



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLA MARIA ANDRIANI

Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.

Londrina
2018

GABRIELLA MARIA ANDRIANI

Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Andriani, Gabriella Maria.

Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp. / Gabriella Maria Andriani. - Londrina, 2018.
71 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Coorientador: Eliandro Reis Tavares.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. *Cryptococcus* - Tese. 2. Biofilme - Tese. 3. Sinergismo - Tese. 4. *Poincianella* - Tese.
I. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie . II. Tavares, Eliandro Reis . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
IV. Título.

GABRIELLA MARIA ANDRIANI

Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada
Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-Orientador: Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Pollyana Myrella Capela dos Santos
Faculdade de Apucarana - FAP

Prof. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de dezembro de 2018.

Dedico este trabalho à minha vó Cida e tia Diva por me ensinarem, mesmo sem saberem, como ser uma mulher forte frente as adversidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, que mesmo longe sempre se mostrou perto. Obrigada por investirem na minha educação e por acreditarem no meu potencial. Ao meu pai, Daniel Antonio Andriani, obrigada por me mostrar o caminho em meio aos anseios e medos. À minha mãe, Sueli Perri Nunes Andriani, obrigada por ser um exemplo de gentileza e amor incondicional, espero ser mais como você. À vocês meu eterno amor e gratidão, nada disso seria possível sem vocês como meu porto seguro. À minha irmã, Grasiella Angelina Andriani, que mesmo fisicamente mais distante de todos nós, continua mantendo seu papel de melhor amiga, parceira e confidente. Obrigada pelos conselhos, lições, aventuras, brigas, diferenças e amor.

À prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, que me acolheu como orientanda e me direcionou na vida acadêmica e científica nesses dois últimos anos, sempre compartilhando seu vasto conhecimento ao mesmo tempo que instigava minha curiosidade.

À prof. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela formação durante a minha graduação, sem ela não teria amadurecido o suficiente para enfrentar a pós-graduação.

Ao prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pela amizade que se tornou orientação e pela inestimável ajuda no cotidiano laboratorial, tanto nos aspectos experimentais como teóricos de maneira descontraída e amigável.

À CAPES, pela concessão da bolsa e ao CNPq e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro ao projeto.

À prof. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi pela disponibilidade de fazer parte da comissão examinadora.

À prof. Dra. Pollyana Myrella Capela dos Santos, que mesmo de longe me ajudou na elaboração desse trabalho. Obrigada pelo conhecimento transmitido, mas acima de tudo, pela amizade que construímos nesses anos de UEL.

À Jussevania Pereira Santos, pela ajuda na realização dos experimentos.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos por toda cooperação, especialmente à Bruna e à Lillian, por termos criado esse laço de amizade nesse curto período de tempo. Obrigada por me ouvirem e por compartilharem suas vidas comigo também.

Aos meus amigos conquistados nessa trajetória em Londrina, em especial ao Alex, Cassiano e Mahira por todas as risadas, momentos incríveis vividos ao longo desses anos e angústias compartilhadas, sem vocês, todo esse processo seria muito mais difícil do que foi. Obrigada por tornarem meus dias mais tranquilos e aconchegantes.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido.

ANDRIANI, G. M. **Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.** 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina (2018).

RESUMO

As leveduras dos complexos *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são agentes etiológicos da criptococose, doença invasiva e potencialmente fatal em indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes. A anfotericina B é o fármaco de escolha, no entanto, seu caráter tóxico dificulta a sua utilização em períodos prolongados, enquanto que outros antifúngicos disponíveis mostram-se menos efetivos. Além disso, sabe-se que há um progressivo relato de cepas resistentes às terapias consolidadas. Neste contexto, os produtos naturais constituem-se em fontes promissoras para o isolamento de novas moléculas antimicrobianas. Estudos com as leguminosas do gênero *Poincianella* mostraram inúmeras propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico do extrato da casca de *P. pluviosa* (sibipiruna) e sua combinação com antifúngicos comerciais sobre células planctônicas e sésseis de cepas de referência e isolados clínicos dos complexos *C. gattii* e *C. neoformans*. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto (EB), fração etil acetato (FAc) e fração FC (FC) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e a concentração fungicida mínima (CFM) considerada aquela capaz de inibir 100% a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), comparado com um controle de crescimento não tratado. A CIM para EB variou de 62,25 a >1000 µg/mL, FC 15,62 a >1000 µg/mL e FAc 31,25 a >1000 µg/mL, que, por exibir melhor perfil de sensibilidade, foi selecionada para as análises subsequentes. O efeito da combinação entre a FAc e os antifúngicos comerciais fluconazol e anfotericina B foi realizado pelo método de *checkerboard* e os resultados interpretados utilizando o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI). A combinação entre fluconazol e FAc foi considerada sinérgica somente para *C. neoformans* ATCC 66031 e *C. neoformans* IV. A combinação entre anfotericina B e FAc mostrou-se sinérgica para todas as cepas testadas, *C. gattii* ATCC 24065, *C. gattii* II, *C. neoformans* ATCC 66031 e *C. neoformans* IV, com FICI de 0,034; 0,125, 0,069 e 0,034 respectivamente e por esse motivo foi escolhida para os demais experimentos. A cinética do tempo de morte das células planctônicas em presença da CIM de FAc sozinha e em combinação com o antifúngico foi analisada durante 72 horas, exibindo ação fungistática para todos os isolados testados. O efeito inibitório de FAc sozinha e em combinação com anfotericina B foi também avaliado durante a fase de formação e sobre o biofilme maduro, resultando em inibição significativa da atividade metabólica. A maior porcentagem de inibição foi observada para *C. gattii* ATCC 24065 na fase inicial de formação (57,93%) e sobre o biofilme formado (68,01%), seguido por *C. neoformans* ATCC 66031 (24,3 – 36,2%). A combinação com anfotericina B teve efeito sinérgico sobre as duas cepas somente na fase de formação do biofilme, com redução dos valores de SCIM superior a 16 vezes. Esses resultados indicam o potencial antifúngico da FAc da casca de *P. pluviosa* sozinha e em combinação com anfotericina B. Esta planta pode ser uma fonte importante de

novas moléculas com atividade antifúngica para formulação de produtos e utilização em tratamentos da criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus*; antifúngico; biofilme; sinergismo; *Poincianella*.

ANDRIANI, G. M. **Antifungal effect of *Poincianella pluviosa* bark extract and synergism with amphotericin B on *Cryptococcus* spp.** 2018. 70 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina (2018).

ABSTRACT

Cryptococcus gattii and *Cryptococcus neoformans* complexes are etiological agents of cryptococcosis, a potentially fatal infectious disease that affects both immunocompromised and immunocompetent individuals. Amphotericin B is the gold standard, however, its toxicity makes its prolonged use difficult while other available antifungal agents are less effective. In addition, it is well isolates exhibiting resistance to these antimicrobials are increase. In this context, plants consist in a promising source for the isolation of new antimicrobial molecules. Studies with *Poincianella* genus have shown a number of biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activity. The aim of this work was to evaluate the antifungal potential of *Poincianella pluviosa* bark extract (sibipiruna) and its combination with commercial antifungals on planktonic and sessile cells of reference strains and clinical isolates of *C. gattii* and *C. neoformans* complexes. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the crude extract (EB), acetate fraction (FAc) and FC fraction (FC) was determined by broth microdilution assay and minimum fungicidal concentration (MFC) was considered the one that inhibited 100% of colony forming unit (CFU) counts, compared to the untreated growth control. The MICs ranged from 62.25 to >1000 µg/mL for EB, 15.62 to >1000 µg/mL for FC and 31.25 to >1000 µg/mL for FAc. Due to its best sensitivity profile, FAc was selected for further analyzes. The effect of the combination between FAc and fluconazole or amphotericin B was evaluated by the checkerboard method and the results interpreted using the fractional inhibitory concentration index (FICI). The combination between fluconazole and FAc was only considered synergistic for *C. neoformans* ATCC 66031 and *C. neoformans* IV. The combination between amphotericin B and FAc was synergistic for all isolates tested, *C. gattii* ATCC 24065, *C. gattii* II, *C. neoformans* ATCC 66031 and *C. neoformans* IV, with FICI of 0.034; 0.125, 0.069 and 0.034 respectively. Due to its best FICI values, this combination was chosen for the other experiments. The time-kill kinetics of planktonic cells were evaluated in presence of MIC of FAc alone and in combination with the antifungal during 72 hours, exhibiting fungistatic activity against all isolates tested. The inhibitory effect of FAc alone and combined with amphotericin B was evaluated during the formation and against mature biofilms, resulting in significant inhibition of the metabolic activity even at the lowest concentration tested. The best percentage inhibition was observed for *C. gattii* ATCC 24065 during the initial phase (57.93%) and mature biofilm (68.01%), followed by *C. neoformans* ATCC 66031 (24,3 – 36,2%). The combination treatment exhibited a synergistic effect against formation stages of these two strains only in the biofilm formation with 16-fold SCIM values reduction. These results highlight the antifungal potential of FAc from *P. pluviosa* bark extract, alone or in combination with amphotericin B. This plant may be an important source of new molecules with antifungal activity for product formulation and use in cryptococcosis treatment.

Keywords: *Cryptococcus*; antifungal; biofilm; synergism; *Poincianella*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – Esquemas terapêuticos para tratamento de meningite criptocócica. Fonte: Ministério da Saúde, 2016.....23
- Figura 2** – *Poincianella pluviosa*. Fonte: Fernandes, 2015.....32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

- Figura 1** – Fracionamento do extrato aquoso da casca de *Poincianella pluviosa*. Fonte: adaptado de Bueno et al., 2014.50
- Figura 2** – Cinética de crescimento de *Cryptococcus spp.* na presença da CIM da fração etil acetato da casca de *Poincianella pluviosa*, nos períodos de 0, 24, 48 e 72h. Os valores são a média e o desvio-padrão representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$58
- Figura 3** – Cinética de crescimento de *Cryptococcus spp.* em presença da CIM da combinação entre a fração etil acetato da casca de *Poincianella pluviosa* com o antifúngico anfotericina B, nos períodos de 0, 24, 48 e 72 h. Os valores são a média e o desvio-padrão representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$58
- Figura 4** – Efeito da fração etil acetato *Poincianella pluviosa* e anfotericina B em *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Análise da viabilidade celular por microscopia de fluorescência utilizando FUN-1. As leveduras foram incubadas com ou sem as CIMs dos dois compostos isolados ou em combinação durante 24 h. Células com fluorescência amarelo-esverdeada difusa caracterizam células metabolicamente inativas e células contendo estruturas fluorescentes vermelhas em seus vacúolos representam leveduras metabolicamente ativas. (A) células viáveis não tratadas; (B) tratamento com 125 µg/mL de FAc; (C) tratamento com 1µg/mL de anfotericina B; (D) tratamento com FAc/ANB (3,9/0,003 µg/mL, respectivamente).....59
- Figura 5** – Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a formação de biofilme de *Cryptococcus spp.* A atividade metabólica do biofilme foi avaliada pelo método de redução do XTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 31,25 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de dois experimentos. Os asteriscos indicam

redução significativa do metabolismo das células do biofilme tratadas com o extrato em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).60

Figura 6 – Efeito da fração etil acetato de *Poincinella pluviosa* sobre células sésseis de *Cryptococcus* spp. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada pelo método de redução do XTT após 48 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 31,25 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de dois experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da atividade metabólica das células do biofilme tratadas com a fração etil acetato em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).61

Figura 7 – Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a viabilidade celular de células HeLa. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 1,95 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de três experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da viabilidade das células tratadas com a fração em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).63

Figura 8 – Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 1,95 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de três experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da viabilidade das células tratadas com a fração em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Cryptococcus spp.* às diferentes frações da casca de *Poincianella pluviosa*.....55
- Tabela 2** – Efeito do fluconazol (FLZ) e/ou fração etil acetato (FAc) da casca de *P. pluviosa* sobre células planctônicas de *Cryptococcus spp.*.....56
- Tabela 3** – Efeito da anfotericina B (ANB) e/ou fração etil acetato (FAc) da casca de *P. pluviosa* sobre células planctônicas de *Cryptococcus spp.*56
- Tabela 4** – Efeito da fração etil acetato em combinação com anfotericina B durante a formação e no biofilme formado de *Cryptococcus spp.* em superfície abiótica.62
- Tabela 5** – Índice de seletividade da fração etil acetato para células mamíferas e *Cryptococcus spp.*.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL:	microlitro
°C:	grau Celsius
AmB:	anfotericina B desoxicolato
ATCC:	<i>American Type Culture Colletion</i>
ANB:	Anfotericina B
CC ₅₀ :	Concentração citotóxica capaz de inibir 50% das células
CC ₉₀ :	Concentração citotóxica capaz de inibir 90% das células
CDC:	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFM:	Concentração fungicida mínima
CIM:	Concentração inibitória mínima
CLSI:	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EB:	Extrato bruto
FAc:	Fração etil acetato
FC:	Fração FC
FIC:	<i>Fractional inhibitory concentration</i> - Concentração inibitória fracionária
FICI:	<i>Fractional inhibitory concentration index</i> - Índice de concentração inibitória fracionária
FLZ:	Fluconazol
g:	grama
GXM:	Glucuronoxilomanana
GalXM:	Galactoxilomanana
h:	hora
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
IDSA:	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
INCQS:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade
IS:	Índice de seletividade
LCR:	Líquido cefalorraquidiano
MAT α:	<i>Mating Type α</i>
MAT a:	<i>Mating Type a</i>
mg:	miligrama
mL:	mililitro

MOPS:	<i>3-(n-morpholino)propanesulfonic acid</i>
MTT:	<i>Dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide</i>
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato-salina
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia pela polimerase
RAPD:	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCIM:	Concentração inibitória mínima para células sésseis
SD:	Sabouraud dextrose
SDA:	Sabouraud dextrose ágar
SIDA:	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC:	Sistema nervoso central
UFC:	Unidade formadora de colônia
v:	volume
XTT:	<i>2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	O GÊNERO <i>CRYPTOCOCCUS</i>	15
2.2	CRÍPTOCOCOSE	17
2.3	EPIDEMIOLOGIA DAS CRÍPTOCOCOSSES	20
2.4	TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	22
2.5	O GÊNERO <i>POINCIANELLA</i>	29
3.	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4.	REFERÊNCIAS	35
5.	APÊNDICE	46
6.	CONCLUSÃO	73

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma importante infecção fúngica de distribuição mundial que acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos, mas também imunocompetentes. Essa infecção é causada principalmente por espécies dos complexos *Cryptococcus gattii*, frequentemente encontrado em eucaliptos, abetos e carvalhos, e *Cryptococcus neoformans*, encontrado em associação com excrementos de pássaros (FINDLEY et al., 2009; MAY et al., 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A infecção inicia-se pela inalação de células vegetativas ou basidiósporos, presentes no ambiente, que se depositam nos alvéolos pulmonares, gerando uma infecção primária. A doença pulmonar pode variar de assintomática, com colonização das vias aéreas, até pneumonia com presença de síndrome respiratória aguda. O agente infeccioso pode também disseminar-se para o sistema nervoso central (SNC) gerando quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Atualmente a criptococose é considerada como a segunda doença mais prevalente em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) no mundo todo, com aproximadamente 220.000 novos casos por ano, resultando em cerca de 181.000 mortes. Essa infecção é também a mais incidente entre as micoses sistêmicas em indivíduos com imunossupressão por diferentes origens (BRATTON et al., 2012; CDC, 2017; RAJASINGHAM et al., 2017).

A maioria dos casos de criptococose ocorre na África subsaariana, com aproximadamente 162.500 novos casos por ano, sendo *Cryptococcus* spp. a principal causa de meningite em adultos com índices de mortalidade próximos à tuberculose (RAJASINGHAM et al., 2017; VIDAL; BOULWARE, 2015). No Brasil, a prevalência da criptococose associada com SIDA é de 8 a 12% na região Sudeste, além de ser a principal infecção oportunista em 4,4% desses indivíduos, sendo que cerca de 80% dos casos manifestam-se como meningoencefalites (Consenso em Criptococose, 2008; Guia de Vigilância em Saúde, 2016).

