



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO

VIVIANNY APARECIDA QUEIROZ FREITAS

Ação da curcumina e morina em leveduras do complexo
Cryptococcus neoformans

Goiânia
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

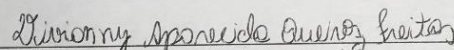
Nome completo do autor: Vivianny Aparecida Queiroz Freitas

Título do trabalho: Ação da curcumina e morina em leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 01/ 06 /2017

I Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

VIVIANNY APARECIDA QUEIROZ FREITAS

Ação da curcumina e morina em leveduras do complexo
Cryptococcus neoformans

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

Goiânia

2017

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

Aparecida Queiroz Freitas, Vivianny

Ação da curcumina e morina em leveduras do Complexo
Cryptococcus neoformans [manuscrito] / Vivianny Aparecida Queiroz
Freitas, Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes. - 2017.
CXIII, 113 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Biologia, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Curcumina. 2. Morina. 3. *Cryptococcus neoformans*. 4.
Flavonoides. I. de Fátima Lisboa Fernandes, Orionalda. II. de
Fátima Lisboa Fernandes, Orionalda, orient. III. Título.

CDU 582.28

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE VIVIANNY APARECIDA QUEIROZ FREITAS - Aos doze dias do mês de maio do ano de 2017 (12/05/2017), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. ORIONALDA DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES, LÚCIA KIOKO HASIMOTO E SOUZA e MÁRCIA SOUZA CARVALHO MELHEM, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AÇÃO DA CURCUMINA E MORINA EM LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **VIVIANNY APARECIDA QUEIROZ FREITAS**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. ORIONALDA DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

Profa. Dra. Márcia Souza Carvalho Melhem

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 9 h 11:30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Profa. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Márcia Souza Carvalho Melhem (IAL/SP)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Orionalda
Lúcia
Marcia
Kariny

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Vivianny Aparecida Queiroz Freitas

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

Membros:

1. Prof^a. Dr^a Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

2. Prof^a. Dr^a Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem

Data: 12/05/2017

***"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes".
(Cora Coralina)***

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, supremo e causa primária de todas as coisas. Por me permitir viver, ter saúde, ter minha família, meus amigos e por me guiar nesta incrível jornada chamada pós-graduação. E a minha família, principalmente meus pais Adair e Magda que tanto me apoiaram durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e não somente nestes últimos anos, mas em todos os momentos, Ele é o maior mestre que alguém pode ter.

A professora Dra. Orionalda de Fátima pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho, por ser tão atenciosa, dedicada, principalmente pelo seu carinho comigo durante todo esse tempo. Sem ela teria sido muito mais difícil.

As professoras do laboratório de micologia: Dra. Maria do Rosário, que concedeu a oportunidade estar neste laboratório e ter me indicado uma orientadora sem igual. A professora Dra. Lucia Kioko, que sempre esteve disposta a ajudar, fez correções fundamentais para conclusão do trabalho. A Professora Dra. Carolina Rodrigues, por feito considerações importantes na minha qualificação.

A professora Dra Vália de Oliveira por ter me doado os compostos e ter contribuído tanto em minha qualificação.

A professora Dra Marcia de Souza Carvalho Melhem por ter aceito o convite para participar da banca examinadora.

Aos meus pais Adair e Magda, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço, por toda dedicação assim como por todos os ensinamentos. Ensinar-me a acreditar em meus sonhos, a lutar pelos meus ideais, encorajando-me a extrair o muito de onde não havia nada, vencendo as dificuldades passadas para hoje ser quem sou, e vitoriosa em minha vida. E também o meu irmão preferido Marcos, meu carinho pela amizade e companheirismo.

Ao meu noivo Bruno por todos os conselhos, toda paciência e todo amor dado a mim durante esta jornada, obrigada por estar o meu lado neste momento tão importante em minha vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Hildene, Andressa, Fernanda, Thaisa, Lucas, Fabíola, Raíssa, Nathane, Maísa e Cícero, por me auxiliarem nos experimentos, e tornarem os meus dias mais agradáveis, transformando todos os desastres em piadas.

Ao mestre e amigo Dr. Fábio Silvestre, que é um exemplo de pessoa e professor, um exemplo a ser seguido.

As colegas Lívia e Meire por auxiliarem na realização da citometria de fluxo, muito obrigada meninas.

A Universidade Federal de Goiás, em especial ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e ao Programa de Pós Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro pela disponibilidade de toda estrutura e oportunidade para cursar o mestrado.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO.....	ix
TABELAS	xii
FIGURAS	xiii
GRÁFICOS.....	xvi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1. Aspectos gerais.....	3
1.2. Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	4
1.3. Aspectos morfológicos e biológicos das espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	6
1.4. Fatores de virulência.....	7
1.5. Criptococose	12
1.6. Epidemiologia.....	13
1.7. Agentes antifúngicos e tratamento	16
1.8. Produtos naturais e bioativos	20
1.8.1. Flavonoides	21
1.8.1.1. Curcumina.....	22
1.8.1.2. Morina.....	24
1.9. Avaliação da atividade antimicrobiana	25
1.10. Citometria de fluxo	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32

