ser encontrada em diversas fontes vegetais durante todas as estações do ano (Grover, Nawange *et al.*, 2007). Outro estudo, na Índia, mostrou a presença de *C. neoformans* var. *grubii* em ratos da espécie *Bandicota indica*, este estudo relata a possibilidade deste animal apresentar-se como um possível disseminador da criptococose (Singh, Naidu *et al.*, 2007).

Os nichos de *C. gattii* são ocos de árvores de várias espécies, principalmente espécies de *Eucalyptus* sp. Kidd *et al.*, (2004) avaliaram isolados ambientais de *C. gattii*, na ilha de Vancouver, a fim de detectar a fonte de contaminação. Amostras de solo e ar mostraram-se positivas para *C. gattii*, o que indica que há presença de propágulos viáveis no ar nas proximidades de moradias de indivíduos e animais doentes, assim como, uma alta proporção de levedura por grama de solo (Kidd, Hagen *et al.*, 2004). Outros estudos também mostram a presença da levedura em amostras de água doce, água do mar, vegetação, solo e ar (Mak, Klinkenberg *et al.*, 2010).

A criptococose apresenta manifestações clínicas graves, sendo as principais meningites, meningoencefalites e a formação de criptococomas. Devido a, gravidade da infecção, ao fato da disseminação estar relacionada ao meio ambiente e a infecção ocorrer por meio da inalação dos propágulos infectantes da levedura, o

estudo epidemiológico e de virulência destas leveduras têm sido reportado em diversos trabalhos (Almeida, Matsumoto *et al.*, 2007; Santos, Meyer *et al.*, 2008; Martins, Wanke *et al.*, 2011).

Tendo em vista o problema da criptococose no estado de São Paulo e na região de Araraquara e Ribeirão Preto como demonstrado nos trabalhos de Barbieri, 2001; Almeida, Matsumoto *et al.*, 2007 e Pedroso, Ferreira *et al.*, 2009. Nosso estudo avaliou a ecoepidemiologia de *Cryptococcus* em fezes secas de pombos e morcegos, na cidade de Araraquara. Por meio de análises bioquímicas, microscópicas e moleculares, 52 isolados ambientais foram avaliados quanto aos tipos moleculares das espécies de *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e de *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII e VGIV).

Por meio das provas bioquímicas para identificação das espécies, incluindo auxanograma e teste do CGB, observamos que 17,2 % (10) dos resultados para os isolados ambientais, foram semelhantes pelos dois métodos, sendo 3,4 % (2) identificados como *C. gattii* e 13,8 % (8) como *C. neoformans* e que em 60,3 % (35) o CGB apresentou-se negativo, porém, pelo auxanograma esses isolados não foram identificados quanto à espécie, sendo denominados *Cryptococcus* spp. Quando relacionamos os resultados do CGB com as espécies não patogênicas, observamos que, a positividade no CGB para a espécie *C. gattii* resultou em um falso positivo para dois isolados, uma vez que, pelo auxanograma foram identificados como da espécie *C. ater*.

Já se esperava a identificação de espécies não-*neoformans* e não-*gattii* pois a avaliação de isolados do ambiente, traz uma gama de microrganismos das espécies e deste gênero. O estudo das espécies de *Cryptococcus*, consideradas não patogênicas, é de grande importância. Alguns estudos mostram possíveis infecções por essas espécies em humanos e principalmente em animais. No estudo de Averbuch *et al.*, (2002) os autores relataram a infecção de paciente com câncer por leveduras da espécie *C. laurentii* resistente ao fluconazol e a 5-fluorocitosina (5-FC) (Averbuch, Boekhout *et al.*, 2002). Kordossis e colaboradores (1998) verificaram o primeiro caso de infecção por *C. laurentii* em humanos, mostrando a infecção em pacientes HIV positivos e a evolução de um quadro de meningite criptocócica (Kordossis, Avlami *et al.*, 1998). Na Turquia, Kantarcioglu *et al.*, (2007) relataram um caso de lesão cutânea por *C. diffluens*, em um jovem estudante saudável, sendo o isolado caracterizado como resistente a anfotericina B e a 5-FC

(Kantarcioglu, Boekhout *et al.*, 2007). Bernal-Martinez e colaboradores (2010) avaliaram o perfil de sensibilidade de isolados de *Cryptococcus* não-*neoformans* e não-*gattii*, sendo eles das espécies *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus*, *C. humicola*, *C. curvatus* e *C. luteolus*. Estes foram avaliados quanto a sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, azóis e às candinas e verificaram que 5-fluorocitosina e candinas apresentavam-se inativos contra essas espécies, enquanto que o fluconazol mostrou atividade limitada contra *C. albidus*, *C. uniguttulatus* e *C. laurentii*, o que mostra a importância de estudos das espécies consideradas não-patogênicas, uma vez que podem ocorrer resistência natural aos antifúngicos usuais (Bernal-Martinez, Gomez-Lopez *et al.*, 2010).

Um estudo realizado em nossa região por Pedroso e colaboradores (2009) avaliaram por meio de isolamento e identificação bioquímica as espécies de *Cryptococcus* em locais públicos no município de Ribeirão Preto (SP). Como resultado obtiveram 41 amostras positivas para o gênero *Cryptococcus*, de um total de 86 amostras de ar e fezes de pombos. Destas 41 amostras, 15 foram identificadas como *C. neoformans*, 15 como *C. albidus*, nove como *C. laurentii* e dois como *C. uniguttulatus* (Pedroso, Ferreira *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, os isolados ambientais do município de Araraquara (SP), foram identificados pelos métodos clássicos, confirmados e determinados os tipos moleculares, por meio de análises moleculares por PCR-RFLP. Observamos que todos os isolados ambientais estudados apresentaram-se como *C. neoformans* var. *grubii*, tipo molecular VNI. Muitos estudos pelo mundo todo, mostraram a prevalência da espécie *C. neoformans* var. *grubii* (VNI). Martins e colaboradores (2011) avaliaram 63 isolados clínicos de pacientes com meningite criptocócica da região do Piauí, no período de 2008 a 2010; os autores observaram que apesar das infecções pela espécie *C. gattii* (VGII) estar epidemiologicamente aumentando, ainda há predominância da espécie *C. neoformans* (VNI) em mais de 50 % dos casos (Martins, Wanke *et al.*, 2011). Outro estudo brasileiro realizado em Minas Gerais por Andrade-Silva *et al.*, (2010) avaliou isolados ambientais de *C. neoformans* e *C. laurentii* de áreas externa de hospitais e constataram a presença de *C. neoformans* em 43 % das amostras coletadas, 23,3 % de *C. laurentii* e em 10,9 % observaram a presença das duas espécies em uma mesma amostra. Entre os isolados de *C. neoformans*, o tipo molecular que predominou foi o VNI (Andrade-Silva, Ferreira-Paim *et al.*, 2010).

Day e colaboradores (2011) no Vietnã, mostraram que *C. neoformans* var. *grubii* VNI é responsável pela maioria dos casos de meningite criptocócica no país e relatam a existência de diferenças moleculares entre as cepas que causam infecções em indivíduos saudáveis e em imunocomprometidos. Esta espécie foi responsável por 73% dos casos de meningite em pacientes não infectados pelo HIV e por 100% dos casos em pacientes HIV positivos (Day, Hoang *et al.*, 2011).

Em nosso laboratório, Diniz (2009) avaliou 67 amostras ambientais de fezes de pombos no município de Araraquara (SP) e todos se mostraram como *C. neoformans* pelas provas bioquímicas e por metodologias moleculares de PCR-RFLP utilizando as mesmas sequências iniciadoras usadas neste estudo. Todas as amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo molecular VNI (*C. neoformans* var. *grubii*). Estes dados confirmam a prevalência da espécie *C. neoformans* e do tipo molecular VNI, em amostras ambientais coletadas de locais públicos na nossa região, conforme o resultado encontrado em nosso trabalho estando de acordo com a literatura, revelado pela maioria dos estudos realizados no estado de São Paulo (Barbieri, 2001; Nishikawa, Lazera *et al.*, 2003; Almeida, Matsumoto *et al.*, 2007; Pedroso, Ferreira *et al.*, 2009).

Em outro estudo epidemiológico realizado em nosso laboratório em 2007 por Matsumoto e colaboradores, foram avaliados 47 isolados clínicos de pacientes HIV positivos de nossa região, especificamente, das cidades de São José do Rio Preto, Santos, Araraquara e Ribeirão Preto. Todos os isolados foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, sendo 45 isolados identificados como tipo molecular VNI e apenas dois como tipo molecular VNII. Esses resultados mostram a epidemiologia molecular de *C. neoformans* de parte da região sudeste do Brasil (Matsumoto, Fusco-Almeida *et al.*, 2007).

Em estudo que verificou a comparação dos resultados das provas bioquímicas com os métodos moleculares, Matsumoto, Fusco-Almeida *et al.*, 2007 e Diniz (2009) verificaram 100 % de concordância entre eles, ao contrário de Leal e colaboradores (2008) que encontraram discordância em seis (4,5 %) de 131 isolados analisados, entre as análises por CGB e tipagem molecular, mostrando que o apresentando o teste do CGB nem sempre é confiável e que os métodos moleculares são de maior especificidade para identificação (Leal, Faganello *et al.*, 2008). No presente estudo, verificamos uma diferença significativa entre os métodos de identificação bioquímicos e moleculares; quando avaliamos os resultados do

ensaio do auxanograma com a tipagem molecular, foi observado que em 75,9 % (41) dos isolados não foi possível identificar as espécies e quando analisados por métodos moleculares eles apresentaram-se da espécie *C. neoformans* var. *grubii* (VNI), 5,6 % (3) isolados foram identificados como *C. gattii* pelo auxanograma e pelo RFLP como *C. neoformans* var. *neoformans*. Desta forma, podemos observar que para isolados ambientais, metodologias bioquímicas como forma de identificação pode gerar dados não precisos na determinação das espécies devido às adversidades dos nichos que podem influenciar no comportamento bioquímico ou metabólico.

Com o intuito de se obter dados mais precisos acerca da virulência da linhagem ATCC para realização dos ensaios de adesão e sua inibição, foi necessária a ativação da cepa por meio da inoculação em camundongo. No presente estudo, verificamos que através da ativação das leveduras em modelo *in vivo*, ocorreu um aumento significativo no tamanho das células fúngicas. Normalmente o tamanho das células de *C. neoformans in vitro* corresponde de 5 a 10 microns. Alguns estudos mostram que é comum o aumento das células leveduriformes, após a ativação da levedura pela passagem *in vivo*, as quais podem chegar até 100 microns de diâmetro. Tais alterações morfológicas alteram a patogenicidade, levando a um aumento da resistência ao estresse oxidativo e aumentando a penetração da levedura no sistema nervoso central. Okagaki e colaboradores (2010) estimularam a co-infecção *in vivo*, analisou o conteúdo do DNA das células filhas e observou que essas células apresentavam um conteúdo poliplóide e tamanho aumentado, com esses resultados, os autores descrevem um novo mecanismo pelo qual *C. neoformans* escapa da fagocitose do hospedeiro, permitindo a sobrevivência de um subconjunto de população nas fases iniciais da infecção, evidenciando a importância das alterações morfológicas durante a infecção (Okagaki, Strain *et al.*, 2010). Tal fato observado nos indicou que provavelmente a virulência desta linhagem ativada foi viabilizada para dar-se andamento aos ensaios de adesão.