O padrão ouro para a terapia de indução é a anfotericina B desoxicolato, antifúngico da classe dos polienos, que possui efeito fungicida pela interação direta com o ergosterol da membrana citoplasmática resultando, entretanto, após a segunda semana de tratamento, insuficiência renal, hipocalcemia,

hipomagnesemia e anemia (ARIKAN; REX, 2001; BICANIC et al., 2015). Outros antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento da criptococose como 5-flucitosina e fluconazol, entretanto também podem apresentar toxicidade devido ao uso prolongado. Além disso, embora a maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. seja sensível a esses fármacos, estudos relatam o isolamento crescente de cepas resistentes ou com sensibilidade reduzida (GUPTA et al., 2018; PEMÁM; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; SLOAN; PARRIS, 2014).

Além disso, a formação de biofilme, comunidade estruturada de microrganismos em que as células aderidas irreversivelmente à superfície secretam uma matriz polimérica extracelular onde permanecem envolvidas, também pode ser considerada como um mecanismo de resistência dessas leveduras (DONLAN; CONSTERTON, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

Em vista desse cenário, estudos sobre produtos naturais com potencial antifúngico e avaliação da toxicidade para células animais têm sido conduzidos e mostram-se promissores para a formulação de novos agentes terapêuticos, uma vez que possuem inúmeras moléculas biologicamente ativas contra diferentes microrganismos (DUARTE et al., 2005; FURLETTI et al., 2011). Algumas leguminosas do gênero *Poincianella* já mostraram múltiplas propriedades biológicas, incluindo atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* (PULIPATHI et al., 2012), antiviral descrita para o vírus parainfluenza tipo 3 (LIU et al., 2009), antifúngica com efeito em *Candida albicans* (PICHARDO et al., 2013) e anti-inflamatória (YODSAOUE et al., 2010). A casca da espécie *Poincianella pluviosa* é utilizada por populações indígenas na forma de chá, obtido por decocção, para o tratamento de disenterias e diarreias (BOURDY et al., 2000). Entretanto, apesar do conhecimento popular de sua capacidade terapêutica, poucos estudos relatam as propriedades biológicas e composição dessa planta, comumente denominada de "sibipiruna".

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Cryptococcus*

Cryptococcus spp. compreendem leveduras encapsuladas pertencentes ao Filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, Classe Tremellomycetes, Ordem Filobasidiales e Família Filobasidiaceae. Este gênero possui mais de 30 espécies distribuídas no meio ambiente, sendo algumas de interesse médico por serem leveduras oportunistas e gerarem diversas manifestações clínicas em humanos e outros mamíferos, como os complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, distribuídos mundialmente (FINDLEY et al., 2009; MAZIARZ; PERFECT, 2016; DE ABREU et al., 2017).

A espécie *C. neoformans* foi a primeira a ser identificada no século XIX e sabe-se hoje que é capaz de causar infecções tanto em indivíduos imunossuprimidos quanto imunocompetentes, já *C. gattii* é historicamente associado a infecções em pacientes saudáveis, no entanto, estudos mostram que essa espécie também afeta indivíduos com deficiências imunológicas (MACDOUGALL et al., 2011; MARR et al., 2012).

Inicialmente, o gênero *Cryptococcus* foi dividido em três variedades, sendo elas *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*; cinco sorotipos, com base em diferenças estruturais na cápsula polissacarídica; e oito subtipos moleculares baseando-se em técnicas de PCR *fingerprint* e *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) (MEYER et al., 1999). Atualmente, métodos moleculares aprimoraram o conhecimento sobre a diversidade genética entre esses complexos, propondo uma nova taxonomia baseada em análises filogenéticas, heterogeneidade em relação à virulência, preferência de hospedeiro e sensibilidade aos antifúngicos. Esses dados forneceram evidências para uma classificação em um esquema de 7 espécies/4 híbridos (HAGEN et al., 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016). As divisões propostas são: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) com 3 genótipos (VNI, VNII, VNB); *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D ou VNIV); e 5 outras espécies distintas, *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (sorotipos B/C ou VGI-IV) (HAGEN et al., 2015). As sete espécies propostas para os complexos

exibem grandes diferenças em relação a epidemiologia, nichos ecológicos, manifestações clínicas das infecções, tipo de reprodução e virulência.

De modo geral, *Cryptococcus* spp. são encontrados no ambiente como leveduras saprofitas residindo em diversos habitats, como em materiais em decomposição dentro de cavidades de árvores, poeira, insetos, no interior de amebas de vida livre e nematódeos do solo, sendo que esses hospedeiros alternativos podem ter um papel importante na distribuição e na virulência de diferentes linhagens criptocócicas (DE JESUS et al., 2012; revisito por BARNETT, 2010; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). A espécie *C. neoformans* é encontrada em associação com excrementos de certos pássaros, como pombos *Columba livia*, tornando essa relação uma importante fonte de infecção em áreas urbanas densamente povoadas (revisito por BARNETT, 2010; MAY et al., 2016). Já *C. gattii* é comumente associado a árvores com cobertura cuticular rica em cera e a várias espécies de eucalipto, no entanto, pela sua adaptação à climas mais frios, pode ser encontrado associado a árvores temperadas, como os abetos e carvalhos (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; SPRINGER et al., 2014).

O ciclo de vida dessas leveduras envolve formas sexuadas e assexuadas (HULL; HEITMAN, 2002). A forma assexuada é composta por leveduras encapsuladas e haploides que se reproduzem por mitose, e são encontradas no ambiente e como isolados clínicos (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Já as formas sexuadas possuem um sistema de *Mating* bipolar que é composto de linhagens *Mating Type a* (*MAT a*) e *Mating Type α* (*MAT α*) ditados por um único locus *MAT* que codifica alelos alternativos opostos. Esse tipo de reprodução normalmente ocorre em resposta à limitação de nutrientes. As células haploides de *Mating Type* opostas liberam feromônios peptídicos para desencadear a fusão entre as leveduras e, assim, produzir filamentos diploides que posteriormente realizam meiose e mitose para a produção de basidiósporos no interior do basídio (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

Em condições laboratoriais de cultivo, as células de *Cryptococcus* são redondas e com diâmetro variando de 5 a 7 μm ; no entanto, o tamanho, a estrutura e as características dessas células podem variar drasticamente no interior de um hospedeiro. Um exemplo são as células titãs, que normalmente são maiores que 12 μm de diâmetro, poliploides e possuem paredes celulares espessas e cápsulas altamente reticuladas (OKAGAKI et al., 2010). Foi mostrado que essa morfologia melhora a adaptação ao estresse oxidativo e inibe a fagocitose por

macrófagos, propiciando a sobrevivência no hospedeiro (GERSTEIN et al., 2015; OKAGAKI et al., 2010). Além disso, células com diâmetro de 2 a 4 µm e paredes celulares espessas, também podem ser encontradas, embora com menos frequência. Essa morfologia parece conferir adaptação para o crescimento no interior de macrófagos, o que sugere uma função importante durante a fase latente da criptococose em que permanecem metabolicamente inativas (ALANIO et al., 2015; MAY et al., 2016).

No ambiente ou até mesmo em condições experimentais, essas leveduras podem crescer como hifas ou pseudo-hifas; entretanto, ao contrário de outros fungos patogênicos, como *Candida albicans*, essas morfologias não são observadas durante as infecções humanas (LIN; IDNURM; LIN, 2015; NEILSON; FROMTLING; BULMER, 1981). Um possível motivo para esse fato está relacionado a superexpressão do fator de transcrição que desencadeia a transição de levedura para hifa, acentuando a resposta imune protetora no hospedeiro, eliminando facilmente o fungo (MAGDITCH et al., 2012; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; WANG; ZHAI; LIN, 2012).

2.2CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma importante infecção fúngica de distribuição mundial que acomete indivíduos imunocompetentes e com deficiências imunológicas consequentes da infecção pelo vírus HIV, pela utilização de terapias imunossupressoras, indivíduos com câncer ou que passaram por procedimentos médicos invasivos (PAPPAS, 2013). A infecção inicia-se pela inalação de leveduras encapsuladas ou basidiósporos presentes no ambiente que se depositam nos alvéolos pulmonares, gerando uma infecção primária. O agente infeccioso pode disseminar-se para o sistema nervoso central (SNC) gerando quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Tecidos danificados, assim como o trato gastrointestinal podem ser vias de entrada para o microrganismo, porém são raros e pouco descritos (CHRISTIANSON; ENGBER; ANDES, 2003).

Após a deposição no pulmão, em pacientes imunossuprimidos, quadros de pneumonia são comuns. Em indivíduos imunocompetentes, a levedura pode ser fagocitada por macrófagos onde estabelecerá uma infecção latente dentro do fagolisossoma, permanecendo dormente em granulomas pulmonares ou até

mesmo linfonodos torácicos por anos. Em desequilíbrio imunológico, o fungo pode restabelecer seu crescimento e disseminar-se a partir desse linfonodo, semelhante ao que ocorre em casos de tuberculose e histoplasmose (GOLDMAN et al., 2000; PERFECT; BICANIC, 2015).

A disseminação das leveduras do pulmão para o SNC através da barreira hematoencefálica é uma característica fundamental da patogênese da criptococose, podendo ocorrer por mecanismos distintos, porém simultâneos (MAY et al., 2016). A paracitose é um desses mecanismos, em que as leveduras penetram a barreira através das junções das células endoteliais devido a atividade de proteases e ureases (OLSZEWSKI et al., 2004; VU et al., 2014). Já a disseminação das leveduras dentro dos fagócitos dos hospedeiros para o SNC é relatada como outro mecanismo, denominado “Cavalo de Troia” (CASADEVALL, 2010).

A infecção pulmonar pode variar de assintomática, com colonização das vias aéreas, até pneumonia com presença de síndrome respiratória aguda. Esta manifestação clínica é predominante na América do Norte e, na Austrália, ocorre geralmente associada à infecção no SNC (CHEN et al., 2012; HARRIS et al., 2011). As manifestações clínicas nervosas incluem uma variedade de sinais e sintomas que se desenvolvem no período de várias semanas, tais como: dor de cabeça, febre, neuropatias cranianas, letargia, perda de memória e sinais de irritação meníngea (PERFECT; CASADEVALL, 2002; PERFECT; BICANIC, 2015). Em pacientes com grave imunossupressão, a carga fúngica no líquido cefalorraquidiano (LCR) pode alcançar um milhão de leveduras por mililitro, gerando maiores títulos de antígenos e maior pressão intracraniana (FRANCO-PAREDES et al., 2015). Essa manifestação clínica no SNC é comum na África, Brasil, Estados Unidos e Austrália (PYRGOS et al., 2013; SOUZA et al., 2013; WILLIAMSON et al., 2016).

Infecções em outros locais do corpo, como pele, próstata, olhos, músculos e ossos podem ocorrer principalmente em pacientes gravemente imunossuprimidos (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Embora a severidade da doença seja determinada principalmente por fatores imunes do hospedeiro, diferentes espécies ou cepas de *Cryptococcus* podem produzir manifestações clínicas únicas, dificultando assim um possível diagnóstico e tratamento (PHILLIPS et al., 2015).

Nas infecções cutâneas, uma variedade de lesões é formada como pápulas, nódulos e úlceras, muitas vezes indistinguíveis de outras infecções, sendo necessária a realização de biópsia da pele para diagnóstico definitivo. Esse quadro

clínico ocorre normalmente por inoculação direta da levedura ou pela presença de uma infecção disseminada, tendo sido relatada em poucos indivíduos imunocompetentes na Austrália e no Brasil (CHRISTIANSON; ENGBER; ANDES, 2003; DORA et al., 2006; LEÃO et al., 2011).

A criptococose prostática geralmente é assintomática, podendo o órgão servir como reservatório em pacientes com alta carga fúngica (LARSEN et al., 1989). Infecções oculares também são descritas e geram uma diversidade de manifestações clínicas, como paralisias oculares e cegueira irreversível (REX et al., 1993). De maneira geral, *C. neoformans* pode causar infecções em qualquer órgão humano (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Para sobreviver e continuar a disseminação no hospedeiro, esses microrganismos utilizam diversos fatores de virulência, como a produção da cápsula polissacarídea, melanina e a síntese de enzimas, como urease e lacase (MAY et al., 2015). A cápsula dessas leveduras, composta majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), é altamente hidrofílica e negativamente carregada, promovendo proteção à dessecação e, no interior do hospedeiro, inibe a digestão pelo fagossoma (ZARAGOZA et al., 2009). A melanina protege do estresse oxidativo intracelular e é catalisada por lacases que utilizam compostos difenólicos, como a dopamina e a epinefrina, no início da síntese dessa molécula, o que pode explicar o neurotropismo desses microrganismos (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

As enzimas fosfolipase B e urease permitem a invasão do tecido hospedeiro. As fosfolipases são capazes de hidrolisar ligações éster em glicerofosfolípidos ocasionando a desestabilização de membranas, levando à liberação das leveduras dos macrófagos do pulmão para o sangue. As ureases catalisam a hidrólise de ureia em amônio, tornando o meio alcalino o que enfraquece as ligações entre as células do endotélio, permitindo, assim, a migração das leveduras através da barreira hematoencefálica, infectando o SNC (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS CRIPTOCOCOSSES

O descobrimento da criptococose ocorreu em 1894, pelo patologista Otto Busse e o médico Abraham Buschke que identificaram *Cryptococcus* spp. como agente etiológico de um granuloma crônico no osso tibial em uma mulher de 31 anos. Entretanto, a criptococose humana só foi reconhecida como uma infecção de importância mundial com o início da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) na década de 1980. Atualmente é considerada como a segunda doença mais prevalente nesses pacientes no mundo todo. Aproximadamente 220.000 casos ocorrem por ano resultando em quase 181.000 mortes. Essa infecção é também a mais incidente entre as micoses sistêmicas em indivíduos imunossuprimidos por outras origens (BRATTON et al., 2012; CDC, 2017; RAJASINGHAM et al., 2017).

A maioria dos casos de criptococose ocorre na África subsaariana, com aproximadamente 162.500 novos casos por ano, sendo *Cryptococcus* spp. a principal causa de meningite em adultos, com índices de mortalidade próximos a tuberculose. Na América Latina, a incidência é de aproximadamente 10.000 novos casos por ano (RAJASINGHAM et al., 2017; VIDAL; BOULWARE, 2015). No Brasil, a prevalência da criptococose associada com SIDA é de 8 a 12% na região Sudeste, além de ser a principal infecção oportunista em 4,4% desses pacientes. Cerca de 80% das manifestações clínicas da criptococose são de meningoencefalite (Consenso em Criptococose, 2008; Guia de Vigilância em Saúde, 2016).

As infecções em pacientes com imunossupressão sempre foram correlacionadas com a espécie *C. neoformans*, enquanto que *C. gattii* era considerado um patógeno de indivíduos imunocompetentes e aparentemente saudáveis. Entretanto, estudos tem sugerido que o tabagismo, gênero, uso de corticosteroides orais, transplante de órgãos e idade avançada podem aumentar o risco de infecção por esta espécie (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; revisado em MACDOUGALL et al., 2011).

A prevalência de casos de criptococose em pacientes do gênero masculino ainda não é bem esclarecida. A princípio era explicada pela maior incidência de indivíduos HIV positivos masculinos, além da maior exposição destes ao agente etiológico, entretanto, estudos já comprovaram que não há diferença na exposição às leveduras entre os gêneros (LOMES et al., 2016). Um estudo realizado

por McClelland e colaboradores em 2013 mostrou que os macrófagos do homem, possuem menor capacidade fagocítica quando comparado aos da mulher e são facilmente mortos pela levedura. Outro resultado indica que o hormônio masculino, testosterona, permite liberação de altos níveis de glucuronoxilomanana *in vitro* podendo gerar maior resposta imunológica do hospedeiro (MCCLELLAND et al., 2013).

A criptococose é a terceira infecção fúngica invasiva mais comum em transplantados, podendo ocorrer após cerca de 2,8% a 8% dos transplantes de órgãos sólidos, sendo os pacientes submetidos a transplantes de fígado os mais frequentemente afetados, seguidos de coração, pulmão e pâncreas (NEOFYTOS et al., 2010). Já pacientes com criptococose associada ao tabagismo também são evidenciados em pesquisas epidemiológicas, possuindo porcentagens que variam de 22% a 51% da população estudada (DROMER et al., 2007).