4	MÉTODOS	33
4.1.	Microrganismos	33
4.2.	Compostos naturais e fármacos	34
4.3.	Testes de Suscetibilidade <i>in vitro</i>	34
4.3.1.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	34
4.3.2.	Preparo dos antifúngicos e compostos bioativos	34
4.3.3.	Preparação do inóculo	35
4.3.4.	Procedimento do teste	35
4.3.5.	Leitura e Interpretação	36
4.3.6.	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	36
4.4.	Avaliação da associação entre os compostos curcumina e morina com fluconazol e anfotericina	37
4.4.1.	Preparação do inóculo	38
4.4.2.	Procedimento do teste “Checkerboard”	38
4.4.3.	Leitura dos resultados	39
4.5.	Efeito dos compostos sobre a cinética de crescimento das leveduras	40
4.6.	Estudo da micromorfologia das leveduras	41
4.7.	Avaliação da citotoxicidade	42
4.8.	Doseamento do ergosterol	43
4.9.	Avaliação da ação dos compostos sobre a membrana das leveduras por citometria de fluxo	45
4.9.1.	Preparo do composto	45
4.9.2.	Preparo do inóculo	46
4.9.3.	Procedimento do teste	46
4.9.4.	Controle de qualidade	47
4.10.	Análise estatística	47
5	RESULTADOS	48
5.1.	Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> CIM e CFM	48
5.2.	Associação entre os compostos curcumina e morina aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B	50

5.3.	Efeito dos compostos sobre a cinética de crescimento das leveduras	52
5.4.	Estudo da micromorfologia das leveduras	53
5.5.	Avaliação da citotoxicidade	54
5.6.	Doseamento do ergosterol	54
5.7.	Avaliação da ação dos compostos sobre a membrana das leveduras por citometria de fluxo.....	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	95
	Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE	95
	Anexo 2- Valores da CIM dos compostos e antifúngicos, valores de ICIF e interpretação do teste de associação.	96

TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e fungicida ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos morina e curcumina sobre os 20 isolados de leveduras do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	49
Tabela 2. Variação da Concentração inibitória mínima, (CIM50 e CIM90) e variação da concentração fungicida mínima da curcumina e morina.	49
Tabela 3. Quantidade de leveduras viáveis de por campo (objetiva de 40X) no estudo da micromorfologia	53
Tabela 4. Dosagem do ergosterol <i>C. gattii</i> ATCC 24065 sob a ação dos compostos curcumina e morina e antifúngico fluconazol	55

FIGURAS

Figura 1. Classificação das espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> considerando os sorotipos, tipos moleculares e distribuição geográfica. Fonte: Adaptada de Ma & May (2009) e Cogliati (2013).	5
Figura 2. Leveduras uniformemente globosas de parede rugosa de <i>Cryptococcus neoformans</i> (A), Células globosas e ovaladas de <i>Cryptococcus gattii</i> (B), Forma teleomórfica dos agentes da criptococose <i>Filobasidiella neoformans</i> (C), e <i>F. bacillispora</i> (D).	7
Figura 3. (A) Cápsula, constituída de GXM, GalXM e manoproteína através de tinta da china. (B) Cápsula de <i>C. neoformans</i> com fibrilas de polissacarídeo por microscopia eletrônica de varredura. (C) Unidades de glucuroxilomanana de <i>C. neoformans</i> caracterizando os diferentes sorotipos. (1) sorotipo D; (2) sorotipo A; (3) sorotipo B; (4) sorotipo C. (Adaptado de kwon-Chung et al. 2014).	9
Figura 4. Esquema da via Biosintética de melanina por <i>C. neoformans</i>	10
Figura 5. Morfologia de <i>C. neoformans</i> . (A) Macroscopia da colônia de <i>C. neoformans</i> em meio L-DOPA. (B) microscopia de <i>C. neoformans</i> melanizados visualizados com tinta nanquim (40x). Fonte: Arquivo pessoal.....	11
Figura 6. Ciclo de infecção das espécies do complexo <i>C. neoformans</i> : células criptocócicas do meio ambiente são inaladas pelo hospedeiro, prolifera no pulmão e dissemina pelo sangue para o cérebro (Adaptado de Kwon-Chung et al. 2014).	13
Figura 7. Principais classes de antifúngicos e seus respectivos sítios de ação na célula.....	17
Figura 8. Fórmula estrutural de várias classes de flavonoides (Adaptado de Tsao (2010).	22

Figura 9. Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da curcumina (Adaptado de Palve et al. 2012).	23
Figura 10. Estrutura química da curcumina, desmetoxicurcumina e bis-desmetoxicurcumina mostrando o número de grupos metóxi (CH ₃) de cada composto (Adaptado de Lee et al. (2013).	24
Figura 11. Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da morina (Adaptado de Zhang 2010).....	25
Figura 12. Representação esquemática de um citômetro de fluxo (Adaptada de Jahan-Tigh et al. 2012).	29
Figura 13. Placa de microtitulação esquematizando o procedimento do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo (CLSI 2008, CLSI 2012). Fonte: Autoria própria.....	36
Figura 14. Esquema representativo da determinação da CFM. Fonte: Autoria própria.	37
Figura 15. Esquema da associação dos compostos com e antifúngicos. Fonte: autoria própria.	39
Figura 16. Procedimento utilizado para cinética de crescimento fúngico.	40
Figura 17. Realização do teste de micromorfologia.	41
Figura 18. Ensaio de toxicidade em hemácias.	43
Figura 19. Técnica de doseamento do ergosterol.	45
Figura 20. Procedimento de avaliação de lesão de membrana por citometria de fluxo.....	47
Figura 21. Viabilidade fúngica de isolados <i>C. gattii</i> ATCC 24065 sob efeito da curcumina (A) e morina (B) em suas concentrações 4x CIM, 2X CIM, CIM, e ½ CIM, e em (C) ambos os compostos e controle na concentração inibitória mínima.	52