Zaragoza e colaboradores (2011) mostraram em sua revisão que as alterações estruturais da cápsula polissacarídica que ocorrem *in vivo* é uma consequência da interação fungo-hospedeiro assim como é um importante fator na infecção, uma vez que a cápsula é a primeira estrutura a ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro (Zaragoza, 2011). Os fatores que induzem o

aumento da cápsula são: altas concentrações de CO₂, deficiência de ferro, soro de mamíferos, baixa concentração de nutrientes e manitol e pH básico (Zaragoza, Fries *et al.*, 2003). Zaragoza e colaboradores (2003) mostrou que o aumento da cápsula ocorre nas primeiras horas após a infecção no hospedeiro e pode ser considerado uma primeira resposta da levedura para a interação com o hospedeiro. A capacidade do *C. neoformans* formar células muito grandes, as quais foram denominadas “células gigantes” por Zaragoza (2010) mostra uma resposta tardia das alterações morfológicas da levedura. Geralmente essas “células gigantes” são encontradas após alguns dias de infecção em pulmões de camundongos e o autor mostra que este fenômeno pode ser considerado uma nova forma de dimorfismo dos fungos (Zaragoza, García-Rodas *et al.*, 2010). Em nossos resultados foi verificado um aumento da cápsula principalmente no sítio hepático e aumento total da levedura no pulmão.

Pfaller *et al.*, (2011) determinaram o ponto de corte de *Cryptococcus* spp para os fármacos posaconazol, itraconazol e fluconazol, os quais apresentaram os valores de 0,25, 0,12 e 8,0 mg/L, respectivamente (Pfaller, Castanheira *et al.*, 2011). Avaliamos a sensibilidade de seis isolados ambientais da espécie *C. neoformans* var. *grubii*, tipo molecular VNI, frente às drogas antifúngicas anfotericina B e fluconazol, a fim de determinar uma possível resistência. Observamos que os seis isolados apresentaram sensibilidade à anfotericina B, porém somente dois (33,33 %) isolados de *C. neoformans* var. *grubii* (M16.2 e M16.3) mostraram-se sensíveis ao fluconazol, com um valor de CIM de 4,0 mg/L e quatro (77,77 %) isolados, apresentaram baixa sensibilidade ao fluconazol com valor de CIM de 8,0 mg/L; apesar do valor da CIM estar mais elevado, não podemos afirmar que esses isolados estão resistentes ao fluconazol, mas sim que, em se tratando de isolados ambientais o resultado é preocupante, pois está no limite do ponto de corte para a resistência, sem que este isolado tenha contato com esta substância. Drummond e colaboradores (2007) avaliaram o comportamento de vários isolados de *Cryptococcus*, entre eles, isolados ambientais, frente à compostos azólicos, tanto ao fluconazol, quanto à pesticidas azólicos e foi observado nos isolados ambientais um aumento da resistência a esses compostos (Drummond, Reimão *et al.*, 2007). Desta forma, supõe-se que a diminuição da sensibilidade da maioria dos isolados ambientais aos azóis, é proveniente de uma possível contaminação ambiental por esses compostos; uma vez que os locais onde as amostras foram coletadas

apresentam serviços de jardinagem como praças, parques, escolas e hospitais. Outros estudos avaliaram a sensibilidade de isolados ambientais os fármacos antifúngicos, como o trabalho de Kobayashi *et al.*, (2005) que avaliaram 36 isolados ambientais de *C. neoformans*, na cidade de Goiânia (GO), frente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol e entre estes não foi determinado nenhum isolado resistente. Os mesmos dados foram encontrados no estudo de Souza *et al.*, (2005) quando avaliaram 110 isolados de *C. neoformans*, sendo 70 isolados clínicos e 40 isolados ambientais, também na cidade de Goiânia (GO); nenhum isolado ambiental mostrou-se resistente aos fármacos anfotericina B, itraconazol, fluconazol e ravulconazol. Esses dados corroboram com os determinados em nosso estudo, que apesar de apresentarem um valor no limite de sensibilidade, ainda são classificados como sensíveis ao fluconazol e a anfotericina B.

Tendo em vista as complicações no tratamento da criptococose, o baixo arsenal de drogas antifúngicas e a aquisição de resistência das leveduras aos azóis, o estudo com plantas e suas substâncias, como compostos antifúngicos inovadores vem apresentando destaque nos últimos anos. Há muito tempo, as plantas vêm sendo amplamente utilizadas na medicina popular, pois representam uma alternativa econômica, de fácil obtenção, apresentam aplicabilidade a diversas doenças e baixa toxicidade ao homem (Regasini, Pivatto *et al.*, 2010; Sardi, Almeida *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram estudadas duas substâncias isoladas da planta *Maytenus ilicifolia*, maitenina e pristimerina, e uma série de chalconas sintéticas. Buscou-se nestas substâncias uma ação fungicida e/ou fungistática contra leveduras do gênero *Cryptococcus*, para o controle desta levedura no seu nicho ambiental e no hospedeiro.

Estudamos as substâncias de *M. ilicifolia*, a maitenina e a pristimerina, com finalidade de desinfecção ambiental, pelo fato de serem substâncias naturais, apresentarem potencial fungicida em uma concentração baixa (0,48 a 0,97 mg/L) e o menor risco de danos ambientais, como por exemplo, um desequilíbrio da fauna e flora da região desinfetada (Drummond, Reimão *et al.*, 2007).

A planta *M. ilicifolia* (Celastraceae), nativa da floresta tropical Atlântica, é amplamente utilizada na medicina tradicional por apresentar diversas atividades biológicas (Vilegas, Sanommiya *et al.*, 1999); (Jorge, Leite *et al.*, 2004); (Santos-Oliveira, Coulaud-Cunha *et al.*, 2009). Nas últimas décadas, o uso de metabólitos secundários extraídos desta família, como os triterpenos, diterpenos e

sesquiterpenos, tem mostrado amplo espectro de bioatividades (Buffa Filho, Corsino *et al.*, 2002; Chang, Hayashi *et al.*, 2003; Tanaka, Ooba *et al.*, 2004; Shiota, Sekita *et al.*, 2004). Há estudos que mostram a atividade antibacteriana e leishmanicida da espécie *Maytenus ilicifolia* (Kloucek, Svobodova *et al.*, 2007). Extratos brutos das folhas e raízes da *M. ilicifolia* foram estudados frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp e mostraram-se eficazes contra esses microrganismos. Este potencial antibacteriano pode ser explicado pela presença de taninos hidrolizáveis, os quais apresentam a capacidade de inibir o crescimento bacteriano devido a modificações na permeabilidade da parede celular (Annuk, Hirno *et al.*, 1999). Souza-Formigoni e colaboradores (1991) avaliaram o potencial antiulcerogênico *in vivo* do extrato aquoso de *M. aquifolium* e de *M. ilicifolia*, a formação de úlceras estomacais foram induzidas, em camundongos, pela administração de indometacina; doses dos extratos aquosos foram administrados por via oral e intraperitoneal, resultando em forte redução das úlceras por ambas espécies de plantas (Souza-Formigoni, Oliveira *et al.*, 1991).

As substâncias maitenina e pristimerina, são compostos triterpenóides quinonametídeos comumente isolados das raízes da família Celastraceae. Recentemente, Dos Santos e colaboradores (2010) apresentaram a maitenina e a pristimerina como substâncias com potente atividade leishmanicida, assim como uma forte e seletiva atividade antitumoral frente as células de glioma, seletivamente, à linhagem celular U343 (Dos Santos, Dos Santos *et al.*, 2010)

Em nosso estudo, a atividade antifúngica dos triterpenos, maitenina e pristimerina, foi avaliada frente à cepa padrão ATCC 90012 de *Cryptococcus neoformans*, aos isolados resistentes de *C. neoformans* (R30) e *C. gattii* (118) e a seis isolados ambientais, previamente identificados, M16.2; M16.3; M16.4; M21.1; V2.3, Hp5.2 (*C. neoformans* var. *grubii* – VNI). Ambas apresentaram atividade fungicida potente para todos os isolados, porém para os isolados resistentes, a maitenina mostrou atividade com valores de CIM variando entre 0,48 a 3,9 mg/L. Assim como para os isolados ambientais onde verificamos uma faixa de CIM variando de 0,48 a 0,97 mg/L para a maitenina.

A definição de saneante pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é “substância ou preparações destinadas á higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento de água” (Anvisa). Para o desenvolvimento de um saneante,

este deve apresentar-se preferencialmente atóxico para o homem e ao meio ambiente, uma vez que, os saneantes até então desenvolvidos agredem e apresentam uma capacidade de contaminação e desequilíbrio ambiental. O atual desinfetante ambiental utilizado na lavagem de locais públicos para a retirada de fezes de pássaros, é o hipoclorito de sódio comercial (2,5 %) em uma diluição 1:10 em água Mendes-Giannini (Mendes-Giannini, Araujo et al., 2010). Realizamos o teste de sensibilidade partindo da concentração correspondente a usual e verificamos que há eficácia, porém esta concentração poderia ser reduzida, com uma diluição até 1:10⁵.

Em nosso trabalho, avaliou-se o potencial de desinfecção das substâncias naturais, utilizando como controle positivo a anfotericina B e a metodologia da curva de morte, na qual por meio de uma cinética de exposição em 24 horas obtivemos a curva de morte das células fúngicas conforme Klepser, Ernst *et al.*, 1998; Diniz, 2009; Sangalli-Leite, Scorzoni *et al.*, 2011 com modificações. Para cada substância, foi avaliada a taxa de morte na CIM, sendo anfotericina B na concentração de 1,0 mg/L e maitenina a 7,8 mg/L e pristimerina 15,62 mg/L. Obtivemos resultados importantes em um período de 24 horas de exposição do isolado às substâncias naturais, uma vez que a taxa de morte de leveduras variou em 80 a 100 % para a cepa ATCC 90012 em um período de 1 a 2 horas e 50 % a 100 % em um período de 1 a 12 horas para o isolado ambiental M16.2 quando tratados com anfotericina B. A taxa de morte para a maitenina variou de 80 a 100 % em um período de 1 a 4 horas para a cepa ATCC 90012 e 70 a 100 % em um intervalo de 2 a 8 horas para o isolado ambiental. Já para a pristimerina, a taxa de morte da cepa ATCC 90012 variou de 60 a aproximadamente 80 % em uma faixa de tempo de 8 a 24 horas, e para o isolado ambiental variou entre 60 a 80 % em um intervalo de tempo de 8 a 24 horas. Com esses resultados, podemos classificar a maitenina como a substância natural mais eficiente quando comparada à pristimerina, pois foi capaz de eliminar 100 % das leveduras no máximo 8 horas.

Com relação à eficiência da desinfecção, observou-se que para a cepa ATCC 90012 a maitenina e anfotericina B tiveram o mesmo comportamento, ambas foram eficazes com aproximadamente 90 % de morte das leveduras em apenas 1 hora. Já para a pristimerina os resultados tiveram menor ação, como observou-se nos testes de sensibilidade. Para o isolado ambiental (M16.2), os resultados de maitenina e anfotericina B foram semelhantes porém menos eficazes quando comparados à

cepa ATCC 90012. A maitenina atingiu 70 % de morte em 2 horas, enquanto que a anfotericina B em 8 horas, podendo constatar, assim, que a maitenina apresentou maior ação em menor tempo. No entanto, quando avaliamos os resultados de pristimerina, observamos que apenas no período de 24 horas, houve 80 % de morte sendo que a maitenina atingiu esse mesmo resultado em apenas 8 horas.