Aproximadamente 95% das infecções criptocócicas são causadas por *C. neoformans* (Sorotipo A) e 4% a 5% por *C. neoformans* (Sorotipo D) ou *C. gattii* (Sorotipos B/C). *C. neoformans* var. *grubii* (Sorotipo A) é distribuído mundialmente, enquanto que *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorotipo D) é observado em países europeus (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

C. gattii era historicamente considerado como um fungo restrito a regiões tropicais e subtropicais, como o sul da Califórnia, Havaí, Brasil, Austrália, Sudeste Asiático e África Central. Entretanto, uma variedade de estudos epidemiológicos tem identificado reservatórios ambientais de *C. gattii* em climas temperados, possivelmente relacionado a mudanças globais de temperatura e umidade, como por exemplo, na Ilha de Vancouver, onde foi observado um surto de criptococose por essa espécie em 1999. Além disso, *C. gattii* tem emergido, como um agente potencialmente letal no Nordeste do Pacífico e América do Norte, onde mais de 200 casos de criptococose por essa espécie foram relatados em seres humanos, e as infecções entre animais domésticos mais do que duplicaram no período de 1999 e 2006 (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; GALANIS et al., 2010; HARRIS et al., 2011; KIDD et al., 2004).

Na Europa, a maioria das infecções geradas por essa espécie foram adquiridas fora do território europeu, durante visitas a regiões endêmicas (HAGEN et al., 2012). A infecção por *C. gattii* é considerada endêmica no nordeste do Brasil com crescente propagação para o norte, sendo encontrada nos estados do

Amazonas, Pará e Roraima, enquanto *C. neoformans* é distribuído nacionalmente, mas encontrado principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (MARTINS et al., 2011; NISHIKAWA et al., 2003; TRILLES et al. 2008).

Em um estudo realizado por Spina-Tensini e colaboradores na cidade Curitiba em 2016, mostrou que dos 286 pacientes estudados, apenas seis estavam infectados por *C. gattii*, fato explicado pelo clima subtropical de sua região. Além disso, por ser considerada uma cidade cosmopolita com alta demografia de pombos, foi possível correlacionar a alta incidência de *C. neoformans* nas amostras clínicas (SPINA-TENSINI et al., 2016). Yamamura e colaboradores (2013) realizaram o primeiro estudo na cidade de Londrina sobre os possíveis nichos ecológicos de *Cryptococcus* spp. no período de 2009-2010. Nesse trabalho, das 360 amostras ambientais analisadas, cinco foram positivas para o gênero, sendo três *C. neoformans* e duas *C. gattii*. Ambas as espécies foram encontradas no solo em excrementos de pombos ou em material vegetal de árvores em locais de grande movimentação na região central da cidade, indicando exposição da população e animais a esses fungos.

Em uma revisão de dados de 2013 constatou-se que, até aquele período, aproximadamente 68.811 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram reportados no mundo e dentre estes, *C. neoformans* foi cerca de oito vezes mais frequente que *C. gattii*, apesar de distribuições distintas entre os continentes. Nesse mesmo trabalho, uma análise de 1.439 isolados de *Cryptococcus* spp. do Brasil mostrou que todos os tipos moleculares, exceto VGIV, são encontrados em território brasileiro, sendo que a maioria pertence ao subtipo VNI (COGLIATI, 2013).

As outras espécies de *Cryptococcus* são geralmente consideradas como saprófitas e pouco se sabe sobre seu potencial patogênico. No entanto, a incidência de criptococose por essas leveduras ambientais aumentou com o decorrer dos anos, com *C. laurentii* e *C. albidus* sendo responsáveis por 80% dos casos relatados. Além disso, infecções causadas por outras espécies também têm sido descritas (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

2.4 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

As diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) sugerem que as medidas terapêuticas devem levar em consideração o

estado do hospedeiro, local da infecção e complicações decorrentes da infecção. Além disso, estudos mais recentes recomendam terapias que levem em consideração o genótipo da cepa infectante e sua possível sensibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, na prática, as estratégias de tratamento fazem uso de terapias semelhantes para *C. neoformans* e *C. gattii* (CHEN et al., 2013; PERFECT et al, 2010).

O tratamento das meningites criptocócicas consiste em três fases: (1) indução, para a redução da carga fúngica, sendo necessários antifúngicos potentes, (2) consolidação em que se normalizam os parâmetros clínicos e laboratoriais do paciente e (3) manutenção com período de um ano, de acordo com o estado imune do indivíduo (Consenso em Criptococose, 2008).

Tratamento da meningite criptocócica e outras formas de criptococose de SNC			
Estado imunológico	Indução	Consolidação	Manutenção
Imunocompetente	Anfotericina B: 1mg/kg/dia endovenosa + 5-Flucitosina: 100mg/kg/dia via oral, de 6 em 6h por 14 dias	Fluconazol: 400mg/dia via oral por 6 a 10 semanas	–
	Anfotericina B: 1mg/kg/dia endovenosa + 5-Flucitosina: 100mg/kg/dia via oral, de 6 em 6h por 6 a 10 semanas		–
	Anfotericina B: 1mg/kg/dia endovenosa por 6 a 10 semanas		–
	Formulações lipídicas de anfotericina B (lipossomal ou complexo lipídico): 3 a 6mg/kg/dia, endovenosa, por 6 a 10 semanas		–
Imunodeprimido (HIV ou outra imunossupressão)	Anfotericina B: 1mg/kg/dia endovenosa + 5-Flucitosina: 100mg/kg/dia via oral, de 6 em 6h por 14 dias	Fluconazol: 400mg/dia via oral por 10 semanas	Fluconazol: 200 a 400mg/dia via oral por 12 a 24 meses ou Itraconazol: 200mg/dia via oral por 12 a 24 meses
	Anfotericina B: 1mg/kg/dia endovenosa + 5-Flucitosina: 100mg/kg/dia via oral, de 6 em 6h por 6 a 10 semanas		
	Formulações lipídicas de anfotericina B (lipossomal ou complexo lipídico): 3 a 6 mg/kg/dia, endovenosa, por 6 a 10 semanas		
	Em caso de intolerância ou impossibilidade do uso de anfotericina B e suas formulações lipídicas		
	Fluconazol: 800 a 1.600mg/dia via oral + 5-flucitozina 100mg/kg/dia 6 em 6h ou		
	Fluconazol: 1.600mg a 2.000mg/dia via oral por 6 a 10 semanas ou		
Fluconazol: 400 a 800mg/dia via oral por 10 a 12 semanas			

Figura 1 - Esquemas terapêuticos para tratamento de meningite criptocócica.

Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

O padrão ouro para a terapia de indução das criptococoses é a anfotericina B desoxicolato (AmB), antifúngico da classe dos polienos, desenvolvida na década de 1950 (VAN DER HORST et al., 1997). Este antifúngico possui efeito fungicida pela interação direta com o ergosterol da membrana citoplasmática, resultando na produção de poros e na alteração da permeabilidade celular,

permitindo, assim, o efluxo de íons potássio e culminando na morte celular (ARIKAN; REX, 2001). É administrado via intravenosa podendo causar, após a segunda semana de tratamento, insuficiência renal, hipocalemia, hipomagnesemia e anemia (BICANIC et al., 2015). Como alternativa, formulações menos tóxicas, como a AmB lipossomal, que incluem complexos lipídicos, podem ser utilizadas. Entretanto, devido ao alto custo da AmB lipossomal, a utilização de hidratação preventiva e suplementação de eletrólitos são mais comuns, utilizando a formulação lipídica somente para pacientes com insuficiência renal (CORNELLY et al., 2007; WHO, 2011).

Uma combinação sinérgica e eficaz utilizada para o tratamento da criptococose envolve anfotericina B com a 5-flucitosina, um análogo de pirimidina. Este antifúngico é convertido pela enzima citosina desaminase em 5-fluoruracila, que se liga ao DNA e RNA impedindo sua síntese e a tradução de proteínas, inibindo o crescimento da levedura (DAY; CHAU; LALLOO, 2013; MAY et al., 2016). Essa terapia é mais eficiente na redução da carga fúngica no SNC quando comparada com a anfotericina B sozinha. A não utilização da 5-flucitosina no tratamento está associada com maiores taxas de mortalidade e recidiva tardia, e, por este motivo, este antifúngico também é classificado como padrão ouro pelas diretrizes de tratamento internacional (DAY; CHAU; LALLOO, 2013; PERFECT et al., 2010; WHO, 2018). Apesar dessa classificação e da baixa taxa de mortalidade relacionada com essa combinação, a 5-flucitosina não é frequentemente utilizada em decorrência de seu alto custo na maioria dos países onde a criptococose é mais prevalente, inclusive no Brasil (LOYSE et al., 2013).

O fluconazol é rotineiramente utilizado nos países em que a 5-flucitosina não é disponível, uma vez que possui boa biodisponibilidade oral e excelente penetração no líquido cefalorraquidiano (LCR), podendo ser utilizado na terapia de manutenção. O seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima lanosterol demetilase (14α -esterol demetilase), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Este antifúngico inibe o crescimento celular, mantendo a célula viável, e, portanto, inviabilizando sua utilização na fase inicial do tratamento (MAY et al., 2016; SLOAN; PARRIS, 2014).

A utilização da combinação da anfotericina B com o fluconazol em países com poucos recursos apresentou-se como um bom custo benefício, exibindo boas taxas de depuração, recuperação neurológica e sobrevivência, sendo,

portanto, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) somente quando a disponibilidade de 5-flucitosina for limitada (RAJASINGHAM et al., 2012; WHO, 2011). Após a fase de indução o tratamento deve prosseguir para a fase de consolidação utilizando-se apenas o fluconazol por mais oito semanas. Essa estratégia de tratamento, tendo o fluconazol em todas as fases de terapia, contribui para variações significativas no prognóstico dos pacientes (SLOAN; PARRIS, 2014).

As altas concentrações de fluconazol associadas ao longo período de tratamento têm sido responsáveis pela seleção de cepas resistentes, e como alternativa, outros azóis podem ser utilizados. O itraconazol é aplicado para a terapia de manutenção, enquanto que o voriconazol, posaconazol e ravuconazol mostraram ótima atividade contra *Cryptococcus* spp. em diferentes dosagens, sendo mais ativos contra *C. gattii* (ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2008; LOCKHART et al., 2012; SLOAN et al., 2008). A combinação desses azóis com a anfotericina B tem atividade fungicida semelhante quando comparada com a 5-flucitosina. Entretanto, devido a diferenças na biodisponibilidade, penetração no LCR, interações medicamentosas, custo e falta de estudos em criptococose, esses agentes não são recomendados na terapia de primeira linha da consolidação e manutenção (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

As equinocandinas também podem ser utilizadas para o tratamento das criptococoses por inibirem a síntese de 1,3- β -D-glucano, resultando na formação de parede celular com integridade estrutural prejudicada, provocando a morte celular (KLEPSER, 2001). A micafungina e a caspofungina são exemplares dessa classe de antifúngico que podem futuramente substituir a anfotericina B, principalmente, por produzirem menores efeitos tóxicos renais (ESPINEL-INGROFF, 2009).

Devido à utilização em larga escala, há uma crescente exposição desses microrganismos a esses antifúngicos que pode conduzir a seleção de cepas resistentes (PEMÁM; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009). A resistência à anfotericina B é incomum, mas já foi relatada em isolados de *C. neoformans* com alta exposição ao antifúngico (MANFRED et al., 2006; GUPTA et al., 2018). Normalmente isso se deve a alterações na composição do ergosterol mediadas tanto pelo aumento da atividade da catalase quanto por mutações na via de biossíntese desse esterol (SANGALLI-LEITE et al., 2011). Mutações em genes relacionados com a transcrição ou tradução resultam em resistência à 5-flucitosina

tanto *in vitro* quanto na prática clínica, logo, a monoterapia com esse antifúngico é desaconselhada (MAY et al., 2016).

O fluconazol também pode selecionar leveduras resistentes por diferentes mecanismos, como pela superexpressão de genes que codificam proteínas de efluxo, realização de rotas metabólicas alternativas para biossíntese de ergosterol e alterações na molécula alvo (revisado por GULLO et al., 2013). A diminuição do transporte do antifúngico pode ser decorrente de alterações nos transportadores de membrana (PRASAD et al., 2006). Além disso, sabe-se que mutações pontuais no gene *ERG11* ocasionam em substituições de aminoácidos no sítio ativo dos azóis, provocando mudanças estruturais na enzima e dificultando o acesso do antifúngico. Essas mutações estão relacionadas com a heterorresistência, em que um mecanismo de resistência pode ser revertido para uma parte da população (RODERO et al., 2003).

A heterorresistência em *C. neoformans* está associada com aneuploidias cromossômicas, ou seja, ao sofrerem pressão seletiva do antifúngico essas leveduras induzem a duplicação de seus cromossomos e conseqüentemente o número de genes *ERG11* mutados, resultando em superexpressão de proteínas com menor afinidade ao agente. Entretanto, após a retirada do antifúngico, os cromossomos são removidos e os microrganismos voltam ao estado inicial de sensibilidade, sendo um possível motivo para a falha nas terapias com fluconazol (SIONOV et al., 2009; SIONOV et al., 2010).

A capacidade de melanização desses fungos durante uma infecção pode estar associada à resistência aos antimicrobianos, principalmente contra equinocandinas e polienos, uma vez que este processo altera as taxas de carbono, nitrogênio e oxigênio da melanina o que contribui para impedir a internalização do fármaco (NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2003).

Por ser um fungo ambiental e apenas um patógeno humano accidental, a capacidade de formar biofilme atua como estratégia para a sobrevivência em ambientes adversos e, por esse motivo, a formação de biofilme também pode ser considerada como um mecanismo de resistência dessas leveduras, uma vez que é uma comunidade estruturada de microrganismos em que as células aderidas irreversivelmente (células sésseis) à superfície secretam uma matriz polimérica extracelular onde permanecem embebidas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; MARTINEZ; FRIES, 2010). Biofilmes podem ser formados

tanto em dispositivos médicos quanto no tecido do hospedeiro, onde geralmente estão associados a infecções persistentes (DONLAN; CONSTERTON, 2002). Em *C. neoformans*, a formação dessas comunidades depende da presença da cápsula polissacarídica composta majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), seguindo uma sequência de eventos que incluem a adesão à superfície, formação de microcolônias, produção da matriz polimérica extracelular e maturação (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

Na fase de adesão, em consequência de mudanças de pH, temperatura, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, as células planctônicas metabolicamente ativas aderem a uma superfície de maneira reversível através de forças físicas, como de van der Waals. Esta interação pode ser facilitada pela presença de fluidos orgânicos, como o LCR que por possuir cátions em sua composição promove interações entre o microrganismo e a superfície (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). A formação da microcolônia consiste na intensa multiplicação celular, ligação irreversível à superfície, produção de sinais auto indutores que regulam a expressão de genes responsáveis pela síntese e secreção da matriz polimérica extracelular (VASUDEVAN, 2014; VILA; ROZENTAL, 2016). Na maturação, a arquitetura tridimensional do biofilme já é mais complexa devido ao desenvolvimento completo da matriz e as células superficiais dessa comunidade podem se dispersar e colonizar outros locais (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015; NOBILE; JOHNSON, 2015).

Diversas hipóteses e mecanismos tentam explicar a resistência de células sésseis aos antifúngicos. A alta densidade celular e a presença da matriz extracelular limitam a penetração de fármacos ao formar uma barreira de difusão permitindo, assim, que apenas as camadas mais superficiais entrem em contato com doses letais de antimicrobianos. O crescimento lento do biofilme com alta regulação da atividade metabólica devido à limitação de nutrientes e a existência de uma subpopulação de células no interior da comunidade, chamadas de persistentes, que se preservam da pressão seletiva ocasionada pelos antifúngicos seriam também responsáveis por essa resistência (MAH; O'TOOLE, 2001; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015).

Biofilmes de *C. neoformans* são mais resistentes aos antifúngicos comerciais do que as células planctônicas, e, além disso, a exposição de biofilmes

pré-formados a azóis não inibe a atividade metabólica dessa comunidade, possivelmente pelo efeito fungistático destes agentes (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006). Anfotericina B e caspofungina possuem efeito sobre o biofilme devido ao caráter fungicida desses antifúngicos e por impedirem adesão da cápsula à superfície, entretanto, essa inibição ocorre somente em concentrações superiores às aquelas permitidas para administração *in vivo*.

Aliado à seleção de cepas resistentes pelo uso indevido dos antifúngicos, o tratamento das infecções fúngicas enfrenta a escassez de novas classes de antimicrobianos, sendo a anidulafungina a última a ser introduzida em 2006; enquanto que os antifúngicos existentes, em sua maioria, não são fungicidas, possuem poucos alvos moleculares, além de toxicidade e efeitos adversos (CAMPOY; ADRIO, 2017; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016). Dessa forma, estratégias para alcançar maior eficácia no tratamento de leveduras patogênicas são de suma importância, tendo como finalidade a busca de novos antifúngicos, desenvolvimento de novas formulações, reposição ou potencialização de medicamentos já existentes (SHARMA et al., 2010).