Figura 22. <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 após 72 horas de exposição aos compostos e antifúngico. A: controle do inóculo, B: controle AMB CIM, C: curcumina CIM, D: morina CIM . Objetiva 40x (aumento 100x). Fonte: arquivo pessoal.....	53
Figura 23. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de <i>C. gattii</i> ATCC 24065, sem tratamento (a) e após tratamento com o composto curcumina nas concentrações (µg/mL) 16 (b), 32(c).	55
Figura 24. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de <i>C. gattii</i> ATCC 24065, sem tratamento em (a) e após tratamento com o composto morina nas concentrações (µg/mL) 16 (b), 32(c).	55
Figura 25. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de <i>C. gattii</i> ATCC 24065 sem tratamento em (a) e após tratamento com o antifúngico fluconazol (A) nas concentrações (µg/mL) 1(b), 2(c). (B) Comparação entre as absorbâncias nas concentrações inibitórias mínimas da morina (b) e curcumina (c) e fluconazol (d).....	56
Figura 26. Histogramas mostrando as células de <i>C. gattii</i> ATCC 24065. (A) Controle de autofluorescência, (B) Controle com álcool 70%, (C) Anfotericina B na concentração de 2 ug/ml. O eixo X mostra, em escala logarítmica, a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI.	57
Figura 27. Histogramas de <i>C. gattii</i> ATCC 24065 tratado com diferentes concentrações dos compostos curcumina e morina. O eixo X mostra, em escala logarítmica, a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI. O gate M1 mostra a porcentagem de células não células não viáveis, marcadas com PI.	58

GRÁFICOS

Gráfico 1. Interação entre os compostos curcumina e morina ao fluconazol em isolados *C. neoformans*..... 50

Gráfico 2. Interação entre os compostos curcumina e morina com anfotericina B em isolados *C. neoformans*..... 51

Gráfico 3. Ação dos compostos curcumina, morina e anfotericina B sobre hemácias..... 54

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMB	Anfotericina B
ART	Terapia Antiretroviral
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CF	Citometria de Fluxo
CFM	Concentração Fúngica Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DHE	Dehydroergosterol
DMSO	Dimetilsulfóxido
FL2	Detector de Fluorescência (585nm)
FS	Forward Scatter
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glicuronoxilomanana
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	Human immunodeficiency Vírus
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IP-HAART	Inibidores de Protease Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
ITRNN-HAART	Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
KOH	Hidróxido de Potássio
L-Dopa	3,4-di-hidroxifenilalanina
MATa	Mating type a
MAT α	Mating type α
MLST	Multilocus Sequence Typing
MOPS	Ácido Morfolinopropanossulfônico

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Iodeto de Propídio
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio caldo Roswell Park Memorial Institute
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
SS	Side Scatter
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFG	Universidade Federal de Goiás
Ure-1	Urease
UV	Ultra Violeta

RESUMO

A Criptococose é uma doença fúngica causada por leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans*. O arsenal antifúngico disponível para o tratamento dessa doença ainda é restrito e está relacionado à elevada toxicidade e efeitos colaterais de alguns fármacos, causando grande prejuízo aos pacientes. Neste contexto, se faz necessário descobrir novos bioativos para debelar as infecções e reduzir os efeitos adversos. As plantas apresentam rica fonte de metabólitos secundários bioativos como taninos, terpenóides, saponinas, alcalóides, flavonoides e outros compostos, registrados com expressiva propriedade antimicrobiana. Portanto, a pesquisa de compostos naturais e derivados de produtos naturais tem sido pertinente nos últimos anos, devido à sua relevância na descoberta de novos medicamentos, além do que, a associação de fármacos ou compostos, com diferentes mecanismos de ação tem sido utilizada como alternativa na terapia convencional. Nós avaliamos os mecanismos de ação e o efeito antifúngico dos compostos naturais, curcumina e morina, sobre isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A atividade antifúngica foi averiguada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM). Os polifenóis, apresentaram CIMs que variaram de 2 a 256 µg/mL. Os compostos apresentaram interação sinérgica em 30% (6/20) e 15% (3/20) dos isolados se tratando da morina e curcumina, respectivamente, associada ao fluconazol. Na interação com a anfotericina B a morina apresentou sinergismo em 70% (14/20) dos isolados. Ambos os compostos não apresentaram antagonismo em nenhuma das combinações. Alterações na morfologia da célula fúngica foram observadas, e em contato com as hemácias, apresentaram baixa toxicidade. Os ensaios de mecanismos de ação revelaram que ambos os polifenóis atuam na membrana da célula fúngica inibindo a síntese de ergosterol e causando danos a mesma. Estes resultados demonstram o potencial dos compostos como bioativos naturais, apresentando grande impacto na descoberta de novos fármacos e sua eficácia para serem utilizados no tratamento de infecções fúngicas.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal disease caused by yeasts belonging to the complex *Cryptococcus neoformans*. The antifungal arsenal available for the treatment of this disease is still restricted and is related to the high toxicity and side effects of some drugs, causing great harm to the patients. In this context, it is necessary to discover new bioactives to quell the infections and reduce the adverse effects. The plants have rich source of secondary bioactive metabolites such as tannins, terpenoids, saponins, alkaloids, flavonoids and other compounds, registered with expressive antimicrobial properties. Therefore, the research of natural compounds and derivatives of natural products has been relevant in recent years, due to their relevance in the discovery of new drugs, in addition to which the association of drugs or compounds with different mechanisms of action has been used as an alternative in conventional therapy. We evaluated the mechanisms of action and antifungal effect of natural compounds, curcumin and morin, on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. The antifungal activity was determined across the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide (MFC). Polyphenols showed MICs ranging from 2 to 256 µg/mL. The compounds showed a synergistic interaction in 30% (6/20) and 15% (3/20) of the isolates when dealing with morin and curcumin, respectively, associated with fluconazole. In the interaction with amphotericin B morin presented synergism in 70% (14/20) of the isolates. Both compounds did not exhibit antagonism in any of the combinations. Changes in fungal cell morphology were observed, and in contact with red blood cells, presented low toxicity. The mechanisms of action revealed that both polyphenols act on the membrane of the fungal cell, inhibiting the synthesis of ergosterol and causing damage to it. These results demonstrate the potential of the compounds as natural bioactives, with great impact on the discovery of new drugs and their efficacy to be used in the treatment of fungal infections.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Aspectos gerais