Nossos resultados estão de acordo com Diniz (2009) que realizou um trabalho semelhante em nosso laboratório com o extrato bruto de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). Avaliou por meio de curva de sobrevivência a eficácia deste extrato bruto em isolados ambientais, para isso utilizou-se 500 µg/mL do extrato em um período de até 24 horas. Os resultados mostraram uma eficiência de até 95,8 % para a maioria dos isolados quando tratados com o extrato de *A. macrophylla*. Foi avaliada a eficiência do hipoclorito de sódio frente a esses isolados ambientais e constatou-se 98,8 % de morte das leveduras. Diante desses resultados, podemos avaliar que a maitenina e a pristimerina são substâncias com um potencial saneante maior que o extrato de *A. macrophylla*, uma vez que além de apresentarem taxas de morte mais elevadas, as concentrações testadas foram aproximadamente 100 vezes menor.

Diante da problemática de desinfecção ambiental e toxicidade, avaliamos a citotoxicidade da maitenina e pristimerina, em diferentes linhagens celulares. A avaliação da citotoxicidade mostrou que na faixa da CIM (0,48 a 3,90 mg/L) da maitenina para todos os isolados testados variou entre 60 % e 100 % para todas as linhagens celulares.

A citotoxicidade da pristimerina tem sido discutida em alguns trabalhos como o de Chang e colaboradores (2003) que mostram a citotoxicidade em diversas linhagens tumorais, como por exemplo, células MDA-MB-231 (câncer de mama) (Chang, Hayashi *et al.*, 2003). Outro estudo mostrou a baixa viabilidade celular da pristimerina em linhagens celulares tumorais A549, MCF-7, HepG2 e Hep3B; em que o IC₅₀ mostrou-se em uma baixa concentração (0,61-0,42 mM). Já em linhagem celulares normais, como por exemplo, em linhagem de células mamárias não-tumorais (MCF-10A), a pristimerina não mostrou citotoxicidade, o que sugere a seletividade da substância para células tumorais (Wu, Chan *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, observamos que a citotoxicidade da pristimerina, em linhagem celular tumoral A549, corroboram os dados apresentados nos demais trabalhos, uma vez que apresentou viabilidade em torno de 50 % em ampla faixa de

concentração. Entretanto, nossos resultados mostraram que em HepG2, nas concentrações testadas, a pristimerina apresentou-se com baixa citotoxicidade, variando em 60 a 100 % de células vivas. O comportamento da maitenina e pristimerina em células humanas normais (NOK) mostrou-se favoráveis para o desenvolvimento de produtos antifúngicos a partir dessas substâncias.

Um segundo objetivo de nosso trabalho, foi buscar substâncias fortemente ativas contra *Cryptococcus*, com baixo potencial citotóxico que possa ser alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. Diante disso, uma série de chalconas sintéticas se destacaram, apresentando reduzidos valores de CIM para *Cryptococcus* e outras leveduras como *Candida* sp e *Paracoccidioides brasiliensis* (dados não demonstrados).

As chalconas são flavonóides de cadeia aberta encontrado em uma grande diversidade de plantas. Há muitos estudos na literatura que avaliam as mais diversas atividades biológicas como a atividade antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antiprotzoária, antiulcerogênica, antiinflamatória. Algumas chalconas já são utilizadas no tratamento de doenças virais, cardiovasculares, parasitárias, dor, gastrite, assim como usada em aditivos alimentares e em cosméticos. Batovska e colaboradores (2010) por meio de ensaios clínicos mostraram que as chalconas atingem concentrações plasmáticas razoáveis e não apresentam toxicidade (Batovska e Todorova, 2010).

Existem várias chalconas naturais e sintéticas, entre as chalconas naturais, isoliquiritigenina foi avaliada quanto a sua atividade para o tratamento da cólera e de doenças renais, nas quais os indivíduos acometidos perdem muitos eletrólitos. Muanprasat e colaboradores (2012) mostraram a capacidade da chalcona natural inibir AMPc, uma vez que a ativação desta via promove a liberação de cloretos pelas membranas intestinais, desta forma, estudos preliminares mostraram que a chalcona natural é potencialmente ativa para o tratamento da cólera e doenças renais (Muanprasat, Sirianant *et al.*, 2012). Há diversos trabalhos que avaliam a atividade antitumoral de chalconas. Recentemente, Neves *et al.*, 2012 avaliaram a capacidade de gerar morte celular, danos no ciclo celular e indução de apoptose de 31 chalconas em linhagens celulares tumorais humanas, MCF-7, NCI-H460 e A375-C5 (Neves, Cravo *et al.*, 2012). Os resultados afirmam que as chalconas interferem nos parâmetros pesquisados e mostra a possibilidade de classificação das chalconas como agentes antitumorais.

A atividade antimicrobiana das chalconas, também é relatada em alguns trabalhos. Barua e colaboradores (2011) avaliaram a relação estrutura-atividade de um conjunto de chalconas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*; os autores mostraram a atividade antimicobacteriana (Barua, Sarmah *et al.*, 2011). Em outro estudo, Brandão e colaboradores (2010) mostraram o potencial antibacteriano e antidermatofítico de uma chalcona natural extraída da planta *Polygonum spectabile*, a qual mostrou-se ativa contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Além do estudo da atividade antimicrobiana, este estudo mostrou uma moderada citotoxicidade em linhagens celulares renais Vero e LLC-MK2 (Brandão, Kroon *et al.*, 2010). Lacka e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, os valores de CIM variaram entre 16 e 1 mg/mL, apresentando atividade fungicida na maior concentração (Łacka, Konieczny *et al.*, 2011). Outros estudos também mostram a atividade de chalconas frente as leveduras de várias espécies de *Candida* sp e *Cryptococcus* spp (Elsohly, Joshi *et al.*, 2001; Tavares, Johann *et al.*, 2011).

No presente trabalho, avaliamos a atividade antifúngica de 15 chalconas sintéticas contra a cepa de *C. neoformans* ATCC 90012 e aos isolados clínicos sensíveis S26 e S27 de *C. neoformans* e aos isolados resistentes 30R de *C. neoformans* e o isolado 118 de *C. gattii*.

Aproximadamente 40 % (6/15) das chalconas testadas apresentaram atividade fungicida para *Cryptococcus* spp, com exceção do isolado 30R, nos quais as chalconas apresentaram 100 % de atividade fungicida. De acordo com Scorzoni e colaboradores (2007) das 15 chalconas testadas, 14 apresentaram forte atividade anti-cryptococcus, sendo somente a isoflavona que apresentou CIM maior que 250 mg/L, sendo assim, considerada inativa (Scorzoni, Benaducci *et al.*, 2007). Somente para a cepa ATCC 90012 que além da isoflavona, a 3'-G-chalc também não apresentou atividade antifúngica. Diante dos reduzidos valores de CIM, selecionou-se três chalconas para avançarmos em nossas pesquisas, sendo elas: 2,3-chalc, 3,4-chalc e a 3'-chalc. A atividade antifúngica contra as leveduras patogênicas *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* também foi relatada no trabalho de Elsohly e colaboradores (2001), onde mostraram a atividade de cinco flavonóides prenilados isolados a partir de extrato etanólico de folhas de *Maclura tinctoria* (L.) Gaud, sendo um deles uma chalcona inédita (Elsohly, Joshi *et al.*, 2001).

Tavares e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica e citotóxica de um grupo de 21 chalconas quinolínicas. A atividade antifúngica foi testada contra cinco fungos patogênicos entre eles *Paracoccidoides brasiliensis*, espécies de *Candida* e *Cryptococcus gattii* e os resultados mostraram uma maior atividade contra o fungo dimórfico *P. brasiliensis*, assim como, somente um composto não apresentou atividade contra o fungo em questão. Já a atividade anti-*Candida*, essa série de chalconas não apresentaram atividade significativa, porém, grande parte dos compostos apresenta atividade contra *C. gattii*, sendo que o composto que mostrou melhor atividade, apresentou uma CIM de 7,80 mg/L (Tavares, Johann *et al.*, 2011). Em nossos resultados, observamos que a CIM para o isolado resistente de *C. gattii* (118) variou em uma faixa de 31,25 a 3,90 mg/L.

É de grande importância o estudo da citotoxicidade das moléculas que pretendemos apresentar como protótipos de novos fármacos anti-*Cryptococcus*. Avaliamos a toxicidade das três chalconas mais potentes em diversas linhagens celulares, procurando abranger tecidos humanos relevantes para o processo infeccioso, como também células metabólicas, onde a substância será metabolizada quando administrada *in vivo*, estudando desta forma a segurança no uso das substâncias. A infecção inicia com a penetração de propágulos infectantes na mucosa do hospedeiro, para isso avaliamos a citotoxicidade em células NOK (células de mucosa oral); esses propágulos atingem os pulmões, para isso estudamos linhagens pulmonares normais (MRC-5) e tumorais (A549). A levedura apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, sendo o principal sítio de instalação da doença, para isso avaliamos a citotoxicidade das chalconas em células de glioma humano (V87). Visando o uso das chalconas como fármaco, avaliamos a sua toxicidade em células metabolizadoras HepG2.

Nossos resultados mostraram que as três chalconas testadas não apresentam citotoxicidade nas linhagens celulares ensaiadas, or meio da metodologia do MTT. Somente na linhagem A549 (tumoral) que quando tratadas com a 3'-chalc, 30 % das células permaneceram vivas, porém quando avaliamos o seu comportamento em células normais de pulmão (MRC-5), verificamos que manteve mais de 80 % das células vivas, desta forma, esses valores indicam uma possível toxicidade direcionada às células tumorais conforme o descrito no trabalho de (Neves, Cravo *et al.*, 2012).

Na avaliação da adesão de *C. neoformans* em diferentes células, observamos uma maior adesão de *C. neoformans* em células do SNC (V87, células de glioma humano). Tendo em vista o tropismo dessa levedura pelo SNC, nossos dados confirmam essa afinidade. Essa atração pode ocorrer por vários mecanismos. Stie e colaboradores (2012), mostraram o papel de proteases desta levedura no comportamento neurotrópico, uma vez que o plasminogênio, no sangue, reveste a superfície de patógenos e esses é transformado em plasmina (protease sérica) através de um transformador de plasminogênio, o autor mostra que para *C. neoformans* não é necessário a ação do transformador de plasminogênio para a conversão do mesmo, uma vez que, esses agentes estão presentes na cápsula polissacarídica. Desta forma, a plasmina mostrou maior capacidade de invasão nas células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais (Stie e Fox, 2012). Outro estudo mostra o processo de passagem do *C. neoformans* pela barreira hematoencefálica, por meio de ensaios *in vitro*. Com este estudo, observa-se que a adesão e invasão da levedura são mediadas por bolsas lipídicas (Huang, Long *et al.*, 2011). Fosfolipases são enzimas importantes no início da infecção pulmonar por *C. neoformans*, uma vez que a adesão ao epitélio pulmonar é o primeiro processo de infecção. Ganendren *et al.*, (2006) avaliaram o papel de uma fosfolipase B no processo de adesão em células epiteliais humanas de pulmão (A549) e mostraram que fosfolipases apresentam um papel importante na ligação de *C. neoformans* em células epiteliais pulmonares. Além disso, os autores observaram que a taxa de adesão nessa linhagem celular, foi maior que 69 % em 4 horas de infecção (Ganendren, Carter *et al.*, 2006). Nosso estudo mostrou uma taxa de adesão muito semelhante a encontrada no trabalho descrito acima, uma vez que, verificamos uma taxa de adesão de *C. neoformans* em fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) de mais de 70 % no tempo de 4 horas.