Com esse objetivo, na última década houve um aumento na busca por terapias alternativas que incluam a utilização de princípios ativos isolados a partir de produtos naturais, tendo em vista a ampla biodiversidade e alta capacidade de exploração em nosso país (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; COLALTO, 2018). Além disso, produtos naturais advindos de plantas possuem em seus extratos brutos inúmeros componentes que são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas contra diferentes microrganismos (DUARTE et al., 2005).

Outra estratégia viável é a combinação entre fármacos que geram efeitos sinérgicos, ou seja, que requerem uma menor concentração dos compostos utilizados para produzir o efeito desejado, aumentando assim a eficácia do tratamento e diminuindo sua toxicidade (MUKHERJEE et al., 2005). O efeito sinérgico pode ocorrer por mecanismos distintos como: o efeito em diferentes alvos simultaneamente; efeito farmacocinético ou físico-químico proporcionando melhor solubilidade; maior taxa de reabsorção e biodisponibilidade; interação dos agentes sobre um mesmo mecanismo e neutralização ou eliminação de efeitos adversos dos agentes antifúngicos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; YEH et al., 2009; CHEN et al., 2014).

2.5O GÊNERO *Poincianella*

Plantas são uma rica fonte de compostos utilizados na medicina popular para o tratamento de inúmeras patologias desde a antiguidade, uma vez que representam uma alternativa econômica e de fácil acesso (SARDI; ALMEIDA; MENDES GIANNINI, 2011). Ensaios *in vitro* com extratos obtidos a partir de diferentes gêneros e espécies de plantas mostram que são fontes naturais importantes de novos compostos com potencial antimicrobiano que possam ser utilizados na formulação de novos antifúngicos (FURLETTI et al., 2011).

As leguminosas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, grupo *Caesalpinia sensu lato* e gênero *Poincianella*, também conhecido como *Caesalpinia*, podem ser encontradas como árvores lenhosas de grande e pequeno porte ou como arbustos; possuem folhas alternadas com flores em cachos terminais na coloração amarela ou alaranjada, frutos alongados e vagens achatadas (NC STATE UNIVERSITY, 2017). Quando altas e com copas largas, contribuem no sombreamento e nas condições microclimáticas do local (SILVA et al., 2009). O grupo *Caesalpinia* s. l. possui mais de 25 gêneros que podem ser utilizados como sinônimo para *Poincianella*, dificultando o reconhecimento e delimitação destes (GAGNON et al., 2013).

Caesalpinia spp. possui em torno de 500 espécies distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, contudo, apesar da sua enorme variedade, muitas ainda não foram investigadas quanto ao seu potencial farmacológico (ZANIN et al., 2012). As poucas espécies estudadas mostraram múltiplas propriedades biológicas, incluindo atividade antibacteriana, agindo sobre *Bacillus subtilis* (PULIPATHI et al., 2012); antiviral descrita para o vírus herpes simplex e poliovírus (LOPES et al., 2013); antifúngica com efeito sobre *Candida albicans* (PICHARDO et al., 2013); e anti-inflamatória (YODSAOUE et al., 2010). Várias classes de compostos já foram isoladas de plantas desse gênero, incluindo flavonoides, esteróis, diterpenos, açúcares e ácidos orgânicos (ZANIN et al., 2012).

Caesalpinia bonducella é um importante exemplar do gênero *Caesalpinia* amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, como Ásia e Caribe, e utilizado para fins medicinais. Suas sementes possuem diversas atividades biológicas, como antidiarreica, antibacteriana, antidiabética, antitumoral, antipirética, analgésica, antifilarial, ansiolítica, anti-inflamatória e antioxidante (BILLAH et al.,

2013; GUPTA et al., 2004; GAUR et al., 2008; PARAMESHWAR; SRINIVASAN; MALLIKARJUNA, 2002; SAEED; SABIR, 2001; SHUKLA et al., 2010; VENKAT et al., 2008). Análises fitoquímicas de sementes dessa espécie mostraram que elas são compostas principalmente de alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos e triterpenos (BILLAH et al., 2013). Além das sementes, estudos mostraram que extratos da casca, flores, raiz e folhas também possuem ação antifúngica, analgésica, anti-inflamatória e antitumoral, respectivamente (ATA; GALE; SAMARASEKERA, 2009; DEVI et al., 2008; GUPTA et al., 2004).

Em comunidades na Amazônia, onde o atendimento médico é precário, sabe-se que plantas medicinais constituem a base para o tratamento de várias patologias. Estudos indicam que a espécie *Caesalpinia ferrea* Martius, amplamente distribuída nessa região, possui ação antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana (contra *Lactobacillus casei*), antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética e preventiva para câncer (GALLÃO et al., 2013; HASSAN et al., 2015; LIMA et al., 2012; MENEZES et al., 2007; SAMPAIO et al., 2009). Sua utilização envolve a preparação de infusões e xaropes a partir de suas folhas, frutos e casca (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A análise fitoquímica do extrato bruto da planta mostrou a presença de antraquinonas, alcaloides, depsídeos, flavonoides, lactonas, saponinas, açúcares, sesquiterpenos, triterpenos e taninos, considerados seus componentes principais (SOUZA et al., 2006). Em outra análise, realizada por Nawwar e colaboradores (2015), foram identificados nove compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* Martius, sendo que a maioria exibiu efeito antioxidante (NAWWAR et al., 2015).

A espécie *Caesalpinia pulcherrima*, encontrada na Ásia, também amplamente estudada, mostrando que suas folhas e flores possuem efeito antioxidante, antimicrobiano, analgésico, anti-inflamatório, larvicida, antidiarreico, anti-helmíntico, imunomodulador e antiviral (revisado por VIVEK et al., 2013). Na análise fitoquímica da flor dessa espécie foram detectados como principais componentes quercetina, lupeol, acetato de lupeol, miricetina e rutina, sendo que os dois primeiros, apresentam efeito inibitório sobre a proliferação do protozoário *Plasmodium falciparum* (OGU; AISUODIONOE; NWACHUKWU, 2012). Além disso, extrato das folhas e flores de *C. pulcherrima* inibiram o crescimento das leveduras *Candida albicans* e *C. neoformans* (VIVEK et al., 2013).

Caesalpinia melanadenia, uma espécie endêmica em aldeias do México, é também utilizada para fins medicinais no tratamento de distúrbios gastrointestinais, respiratórios e infecções de pele. O extrato hexânico das partes aéreas dessa espécie apresentou efeito fungistático sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *C. neoformans*. Além disso, a análise fitoquímica desse extrato foram detectados derivados fenólicos, diterpenos e triterpenos (PICHARDO et al., 2013).

Poincianella pluviosa (DC.) L.P. Queiroz, sinônimo de *Caesalpinia pluviosa* DC., *Caesalpinia peltophoroides* (Benth.) e *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, encontra-se amplamente distribuída na América do Sul, podendo ser encontrada cinco variedades distintas na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil (LEWIS et al., 1998; TROPICOS, 2018). No território brasileiro a espécie é distribuída principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia e no Pantanal Mato-Grossense, podendo ser utilizada para arborização nas cidades e na produção de móveis (LORENZI, 1992; PONTES et al., 2006). Tradicionalmente a comunidade indígena Tacana utiliza a casca dessa espécie para a produção de chás, pelo método de decocção, para o tratamento de disenterias e diarreias (BOURDY et al., 2000). Apesar do conhecimento popular de sua capacidade terapêutica, poucos estudos relatam as propriedades biológicas e composição dessa planta, comumente denominada de "sibipiruna".



Figura 2 - *Poincianella pluviosa*. Fonte: Fernandes, 2015.

Deharo e colaboradores (2001) mostraram que o extrato etanólico feito a partir da casca da planta possui atividade sobre uma cepa de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (DEHARO et al., 2001). Em outro trabalho o extrato bruto extraído da casca da árvore apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* sobre cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium chabaudi* resistentes e sensíveis à cloroquina, inibindo significativamente a parasitemia em animais infectados (KAYANO et al., 2011). Bueno e colaboradores mostraram que o extrato hidroalcoólico da casca de *P. pluviosa* estimula a proliferação de queratinócitos e fibroblastos da derme *in vitro* pela alta concentração de taninos hidrolisados no extrato. As frações etil acetato e FC do extrato da casca de *P. pluviosa* apresentou atividade fungistática *in vitro* sobre células planctônicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (SANTOS, 2018).

Recentemente, em modelo *in vivo*, verificaram que o extrato bruto estimula a produção de fibras colágenas e re-epitelização de feridas em ratos e que a presença de compostos fenólicos permitiu ação protetiva por inibição de agentes oxidantes produzidos pelo tecido lesionado (BUENO et al 2014; BUENO et al., 2016).

A caracterização fitoquímica das folhas e da casca da árvore dessa espécie, identificou a presença de esteróis como o estigmasterol; triterpenos como o lupeol e ácido betulínico; taninos como o ácido malotínico e a tellimagrandin; flavonoides como a quercitina; saponinas e compostos fenólicos como ácido gálico; ácido elágico e geraniin (BUENO et al., 2014; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; KAYANO et al., 2011; RODRIGO et al., 2010). Recentemente, um novo biflavonoide, caesalpinioflavona, foi extraído da casca de *P. pluviosa* var. *peltophoroides* e apresentou atividade antitumoral promissora (ZANIN et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* (sibipiruna) sobre células planctônicas e sésseis de *C. neoformans* e *C. gattii* e analisar o efeito da combinação deste composto com anfotericina B.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos de sibipiruna sobre células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Avaliar o efeito da combinação entre a fração etil acetato e os antifúngicos comerciais anfotericina B e fluconazol sobre o crescimento de *Cryptococcus* spp.
- Analisar a cinética de crescimento de células planctônicas de *Cryptococcus* spp. quando tratadas com a fração e em combinação com o antifúngico.
- Investigar a atividade da fração sozinha e em combinação com o antifúngico sobre a atividade metabólica do biofilme em formação e sobre as células sésseis de *Cryptococcus* spp.
- Verificar a citotoxicidade da fração sozinha e em combinação com o antifúngico sobre células mamíferas.

4. REFERÊNCIAS

- ALANIO, A. et al. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. **mBio**, v.6, n. 2, p. 2580–2614, 2015.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015.
- ARIKAN, S.; REX, J. H. Lipid-based antifungal agents: current status. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 5, p. 393–415, 2001.
- ATA, A.; GALE, E.M.; SAMARASEKERA, R. Bioactive chemical constituents of *Caesalpinia bonduc* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p.106–109, 2009.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010.
- BICANIC, T. et al. Toxicity of amphotericin B deoxycholate-based induction therapy in patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7224–7231, 2015.
- BILLAH, M. M. et al. Antibacterial, antidiarrhoeal, and cytotoxic activities of methanol extract and its fractions of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb leaves. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2013.
- BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 87-109, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília, DF, 2016.
- BRATTON, E. et al. Comparison and temporal trends of three groups with Cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2012.
- BUENO, F. G. et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252–260, 2014.
- BUENO, F. G. et al. Enhanced Cutaneous Wound Healing In Vivo by Standardized Crude Extract of *Poincianella pluviosa*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0149223, 2016.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 86-96, 2017.
- CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1389–1392, 2010.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *C. neoformans* Infection Statistics. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>>. Acesso em: 9 out. 2017.
- CHEN, S. C. et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. 543–551, 2013.
- CHEN, S. C. et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 789–798, 2012.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.
- CHEN, X. et al. ASDCD: Antifungal Synergistic Drug Combination Database. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.
- CHRISTIANSON, J.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 177–188, 2003.
- COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–23, 2013.
- COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 413–425, 2018.
- CORNELY, O. A. et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 10, p. 1289–1297, 2007.
- DAY, J. N.; CHAU, T. T.; LALLOO, D. G. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 14, p. 2522–2523, 2013.
- DE ABREU, D. P. B. et al. Intestinal Lesion in a Dog Due to *Cryptococcus gattii* Type VGII and Review of Published Cases of Canine Gastrointestinal Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5–6, p. 597–602, 2017.
- DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.
- DE JESUS, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* carried by *Odontomachus bauri* ants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 466–469, 2012.
- DEVI, R. A. et al. Analgesic activity of *Caesalpinia bonducella* flowers extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 10, p. 668–672, 2008.
- DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Unesp, 2002.

- DONLAN, R. R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.
- DORA, J. M. et al. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 235–238, 2006.
- DROMER, F. et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D study. **PLOS Medicine**, v. 4, n. 2, p. 297–308, 2007.
- DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, v. 336, n. 8720, p. 923–925, 1990.
- ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005–2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15–22, 2009.
- FINDLEY, K. et al. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukariotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353–361, 2009.
- FLORES, Y; VILA, J.; ALMANZA, G.R. Secondary Metabolites From *Caesalpinia pluviosa*. **Revista Boliviana de Química**, v. 23, 2006.
- FRANCO-PAREDES, C. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 348–355, 2015.
- FURLETTI, V. F. et al. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential oil upon oral *Candida albicans* Biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- GAGNON, E. et al. A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new insights and more genera than expected. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 111–127, 2013.
- GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 58–62, 2013.
- GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251–257, 2010.
- GAUR, R. L. et al. Antifilarial activity of *Caesalpinia bonducella* against experimental filarial infections. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 1, p. 65–70, 2008.
- GERSTEIN, A. C. et al. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. **mBio**, v. 6, n. 5, p. 1340–1415, 2015.
- 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. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 832–838, 2000.
- GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, 2013.
- GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 2, p. 177–184, 2004.
- GUPTA, P. K. et al. A Rare Case of Amphotericin B Resistant Cryptococcal Meningitis in a HIV Non-reactive Immunocompetent Patient. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, v. 12, n. 3, p. 3-5. 2018.
- HAGEN, F. et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1618–1624, 2012.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 16–48, 2015.
- HARRIS, J. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 12, p. 1188–1195, 2011.
- HASSAN, S. et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 462–471, 2015.
- HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of genetics**, v. 36, p. 557–615, 2002.
- 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1580–1582, 2008.
- KAYANO, A. C. A. V. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. **Malaria Journal**, v. 10, p. 1-11, 2011.
- KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: A systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 51-58, 2007.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004.
- KLEPSEK, M. E. Antifungal resistance among *Candida* species. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8, p. 124–132, 2001.
- LARSEN, R. A. et al. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 2, p. 125–128, 1989.

- LEÃO, C. A. et al. Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent host. **Medical mycology**, v. 49, n. 4, p. 352–355, 2011.
- LEWIS, G.P. **Caesalpinia: revision of Poincianella-Erythrostemon**. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 233, 1998.
- LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.
- LIN, J.; IDNURM, A.; LIN, X. Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between *Cryptococcus neoformans* and its hosts. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p. 493-504, 2015.
- LOCKHART, S. R. et al. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: Correlation of molecular type and in vitro susceptibility. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 2, p. 144–148, 2012.
- LOMES et al. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p.669-676, 2016.
- LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.
- LORENZI, H. *Caesalpinia peltophoroides* Benth. In: LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 1992.
- LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: Time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2435–2444, 2013.
- MCCLELLAND E. E. et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1-7, 2013.
- MACDOUGALL, L. et al. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 193–199, 2011.
- MAGDITCH, D. A. et al. DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, p. 1-14, 2012.
- MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.
- MANFRED, R. et al. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. **AIDS PATIENT CARE AND STDS**, v. 20, n. 4, p. 227-232, 2006.
- MARR, K. et al. *Cryptococcus gattii* Infection in healthy Hosts: A Sentinel for Subclinical Immunodeficiency? **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 153–154, 2012.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2015.

- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592-4601, 2007.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–6123, 2006.
- MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: Relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.
- MARTINS, L. M. S. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725–730, 2011.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106–117, 2016.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- MENEZES, I. A. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 41–47, 2007.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, 1999.
- MUKHERJEE, P.K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 163-194, 2005.
- NAWWAR, M. A. et al. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: Antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, v. 70, n. 8, p. 553–558, 2015.
- NC STATE UNIVERSITY. *Caesalpinia* spp. Disponível em: <<https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/caesalpinia-spp/>>. Acesso em: 03 agosto 2017.
- NEILSON, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. **Mycopathologia**, v. 73, n. 1, p. 57–59, 1981.
- NEOFYTOS, D. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 3, p. 220–229, 2010.
- NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 73–77, 2003.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.