A incidência das micoses oportunistas tornou-se relevante problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial, muitas vezes comprometendo a qualidade e a expectativa de vida dessas pessoas. O problema se agrava em pacientes transplantado de órgãos sólidos e de células-tronco hematopoiéticas, pacientes submetidos à quimioterapia, indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), diabetes mellitus, tuberculose ou que se encontram em tratamento prolongado com imunossupressores. Estes são considerados os mais susceptíveis a desenvolver estas infecções, levando-os muitas vezes a morte (Badiee & Hashemizadeh 2014, Curbeloa et al. 2015, Jabbari et al. 2015, Warthe et al. 2015).

O fato destas infecções ocorrerem quase exclusivamente em pacientes com o mecanismo de defesa debilitado, torna evidente que o estado imunológico do hospedeiro é geralmente o determinante mais importante de micoses oportunistas (Krishnamurthy et al. 2013, Galisteu et al. 2015). Isto justifica a intensa correlação entre o número relevante de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a ocorrência de doenças oportunistas por fungos (Puebla 2012, Galisteu et al. 2015, Rubaihayo et al. 2015).

Ainda que haja elevado número de fungos responsáveis por doenças fúngicas oportunistas, *Candida* spp, *Aspergillus* spp e espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, são considerados os mais frequentes (Nucci et al. 2010, Sifuentes-Osornio et al. 2012, Ravikant et al. 2015). Outros fungos do gênero *Trichosporon* spp, *Fusarium* spp e *Penicillium* spp. podem, também ser relacionados a esta micose (Cho et al. 2015, Warthe et al. 2015). Estes microrganismos tem em comum uma virulência inerente muito baixa e constituem um número quase ilimitado de fungos, e estão presente em todos os ambientes (Rani & Jiloha 2014). Em pacientes vulneráveis causam micoses oportunísticas invasivas, ditas candidíase, aspergilose, zigomicose, pneumocistose (Nucci et al. 2010, Taj-Aldeen et al. 2015) destacando-se a criptococose.

1.2. Complexo *Cryptococcus neoformans*

Por muitas décadas, os agentes da criptococose foram agrupados em duas variedades que incluíam cinco sorotipos, com diferenças antigênicas na estrutura polissacarídica capsular. Esta característica permite a identificação de *C. neoformans* var. *neoformans* para os sorotipos A, D, e AD (híbrido entre estirpes A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* para sorotipos B e C (Kwon-Chung et al. 1982, Ikeda et al. 1982, Mitchell & Perfect 1995, Franzot et al. 1999, Boekhout et al. 2001, Lengeler et al. 2001, Xu & Mitchell 2003).

A partir da descoberta da forma teleomórfica o gênero *Filobasidiella*, foi classificado *Filobasidiella neoformans* (sorotipos A e D) e *F. bacillispora* (sorotipos B e C), definindo-se o que são agora reconhecidos como duas espécies distintas, *C. neoformans* e *C. gatti* compondo o complexo *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung 1975, 1976, Casadevall & Perfect 1999, Kwon-Chung & Varma 2006). Ambas as espécies, estão incluídas no Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Tremellomycete, Ordem Tremellales e Família Tremellaceae (Kwon-Chung 1975, 1976, Fonseca et al. 2011).

Foi a partir dos estudos de Kwon-Chung et al. (2002) que identificaram através de métodos moleculares, *C. neoformans* var. *gattii* na espécie distinta *C. gattii*, e o táxon *C. neoformans*, reservado para as variedades *neoformans* e *grubii*.

Abordagens moleculares contribuíram para melhor compreensão e clareza na classificação dos agentes etiológicos da criptococose (Kwon-Chung et al. 2014). Franzot et al. (1999), com base em divergências na sequência do gene URA5 reconheceu como uma variedade separada, amostras do sorotipo A de *C. neoformans* var. *grubii* a partir de cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), também compartilhado em estudos epidemiológicos, ecológicos, fenotípicos, fisiológicos e genéticos por outros estudiosos que mostraram divergências significativas entre os sorotipos (Mitchell & Perfect 1995, Franzot et al. 1999).

Com base em diferentes metodologias moleculares as leveduras do complexo *C. neoformans* foram caracterizadas genotipicamente em nove tipos moleculares distintos VNI, VNII e VNB (sorotipo A, var. *grubii*), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D, var. *neoformans*), VGI, VGII e VGIII, VGIV sorotipos B

e C respectivamente, ambos pertencentes a espécie *C. gattii* (Lin & Heitman 2006, Kwon-Chung et al. 2014). Na Figura 1 encontra-se resumido as características do complexo *C. neoformans*.