Outros estudos sobre a adesão de *C. neoformans* mostram a capacidade que a levedura tem de impedir a primeira defesa do hospedeiro pelo fato de internalizar-se nos macrófagos e mesmo quando ocorre fagocitose, a levedura é capaz de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos, sendo este um fator de virulência do fungo. Srikanta e colaboradores (2011) avaliaram a interação intracelular de *C. neoformans* em células fagocíticas or meio de microscopia e observaram uma alta adesão da levedura em três linhagens fagocíticas diferentes (Srikanta, Yang *et al.*, 2011).

Nossos dados apontam a chalcona, 2,3-chalc, como um protótipo promissor para o desenvolvimento de novo fármaco antifúngico, uma vez que, não apresenta citotoxicidade em várias células, apresenta um alto potencial em inibir a adesão em células humanas e também apresenta atividade fungistática contra isolados resistentes, o que vem a estudá-la como um novo composto para solucionar o problema da resistência aos azóis. Assim como, apontamos as substâncias naturais, maitenina e pristimerina, como candidatos promissores para o desenvolvimento de saneantes eficazes para a desinfecção ambiental em locais públicos. Nossos resultados mostram um grande avanço para continuarmos no estudo dos mecanismos de ação das substâncias aqui apresentadas para futuramente apresentarmos novas medidas para a redução dos casos de criptococose de forma eficiente e segura.

7. CONCLUSÕES

1. O levantamento geográfico na cidade de Araraquara (SP) mostrou uma alta prevalência da presença de *Cryptococcus* spp (66,6 %), sendo que das 58 amostras positivas, 55,2% destas estavam próximas a hospitais;
2. A identificação bioquímica, baseada na utilização do CGB, mostrou que 20,7 % dos isolados foram *C. gattii* e 79,3 % *Cryptococcus* spp. Já a identificação pelo auxanograma, mostrou que 17,2 % pertencem à espécie *C. gattii* e 79,7 % *C. neoformans*;
3. Entre as espécies não patogênicas, houve prevalência da espécie *C. luteolus*;
4. De acordo com a tipagem global de Meyer, todos os isolados foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii* tipo molecular VNI, mostrando que o município de Araraquara (SP) apresenta-se endêmico para este tipo genético;
5. Não foram encontrados isolados ambientais resistentes aos fármacos antifúngicos, anfotericina B e fluconazol;
6. A cepa de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 alterou sua morfologia em tecidos de pulmão e fígado, com o aumento da célula fúngica, após a reativação *in vivo*;
7. A maitenina e pristimerina apresentaram atividade antifúngica potente contra *Cryptococcus* spp, podendo ser utilizado como um modelo para saneante ambiental, uma vez que as duas substâncias apresentam valores de CIM reduzidos com baixa citotoxicidade;
8. Os isolados resistentes das espécies de *Cryptococcus* spp foram potentes à maitenina e pristimerina, sendo que maitenina foi duas vezes mais ativo que a pristimerina;
9. A maitenina foi mais eficiente na desinfecção podendo ser utilizada como saneante ambiental, pois sua eficiência se inicia com o tempo de 1 hora de contato, mostrando o comportamento idêntico ao da anfotericina B;
10. As chalconas apresentaram atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp, onde mais de 85 % destas substâncias apresentaram atividade;
11. Os derivados chalcônicos mais potentes foram 2,3-chalc > 3'-chalc > 3,4-chalc;

12. No ensaio de citotoxicidade, a maitenina apresentou-se menos tóxica quando comparada com pristimerina, embora a viabilidade celular para ambas tenha sido alta, aproximadamente 80 %;
13. No ensaio de citotoxicidade, as chalconas apresentaram baixa toxicidade nas diferentes linhagens celulares, com viabilidade celular maior que 80 %;
14. A maior taxa de adesão de *C. neoformans* ATCC 90012 ocorreu em células de glioma humano (V87) com 35 % de adesão, seguido de células de hepatoma humano (HepG2) com 20 % de adesão no período de 1 hora;
15. A 2,3-chalc foi capaz de inibir a adesão de *C. neoformans* para todas as células testadas, e sua atividade foi mais eficiente na inibição da adesão às células de glioma (V87), seguido de HepG2, a partir de 30 minutos, chegando a 100 % de inibição com 2 horas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As substâncias testadas neste estudo com finalidade da busca de um saneante apresentaram resultados promissores e podem ser utilizados como desinfetante ambiental. Com relação ao uso das chalconas e seu possível protótipo como fármacos antifúngicos para *Cryptococcus* spp ainda não foram bem estabelecidos, com base neste e outros estudos científicos publicados, uma vez que essas substâncias foram testadas somente *in vitro*, sugerindo que trabalhos futuros devam ser realizados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(CDC), C. F. D. C. A. P. Emergence of *Cryptococcus gattii*-- Pacific Northwest, 2004-2010. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 59, n. 28, p. 865-8, Jul 2010. ISSN 1545-861X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651641> >.

(EUCAST), E. C. F. A. S. T. **Definitive Document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeast**. *Clinical Microbiological Infect*: 7 p. 2008.

ABRUZZO, G. K. et al. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 11, p. 2333-8, Nov 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371329> >.

AGÜERO, M. B. et al. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 9, p. 1970-8, Sep 2011. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600954> >.

ALHAJI, M.; SADIKOT, R. T. Cryptococcal endocarditis. **South Med J**, v. 104, n. 5, p. 363-4, May 2011. ISSN 1541-8243. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606721> >.

ALMEIDA, A. M. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 1, p. 152-64, Jan 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311593> >.

ANDRADE-SILVA, L. et al. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biol**, v. 114, n. 5-6, p. 438-45, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943154> >.

ANDRIOLE, V. T. Current and future therapy of invasive fungal infections. **Curr Clin Top Infect Dis**, v. 18, p. 19-36, 1998. ISSN 0195-3842. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9779349> >.

ANNUK, H. et al. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol Lett**, v. 172, n. 1, p. 41-5, Mar 1999. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079525> >.

AVERBUCH, D. et al. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med Mycol**, v. 40, n. 5, p. 479-84, Oct 2002. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462527> >.

BAIXENCH, M. T. et al. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 6, p. 1076-83, Jun 2007. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468115> >.

BANDAY, A. H.; IQBAL ZARGAR, M.; GANAIE, B. A. Synthesis and antimicrobial studies of chalconyl pregnenolones. **Steroids**, v. 76, n. 12, p. 1358-62, Nov 2011. ISSN 1878-5867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771607> >.

BARBIERI, M. S. C. **Meningite criptocócica em indivíduos HIV na Região de Araraquara**. 2001. (Especialização). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP / Araraquara

BARUA, N. et al. DFT-based QSAR Models to Predict the Antimycobacterial Activity of Chalcones. **Chem Biol Drug Des**, Dec 2011. ISSN 1747-0285. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151277> >.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 475-506, Oct 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302058> >.

BATISTA, M. V. et al. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. **Trop Med Int Health**, v. 16, n. 9, p. 1134-42, Sep 2011. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692958> >.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Curr Clin Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 1-29, Feb 2010. ISSN 2212-3938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891604> >.

BERNAL-MARTINEZ, L. et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 90-6, Feb 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235546> >.

BINDER, U.; LASS-FLÖRL, C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 3, n. 1, p. e20110016, 2011. ISSN 2035-3006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625305> >.

BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 5, p. 1538-45, Mar 2006. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386424> >.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 4, p. 891-907, Apr 2001. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283285> >.

BRANDÃO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 926-9, Oct 2010. ISSN 1618-095X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382006> >.

BUFFA FILHO, W. et al. Quantitative determination for cytotoxic Friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochem Anal**, v. 13, n. 2, p. 75-8, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0958-0344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12018026> >.

BUISSA-FILHO, R. et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3321-8, Jul 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458072> >.

BYRNES, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220140> >.

_____. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909264> >.

CALLEJAS, A. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 341-4, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075505> >.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**, v. 3, n. 4, p. 405-15, Jun 2003. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748052> >.

CASTRO-FERREIRA, I. et al. Early-onset of disseminated cryptococcal infection in two renal transplant recipients. **Clin Nephrol**, v. 75, n. 6, p. 542-6, Jun 2011. ISSN 0301-0430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612758> >.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. [Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics]. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, n. 1, p. 39-49, Mar 2006. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499430> >.

CHANG, F. R. et al. Antitumor agents. 228. five new agarofurans, Reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. **J Nat Prod**, v. 66, n. 11, p. 1416-20, Nov 2003. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640511> >.

CHEENPRACHA, S. et al. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 6, p. 1710-4, Mar 2006. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263298> >.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 5, p. 570-4, Sep 1996. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877137> >.

CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987712> >.

CIPRIANI, T. R. et al. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **J Nat Prod**, v. 67, n. 4, p. 703-6, Apr 2004. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15104510> >.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 4, p. 899-902, Apr 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9559804> >.

CORREA, M. P. S. C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, R. R. B. S. **Criptococose em crianças no Estado de Pará, Brasil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 32: 505 - 508 p. 1999.

COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 854-63, Jun 2008. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296021> >.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123698> >.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 20, n. 5, p. 1020-32, Mar 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230126> >.

CRUZ, M. C. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 409-12, May 2007. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234376> >.

DAY, J. N. et al. Most cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected patients in Vietnam are due to a distinct amplified fragment length polymorphism-defined cluster of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VN1. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 658-64, Feb 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159929> >.

DEEPA, M. A.; NARMATHA BAI, V. **Bioinsecticidal compounds of Celastraceae the spindle tree family**. . International Journal Botany. 6: 220 - 227 p. 2010.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, May 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486233> >.

DINIZ, J. N. M. ***Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais e bioprospecção de extratos de plantas com atividade saneante**. 2009. 140 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP / Araraquara

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 840452, 2009. ISSN 1687-708X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19503836> >.

DORNEANU, O. et al. [*Cryptococcus* meningitis, five years of experience and literature review]. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 112, n. 1, p. 100-3, 2008 Jan-Mar 2008. ISSN 0048-7848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677910> >.

DOS SANTOS, V. A. et al. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 6956-73, 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938406> >.

DRUMMOND, E. D. et al. [Behaviour azole fungicide and fluconazole in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 209-11, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568890> >.

DUAN, H. et al. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* and *Tripterygium wilfordii*: a new class of potent anti-HIV agents. **J Nat Prod**, v. 63, n. 3, p. 357-61, Mar 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757718> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

ELSOHLY, H. N. et al. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. **Planta Med**, v. 67, n. 1, p. 87-9, Feb 2001. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270732> >.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 1, p. 15-22, Mar 2009. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463273> >.

FARIA, R. O. et al. [Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 2, p. 198-200, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464153> >.

FERNANDES, O. L. et al. ***Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com Aids**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33 2000.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J Immunol Methods**, v. 131, n. 2, p. 165-72, Aug 1990. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391427> >.

FILIÚ, W. F. et al. [Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 591-5, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612740> >.

FIRACATIVE, C. et al. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. **Biomedica**, v. 31, n. 1, p. 118-23, Mar 2011. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159490> >.