- OGU, G. I.; AISUODIONOE, M. E.; NWACHUKWU, P. U. Anti-plasmodial activity of *Caesalpinia pulcherrima* (Swartz) stem bark extract against *Plasmodium berghei* in albino mice. **International Journal of Biology**, v. 1, n. 2, p. 168-178, 2012.
- OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, p. 1-15, 2010.
- OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.
- PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61–79, 2013.
- PARAMESHWAR, S.; SRINIVASAN, K.K.; MALLIKARJUNA, R. C. Oral antidiabetic activities of different extracts of *Caesalpinia bonducella* Seed Kernels. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 8, p. 590-595, 2002.
- PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 2009.
- PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49–54, 2015.
- PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837-874, 2002.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.
- PHILLIPS, P. et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clinical infectious diseases**, v. 60, p. 1–9, 2015.
- PIANALTO, K.; ALSPAUGH, J. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 1-24, 2016.
- PICHARDO, A. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia melanadenia* (Rose) Standl (Fabaceae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 11, p. 186-193, 2013.
- PONTES, C. A. et al. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (SIBIPIRUNA). **Revista árvore**, v.30, n.1, p.43-48, 2006.
- PRASAD, R. et al. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 69–83, 2006.
- PULIPATHI, S. et al. Evaluation of antibacterial activity of fresh and dry flower extracts of *Caesalpinia pulcherrima* L. **International Journal of Biological and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 360-365, 2012.
- PYRGOS, V. et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2013.

- RAJASINGHAM, R. et al. Cryptococcal Meningitis Treatment Strategies in Resource-Limited Settings: A Cost-Effectiveness Analysis. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1-10, 2012.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.
- RELATÓRIO TÉCNICO. Consenso em criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- REX, J. H. et al. Catastrophic visual loss due to *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Medicine**, v. 72, n. 4, p. 207–24, 1993.
- RODERO, L. et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 2003.
- RODRIGO, G. C. et al. Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 21, p. 2204-2210, 2010.
- SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 807–809, 2001.
- SAMPAIO, F.C. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289–294, 2009.
- SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457-467, 2011.
- SANTOS, P. M. C. S. **Efeito do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e fluconazol sobre células planctônicas e sésseis de *Candida* spp.** 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.
- SARDI, J. C. O.; ALMEIDA, A. M. F.; MENDES GIANNINI, M. J. S. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 10, p. 951-959, 2011.
- SHARMA, M. et al. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 5, p. 570–578, 2010.
- SHUKLA, S. et al. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 61–64, 2010.
- SILVA, L. B. et al. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 436–445, 2009.

- SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2010.
- SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, 2009.
- SLOAN, D. et al. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. 1-21, 2008.
- SLOAN, D.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 13, n. 6, p. 169-182, 2014.
- SOUZA, A. B. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380–383, 2006.
- SOUZA, L. K. et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 343–347, 2013.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections: Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **Biomed Research International**, v.2013, p 1-34, 2013.
- SPINA-TENSINI, T. et al. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 51-58, 2016.
- SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 14–20, 2010.
- SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. 1-19, 2014.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–50, 2001.
- TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 67–74, 2016.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p. 455-462, 2008.
- TROPICOS. **Poincianella pluviosa (DC.) L.P. Queiroz**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/100383047>>. Acesso em: 23 outubro 2018.

- VAN DER HORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 1, p. 15–21, 1997.
- VASUDEVAN, R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 3, p. 1-14, 2014.
- VENKAT, R. N. et al. Anxiolytic activity of seed extract of *Caesalpinia bonducella* (Roxb) in laboratory. **Internet Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2008.
- VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of hiv care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 38-45, 2015.
- VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm formation as a pathogenicity factor of medically important fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. [s.l.] InTech, p. 1–24, 2016.
- VIVEK, M. N. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of leaf and flower extract of *Caesalpinia pulcherrima*, *delonix regia* and *peltaphorum ferrugineum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. 64–71, 2013.
- VU, K. et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1-13, 2014.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–110, 2009.
- WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, 2012.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 2016.
- World Health Organization. Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: WHO; 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260399/9789241550277-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 de outubro, 2018
- World Health Organization. Rapid Advice: Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children. Geneva: WHO; 2011. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502979_eng.pdf. Acesso em: 1 de agosto, 2017.
- YAMAMURA, A. A. M. et al. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 793-803, 2013.
- YEH, P. J. et al. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 460-466, 2009.
- YODSAOUE, O. et al. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1756–1764, 2010.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, p. 133–216, 2009.

ZANIN, J. L. B. et al. Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 26, n. 4, p. 804-809, 2015.

ZANIN, J. L. B. et al. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887-7902, 2012.

5. APÊNDICE

Efeito antifúngico do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e sinergismo com anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.

Gabriella Maria Andriani¹; Eliandro Reis Tavares¹; João Carlos Palazzo de Mello²; Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Departamento de Farmácia, Laboratório de Biologia Farmacêutica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

Resumo

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são agentes etiológicos da criptococose, uma doença infecciosa invasiva e potencialmente fatal. O caráter tóxico dos antifúngicos disponíveis para o tratamento dessa infecção dificulta a utilização por período prolongado, além do progressivo relato de cepas resistentes às terapias consolidadas. Neste contexto, leguminosas do gênero *Poincianella*, são uma importante fonte para o isolamento de novas moléculas antimicrobianas, além da possível utilização em combinação com os antifúngicos comerciais disponíveis. Este é o primeiro trabalho a mostrar o efeito antifúngico da fração etil acetato da casca de *Poincianella pluviosa* e sua combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B, sobre *Cryptococcus* spp. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) sobre as células planctônicas de fração etil acetato (FAC) variaram de 31,25 a >1000 µg/mL, mostrando efeito fungistático sobre todas as cepas testadas através da análise da cinética de tempo de morte e viabilidade celular. A combinação entre fluconazol e FAC só foi considerada sinérgica em *C. neoformans*, enquanto que a combinação entre anfotericina B e FAC foi sinérgica para todas as cepas testadas, com índices da concentração inibitória fracionária (FICI) que variaram de 0,34 a 0,125, apresentando ação fungistática. O efeito inibitório de FAC sozinha e em combinação com anfotericina B também foi avaliado durante a fase de formação e sobre o biofilme maduro resultando em inibição significativa da atividade metabólica das células sésseis mesmo nas menores concentrações testadas. A maior porcentagem de inibição da atividade metabólica provocada por FAC foi evidenciada em *C. gattii* ATCC 24065 tanto na fase inicial de formação (57,93%) como no biofilme formado (68,01%), seguido por *C. neoformans* ATCC 66031. A combinação com anfotericina B teve efeito sinérgico sobre as duas cepas somente na fase de formação do biofilme com redução dos valores de SCIM em mais de 16 vezes. Esses resultados indicam o potencial antifúngico da FAC da casca de *P. pluviosa* sozinha e em combinação com anfotericina B. Esta planta pode ser uma fonte importante de novas moléculas com atividade antifúngica para formulação de produtos e utilização em tratamentos da criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, antifúngico, sibipiruna, biofilme, sinergismo, *Poincianella*

Introdução

A criptococose é uma importante infecção fúngica de distribuição mundial causada em sua maioria por espécies dos complexos *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* que acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos, mas também imunocompetentes (FINDLEY et al., 2009; MAY et al., 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Atualmente a criptococose é considerada a segunda doença mais prevalente em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) no mundo todo com aproximadamente 220.000 novos casos por ano, resultando em quase 181.000 mortes, além de ser a infecção mais incidente entre as micoses sistêmicas em indivíduos com imunossupressão por outras origens (BRATTON et al., 2012; CDC, 2017; RAJASINGHAM et al., 2017).

O tratamento adequado da criptococose é de suma importância para o controle do agente etiológico no hospedeiro. O padrão ouro para a terapia de indução é a anfotericina B desoxicolato que possui efeito fungicida que age através da interação direta com o ergosterol da membrana citoplasmática. Entretanto, após a segunda semana de tratamento pode gerar insuficiência renal, hipocalcemia, hipomagnesemia e anemia (ARIKAN; REX, 2001; BICANIC et al., 2015). Outros antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento da criptococose como o fluconazol, entretanto, também podem apresentar toxicidade devido ao uso prolongado, além de conduzirem a seleção de cepas resistentes ou com sensibilidade reduzida (GUPTA et al., 2018; PEMÁM; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; SLOAN; PARRIS, 2014).

Em vista desse cenário, estratégias como estudos de novos antifúngicos, desenvolvimento de novas formulações e a reposição ou potencialização de medicamentos já existentes são de suma importância para alcançar maior eficácia no tratamento dessa doença (SHARMA et al., 2010). Assim, na última década, houve um aumento na busca por terapias alternativas que incluem a utilização de princípios ativos isolados a partir de produtos naturais, tendo em vista principalmente a ampla biodiversidade e alta capacidade de exploração no Brasil (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; COLALTO, 2018). Além disso, produtos naturais advindos de plantas possuem em seus extratos brutos inúmeros componentes

fontes de moléculas biologicamente ativas contra diferentes microrganismos (DUARTE et al., 2005).

As leguminosas do gênero *Poincianella* mostraram múltiplas propriedades biológicas, incluindo atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* (PULIPATHI et al., 2012), antiviral contra o vírus herpes simplex e poliovírus (LOPES et al., 2013), antifúngica com efeito em *Candida albicans* (PICHARDO et al., 2013) e anti-inflamatória (YODSAOUE et al., 2010). A casca da espécie *P. pluviosa* é utilizada por populações indígenas para tratamento de disenterias e diarreias e exibiu efeito antifúngico contra diferentes espécies de *Candida* spp. (BOURDY et al., 2000; SANTOS, 2018). Entretanto, apesar de sua ampla utilização na medicina popular e alternativa, poucos estudos relatam as propriedades biológicas e composição química desta planta, comumente denominada de "sibipiruna".

A combinação entre fármacos que geram efeitos sinérgicos é outra estratégia que tem sido explorada para o tratamento de infecções por fungos e, em geral, esta forma de terapia pode resultar em: menor concentração dos fármacos utilizados para produzir o efeito desejado, aumentando assim a eficácia do tratamento por interação em diferentes alvos simultaneamente; redução de sua toxicidade por neutralizar ou eliminar efeitos adversos; além de diminuir a possibilidade de selecionar cepas resistentes (CHEN et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2005; YEH et al., 2009).

Dessa forma, nesse trabalho foi avaliado o potencial antifúngico do extrato da casca de *P. pluviosa* (sibipiruna) e sua combinação com antifúngicos comerciais sobre células planctônicas e sésseis de cepas de referência e isolados clínicos dos complexos *C. gattii* e *C. neoformans*.

Metodologia

1. Cultivo e manutenção dos microrganismos

C. gattii sorotipo B ATCC 24065, *C. gattii* sorotipo C ATCC 24066, *C. gattii* sorotipo B ATCC 32269, *C. gattii* sorotipo B ATCC 56990, *C. neoformans* sorotipo A ATCC 34872, *C. neoformans* sorotipo D ATCC 66031 (doados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Brasil) e quatro isolados clínicos de *C. gattii* e *C. neoformans* (Tabela 1) provenientes de infecções em seres humanos e pertencentes à coleção de

microrganismos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos – NIP5 foram cultivados em Sabouraud dextrose ágar (SDA) a 37 °C e armazenados a 4 °C. Para os experimentos, as células planctônicas foram obtidas a partir do cultivo em meio Sabouraud dextrose caldo (SD) sob agitação a 37 °C por 48 h.

2. Substâncias naturais e antifúngicos

Os extratos testados foram obtidos da casca de *P. pluviosa* segundo Bueno e colaboradores (2014) e fornecidas pelo Prof. João Carlos Palazzo de Mello da Universidade Estadual de Maringá. Para a avaliação antifúngica o extrato bruto (EB) e as frações etil acetato (FAc) e metanol/acetona (FC), foram diluídos em DMSO 10% e meio RPMI-MOPS obtendo-se as soluções estoque (4 mg/mL). Os antifúngicos fluconazol (FLZ) (Sigma, Brasil) e anfotericina B (ANB) (Sigma, Brasil) foram pesados e diluídos em água ultrapura (5 mg/mL) e DMSO 10% (1,6 mg/mL) respectivamente e mantidos a -20°C. Para os ensaios, os antifúngicos foram diluídos nas concentrações desejadas em meio RPMI-MOPS antes de sua utilização.

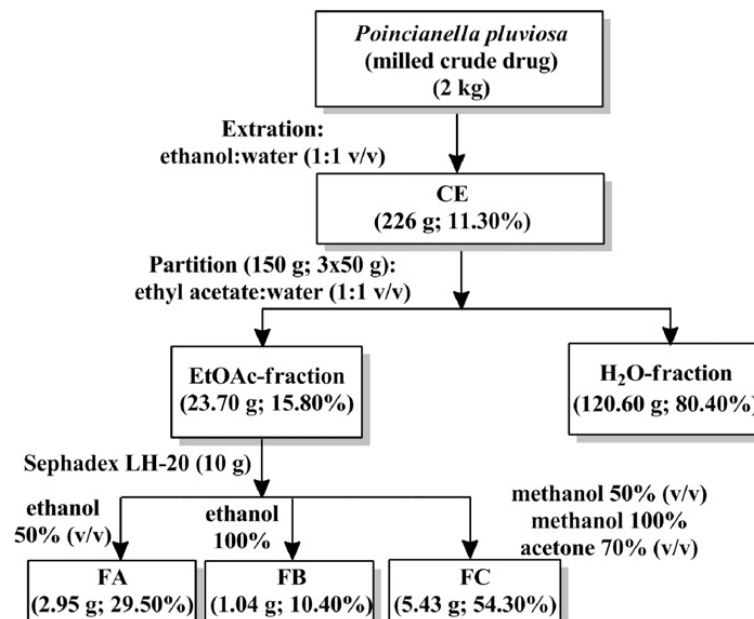


Figura 1 - Fracionamento do extrato aquoso da casca de *Poincianella pluviosa*.

Fonte: adaptado de Bueno et al., 2014.

3. Determinação da sensibilidade dos extratos sobre células planctônicas

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do EB, FAc e FC sobre as células planctônicas foi realizada pela técnica de microdiluição em

caldo, segundo normas preconizadas pelo CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* para leveduras [M27 documento A3 (CLSI, 2008)]. Para isso, foi realizada a diluição seriada (1:2) em meio RPMI-MOPS dos extratos (1 mg/mL - 1,95 µg/mL), FLZ (64 - 0,125 µg/mL) e ANB (16 - 0,031 µg/mL), seguida de uma alíquota de 100 µL da suspensão celular com 0,5 - 2,5x10³ células/mL nos poços teste e controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata e os controles positivos e negativos foram respectivamente performados com as amostras fúngicas sem tratamento e com *Candida parapsilosis* ATCC 22019 tratada com fluconazol. Definiu-se a CIM como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visual em 100% após incubação de 72 h, em comparação com as células planctônicas sem tratamento. Após esse período, 10 µL dos poços sem crescimento observado foram semeados em SDA e a placa incubada a 37°C por 48 h para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), como a concentração capaz de reduzir 99,9% a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

4. Efeito da combinação entre anfotericina B/fluconazol e FAc de *Poincianella pluviosa* sobre células planctônicas de *cryptococcus* spp.

A avaliação da combinação de FAc com ANB/FLZ foi realizada segundo Scott, Tariq e McCrory (1995) utilizando a metodologia de microdiluição em caldo *checkerboard*. Foram utilizadas as diluições seriadas (1:2) em meio RPMI-MOPS da FAc (1 mg/mL - 0,03 µg/mL) e de ANB (16 - 0,000001µg/mL) para gerar 192 combinações, e da FAc (1 mg/mL - 7,81 µg/mL) e de FLZ (64 - 0,125 µg/mL) para gerar 96 combinações. Posteriormente, o inóculo foi preparado de acordo com protocolo padrão (CLSI, 2008). Os resultados foram interpretados pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) através do cálculo: $FICI = FIC_{FAc} + FIC_{ANB/FLZ}$, em que FIC_{FAc} é o quociente da divisão entre a CIM_{FAc} da combinação pela CIM_{FAc} da substância sozinha e $FIC_{ANB/FLZ}$ é o quociente da divisão entre a $CIM_{ANB/FLZ}$ da combinação pela $CIM_{ANB/FLZ}$ sozinha. Os valores de FICI foram utilizados para classificar as combinações como: sinérgicas $\leq 0,5$, antagônicas ≥ 4 e indiferentes $> 0,5$ a 4. (Odds, 2003).