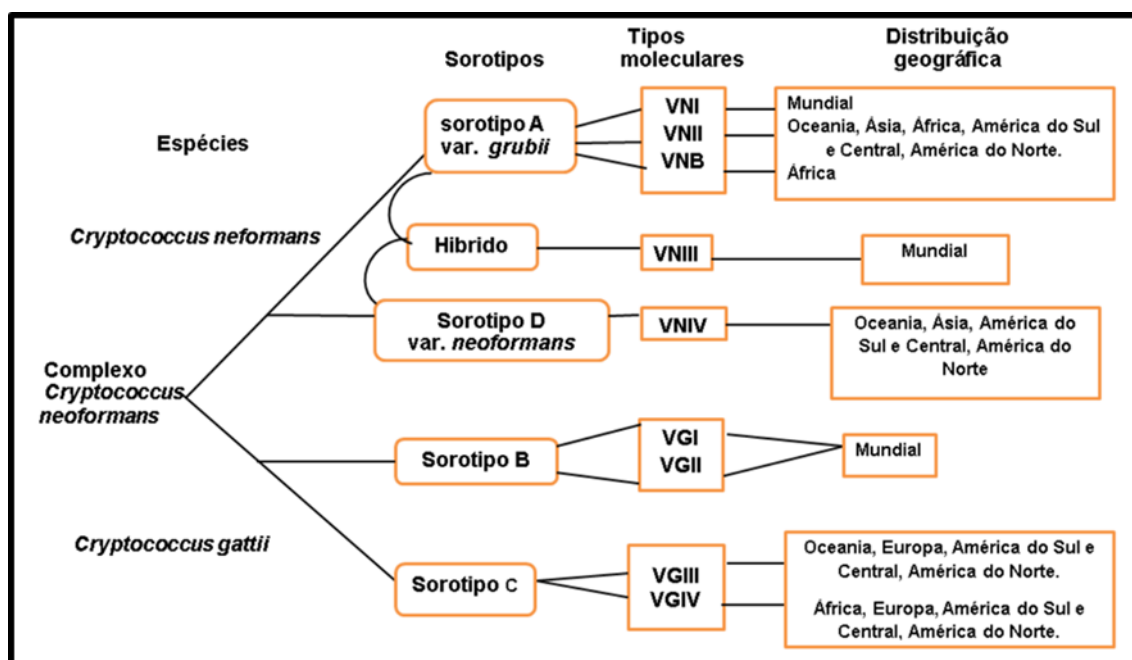


Figura 1. Classificação das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* considerando os sorotipos, tipos moleculares e distribuição geográfica. Fonte: Adaptada de Ma & May (2009) e Cogliati (2013).

Fundamentado em análise filogenética de 11 locus gênicos e resultados de muitos estudos de genotipagem, Hagen et al. (2015) propõem o reconhecimento de um novo complexo para os agentes da criptococose: complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, e reconhece *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* como espécies separadas, assim como a inclusão de novas espécies pertencentes ao complexo *C. gattii*: *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii*, conforme mostrado no quadro 1.

Quadro 1. Espécies atuais e propostas para as leveduras do complexo *C. neoformans*/*C. gattii* (Adaptado de Hagen et al. (2015).

Nome atual da espécie	Tipos moleculares	Nome proposto para espécie
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNI	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Var. <i>grubii</i>	VNII	
	VNB	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNIV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
Var. <i>neoformans</i>		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNIII	<i>Cryptococcus neoformans</i> X <i>Cryptococcus deneoformans</i>
Híbrido		
	VGI	<i>Cryptococcus gattii</i>
	VGII	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
<i>Cryptococcus gattii</i>	VGIII	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	VGIV	<i>Cryptococcus tetragattii</i>

1.3. Aspectos morfológicos e biológicos das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*

As leveduras das espécies que compõem o complexo *C. neoformans* podem ser bem diferenciadas em sua forma sexuada, sorotipo, características ecológica, biológica e bioquímica (Kwon-Chung et al. 1982).

Apresentam características morfológicas de célula eucariótica, com núcleo circundado por uma membrana com poros e nucléolos no seu interior (Casadevall & Perfect 1999). Ambas as leveduras são haplóides heterotáticas, em dois mating types, MAT α e MAT α , com predominância no meio ambiente de cepas MAT α , o que justifica a extensa maioria de isolados clínicos (Litvintseva et al. 2005)

As leveduras apresentam-se de 4 a 10 μ m de diâmetro, com um ou múltiplos brotamentos, envolvida por uma rede de microfibrilas constituindo

uma densa cápsula polissacarídica (Casadevall & Perfect, 1995, Steenbergen & Casadevall 2003, Doering 2009, Ma & May 2009). A morfologia teleomórfica de *C. neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, mostra basidiósporo ovoide de parede rugosa, enquanto de *C. gattii*, *F. bacillispora*, seu basidiósporo tem aparência bacilar com parede lisa (Kwon-Chung 1975, 1976). Na figura 2 visualizamos a morfologia microscópica e as estruturas sexuais das espécies de *Cryptococcus* do complexo *Cryptococcus neoformans*.