FRANZOT, S. P. et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 9, p. 2243-51, Sep 1997. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276395> >.

FUSCO-ALMEIDA, A. M. **Caracterização molecular de polimorfismo e do gene ERG11 associados a mecanismos de resistência a drogas antifúngicas em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans***. 2005. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP / Araraquara

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 308-29, 1990 Mar-Apr 1990. ISSN 0162-0886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2184499> >.

GANENDREN, R. et al. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1006-15, Apr 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487740> >.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J Immunol Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, Nov 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782817> >.

GIROIS, S. B. et al. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 25, n. 2, p. 138-49, Feb 2006. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622909> >.

GOLDMAN, D. L. et al. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 832-8, Feb 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639453> >.

GOLLAPUDY, R.; AJMANI, S.; KULKARNI, S. A. Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14- α demethylase 'A' with azole antifungals. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 11, p. 2937-50, Jun 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142553> >.

GONZÁLEZ-HEIN, G.; GONZÁLEZ-HEIN, J.; DÍAZ JARABRÁN, M. C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile. **J Avian Med Surg**, v. 24, n. 3, p. 227-36, Sep 2010. ISSN 1082-6742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046943> >.

GRECHI, J. et al. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. **J Biol Chem**, v. 286, n. 17, p. 14820-9, Apr 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388964> >.

GROVER, N. et al. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 159-70, Oct 2007. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661160> >.

GUERRERO, A.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4322-31, Sep 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591227> >.

HARA, H. et al. Inhibitory effects of chalcone glycosides isolated from *Brassica rapa* L. 'hidabeni' and their synthetic derivatives on LPS-induced NO production in microglia. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 18, p. 5559-68, Sep 2011. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856162> >.

HUANG, S. H. et al. Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3). **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34761-9, Oct 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693704> >.

HULL, C. M. Preventing phagocytosis takes more than a sweet disposition. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 3, p. 174-5, Mar 2011. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402356> >.

HUSØY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol In Vitro**, v. 7, n. 2, p. 149-54, Mar 1993. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732183> >.

IGREJA, R. P. et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol**, v. 42, n. 3, p. 229-38, Jun 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283237> >.

IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiol Immunol**, v. 47, n. 4, p. 271-7, 2003. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801064> >.

ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. et al. In Vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1580-2, Apr 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212095> >.

JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **J Bacteriol**, v. 175, n. 21, p. 7102-4, Nov 1993. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226653> >.

JARVIS, J. N. et al. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 6, p. 596-603, Dec 2008. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978527> >.

JOHNSON, E. et al. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 6, p. 511-4, Dec 2008. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790613> >.

JONG, A. et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1313-26, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248627> >.

JORGE, R. M. et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 1, p. 93-100, Sep 2004. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261968> >.

KANTARCIOĞLU, A. S. et al. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and in vitro antifungal susceptibilities. **Med Mycol**, v. 45, n. 2, p. 173-81, Mar 2007. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17365654> >.

KATSORI, A. M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 10, p. 1575-96, Oct 2011. ISSN 1744-7674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711087> >.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KIDD, S. E.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from insect frass. **Med Mycol**, v. 41, n. 2, p. 171-6, Apr 2003. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964851> >.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 5, p. 1207-12, May 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593151> >.

KLOUCEK, P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 427-9, May 2007. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178202> >.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-44, Mar 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943280> >.

KORDOSSIS, T. et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 335-9, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075504> >.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clin Epidemiol**, v. 3, p. 175-91, 2011. ISSN 1179-1349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750627> >.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-35, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830725> >.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. . Amsterdam: Elsevier Scientific. B.V., 1998.

KWON-CHUNG, K. J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. **Zentralbl Bakteriol**, v. 275, n. 3, p. 390-3, Aug 1991. ISSN 0934-8840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741922> >.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. **J Med Vet Mycol**, v. 30 Suppl 1, p. 133-42, 1992. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474438> >.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 535-7, Mar 1982. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7042750> >.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1414-21, Jun 1982. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804444> >.

LAKSHMI, V. et al. Antifungal activity of bivittoside-D from *Bohadschia vitiensis* (Semper). **Nat Prod Res**, Aug 2011. ISSN 1478-6427. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809953> >.

LANJEWAR, D. N. The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of 236 autopsied cases in mumbai, India. **Patholog Res Int**, v. 2011, p. 547618, 2011. ISSN 2042-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660276> >.

LEAL, A. L. et al. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 71-5, Aug 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443922> >.

LEIMANN, B. C.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 11, p. 2582-92, Nov 2008. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009138> >.

LENGELER, K. B.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infect Immun**, v. 69, n. 1, p. 115-22, Jan 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119496> >.

LESTER, S. J. et al. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Vet Clin Pathol**, v. 40, n. 1, p. 4-17, Mar 2011. ISSN 0275-6382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244455> >.

LEVITZ, S. M.; SPECHT, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 513-24, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696647> >.

LEÃO, R. N. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. 1997.

LIZARAZO, J. et al. [Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005]. **Biomedica**, v. 27, n. 1, p. 94-109, Mar 2007. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546227> >.

LOPES, J. O. et al. [Cryptococcosis not related to AIDS in Rio Grande do Sul: a report of 8 cases and a review of the literature]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 5, p. 369-72, 1997 Sep-Oct 1997. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380896> >.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. Instituto Pantarun, São Paulo: 2002. 102 - 122

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants**. 2th 1997.

MACDOUGALL, L. et al. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291588> >.

MAK, S. et al. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 5, p. 653-8, May 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439176> >.

MARTINS, C. V. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 337-9, Feb 2009. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038979> >.

MARTINS, L. M. et al. **Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresin, Piauí (northeastern Brazil)**. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 106: 725 - 730 p. 2011.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 3, p. 193-7, Mar 2008. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703922> >.

MATSUMOTO, M. T. et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 41-7, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384819> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. **Manual de manejo ambiental e controle de Columbídios (*Columba livia*) em escolas públicas do município de Araraquara** 2010.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MIN, K. H.; KWON-CHUNG, K. J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 261, n. 4, p. 471-80, Jul 1986. ISSN 0176-6724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3094288> >.

MING, L. C.; CASTRO, D. M.; DELACHIAVE, M. E. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares**. 1998.

MIURA, T. et al. Cutaneous cryptococcosis in a patient with cirrhosis and hepatitis C virus infection. **Acta Derm Venereol**, v. 90, n. 1, p. 106-7, 2010. ISSN 1651-2057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107746> >.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med Mycol**, v. 38, n. 5, p. 385-90, Oct 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092386> >.

MOREIRA, T. A. et al. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. . *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 39, n. 3, p. 255 - 258, 2006

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 2, p. 94-106, Feb 2010. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665571> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOSSI, A. J. et al. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168-78, Mar 2004. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030921> >.

MOYRAND, F. et al. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 837-49, Aug 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139628> >.

MUANPRASAT, C. et al. Novel Action of the Chalcone Isoliquiritigenin as a Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Inhibitor: Potential Therapy for Cholera and Polycystic Kidney Disease. **J Pharmacol Sci**, v. 118, n. 1, p. 82-91, Jan 2012. ISSN 1347-8648. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186622> >.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 22, p. 6115-6, Nov 1992. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1461751> >.

NEOFYTOS, D. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transpl Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 220-9, Jun 2010. ISSN 1399-3062. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113459> >.

NEVES, M. P. et al. Solid-phase synthesis of 2'-hydroxychalcones. Effects on cell growth inhibition, cell cycle and apoptosis of human tumor cell lines. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 1, p. 25-33, Jan 2012. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177409> >.

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**, v. 41, n. 1, p. 73-7, Jan 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517828> >.

_____. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **J Med Vet Mycol**, v. 34, n. 5, p. 365-6, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912173> >.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2576-89, May 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184205> >.

OHKUSU, M. et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 6, p. 299-302, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12532211> >.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585559> >.

OLIVEIRA, J. F. et al. **Neurological disease in HIV infected patients in the era of high active antiretroviral treatment a Brazilian experience.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39: 146 - 151 p. 2006.

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003 Nov-Dec 2003. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762626> >.

PARK, J. Y. et al. Characteristic of alkylated chalcones from *Angelica keiskei* on influenza virus neuraminidase inhibition. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 18, p. 5602-4, Sep 2011. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824777> >.

PASSONI, L. F. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 305-11, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075500> >.

PEDEZERT, M. R.; VACAREZZA, M.; SAVIO, E. **Meningitis por *Cryptococcus neoformans* - experiencia clínica y consideraciones terapéuticas.** Revista Panamericana de Infectologia. 6: 34 - 40 p. 2004.

PEDROSO, R. S. et al. [Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 5, p. 566-8, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992414> >.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol Res**, v. 164, n. 2, p. 221-7, 2009. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428645> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PERLIN, D. S.; SETO-YOUNG, D.; MONK, B. C. The plasma membrane H(+)-ATPase of fungi. A candidate drug target? **Ann N Y Acad Sci**, v. 834, p. 609-17, Nov 1997. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405872> >.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 71, n. 3, p. 252-9, Nov 2011. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917395> >.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

PRASAD, S. et al. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1044-63, Aug 2010. ISSN 1439-0221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20635307> >.

PROBST, C. et al. Cryptococcosis mimicking cutaneous cellulitis in a patient suffering from rheumatoid arthritis: a case report. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 239, 2010. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699010> >.

QADIR, I. et al. Isolated cryptococcal osteomyelitis in an immunocompetent patient. **J Infect Dev Ctries**, v. 5, n. 9, p. 669-73, Sep 2011. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918309> >.

RAHMAN, A. A. et al. Antiparasitic and Antimicrobial Indolizidines from the Leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, 2011.

RANDHAWA, H. S. et al. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. **Med Mycol**, v. 46, n. 8, p. 823-33, Dec 2008. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18608895> >.

RASO, T. F. et al. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 355-62, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473361> >.

REGASINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul. Fabaceae, against opportunistic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, 2010.

RHODES, J. C.; POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 36, n. 3, p. 1175-84, Jun 1982. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6807845> >.

ROJAS, J. J. et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complement Altern Med**, v. 6, p. 2, 2006. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483385> >.

ROSARIO, I. et al. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 421-4, Nov 2005. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262879> >.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, n. 2, p. 265-72, Aug 1997. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271852> >.

ROSSI, S. A. **Caracterização de gene ERG11 envolvido na resistência de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* às drogas azólicas de identificação de novos alvos a partir de produtos naturais**. 2011. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP / Araraquara

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in antifungal therapy. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 361-79, 2008. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967129> >.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes Infect**, v. 13, n. 5, p. 457-67, May 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21310262> >.

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148422> >.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, 2009.

SARDI, J. C.; ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 951-9, Oct 2011. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676377> >.

SARDI, J. C. et al. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. **Med Mycol**, v. 50, n. 1, p. 43-9, Jan 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671830> >.

SASTRARUJI, T. et al. Phytochemical studies on *Stemona aphylla*: isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans. **J Nat Prod**, v. 74, n. 1, p. 60-4, Jan 2011. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126060> >.

SATHEESH, L. S.; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. **Indian J Exp Biol**, v. 49, n. 5, p. 366-74, May 2011. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615062> >.

SCORZONI, L. et al. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp* and *Cryptococcus sp*. **Brazilian Journal Microbiological**, v. 38, 2007.

SERENA, C. et al. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2994-6, Jul 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980382> >.

SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, n. 3, p. 152-4, Sep 1999. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473564> >.

SHAO, L. C.; SHENG, C. Q.; ZHANG, W. N. [Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 42, n. 11, p. 1129-36, Nov 2007. ISSN 0513-4870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18300466> >.

SHENG, C. et al. Three-dimensional model of lanosterol 14 alpha-demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3487-95, Aug 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470512> >.

SHIROTA, O. et al. Nine new isoxuxuarine-type triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Chem Biodivers**, v. 1, n. 9, p. 1296-307, Sep 2004. ISSN 1612-1880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191907> >.

SILVA, P. R. et al. [Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 2, p. 158-62, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545836> >.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2006. 577 - 609

SINGH, S. M. et al. First case of cryptococcosis in a new species of bandicoot (*Bandicota indica*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Med Mycol**, v. 45, n. 1, p. 89-93, Feb 2007. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325950> >.

SLOAN, D. et al. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD005647, 2008. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843697> >.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J Infect Dis**, v. 154, n. 1, p. 76-83, Jul 1986. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3519792> >.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, v. 34, n. 1, p. 21-7, Aug 1991. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753784> >.

SRIKANTA, D. et al. A sensitive high-throughput assay for evaluating host-pathogen interactions in *Cryptococcus neoformans* infection. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22773, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829509> >.

STIE, J.; FOX, D. Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 240-58, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998162> >.

SVETAZ, L. et al. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3297-300, Jun 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161186> >.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. **Sabouraudia**, v. 14, n. 3, p. 313-7, Nov 1976. ISSN 0036-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/793055> >.

TANAKA, N. et al. Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2071-6, Jul 2004. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279974> >.

TAVARES, L. C. et al. **Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities.** . European Journal Med. Chemistry. 46 4448 - 4456 p. 2011.

TORTORANO, A. M. et al. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 73-9, Jan 2012. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668521> >.

TRÖSKEN, E. R. et al. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. **Toxicology**, v. 219, n. 1-3, p. 33-40, Feb 2006. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330141> >.

VALLA, A. et al. New syntheses and potential antimalarial activities of new 'retinoid-like chalcones'. **Eur J Med Chem**, v. 41, n. 1, p. 142-6, Jan 2006. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274873> >.

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. 337, n. 1, p. 15-21, Jul 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203426> >.

VILEGAS, W. et al. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of maytenus aquifolium leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 2, p. 403-6, Feb 1999. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563907> >.

VLCHKOVA-LASHKOSKA, M. et al. Cutaneous cryptococcus Laurentii infection in a human immunodeficiency virus-negative subject. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 18, n. 1, p. 99-100, Jan 2004. ISSN 0926-9959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678544> >.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized Cryptococcus neoformans to UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, n. 10, p. 3864-6, Oct 1994a. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986054> >.

_____. Growth of Cryptococcus neoformans in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 11, p. 2648-50, Nov 1994b. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7872761> >.

_____. Susceptibility of melanized and nonmelanized Cryptococcus neoformans to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, v. 62, n. 7, p. 3004-7, Jul 1994c. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005689> >.

WARKENTIEN, T.; CRUM-CIANFLONE, N. F. An Update on Cryptococcosis Among HIV-Infected Persons **International Journal STD AIDS**, v. 21, n. 10, 2010.

WU, C. C. et al. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 8, p. 1277-85, Aug 2005. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093444> >.

YANG, H. M. et al. Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 1, p. 104-11, Jan 2007. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17064909> >.

ZARAGOZA, O. Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. **Front Microbiol**, v. 2, p. 181, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922016> >.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6155-64, Nov 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573631> >.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000945, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585557> >.

ZICKER, M. et al. Epidemiology of fungal infections in liver transplant recipients: a six-year study of a large Brazilian liver transplantation centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 339-45, May 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655823> >.

ŁĄCKA, I. et al. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e407-14, Sep 2011. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910757> >.

Capítulo II

Action of the *Maytenus ilicifolia* molecule in pathogenic fungi.

Fernanda P. Gullo¹, Janaina C.O. Sardi¹, Vania A.F.F.M. Santos², Fernanda S. Leite¹; Nayla S. Pitangui¹; Suelen A. Rossi¹; Ana C.A.P. Silva¹; Luciana A. Soares¹; Julhiany F. Silva¹; Haroldo C. Oliveira¹; Maysa Furlan²; Dulce H.S. Silva²; Vanderlan S. Bolzani²; Maria José S. Mendes-Giannini¹; Ana Marisa Fusco-Almeida¹.

¹ Department of Clinical Analysis, Laboratory of Clinical Mycology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, 1621; CEP 14801-902, Araraquara, São Paulo - Brazil.

² Institute of Chemistry, UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, 55; CEP 14800-900 Araraquara, São Paulo – Brazil.

Correspondence to:

Dr. Ana Marisa Fusco Almeida, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Department of Clinical Analysis, Laboratory of Clinical Mycology, Univ Estadual Paulista (UNESP), R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP. 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil

Tel: +55 – 16 – 3301 - 5715

Fax: +55 – 16 – 3301 - 5715

e-mail: ana.marisa@uol.com.br

32 Abstract

33

34 Fungal infections in humans have increased alarmingly in recent years, particularly in
35 immunocompromised individuals. *Candida* spp. are among the main causes of yeast infections.
36 The systemic infections caused by the *Cryptococcus* genus are also among the most prevalent
37 and most serious causes of mortality. Another very important fungal infection is
38 paracoccidioidomycosis, a human systemic mycosis that produces a pulmonary infection that
39 can be fatal, affects mainly the rural population of Latin America. Among other lung infections
40 caused by fungi with the development and evolution of serious injury are systemic
41 histoplasmosis and aspergillosis. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*,
42 stand out as the main etiological agents of dermatophytosis in humans. The molecules
43 maytenin and pristimerin obtained from the plant *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) are known
44 to show various pharmacological activities. This study aimed to evaluate the spectrum of
45 antifungal activity of the maytenin and pristimerin molecules and their cytotoxicity on
46 different cell lines. It was concluded that the best spectrum of antifungal activity was
47 presented by maytenin, although pristimerin was also active and not cytotoxic to the MIC
48 values against most tested fungi. The two molecules may be possible prototypes with a broad
49 spectrum of action for the development of new antifungal agents.

50

51 **Keywords:** pathogenic fungi, maytenin, pristimerin, activity antifungal.

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 1. Introduction

66 It is estimated that there are over 100,000 species of fungi inhabiting our planet;
67 however, only a small percentage are known to cause human infection. Most fungal infections
68 are opportunistic and are usually associated with immunosuppression and patients suffering
69 from leukemia, diabetes, transplant surgery, treatment with corticosteroids, or HIV infection
70 ^[1]. Over the past two decades, invasive fungal infections have emerged as a major threat to
71 immunocompromised patients. Species of *Aspergillus*, *Candida*, *Histoplasma*, *Cryptococcus* and
72 emerging pathogens such as *Trichophyton* and *Fusarium*, all of which are largely opportunistic,
73 cause infection when host defenses are breached ^[1]. Paracoccidioidomycosis, a human
74 systemic mycosis, is another fungal infection that is very important, affecting mainly the rural
75 population of Latin America, mainly in Brazil, which contains 80% of the reported cases ^[2].

76 There is currently great interest in discovering new molecules of natural origin to treat
77 various diseases. Phytotherapy is based on the use of active components contained in plants
78 or vegetables ^[3]. Plants contain many components that are important sources of biologically
79 active molecules ^[4]. Natural products have provided a wide variety of drugs and have become
80 a great alternative in the search for new antifungal drugs ^[5]. According to the World Health
81 Organization (WHO), more than 50% of the population of North America uses natural products
82 and this percentage is even higher in Canada and China, where the statistic ranges from 50-
83 70% ^[6].

84 In Brazil, the use of medicinal plants in traditional medicine has increased considerably
85 in recent years. The wide distribution of natural resources in Brazilian ecosystems and the
86 diversity of natural chemical components provides the country with potential bioactive
87 materials ^[7]. *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), popularly known as "*espinha santa*", has
88 been used in traditional medicine since the mid-1920s ^[8]. The secondary metabolites,
89 maytenin and pristimerin, are classified as quinonemethide triterpenoids and mainly isolated
90 from the bark of the roots of mature *M. ilicifolia* plants ^[10]. Several studies have shown that
91 maytenin exhibits strong antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative
92 organisms, but there are no studies detailing the effects of these substances on fungi ^[9].

93 The need to discover new antifungal molecules and natural products is of great
94 importance for the development of new therapeutic tools. This paper proposes the study of
95 the potential antifungal potential of maytenin and pristimerin against fungi, an agent of
96 important mycoses. The potential broad spectrum of these molecules was evaluated, and the
97 cytotoxicity of these substances in different cell lines was evaluated, suggesting possible
98 prototypes of a broad spectrum of components for the treatment of mycoses.

99

100 2. Methods

101 2.1 Microorganisms

102 ATCCs strains and clinical isolates belong to the mycology collection of the Laboratory
103 of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
104 UNESP, Araraquara were used in the current study. The strains used were: *Candida albicans*

ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90012, *Histoplasma capsulatum* (G217B), *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ATCC 7100, *Trichophyton interdigitalis* ATCC 40131. Clinical isolates from *Paracoccidioides brasiliensis* (18), *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton menthagrophytes* (102), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* resistant to fluconazole (R30), two clinical isolates from *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* susceptible to fluconazole (S26 and S27) and *Cryptococcus gattii* (118) isolate from animals, resistant to fluconazole and *Histoplasma capsulatum* (M238P) (lung bat) were also used.

114

115

116 2.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

117 All microorganisms were tested for susceptibility to specific commercial drugs for the
118 treatment of each gender. The test for yeast was carried out in accordance with the
119 microdilution method described according to the M27-S3 of the CLSI (Clinical and Laboratory
120 Standards Institute) (2008), with modifications. The filamentous fungi susceptibility testing was
121 performed according to the M38-A2 of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)
122 (2008)^[10] with modifications to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

123 Two pure substances extracted from *Maytenus ilicifolia*, maytenin and pristimerin, were
124 prepared as described by Scorzoni, et al., 2007^[11]. The antifungal drugs were diluted according
125 to CLSI M27-S3^[10]. Inoculums were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with
126 L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a
127 pH of 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The yeast suspension was
128 adjusted to a final concentration of 1.0×10^4 CFU / mL in RPMI-1640 and for filamentous fungi,
129 a suspension of microconidia was adjusted to 2.5 to 5.0×10^3 ^[10]. In the 96-well plates,
130 substances were added in serial dilutions, starting from a concentration of 250mg /L to 0.48
131 mg /L. The plates were incubated in a shaker at 37°C/150rpm to a specific time determined
132 for each microorganism. The reading of MIC was performed by spectrophotometry at 490nm
133 and confirmed using Alamar Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

134

135 2.3 Minimum Fungicide Concentration

136 A qualitative analysis of fungal viability was performed, by transferring a portion of the
137 wells to a plate with Sabouraud (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) medium and incubated at 37 ° C
138 during the time determined for each fungal agent. The MFC was determined as the lowest
139 concentration of the extract that did not allow the growth of any fungal colony on the solid
140 medium after the incubation period^[12]. A visual reading was performed to confirm the death
141 or growth inhibition provided by the antifungal substances, maytenin and pristimerin.