5. Efeito de FAc sozinha e em combinação com anfotericina B sobre a cinética de crescimento de células planctônicas

A cinética do tempo de morte foi determinada utilizando-se as CIMs obtidas para cada isolado no teste de microdiluição em caldo. Para isso, os inóculos foram ajustados à densidade celular de 10^3 células/mL em meio RPMI-MOPS e incubados com FAc sozinha e em combinação com ANB (células tratadas) ou apenas meio de cultura (curva de crescimento) pelos tempos de 0, 24, 48 e 72 h. Após esses períodos, uma alíquota (10 μ L) foi diluída seriadamente (1:10) em solução salina 0,85% esterilizada e 10 μ L inoculados em SDA. Após 48 h, foi realizada das UFC e o cálculo ajustado para obtenção dos valores de UFC/mL (ENDO et al., 2010).

6. Efeito de FAc sozinha e em combinação com anfotericina B sobre a viabilidade celular de células planctônicas

Avaliou-se a viabilidade das leveduras utilizando-se os corantes FUN1[®] e Calcofluor White[™] componentes do kit LIVE/DEAD[®] Yeast Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen). *C. gattii* ATCC 24065 foi tratada com FAc (125 μ g/mL), ANB (1 μ g/mL) e a combinação entre FAc e ANB (3,9/0,003 μ g/mL, respectivamente) por 24 h e o ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. As leveduras foram colocadas sobre uma lâmina, coberta por uma lamínula e analisadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX53F). O teste foi realizado com um controle positivo (sem tratamento).

7. Efeito de FAc sozinha e em combinação com anfotericina B sobre biofilmes

A formação de biofilme foi realizada segundo a metodologia proposta por Martinez e Casadevall (2006a). O ensaio foi realizado em meio líquido SD, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato a partir de um inóculo de 1×10^7 leveduras a 37 °C por 24 h sem agitação. Para avaliar a sensibilidade do biofilme maduro, o mesmo foi formado como descrito anteriormente, exceto que a placa foi incubada por 48 h a 37 °C sem agitação. Após o período de incubação, as células não aderidas foram removidas pela lavagem com salina 0,85 % esterilizada. Para avaliar o efeito FAc sozinha, uma alíquota de 200 μ L de meio RPMI-MOPS contendo diferentes concentrações (1 mg/mL – 31,25 μ g/mL) foi adicionada em todos os poços; enquanto que para o efeito da combinação entre FAc e ANB, uma alíquota de 200 μ L de meio contendo diferentes concentrações de FAc (1 mg/mL – 7,81 μ g/mL) e de ANB (16 - 0,007 μ g/mL) foram adicionadas e as placas incubadas

por mais 72 h para a formação do biofilme e 48 h para o biofilme maduro, ambos a 37 °C. Após o tratamento, as células não aderidas foram removidas pela lavagem com salina 0,85 % esterilizada. Determinou-se a viabilidade do biofilme formado pela medida da atividade metabólica celular utilizando o ensaio de redução do XTT (*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*). Assim, em cada poço da placa, incluindo o controle de esterilidade, foram adicionados 200 µL de solução de XTT/menadiona (1 mg/mL XTT em PBS 1% e 1 µM menadiona) e a placa foi incubada a 37°C por 5 h. Mediu-se a densidade óptica em espectrofotômetro (*Universal Microplate Reader* modelo *ELx 800*, *Bio-Tek Instruments* INC) em comprimento de onda de 492 nm. Determinou-se a CIM da combinação entre FAc e ANB para as células sésseis pela menor concentração da substância capaz de inibir 50% (SCIM₅₀) das células quando comparadas com o controle não tratado. Os resultados da combinação foram interpretados usando o FICI, como descrito anteriormente.

8. Efeito de FAc sozinha e em combinação com anfotericina B em células de mamíferos

Avaliou-se a citotoxicidade de FAc sozinha e em combinação com ANB sobre eritrócitos obtidos de um doador saudável. O sangue foi coletado, desfibrinado e as células lavadas com salina glicosilada (NaCl 0,85% acrescido de 5% de glicose). Em cada poço, foram inoculados eritrócitos (3%) com diferentes concentrações de FAc (1 mg/mL - 1,95 µg/mL) e de ANB (16 - 0,007µg/mL) sozinhas e em combinação. Utilizou-se Triton X-100 (1%) como controle positivo de hemólise e após incubação por 3 horas a 37 °C, a leitura do sobrenadante foi realizada a 550 nm (IZUMI *et al.*, 2012).

Células HeLa e macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em microplacas de poliestireno de 96 poços em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C durante 24 h. Após a incubação foi realizada uma lavagem com PBS para retirada das células não aderidas, adicionado novo meio contendo diferentes concentrações de FAc (1 mg/mL – 1,95 µg/mL) e de ANB (16 - 0,007µg/mL) sozinhas e em combinação e a cultura incubada durante 72 h. Determinou-se a viabilidade celular pelo método do MTT (*dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide*, Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. A

concentração de FAc necessária para inibir a proliferação de 50% e 90% das células (CC₅₀-CC₉₀) foi determinada pela análise de regressão linear. O valor da concentração citotóxica 90% após 72 h foi utilizada para calcular o índice de seletividade (IS) usando a seguinte equação: $IS = CC_{90}/CIM$.

9. Análises estatísticas

O *software* GRAPHPAD PRISM versão 6.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA) foi utilizado para as análises estatísticas. Para o teste de sensibilidade da FAc e combinação com ANB sobre biofilme, os valores médios foram testados por ANOVA One Way. Valores de p menor que 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

1. Extratos de *Poincianella pluviosa* apresentam atividade antifúngica em *C. gattii* e *C. neoformans*

Inicialmente foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato bruto (EB), fração etil acetato (FAc) e fração metanol/acetona (FC) da casca de *Poincianella pluviosa* sobre células planctônicas de *C. gattii* e *C. neoformans* (Tabela 1). Foi considerado que os extratos possuíam ação antifúngica quando a CIM obtida foi menor ou igual a 1000 µg/mL. Para o complexo *C. gattii*, os valores de CIM variaram de 62,5 a 1000 µg/mL, 31,25 a 125 µg/mL e 15,65 a 500 µg/mL para EB, FAc e FC respectivamente. Os valores de CFM para todos os isolados de *C. gattii* foram >1000 µg/mL, indicando que esses extratos possuem ação fungistática.

Com exceção de *C. neoformans* ATCC 34872, *C. neoformans* ATCC 66031 e o isolado clínico *C. neoformans* IV que exibiram valores de CIM que variaram de 125 a 1000 µg/mL para FAc e FC, os outros isolados deste complexo foram resistentes aos extratos (CIM/CFM > 1000 µg/mL).

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Cryptococcus spp.* às diferentes frações da casca de *Poincianella pluviosa*.

Isolado	CIM ₁₀₀ (µg/mL)		
	Extrato Bruto	Fração etil acetato	Fração FC
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	1000	125	250
<i>C. gattii</i> ATCC 24066	125	62,5	62,5
<i>C. gattii</i> ATCC 32269	62,5	31,25	62,5
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	1000	31,25	62,5
<i>C. gattii</i> I	1000	125	500
<i>C. gattii</i> II	62,5	31,25	15,62
<i>C. gattii</i> III	500	65,5	125
<i>C. gattii</i> IV	250	125	125
<i>C. neoformans</i> ATCC 34872	>1000	1000	125
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	>1000	1000	>1000
<i>C. neoformans</i> I	>1000	>1000	>1000
<i>C. neoformans</i> II	>1000	>1000	>1000
<i>C. neoformans</i> III	>1000	>1000	>1000
<i>C. neoformans</i> IV	1000	125	125

2. FAc em combinação com anfotericina B ou fluconazol apresenta interação sinérgica para a maioria das cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Com base nos valores de CIM optou-se por utilizar para os experimentos seguintes uma cepa de referência e um isolado clínico para as duas espécies, dentre elas: *C. gattii* ATCC 24065, *C. gattii* II, *C. neoformans* ATCC 66031 e *C. neoformans* IV. Seguindo o mesmo critério, FAc foi selecionada, uma vez que esta, dentre os três extratos testados, mostrou melhor efeito antifúngico, tendo um maior número de amostras sensíveis.

O efeito da combinação entre FAc com os antifúngicos comerciais fluconazol e anfotericina B foi avaliado utilizando o método de *checkerboard* (Tabela 2 e 3) e a natureza da interação entre os compostos foi definida pelo FICI que é o resultado da soma das FICs de cada um dos compostos. Para o cálculo das FICs foram determinadas previamente as CIM de fluconazol e anfotericina B para cada uma das cepas testadas (Tabela 2 e 3). As cepas analisadas foram classificadas

como sensíveis a anfotericina B (MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$) e resistentes ao fluconazol quando MIC ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ (PFALLER et al., 2005). A CIM de FLZ para *Candida parapsilosis* (2 $\mu\text{g/mL}$) está de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI, validando o teste (BONGOMIN et al., 2018; CLSI, 2008; ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

A combinação entre FAc e os antifúngicos comerciais resultou em interações sinérgicas para a maioria das cepas testadas.

Tabela 2 - Efeito do fluconazol (FLZ) e/ou fração etil acetato (FAc) da casca de *P. pluviosa* sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

Fungo	FAc ($\mu\text{g/mL}$)	FLZ ($\mu\text{g/mL}$)	FAc/FLZ ($\mu\text{g/mL}$)	FICI	Interação
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	125	64	125/0,125	1	Indiferente
<i>C. gattii</i> II	31,25	64	125/4	4,06	Antagonismo
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	1000	32	7,8/4	0,132	Sinergismo
<i>C. neoformans</i> IV	125	16	31,25/2	0,375	Sinergismo

FAc: fração etil acetato. FLZ: fluconazol. FAc/FLZ: fração etil acetato em combinação com fluconazol. FICI: índice de concentração inibitória fracionada. Valores de referência: Sinergismo: FICI $\leq 0,5$; Antagonismo: FICI ≥ 4 e Indiferente: FICI $> 0,5$ a 4 (ODDS, 2003).

Tabela 3 - Efeito da anfotericina B (ANB) e/ou fração etil acetato (FAc) da casca de *P. pluviosa* sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

Fungo	FAc ($\mu\text{g/mL}$)	ANB ($\mu\text{g/mL}$)	FAc/ANB ($\mu\text{g/mL}$)	FICI	Interação
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	125	1	3,9/0,003	0,034	Sinergismo
<i>C. gattii</i> II	31,25	2	3,9/0,003	0,125	Sinergismo
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	1000	1	3,9/0,003	0,069	Sinergismo
<i>C. neoformans</i> IV	125	1	3,9/0,003	0,034	Sinergismo

FAc: fração etil acetato. ANB: anfotericina B. FAc/ANB: fração etil acetato em combinação com anfotericina B. FICI: índice de concentração inibitória fracionada. Valores de referência: Sinergismo: FICI $\leq 0,5$; Antagonismo: FICI ≥ 4 e Indiferente: FICI $> 0,5$ a 4 (ODDS, 2003).

A combinação de FAc com fluconazol foi sinérgica somente para *C. neoformans* ATCC 66031 (FICI=0,132) e *C. neoformans* IV (FICI=0,375), enquanto que se observou efeito indiferente para *C. gattii* ATCC 24065 (FICI=1) e antagônico para *C. gattii* II (FICI=4,06). Mesmo sem sinergismo, os valores de CIM de fluconazol

reduziram 512 vezes e 16 vezes para *C. gattii* ATCC 24065 (64 µg/mL sozinho versus 0,125 µg/mL em combinação) e *C. gattii* II (64 µg/mL sozinho versus 4 µg/mL em combinação), respectivamente.

Para a combinação entre FAc e anfotericina B, os valores de FICI variaram de 0,034 a 0,125 para todas as cepas testadas, indicando efeito sinérgico. *C. gattii* II, apesar de não possuir o valor mais baixo de FICI, teve a CIM de anfotericina B reduzida em 666 vezes quando comparada com o tratamento sozinho (2 µg/mL sozinho versus 0,003 µg/mL em combinação). Por demonstrar efeito sinérgico sobre todos os isolados testados, a combinação entre FAc e anfotericina B foi escolhida para os testes seguintes.

3. FAc sozinha ou em combinação com anfotericina B exibe um efeito fungistático em células planctônicas de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Para a avaliação da cinética de crescimento de *Cryptococcus*, células planctônicas foram incubadas em presença de suas respectivas CIMs sozinhas (Figura 2) e em combinação com anfotericina B (Figura 3). As UFCs foram determinadas em diferentes intervalos de tempo por 72 h e os valores de UFC/mL de todas as cepas para os dois tratamentos tiveram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) a partir de 24 h quando comparados aos controles de crescimento. Todos os tratamentos inibiram o crescimento das células planctônicas das duas espécies analisadas, exibindo um efeito fungistático.

Após 24 h de tratamento com FAc, *C. gattii* ATCC 24065, *C. gattii* II e *C. neoformans* IV apresentaram diferença de aproximadamente 2 log₁₀ quando comparados com o crescimento do controle não tratado, e que se manteve após 72 h ($p < 0,05$). *C. neoformans* ATCC 66031 após 24 h de tratamento com FAc apresentou diferença de 1 log₁₀ quando comparado com o controle não tratado, entretanto, após 72 h a diferença aumentou para aproximadamente 4 log₁₀ ($p < 0,05$).

As cepas *C. gattii* ATCC 24065 e *C. gattii* II quando tratadas com a combinação de FAc e ANB por 48 h apresentaram diferença de aproximadamente 2 log₁₀ comparado com o controle não tratado ($p < 0,05$), enquanto para *C. neoformans* ATCC 66031 a diferença foi de 3 log₁₀ e para *C. neoformans* IV, 1 log₁₀ ($p < 0,05$). As cepas de referência após 72 h de tratamento aumentaram a contagem de UFC/mL, diminuindo a diferença entre o controle de crescimento. Não foi observada

morte celular para os tratamentos testados, confirmando o efeito fungistático da FAc e sua combinação com ANB.