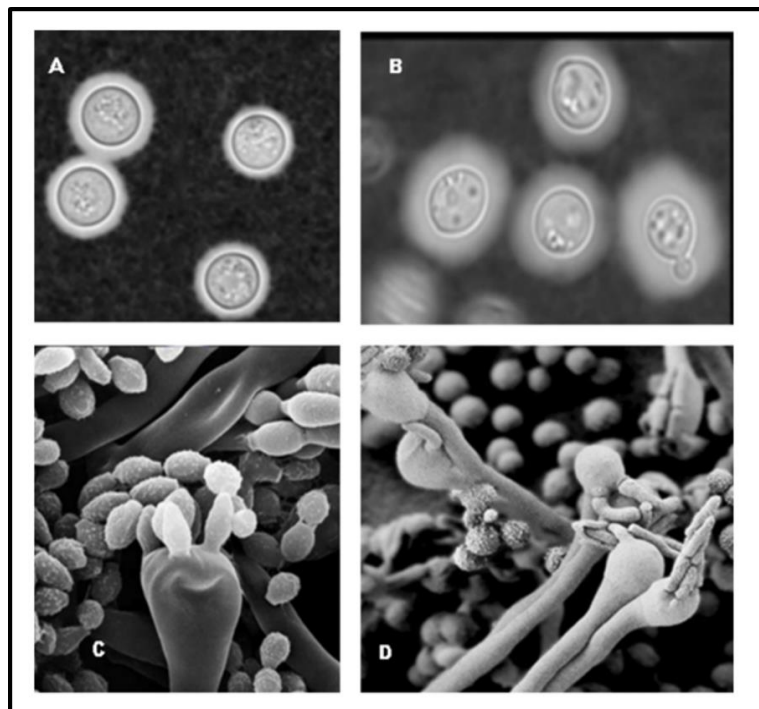


Figura 2. Leveduras uniformemente globosas de parede rugosa de *Cryptococcus neoformans* (A), Células globosas e ovaladas de *Cryptococcus gattii* (B), Forma teleomórfica dos agentes da criptococose *Filobasidiella neoformans* (C), e *F. bacillispora* (D).

1.4. Fatores de virulência

Uma vez em contato com o hospedeiro, as espécies do complexo *C. neoformans* produzem mecanismos ditos fatores de virulência, que irão exercer funções na sua patogenicidade, auxiliando o fungo em situação adversa, contribuindo para a invasão e sobrevivência no hospedeiro, resultando no estabelecimento da infecção e persistência da doença (Steenbergen &

Casadevall 2003, Ma & May 2009, Andrade-Silva et al. 2010, Kronstad et al. 2012).

C. neoformans e *C. gattii* têm um número bem definido de mecanismos de virulência, que influenciam fortemente o grau de patogenicidade dos isolados, incluindo entre estes a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase (Pessoa et al. 2012, Almeida et al. 2015), liberação de metabólitos de poliol, a interação com hormônios (McClelland et al. 2013), e a adesão e produção de manoproteínas (Cadieux et al. 2013).

C. neoformans e *C. gattii* compartilham três principais atributos de virulência que contribuem para a sua capacidade de causar doença: a produção de uma cápsula polissacarídica, a habilidade de crescer a 37 ° C e a deposição de melanina na parede da célula (Casadevall et al. 2000, Steenbergen & Casadevall 2003, Ma & May 2009). Além desses fatores, produção de manitol e mating-type são importantes mecanismos de virulência associadas a esta levedura (Casadevall & Perfect 1999, Idnurm et al. 2005, Alspaugh 2014).

A cápsula criptocócica é um dos mais importantes fatores de virulência, sendo constituída de dois grandes polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) 90-95%, galactoxilomanana (GalXM) 5% e, algumas manoproteínas com relevantes propriedades antigênicas, além de ácido hialurônico e ácido siálico (McFadden et al. 2006, Doering 2009a, Zaragoza et al. 2009, Gilbert et al. 2014, Kwon-Chung et al. 2014). Está intimamente ligada à parede celular, que é constituída por glucanos, quitina, quitosano e glicoproteína responsável pela rigidez e a forma da célula, pelo controle da permeabilidade e confere proteção a lise osmótica e ao estresse ambiental (Steenbergen & Casadevall 2003, Zaragoza & Casadevall 2004, Idnurm et al. 2005, McFadden et al. 2006).

Diferenças na estrutura dos componentes (manose, xilose e ácido glucurônico) de GXM caracterizam vários sorotipos dentro das espécies do complexo *Cryptococcus*, denominados de A, B, C, D e o híbrido AD (Ikeda et al. 1985, Lengeler et al. 2001, Bose et al. 2003), conforme mostrado na Figura 3.

A diversidade nos sorotipos são importantes não somente por permitir dados relacionados a epidemiologia da criptococose, mas também ao

mecanismo de ação das espécies do fungo no hospedeiro, assim como no prognóstico da doença (Desnos-Ollivier et al. 2015).