142

143 2.4 Cell Cytotoxicity Assay

144 The cytotoxicity of maytenin and pristimerin was assessed by MTT for cell lines NOK
 145 (keratinocyte oral mucosa), obtained from the American Type Culture Collection (Manassas,
 146 VA, USA). The cells were grown in own culture medium NOK (Keratinocytes – SFM, GIBCO), and
 147 maintained at 36.5 °C. A concentration ranging from 2.5 to 5.0 x 10⁴ cells / mL was used for the
 148 formation of monolayer cells. The concentrations of pure substances were kept in contact with
 149 the cells for 24 hours. After the incubation period, the cells treated with the MTT reagent has
 150 an additional 5mg / mL added, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and the cells were incubated
 151 again for another 4 h. After the formation of formazan crystals, 100 µL of isopropanol was
 152 added to solubilize the precipitate and allow the reading of the result by changing the color of
 153 the medium^[13]. The absorbance of formazan was quantified using an ELISA reader (enzyme-
 154 linked immunosorbent assay) set at 560 nm. As a positive control test, hydrogen peroxide was
 155 used.

156

157

158

159 3. Results

160 3.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

161 Table 1 present the results of the antifungal activity of maytenin and pristimerin,
 162 isolated from *Maytenus ilicifolia*. Maytenin activity was classified as good for both yeasts and
 163 for filamentous fungi, when compared to positive controls itraconazole and amphotericin B;
 164 since the MIC ranged between 0.12 and 62.5 mg / L. Pristimerin previously showed a
 165 significant variation in the action potential. For yeasts, the pristimerin showed good activity,
 166 with the exception of *C. glabrata* ATCC 90030 which showed moderate activity and *C. albicans*
 167 ATCC 90028, which presented low antifungal activity. For the filamentous fungi, pristimerin
 168 showed moderate activity, with the exception of *Trichophyton menthagrophytes* ATCC 40131,
 169 which showed a MIC of 62.5 mg / L and was classified as having good activity.

170

171 3.2 Minimum Fungicide Concentration (MFC)

172 Minimum Fungicide Concentration was performed to confirm cell death in MIC
 173 through observation of no colony growth in a rich medium. The maytenin showed efficacy in
 174 the MIC for most yeasts. No growth of *C. albicans* colonies was observed, and the death of
 175 yeast occurred in a higher dilution concentration (Table 1). For the filamentous fungi, MFC was
 176 confirmed by testing cell viability, which occurs in MIC fungal cell death (Table 1).

177 Pristimerin presented a greater difference between the MIC and the concentrations
 178 that showed no growth of colonies. Moreover, the difference between the MIC and the value
 179 of qualitative analysis of fungal viability was greater than the difference presented by
 180 maytenin (Table 1).

For the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *fumigatus*, the qualitative test of fungal viability was flawed, since the growth of colonies cannot be observed on a solid medium.

3.3 Cell Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity assay for the NOK cell line showed more than 80% of cell viability in MIC maytenin concentrations. The substance pristimerin showed cell viability above 80% in normal cells. In this present experiment, death hydrogen peroxide (Table 1).

4. Discussion

Plants have been used in medicine for a long time, being extensively used in folk medicine because they represent an economical alternative, are easy to obtain and apply to various pathologies^[5,14]. Regarding the search for new drugs, an ideal antifungal should have a broad spectrum of fungicidal activity and does not cause toxicity to the host^[15]. The treatment of human mycoses is not always effective, because the available antifungal drugs produce recurrence or cause resistance, in addition to presenting important toxicity. For this reason, there is a continual search for new antifungal drugs that are more potent, but safer, than existing drugs^[16].

The present results showed that both pristimerin and maytenin had an action on the fungi studied (Table 1), but maytenin showed the best results. The exception was for *H. capsulatum* isolated M238P and *P. brasiliensis* which showed MIC equal for both substances. *H. capsulatum* is a pathogenic fungus that causes a respiratory and systemic disease, histoplasmosis^[17]. Pulmonary mycoses infections have a high incidence in humans and have increased due to their relationship with immunocompromised persons; this increase is due to advances in medicine^[18]. Alanis-Garza et al., 2007^[19] studied extracts obtained from *Salvia texana*, *Leucophyllum frutescens*, *Cordia boissieri*, *Schinus molle*, and *Clematis drummondii* "female", which all displayed activity against *H. capsulatum*, with MICs between 16 and 125 mg / L. The MIC for the ATCC strain of *H. capsulatum* was 0.97 and less than 0.48 mg / L for maytenin and pristimerin respectively, while for the clinical isolate, the MIC for both substances was below 0.48 mg / L. Faced with little literary data of natural products active against this strain, maytenin and pristimerin can be considered prototypes that are excellent anti-*Histoplasma* agents.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease and in the absence of drug therapy, the disease is usually fatal^[20]. Few studies have searched for new drugs from natural products for *P. brasiliensis*^[20,21]. In studies performed by Johann et al., 2010^[20], *Piper regnellii* and *Baccharis dracunculifolia* were the most active against the fungus *P. brasiliensis*, presenting MIC values of 7.8 mg / L and 7.8-30 mg / L, respectively. Martins et al., 2009^[22] obtained good results with the compound curcumin. Additionally, this study indicated that curcumin was more potent than the antifungal fluconazole against *P. brasiliensis*. The current

220 results were excellent for *P. brasiliensis*, with MIC of 0.12 mg / L for both molecules, with a
221 concentration 65 fold lower than the results of the study mentioned above.

222 The infection rate by *Cryptococcus* sp has increased, mainly because of AIDS. It is estimated
223 that the incidence of cryptococcosis in HIV positive patients around the world varies from 5 to
224 30%. In Brazil, it is estimated that 5-10% of HIV-positive patients are affected by this mycosis
225 ^[23]. In the current results indicate that the molecules had an excellent MIC for the yeasts of
226 genus *Cryptococcus*, ranging from 0.48 to 3.9 mg / L for maytenin and 0.97 to 7.8 for
227 pristimerin. In another study, *Maytenus undata* extracts had promising antifungal activity
228 against *C. neoformans*, with an average MIC of 0.09 mg / L after 24 h and 0.18 mg / L after 48 h
229 ^[24]. *Croton sylvaticus* and *Catha transvaalensis* extracts also had good activity, with average
230 MIC values of 0.07 mg / mL and 0.09 mg / mL, respectively. *Candida* spp. is another
231 opportunistic fungus that has increased in patients with immunosuppression. These yeasts
232 rank as the fourth most common bloodstream pathogen in hospitals in the Western world and
233 they are associated with the highest mortality amongst bloodstream infections, due to the
234 high resistance these fungi have against existing antifungals ^[25]. This is why it is so important to
235 search for alternative medicines. For this yeast, the pristimerin showed good activity, with the
236 exception of *C. glabrata* ATCC 90030, which showed moderate activity and *C. albicans* ATCC
237 90028, which obtained low antifungal activity. Maytenin showed moderate antifungal activity
238 for this specie.

239 *C. albicans* showed no growth of colonies when withdrawn from treatment; however,
240 the *Candida non-albicans* showed killing of yeast in a higher concentration than the MIC for
241 maytenin and pristimerin, except for *C. glabrata* in contact pristimerin.

242 Dermatophytes are a group of parasitic fungi that live at the expense of the keratin of
243 skin, nails and hair. Although dermatophyte infections are restricted to certain areas of the
244 epidermis, they can be invasive and cause serious and widespread infections in
245 immunocompromised patients, with the eventual development of granulomas ^[26]. According
246 to the World Health Organization (WHO), dermatophytes affect about 25% of the world
247 population. Because of the high incidence of dermatophytosis worldwide, there is a great need
248 of finding new drugs that act on these pathogenic fungi. Maytenin showed good activity, with
249 MIC ranging from 1.95 - 3.9 mg / L. For filamentous fungi, the pristimerin showed moderate
250 activity, with the exception of *Trichophyton mentagrophytis* ATCC 44131, which showed a
251 MIC of 62.5 mg / L. Lau et al., 2010 ^[27] studied extracts from *Fructus Psoraleae* and *Folium*
252 *Eucalypti Globuli* to treat dermatomycosis. Both pure compounds effectively inhibited the
253 growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* *in vitro*. The composition of a volatile
254 extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*, provided an antifungal activity (MIC values:
255 0.16 - 0.32 mg/L) against several dermatophyte species (*Trichophyton mentagrophytes*, *T.*
256 *rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) ^[28]. Many studies have demonstrated the
257 potential antifungal plants against these dermatophytes ^[26-28].

258 Invasive aspergillosis is an important cause of mortality in long-term neutropenic
259 patients, particularly after bone marrow (B.M.T.) and solid organ transplantation. More than
260 90% of invasive fungal infections in immunocompromised patients can be attributed to
261 *Candida* and *Aspergillus* ^[29]. The fungi are present in the environment, and the gateway in

humans is commonly the lung. The organism invades the blood vessels, often leading to hematogenous dissemination. Maytenin had a better result against *Aspergillus niger* with a MIC value of 0.97 mg / L while the MIC for *A. fumigatus* was 125 mg / L and pristimerin was similar for both 250 mg / L (*A. fumigatus* and *A. niger*).

Maytenin showed good efficacy for most yeasts and caused cell death in the MIC levels. In addition, pristimerin showed greater difference among the MIC levels and the concentrations that showed no colony growth. Moreover, the difference between the MIC and the value of CFU for pristimerin was greater than the difference presented by maytenin (Table 1).

On the other hand, cytotoxicity tests were performed with NOK (keratinocyte oral mucosa), obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The experimental substances were not cytotoxic for any of these different cells in the concentrations analyzed in the current experiment (Table 1). Although most of the antifungal agents available on the market are of synthetic origin, the study of natural products has received the attention of scientists, mainly due to the occurrence of undesirable factors such as the resistance of some strains to conventional antifungal agents - especially in immunocompromised individuals - and the presence of these toxic effects. Therefore, the study of plants with therapeutic properties, including those with antimycotic activity, has grown considerably^[30,31]. Brazilian plant species are usually used as antifungal agents and it is clear that Brazil, because of its plant diversity, is a country known worldwide for its variety of products with medicinal action, largely used in diverse regions^[32].

With respect to selectivity index (SI), it is known that the higher the SI of a substance, the greater is its security. In our study we found that the maitenin substance had SI above 1.0 for all species tested, so we can demonstrate the safe use of this. Likewise, the pristimerin presented high SI against some fungal species, as described for *H. capsulatum* (SI 13.40). However, when comparing the two substances, maitenin still showed better results (Table 1).

5. Conclusion

The results of this current study indicate the potential use of maytenin and pristimerin for the treatment of fungal infections, which showed a strong antifungal activity against the fungi studied. Therefore, the data obtained is promising and can serve as a guide in selecting plants with antifungal activities for future studies of the prospect of a possible therapeutic application of these products. However, more studies are needed to investigate the potential targets or possible prototypes for new pharmacologically active models.

6. Acknowledgements. The authors are grateful to the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq) for their financial support. V. A. F. F. M. S. thanks CAPES and also is grateful to Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe/UNESP) for providing a research fellowship.