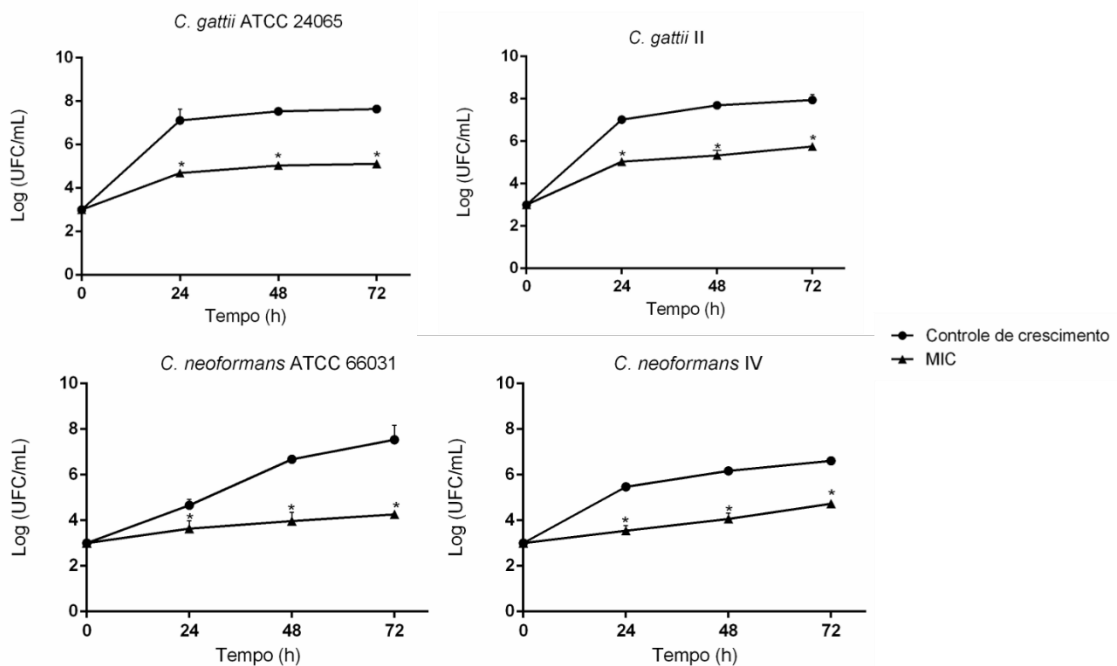


Figura 2 - Cinética de crescimento de *Cryptococcus* spp. na presença da CIM da fração etil acetato da casca de *Poincianella pluviosa*, nos períodos de 0, 24, 48 e 72h. Os valores são a média e o desvio-padrão representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$

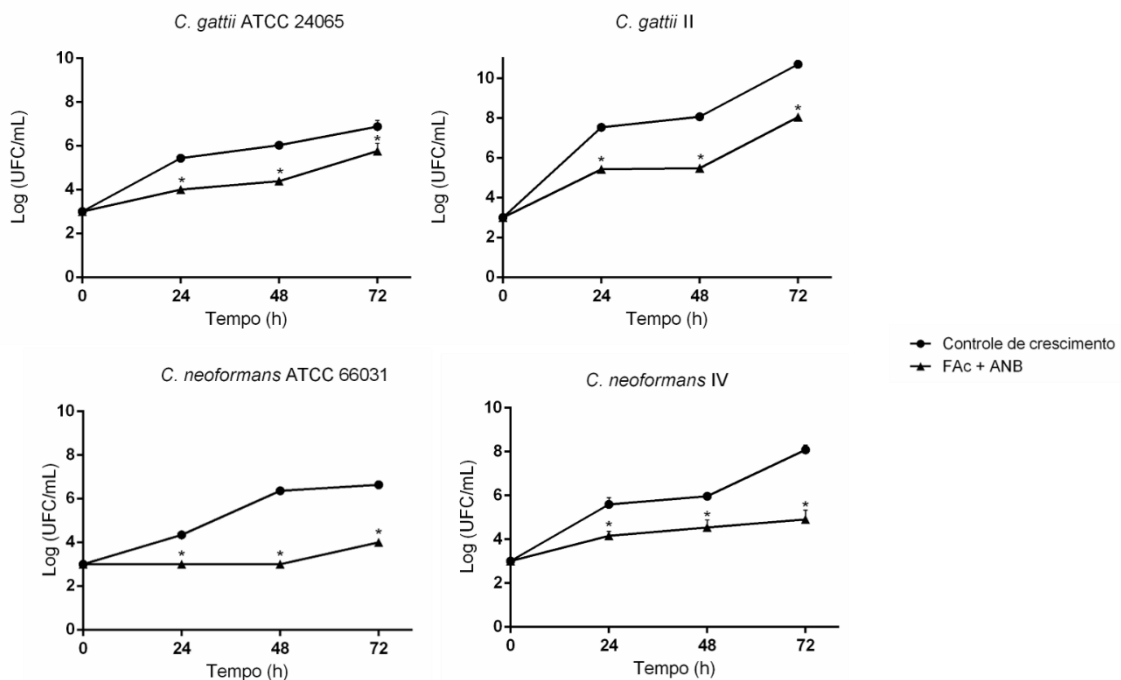


Figura 3 - Cinética de crescimento de *Cryptococcus* spp. em presença da CIM da combinação entre a fração etil acetato da casca de *Poincianella pluviosa* com o antifúngico anidoterina B, nos períodos de 0, 24, 48 e 72 h. Os valores são a média e o desvio-padrão representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$.

O efeito da FAc e sua combinação com anfotericina B sobre a viabilidade celular de *C. gattii* ATCC 24065 foi analisado por microscopia após utilização de corantes fluorescentes para marcação diferencial. As imagens mostram que leveduras não tratadas exibiram estruturas fluorescentes vermelhas em seu citoplasma, indicando células metabolicamente ativas com membrana citoplasmática intacta (Figura 3). Entretanto, as células tratadas com os compostos sozinhos ou em combinação exibiram coloração verde fluorescente, sugerindo células com pouca atividade metabólica. Além disso, a combinação mostra inibição semelhante aos tratamentos isolados, confirmando a ação sinérgica dos compostos, em concentrações menores.

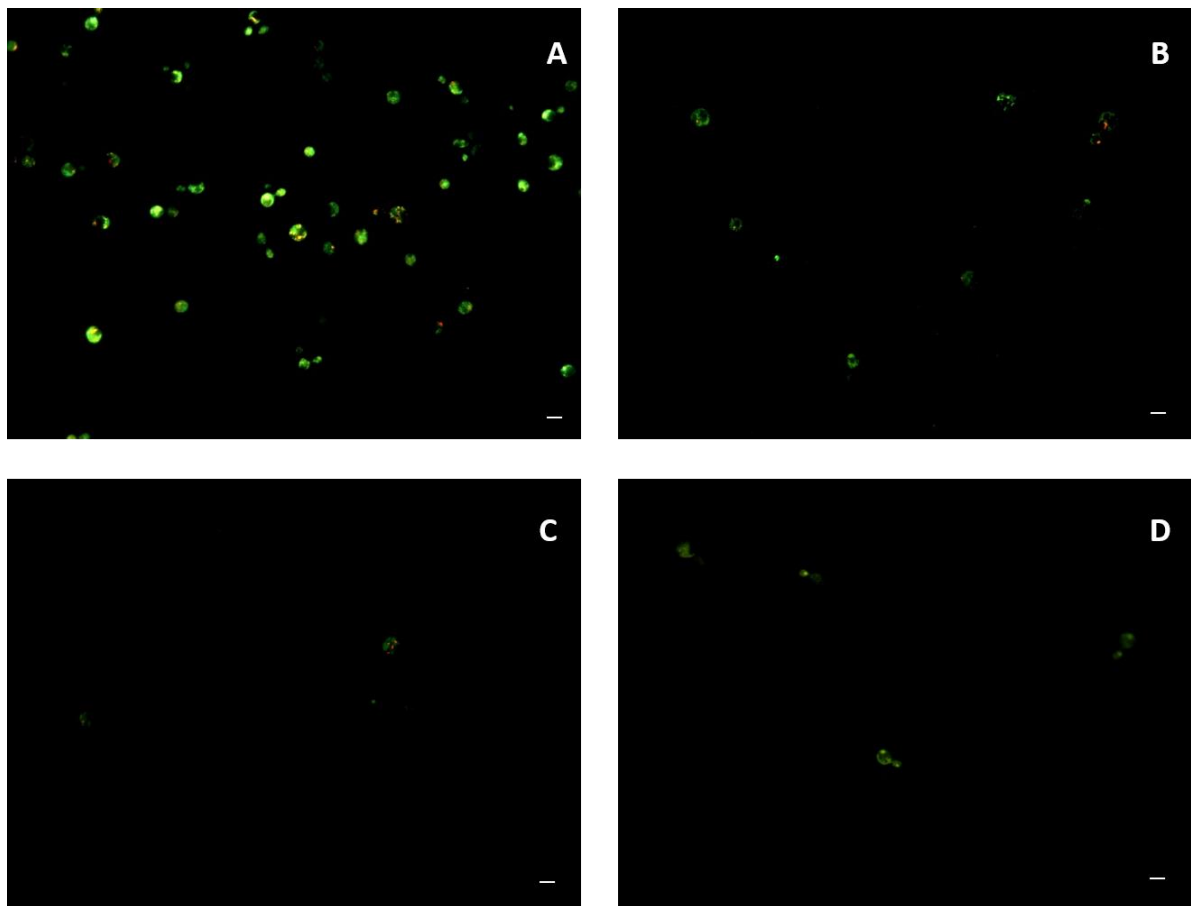


Figura 4 - Efeito da fração etil acetato *Poincianella pluviosa* e anfotericina B em *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Análise da viabilidade celular por microscopia de fluorescência utilizando FUN-1. As leveduras foram incubadas com ou sem as CIMs dos dois compostos isolados ou em combinação durante 24 h. Células com fluorescência amarelo-esverdeada difusa caracterizam células metabolicamente inativas e células contendo estruturas fluorescentes vermelhas em seus vacúolos representam leveduras metabolicamente ativas. (A) células viáveis não tratadas; (B) tratamento com 125 µg/mL de FAc; (C) tratamento com 1 µg/mL de anfotericina B; (D) tratamento com FAc/ANB (3,9/0,003 µg/mL).

4. FAc sozinho ou em combinação apresenta atividade anti-biofilme em *C. gattii* e *C. neoformans*.

Além da análise do efeito de FAc sobre células planctônicas, os tratamentos, sozinho e em combinação com antifúngicos, foram avaliados durante a formação do biofilme e sobre o biofilme formado de *Cryptococcus* spp. e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da atividade metabólica quando comparado com o controle não tratado.

Para a maioria das cepas houve significativa redução ($p < 0,05$) da formação do biofilme, mesmo nas menores concentrações de FAc utilizadas (Figura 5). A cepa que exibiu maior sensibilidade ao tratamento foi *C. gattii* ATCC 24065 em que houve redução de 31,2% e 57,9% de metabolismo do biofilme em presença de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. *C. neoformans* ATCC 66031 e os isolados clínicos *C. gattii* II e *C. neoformans* IV mostraram sensibilidade reduzida mesmo na maior concentração testada (1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentando 24,3, 12,2 e 8,4% de inibição do biofilme em formação, respectivamente (Figura 5).

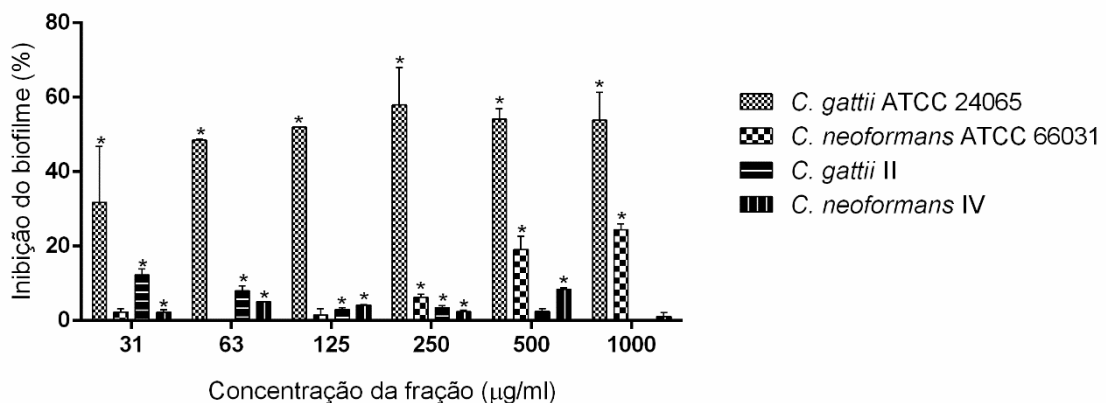


Figura 5 - Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada pelo método de redução do XTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 31,25 $\mu\text{g/mL}$). Valores são média \pm desvio padrão de dois experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa do metabolismo das células do biofilme tratadas com o extrato em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).

O biofilme maduro de *C. gattii* ATCC 24065 também foi o mais sensível à FAc com redução da atividade metabólica de 68,0% em presença de 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 6). Por outro lado, houve inibição de 18,6% do biofilme de *C.*

neoformans IV em presença de 125 µg/mL de FAc; e de 36,2% de *C. neoformans* ATCC 66031 em presença de 500 µg/mL de FAc.

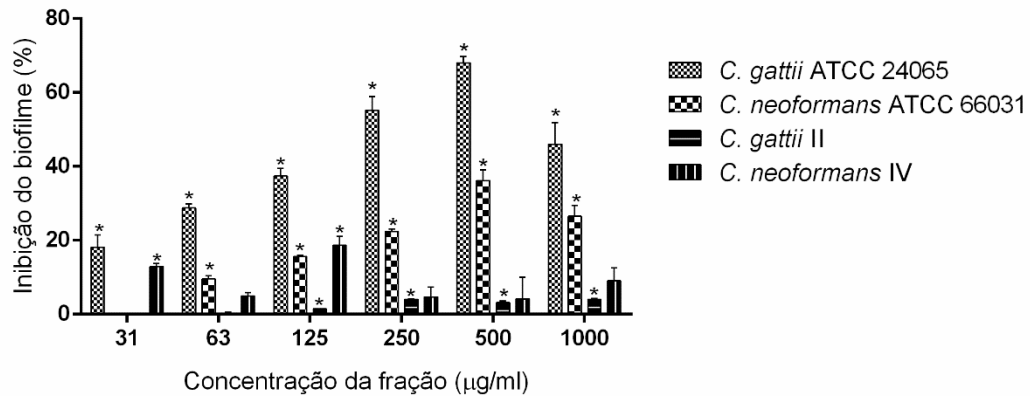


Figura 6 - Efeito da fração etil acetato de *Poincinella pluviosa* sobre células sésseis de *Cryptococcus* spp. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada pelo método de redução do XTT após 48 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 31,25 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de dois experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da atividade metabólica das células do biofilme tratadas com a fração etil acetato em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).

O efeito da combinação entre FAc e ANB B foi avaliado somente nos biofilmes de *C. gattii* ATCC 24065 e *C. neoformans* ATCC 66031, uma vez que tiveram maior sensibilidade ao tratamento com FAc sozinha. A combinação foi sinérgica para as duas espécies na fase de formação do biofilme tendo valores de FICI de 0,124 para *C. gattii* ATCC 24065 e 0,093 para *C. neoformans* ATCC 66031 (Tabela 4). As CIMs de FAc e ANB em combinação para *C. gattii* ATCC 24065 apresentaram redução de 16 vezes quando comparado com os valores sozinhos, enquanto que para *C. neoformans* ATCC 66031 houve redução de 32 vezes da CIM de FAc. O tratamento combinado sobre o biofilme formado, apesar de diminuir as CIMs de FAc para ambas as espécies foi considerado como indiferente.

Tabela 4 – Efeito da fração etil acetato em combinação com anfotericina B durante a formação e no biofilme formado de *Cryptococcus spp.* em superfície abiótica.

Espécie	FAC ($\mu\text{g/mL}$)	ANB ($\mu\text{g/mL}$)	FAC/ANB ($\mu\text{g/mL}$)	FICI	Interação
Biofilme em formação					
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	125	1	7,81/0,062	0,124	Sinergismo
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	>1000	1	31,25/0,062	0,093	Sinergismo
Biofilme formado					
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	500	0,5	125/0,25	0,75	Indiferente
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	>1000	1	>500/>1	1,5	Indiferente

Concentração inibitória séssil 50% analisada após 72h de tratamento. FAC: fração etil acetato. ANB: anfotericina B. FICI: índice de concentração inibitória fracionada. Valores de referência: Sinergismo - FICI $\leq 0,5$; Antagonismo - FICI ≥ 4 e Indiferente - FICI $> 0,5$ a 4 (ODDS, 2003).

5. A combinação de FAC e anfotericina B reduz a toxicidade para células de mamíferos.

O efeito de FAC e sua combinação com ANB foi avaliado em eritrócitos humanos, células HeLa (Figura 7) e macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 8). A porcentagem de hemólise para as concentrações testadas variou de 21,2 a 0,2% para FAC; 26,6 a 0,5% para anfotericina B e 3,7 a 0% para a associação FAC/ANB (dados não mostrados). Os valores de hemólise mostram que a associação entre FAC e ANB reduz a capacidade hemolítica para 4% (dados não mostrados).

As concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) e 90% (CC₉₀) de FAC para os eritrócitos foram CC₅₀ = 1379 $\mu\text{g/mL}$ e CC₉₀ = 2482,2 $\mu\text{g/mL}$. Para as células HeLa, os valores obtidos foram CC₅₀ = 115,9 $\mu\text{g/mL}$ e CC₉₀ = 268,7 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para os macrófagos peritoneais foram CC₅₀ = 138,3 $\mu\text{g/mL}$ e CC₉₀ > 1000 $\mu\text{g/mL}$. Com esses dados foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que leva em consideração a CC₉₀ e as CIM das cepas testadas (Tabela 5). Os melhores IS foram para *C. gattii* II com: IS = 79,43 considerando CC₉₀ dos eritrócitos humanos; IS = 8,59 considerando CC₉₀ das células HeLa e IS = 32 considerando CC₉₀ dos

macrófagos, indicando que a FAc é mais tóxica para a levedura do que para as células mamíferas.

A combinação entre FAc e ANB em macrófagos peritoneais não mostrou efeito citotóxico, conforme verificado pela viabilidade celular que permaneceu acima de 50% após 72 h de tratamento (dados não mostrados).