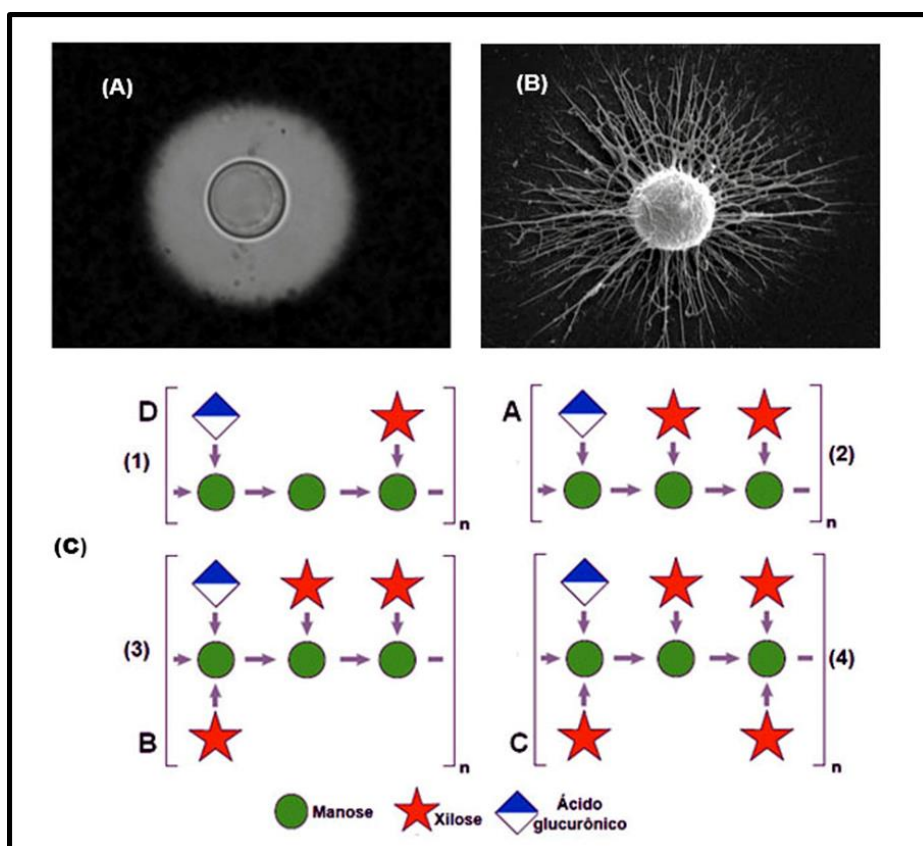


Figura 3. (A) Cápsula, constituída de GXM, GalXM e manoproteína através de tinta da china. (B) Cápsula de *C. neoformans* com fibrilas de polissacarídeo por microscopia eletrônica de varredura. (C) Unidades de glucuroxilomanana de *C. neoformans* caracterizando os diferentes sorotipos. (1) sorotipo D; (2) sorotipo A; (3) sorotipo B; (4) sorotipo C. (Adaptado de kwon-Chung et al. 2014).

A melanina, outro componente importante de virulência inerente das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, é essencial para diferenciar as espécies patogênicas de não patogênicas dentro do gênero *Cryptococcus* (Nosanchuk & Casadevall 2006).

Diferente dos fungos negros ditos dematiáceos encontrados no solo ou sobre as plantas que sintetizam a melanina a partir do dihidroxinaftaleno (DHN), as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* produzem este pigmento apenas na presença de substratos tais como L- 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) e outros di/compostos polifenólicos (Chaskes & Tyndall 1975, Polacheck et al.

1982). Esta reação é catalisada por uma fenoloxidase, a lacase (Nosanchuk & Casadevall 2003), através de um processo complexo de polimerização na conversão destes compostos fenólicos a dopaquinona, conforme a Figura 4. A enzima que catalisa a formação de melanina tem sido sugerida como um alvo terapêutico (Zhu & Williamson 2004).

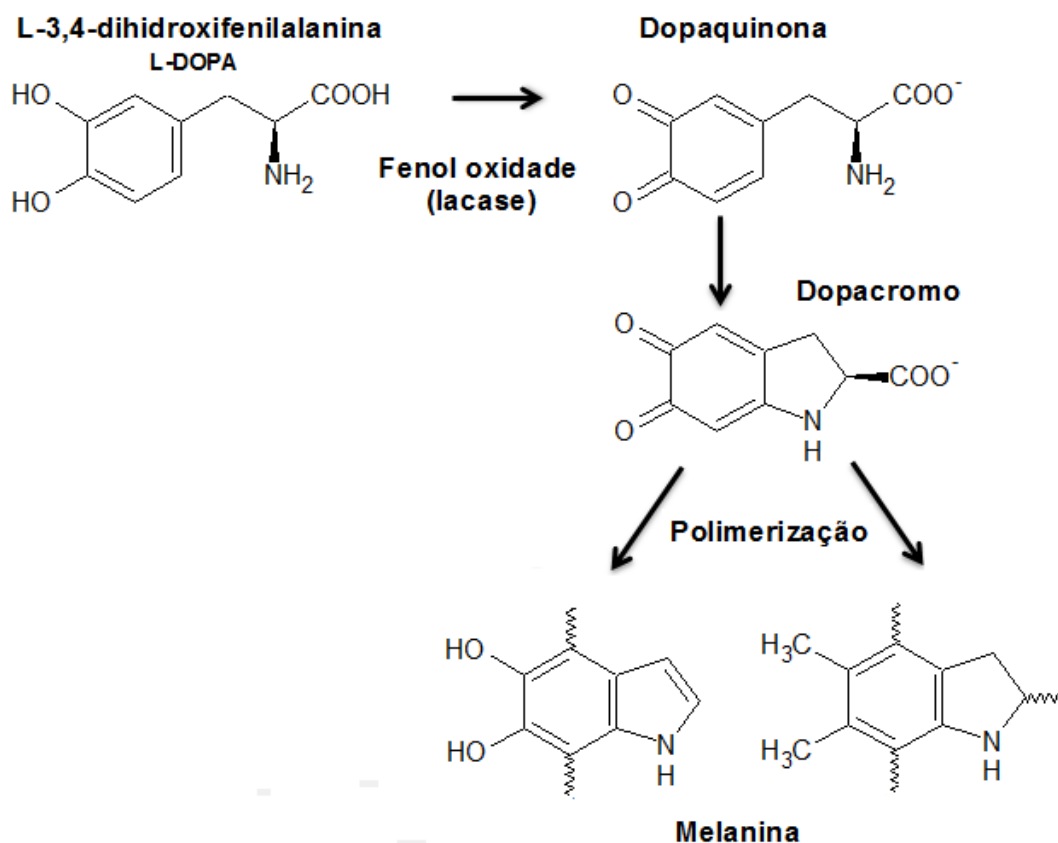


Figura 4. Esquema da via Biosintética de melanina por *C. neoformans*.