301 7. Reference

- 302 [1] S. Shoham, S.M. Levitz, "The immune response to fungal infections," *Br. J. Haematol*,
303 vol.129, nº 5, pp. 569-582, 2005.
- 304 [2] M.A. Shikanai-Yasuda, F.Q. Telles Filho, R.P. Mendes, A.L. Colombo, M.L. Moretti,
305 "Guidelines in paracoccidioidomycosis," *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.39 nº 3, pp.297-310,
306 2006.
- 307 [3] K. Hostettman, "Strategy of the biological and chemical evaluation of plant extracts",
308 *IUPAC*, vol.70, pp. 21–22, 1998.
- 309 [4] M.S. Butler, "The role of product chemistry in drug discovery," *J. Nat. Prod.*, vol. 67, nº 12,
310 pp.2141-2153, 2004.
- 311 [5] J.C. Sardi, A.M. Almeida, M.J. Mendes-Giannini, "New antimicrobial therapies used against
312 fungi present in subgingival sites-A brief review," *Arch. Oral Biol*, vol.56, nº10, pp.951-959,
313 2011.
- 314 [6] M. Dolenc-voljc, "Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002,"
315 *Mycoses*, vol. 48, nº 3, pp. 181-186, 2005.
- 316 [7] M.C.T. Duarte, G.M. Figueira, A. Sartoratto, V.L.G. Rehder, A.L.M. Machado, C.
317 Delarmelina, "Anti-candida activity of essential oils and extracts from native and exotic
318 medicinal plants used in Brazil," *J. of Etnopharmacol.*, vol.97, nº2, pp.305-311, 2005.
- 319 [8] R. Santos-Oliveira, S. Coulaud-Cunha, W. Colaço, "Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex
320 Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas," *Braz. J.*
321 *Pharmacogn*, vol.19, nº2, pp.650-659, 2009.
- 322 [9] V.A.F.F.M. Santos, D.P. Santos, I. Castro-Gamboa, M.V.B. Zanoni, M. Furlan, "Evaluation of
323 antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic
324 substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)," *Molecules*, vol.15, nº 10, pp. 6956-6973,
325 2010.
- 326 [10] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of
327 filamentous fungi; approved standard-second edition. CLSI document M38-A2. Clinica and
328 Laboratory Standards Institute (formely NCCLS), 940 West Valley Road, Wayne, Pa. 2008.
- 329 [11] L. Scorzoni, T. Benaducci, A.M. Fusco-Almeida et al., "The use of standart methodology for
330 determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and
331 *Cryptococcus* sp," *Braz. J. Microbiol.* vol.38, nº 3, pp.391-397, 2007.
- 332 [12] L.O. Regasini, M. Pivatto, L. Scorzoni, T. et al., "Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens*
333 Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi," *Rev. bras. farmacogn*, vol. 20, nº 5, pp.706-711,
334 2010.
- 335 [13] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
336 proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol Methods*, vol.65, nº1, pp.55-63, 1983.

- 337 [14] J.J. Rojas, V.J. Ochoa, S.A. Ocampo, J.F. Muñoz, "Screening for antimicrobial activity of ten
338 medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of
339 non-nosocomial infections," *BMC Complement Altern Med*, vol. 6, nº 2, pp. 1- 6, 2006.
- 340 [15] A.J. Carrillo-Muñoz , G. Giusiano, P.A. Ezkurra , G. Quindós, "Antifungal agents: mode of
341 action in yeast cells," *Rev Esp Quimioter*, vol.19, nº2, pp.130-139, 2006.
- 342 [16] R. Fenner, A.H. Betti, L.A. Mentz, S.M. Kuze Rates, "Plants with potencial antifungal
343 activity employed in Brazilian folk medicine," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*,
344 vol.42, nº 3, pp. 369-394, 2006.
- 345 [17] R.M. Zancopé-Oliveira, P. Morais e Silva Tavares, M.M. Muniz, "Genetic diversity of
346 *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil," *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, vol.45, nº3, pp. 443
347 - 449, 2005.
- 348 [18] C. Gassiot-Nuño, "A propósito de micosis pulmonares," *Acta Medica*, vol.9, pp. 59–66,
349 2000.
- 350 [19] B.A. Alanis-Garza, G.M. Gonzalez-Gonzalez b, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres,
351 V.M. Rivas-Galindo, "Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico," *J*
352 *Ethnopharmacol*, vol.114, nº 3, pp. 468–471, 2007.
- 353 [20] S. Johann, P.S. Cisalpino, G.A. Watanabe et al., "Antifungal activity of extracts of some
354 plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides*
355 *brasiliensis*," *Pharm. Biol*, vol.48, nº 4, pp. 388-396, 2010.
- 356 [21] L. de Carvalho Tavares, S. Johann, T. Maria de Almeida Alves et al., "Quinoliny and
357 quinoliny N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities," *Eur. J. Med. Chem*,
358 vol.46, nº 9, pp.4448-4456, 2011.
- 359 [22] C.V.B. Martins, D.L. da Silva, A.T.M. Neres et al., "Curcumin as promising antifungal of
360 clinical interest," *J Antimicrob Chemother*, vol.63, nº 2, pp.337-339, 2009.
- 361 [23] Brasil–Ministério da Saúde "Dados e pesquisas em DST e AIDS. Brasília. Coordenação
362 Programa Nacional de DST/AIDS," 2002.
- 363 [24] T.A. Mokoka, L.J. McGaw, J.N. Eloff, "Antifungal efficacy of ten selected South African
364 plant species against *Cryptococcus neoformans*," *Pharm. Biol*, vol.48, nº 4, pp. 397-404, 2010.
- 365 [25] T. Rossignol, B. Kelly, C. Dobson, C. d'Enfert, "Endocytosis-mediated vacuolar
366 accumulation of the human ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide
367 contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*," *Antimicrob. Agents Chemother*,
368 vol.55, nº10, pp. 4670-4681, 2011.
- 369 [26] N.T. Peres, F.C. Maranhão, A. Rossi, N.M. Martinez-Rossi, "Dermatophytes: host-pathogen
370 interaction and antifungal resistance," *An Bras Dermatol*, vol.85, nº 5, pp. 657-667, 2010.
- 371 [27] K.M. Lau, L.H. Fu, L. Cheng et al., "Two antifungal components isolated from Fructus
372 Psoraleae and Folium Eucalypti Globuli by bioassay-guided purification," *Am. J. Chin. Med*, vol.
373 38, nº pp.1005-1014, 2010.

- 374 [28] C. Cavaleiro, M.J. Gonçalves, D. Serra et al., "Composition of a volatile extract of *Erygium*
375 *duriae* subsp. *juresianum* (M. Laínz) M. Laínz, signalized by the antifungal activity," *J. Parm.*
376 *Biomed. Anal*, vol. 54, nº 3, pp. 619-622, 2011.
- 377 [29] M.C.Z. Novaretti, A.S. Ruiz, F.L. Dulley, P.E. Dorlhiac-Llacer, D.A.F. Chamone, "Detection
378 of *Aspergillus sp* in bone marrow transplant patients by PCR-nested technique" *Rev. Bras.*
379 *Hematol. Hemoter*, vol. 30, nº 2, pp.162-163, 2008.
- 380 [30] V. Lakshmi, S. Srivastava, S.K. Mishra, P.K. Shuklab, "Antifungal activity of bivittoside-D
381 from *Bohadschia vitiensis* (Semper)," *Nat Prod Res*. pp.1-6, 2011.
- 382 [31] R. Rodríguez-Guzmán, L.C.J. Fulks, M.M. Radwan, C.L. Burandt, S.A. Ross, "Chemical
383 constituents, antimicrobial and antimalarial activities of *Zanthoxylum monophyllum*," *Planta*
384 *med*, vol.77,nº13, pp.1542-1544, 2011.
- 385 [32] T.O.A. Menezes, A.C.B.A. Alves, J.M.S. Vieira, S.A.F. Menezes, B.P. Alves, L.C.V. Mendonça,
386 "Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região
387 amazônica sobre cepa de *Candida albicans*," *Revista de Odontologia da UNESP*, vol.38, nº3, pp.
388 184-191,2009.
- 389
- 390

Table 1. MIC values and quantitative analysis of fungal cellular viability of pure substances maytenin and pristimerin front of the yeasts and filamentous pathogenic strains causing the most mycoses and evaluation of cytotoxic activity in NOK cells and selectivity index from the ratio of the IC 50 and MFC.

	Maytenin		Pristimerin		Amphotericin B reference values		Itraconazole reference values		Maytenin		Pristimerin	
	MIC / MFC		MIC / MFC		MIC		MIC		IC50 (mg/L) / SI		IC50 (mg/L) / SI	
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	62.50 / 62.50		250,00 / 250,00		0.50-2.00		-		◆ 265.7 / 4.25		*	
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	15.62 / 62.50		7.81 / 62.50		0.25-2.00		0.12-0.50		◆ 78.33 / 1.25		◆ 24.25 / 0.38	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	15.62 / 31.25		125,00 / 125,00		0.25-1.00		0.06-0.25		◆ 78.33 / 2.50		*	
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	15.62 / 31.25		31.25 / 62.52		0.50-2.00		-		◆ 78.33 / 2.50		◆ 203.98 / 3.26	
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	31.25 / 31.25		125,00 / 125,00		0.25-1.00		-		◆ 203.98 / 6.52		*	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.48 / 0.48		0.97 / 0.97		0.50		0.125		◆ 2.53 / 5.29		◆ 3.92 / 4.04	

ATCC 90012						
<i>Cryptococcus neoformans</i> R30	3.90 / 3.90	7.81 / 7.81	1.00	>32.00	◆ 22.18 / 5.68	◆ 24.25 / 3.10
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 26	0.48 / 0.48	1.95 / 1.95	0.50	0.125	◆ 2.53 / 5.29	◆ 6.41 / 3.28
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 27	0.48 / 0.48	3.90 / 3.90	0.50	0.125	◆ 2.53 / 5.29	◆ 20.10 / 5.15
<i>Cryptococcus gattii</i> 118	1.95 / 1.95	3.90 / 3.90	1.00	>32.00	◆ 9.84 / 5.05	◆ 20.10 / 5.15
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	<0.12 / -	<0.12 / -	0.015-0.25	<0.0039	**	**

<i>Histoplasma capsulatum</i> ATCC OG217B	0.97 / 0.97	0.48 / 0.48	0.06-0.25	0.25-2.00	◆ 3.70 / 3.81	◆ 6.43 / 13.40
<i>Histoplasma capsulatum</i> isolated M238P	0.48/ 0,48	0,48 / 0,48	0.06-0.25	0.25-2.00	◆ 2.53 / 5.29	◆ 6.43 / 13.40
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 7100	125/ -	>250 / -	0.12-2.0	0.12 - >16,00	*	*
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	0.97 / 0,97	250 / 250	0.12-0.5	0.12-1.00	◆ 3.70 / 3.81	*
<i>Trichophyton rubrum</i> clinical isolated	1,95 / 1,95	250 / 250	-	0.03-4.00	◆ 9.84 / 5.05	*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40131	3,9 / 3,9	62,5 / 250	-	0.03-0.25	◆ 22.18 / 5.68	◆ 150.24 / 0.6
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolated 102	3,9 / 3,9	125 / 250	-	0.03-0.25	◆ 22.18 / 5.68	*

--

MIC - Minimum Inhibitory Concentration; MFC - Minimum Fungicide Concentration

◆ - IC₅₀/IS values in NOK cells.

* - IC₅₀/IS not apply because the MIC and MFC values are above 62.5 mg/L.

** - IC₅₀/IS not apply because the MIC and MFC values are below 0.12 mg/L.

IC50: 50% inhibitory concentration. SI: Selectivity index obtained from the relationship between the IC50 (NOK) by MFC for each fungi.