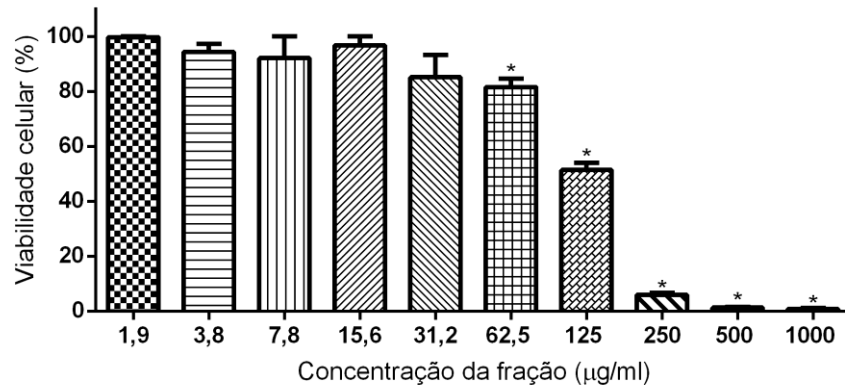


Figura 7 - Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a viabilidade celular de células HeLa. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 1,95 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de três experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da viabilidade das células tratadas com a fração em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).

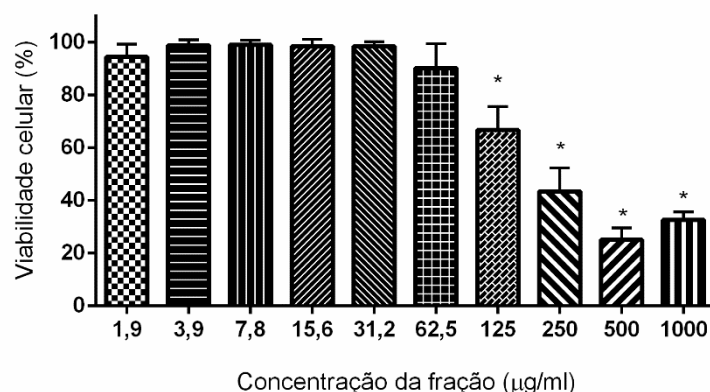


Figura 8 – Efeito da fração etil acetato de *Poincianella pluviosa* sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT após 72 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações de FAc (1000 – 1,95 µg/mL). Valores são média ± desvio padrão de três experimentos. Os asteriscos indicam redução significativa da viabilidade das células tratadas com a fração em comparação com células não tratadas (* $p < 0,05$).

Tabela 5 – Índice de seletividade da fração etil acetato para células mamíferas e *Cryptococcus* spp.

Isolado	Índice de seletividade ^a		
	Eritrócitos humanos	Células HeLa	Macrófagos peritoneais ^b
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	19,85	2,15	8
<i>C. gattii</i> II	79,43	8,59	32
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	2,48	0,27	1
<i>C. neoformans</i> IV	19,85	2,15	8

^aÍndice de seletividade (IS) = CC₉₀/CIM. ^bObtidos de camundongos BALB/c.

Discussão

O controle de *Cryptococcus* spp. no hospedeiro é de suma importância para o sucesso do tratamento da criptococose. Entretanto, os antifúngicos comumente utilizados para as terapias de indução e manutenção apresentam toxicidade devido ao uso prolongado, que em geral é requerido (BICANIC et al., 2015). Além disso, embora a maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. permaneça sensível aos fármacos utilizados, diversos estudos na literatura relatam o isolamento crescente de cepas resistentes ou com sensibilidade reduzida (GUPTA et al., 2018; SANGALLI-LEITE et al., 2011). Como alternativas, estudos sobre produtos naturais com potencial antifúngico e toxicidade reduzida para células animais têm sido conduzidos e se mostram cada vez mais promissores na formulação de novos agentes terapêuticos (COLALTO, 2018).

Vários estudos mostraram que extratos obtidos a partir de diferentes partes de plantas inibem o crescimento de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp., tais como as folhas de *Carica papaya*, *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* e das cascas de *Curatella americana*, *Plathymenia reticulata* B e *Sclerolobium aureum* (Tul.) Benth. (BASKARAN et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; TOLEDO et al., 2011; TOLEDO et al., 2015).

O presente trabalho mostra que os três extratos testados inibem o crescimento de todas as cepas e isolados clínicos de *C. gattii* e que FAc apresentou os menores valores de CIM. Por outro lado, somente três isolados de *C. neoformans* foram inibidos pelo tratamento com FAc e FC, indicando que esta espécie possui

sensibilidade reduzida aos extratos testados. Alguns estudos mostram o potencial antifúngico de determinadas espécies do gênero *Poincianella* (*Caesalpinia*). Extrato bruto obtido a partir da casca da espécie *Caesalpinia ferrea* Martius mostrou efeito antifúngico *in vitro* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis* (FERREIRA et al., 2013). As frações etil acetato, éter de petróleo e aquosa, obtidas de sementes de *Caesalpinia bonducella*, apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* e *Candida albicans* (SHUKLA et al., 2011). A atividade antimicrobiana de *P. pluviosa* foi estudada sobre o protozoário *Plasmodium* spp. mas o seu efeito sobre os complexos *C. gatti* e *C. neoformans* e sua possível associação com antifúngicos comerciais permaneciam desconhecidos (DEHARO et al., 2001; KAYANO et al., 2011).

Neste trabalho, foi avaliado a combinação de FAc com ANB e FLZ sobre células planctônicas. Os dois tratamentos apresentaram sinergismo com diminuição, no mínimo, de oito vezes da CIM de FAc. Ambas as combinações foram sinérgicas contra as cepas de *C. neoformans* que se mostraram pouco sensíveis quando tratadas com a fração sozinha. A combinação com ANB mostrou potente efeito sinérgico, com diminuição significativa das CIMs, contra todas as leveduras testadas.

Vários estudos mostram que a combinação de antifúngicos com produtos naturais pode diminuir os valores de suas CIM. Liu e colaboradores (2014) mostraram que a associação de glabridin, isoflavona isolada de *Glycyrrhiza glabra* com FLZ exibiu efeito sinérgico contra *Candida albicans*, *C. neoformans* e *Candida tropicalis*. Faria e colaboradores (2011) observaram o efeito sinérgico entre a combinação de timol com ANB e 2,5-dihidroxibenzaldeído com FLZ sobre *Candida albicans* e *C. neoformans*. A combinação entre o monoterpenoide geraniol isolado do óleo essencial de *Ocimum basilicum* com FLZ também inibiu o crescimento de *Candida albicans* e *C. neoformans* (CARDOSO et al., 2016). A fração etil acetato da casca de *P. pluviosa* em combinação com fluconazol mostrou efeito sinérgico sobre células planctônicas e durante a formação de biofilme de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (SANTOS, 2018).

A cinética do tempo de morte e o ensaio da viabilidade celular confirmou a ação fungistática da FAc, como previamente indicado pela determinação da CFM. Interessantemente, a combinação em concentração sinérgica a FAc com

ANB resultou em um efeito fungistático. Possivelmente a ação fungicida da anfotericina B não foi evidenciada, uma vez que seu FIC é muito baixo quando comparado com sua CFM (0,003 µg/mL em combinação *versus* 2 µg/mL sozinha).

A formação de biofilme por *Cryptococcus* spp. pode ocorrer em superfícies abióticas e bióticas e está associada com menor sensibilidade aos tratamentos disponíveis e a evasão da resposta imunológica do hospedeiro, gerando infecções persistentes (MARTINEZ; FRIES, 2010). Os resultados deste trabalho mostram que a fração etil acetato além de inibir o crescimento das células planctônicas de *Cryptococcus* spp. também é capaz de reduzir a atividade metabólica das células sésseis durante a formação de biofilme e do biofilme formado das cepas testadas, exibindo melhor efeito sobre o biofilme maduro de *C. gattii* ATCC 24065. Poucos trabalhos mostram a atividade de produtos naturais sobre os biofilmes de *Cryptococcus* spp.. No trabalho realizado por Almeida-Apolonio e colaboradores (2018), o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (10 mg/mL) foi capaz de reduzir em 42,6% a formação do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990. Nessa mesma concentração, o extrato foi capaz de inibir 15,4% do biofilme maduro.

A combinação entre fármacos já é utilizada na prática clínica para o tratamento de tuberculose, câncer e criptococose (CAMINERO et al., 2010; KEITH; BORISY; STOCKWELL, 2005; WHO, 2018). As interações sinérgicas entre os compostos são de amplo benefício devido ao aumento do espectro de ação, maior tolerância e diminuição da possibilidade de cepas resistentes, uma vez que a célula terá dificuldade de criar mecanismos para se proteger de dois fármacos diferentes (ZIMMERMANN; LEHÁR; KEITH, 2007). Extratos de plantas são constituídos por uma grande reserva de substâncias que podem apresentar sinergismo ou outras interações benéficas quando combinadas com antimicrobianos, assim como evidenciado pela associação entre a fração etil acetato com os antifúngicos comerciais fluconazol e anfotericina B.

Os diferentes efeitos terapêuticos apresentados por extratos de plantas devem-se às características fitoquímicas e farmacocinéticas distintas, que podem depender do local de origem, parte da planta utilizada, genótipo e período de colheita (PARLATAN; SARIÇOBAN; ÖZCAN, 2009; TAN et al., 2008).

Bueno e colaboradores (2014) detectaram vários polifenóis, dentre eles ácido gálico e taninos hidrolisados, a partir do extrato hidroalcoólico e da fração

etil acetato de *P. pluviosa* que apresentaram a capacidade de estimular a produção de fibras colágenas e reepitelização de feridas, além de possuir efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras (BUENO et al., 2014; CARVALHO et al., 2018). Outros estudos mostraram a presença, na casca desta árvore, de triterpenos e saponinas, substâncias com atividade antimicrobiana em bactérias e fungos (CÖR; KNEZ; HRNČIČ, 2018; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; TAGOUSOP et al., 2018). Recentemente, Souza e colaboradores (2018) também detectaram alto conteúdo fenólico a partir da fração etil acetato das folhas desta espécie.

A extração realizada com o solvente etil acetato para a planta *Cochlospermum regium* também apresentou diversos compostos fenólicos como flavonoides, taninos e ácido gálico, sendo este último com potente atividade antifúngica relatada (ALVES et al., 2014; CARVALHO et al., 2018). O mecanismo de ação proposto para o ácido gálico é por alteração na estrutura da membrana celular, inibindo o processo de brotamento (ENDO et al., 2010; GHANNOUM; RICE, 1999; KIM et al., 2009). Endo e colaboradores (2010) isolaram um composto fenólico de alto peso molecular na fração acetato de etila de *Punica granatum* com forte inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, além de efeito sinérgico com fluconazol, sugerindo que o composto extraído altera a permeabilidade da membrana das leveduras resultando em morte celular. Ainda não se sabe a constituição fitoquímica da fração etil acetato, mas os resultados mostraram que seu efeito sozinha ou em combinação com ANB foi capaz de reduzir o metabolismo das células planctônicas e sésseis de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Conclusão

Os resultados deste estudo mostraram que a fração etil acetato da casca de *P. pluviosa* tem um efeito antifúngico contra diferentes cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*. Além disso, sua combinação com anfotericina B mostrou potente interação sinérgica reduzindo as concentrações inibitórias de ambos os compostos de maneira significativa tanto para células planctônicas quanto durante a formação de biofilme. Os resultados apresentados expandem o conhecimento sobre as propriedades da casca dessa leguminosa, sendo o primeiro trabalho a descrever o seu efeito antifúngico, assim como a sua combinação com fármacos comerciais sobre *Cryptococcus* spp.

Referências

- ALMEIDA-APOLONIO, A. A. et al. Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves. **Scientific World Journal**, p.1-7, 2018.
- ALVES et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139-146, 2014.
- ARIKAN, S.; REX, J. H. Lipid-based antifungal agents: current status. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 5, p. 393–415, 2001.
- BASKARAN, C. et al. The efficacy of *Carica papaya* leaf extract on some bacterial and a fungal strain by well diffusion method. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. S658-S662, 2012.
- BICANIC, T. et al. Toxicity of amphotericin B deoxycholate-based induction therapy in patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7224–7231, 2015.
- BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, n. 61, n. 5, p. 290-297, 2018.
- BRATTON, E. et al. Comparison and temporal trends of three groups with Cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2012.
- BUENO, F. G. et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252–260, 2014.
- CAMINERO, J et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drugresistant tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 621-629, 2010.
- CARDOSO, N. N. R. et al. Synergism effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-12, 2016.
- CARVALHO, R. S. et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 181-187, 2018.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *C. neoformans* Infection Statistics. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>>. Acesso em: 9 out. 2017.
- CHEN, X. et al. ASDCD: Antifungal Synergistic Drug Combination Database. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.

- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Third Informational Supplement. **CLSI document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 413–425, 2018.
- CÖR, D.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M. K. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. **Molecules**, v. 23, n. 649, p. 1-21, 2018.
- DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.
- DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.
- ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 2010.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3107-3113, 2012.
- FARIA, N. C. G. et al. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 506-513, 2011.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008-2013, 2013.
- FINDLEY, K. et al. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukariotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353–361, 2009.
- FLORES, Y; VILA, J.; ALMANZA, G.R. Secondary Metabolites From *Caesalpinia pluviosa*. **Revista Boliviana de Química**, v. 23, 2006.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology**, v. 12, v. 4, p. 501-517, 1999.
- GUPTA, P. K. et al. A rare case of amphotericin B resistant cryptococcal meningitis in a HIV non-reactive immunocompetent patient. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 12, n. 3, p. 3-5. 2018.
- IZUMI, E. et al. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.
- KAYANO, A. C. A. V. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. **Malaria Journal**, v. 10, p. 1-11, 2011.

- KEITH, C. T.; BORISY, A. A.; STOCKWELL, B. R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.
- KIM et al. Activity and mode of action of silver-nanoparticles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, n. 39, p. 235-242, 2009.
- LIU, W. et al. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1-10, 2014.
- LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–33, 2006a.
- MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: Relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106–117, 2016.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- MUKHERJEE, P.K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 163-194, 2005.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 1 p. 1, 2003.
- PARLATAN, A.; SARIÇOBAN, C.; ÖZCAN, M. M. Chemical composition and antimicrobial activity of the extracts of *Keefe cumin* (*Lasium trilobum* L.) fruits from different regions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n. 60, v. 1, p. 606-617, 2009.
- PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 2009.
- PFALLER, M. A. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163-2167, 2005.
- PICHARDO, A. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia melanadenia* (Rose) Standl (Fabaceae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 11, p. 186-193, 2013.
- PULIPATHI, S. et al. Evaluation of antibacterial activity of fresh and dry flower extracts of *Caesalpinia pulcherrima* L. **International Journal of Biological and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 360-365, 2012.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457-467, 2011.

SANTOS, P. M. C. S. **Efeito do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* e fluconazol sobre células planctônicas e sésseis de *Candida* spp.** 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

SCOTT, E. M.; TARIQ, V. N.; MCCRORY, R. M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2610-2614, 1995.

SHARMA, M. et al. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 5, p. 570–578, 2010.

SHUKLA, S. et al. Preliminary phytochemical and antifungal screening of various organic extracts of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 4, p. 6384-6389, 2011.

SLOAN, D.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 13, n. 6, p. 169-182, 2014.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections: Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p 1-34, 2013.

TAGOUSOP, C. N. et al. Antimicrobial activities of saponins from *Melanthera elliptica* and their synergistic effects with antibiotics against pathogenic phenotypes. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 97, p. 1-9, 2018.

TAN, X. J. et al. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in Herba *Artemisia scopariae* (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 847-853, 2008.

TOLEDO, C. E. M. et al. Antifungal properties of crude extracts, fractions, and purified compounds from bark of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) against *Candida* species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

TOLEDO, C. E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420–425, 2011.

World Health Organization. Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: WHO; 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260399/9789241550277-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 de outubro, 2018

YEH, P. J. et al. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 460-466, 2009.

YODSAOUE, O. et al. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1756–1764, 2010.

ZIMMERMANN, G. R.; LEHÁR, J.; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. ½, p. 34-42, 2007.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a fração etil acetato da casca de *P. pluviosa* tem um efeito antifúngico contra diferentes cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*. Além disso, sua combinação com anfotericina B mostrou potente interação sinérgica reduzindo as concentrações inibitórias de ambos os compostos de maneira significativa tanto para células planctônicas quanto durante a formação de biofilme. Os resultados apresentados expandem o conhecimento sobre as propriedades da casca dessa leguminosa, sendo o primeiro trabalho a descrever o efeito antifúngico e combinação com antifúngicos comerciais sobre *Cryptococcus* spp.