A melanina depositada na parede das células apresenta-se como partículas granuladas esféricas com aproximadamente 40-130 nm de diâmetro, distribuídas em várias camadas concêntricas, atingindo 75% da área da parede celular do fungo, sendo visualizadas a partir de microscopia eletrônica de varredura (Eisenman et al. 2005, Mandal et al. 2007). A Figura 5 mostra a macroscopia e microscopia de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* melanizados.

A síntese de melanina por *Cryptococcus neoformans* tem sido associada à virulência, por preservar o fungo contra a ação dos anticorpos mediadores da fagocitose e proteger a integridade celular contra reações oxidativas, radiações

ultravioleta e temperaturas extremas, além de interferir na suscetibilidade aos antifúngicos (Kwon-Chung & Rhodes 1986, Williamson 1997, Ikeda et al. 2003, Martinez & Casadevall 2006, Alp 2010).

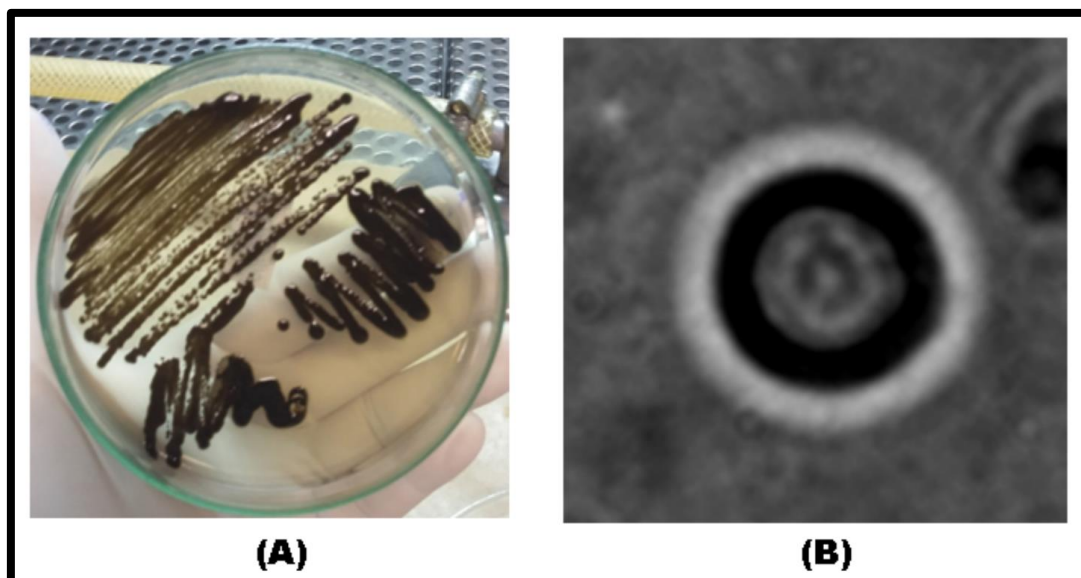


Figura 5. Morfologia de *C. neoformans*. (A) Macroscopia da colônia de *C. neoformans* em meio L-DOPA. (B) microscopia de *C. neoformans* melanizados visualizados com tinta nanquim (40x). Fonte: Arquivo pessoal.

Mesmo que a habilidade de crescer a 37° C não seja o suficiente por si só o único requisito para o microrganismo ser um patógeno de mamífero, este fator é essencial para qualquer agente microbiano patogênico ter a capacidade de causar a doença (Bhabhra & Askew 2005, Kwon-Chung et al. 2014).

Entre as mais de 70 espécies de *Cryptococcus*, apenas as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* são capazes de crescer e sobreviver à temperatura 37° C, sendo essa a principal característica de agentes patogênicos bem-sucedidos em mamíferos (Perfect 2005, Kwon-Chung et al. 2014).

Entender os determinantes de virulência dos agentes fúngicos contribui para uma melhor compreensão da patogênese da infecção e dispõe condições para o controle da doença e procedimentos favoráveis à descoberta de novos fármacos.

1.5. Criptococose

A criptococose evoluiu para uma importante doença fúngica invasiva durante o último século e, a sua epidemiologia tem sido fundamentada nos principais focos da doença, que é reflexo tanto da alteração ambiental da exposição ao fungo, quanto ao crescimento de fatores de risco do hospedeiro (Harris et al. 2013, Perfect & Bicanic 2014). Tem como agente etiológico, espécies de leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que são subdivididos em diferentes sorotipos e genótipos (Kwon-Chung & Varma 2006, Lin & Heitman 2006). Entretanto, outras espécies de *Cryptococcus* como *C. laurentii* e *C. albidus*, podem produzir infecção fúngica em raras circunstâncias (Molina-Leyva et al. 2013, Liu et al. 2014, Perfect & Bicanic 2014). As leveduras pertencentes ao complexo *C. neoformans* são comumente encontrados em excretas de pombos e de outras aves, solo e madeira em decomposição (Nweze et al. 1997, Ior et al. 2015).

A infecção é adquirida após a inalação de propágulos infectantes, basidiósporos ou leveduras desidratadas presentes no meio ambiente. Ao alcançar os alvéolos pulmonares, inicia-se a infecção primária nos pulmões, e através da disseminação hematogênica podem causar lesões de cutâneas à infecções sistêmicas (Kwon-Chung et al. 2014).

A meningite criptocócica é a mais frequente forma clínica da doença relatada entre pacientes com o vírus da imunodeficiência humana, acometendo cerca de 80% desses pacientes (Hung et al. 2007, Jarvis et al. 2014). A Figura 6 mostra a penetração e disseminação de *Cryptococcus neoformans* no organismo do hospedeiro.

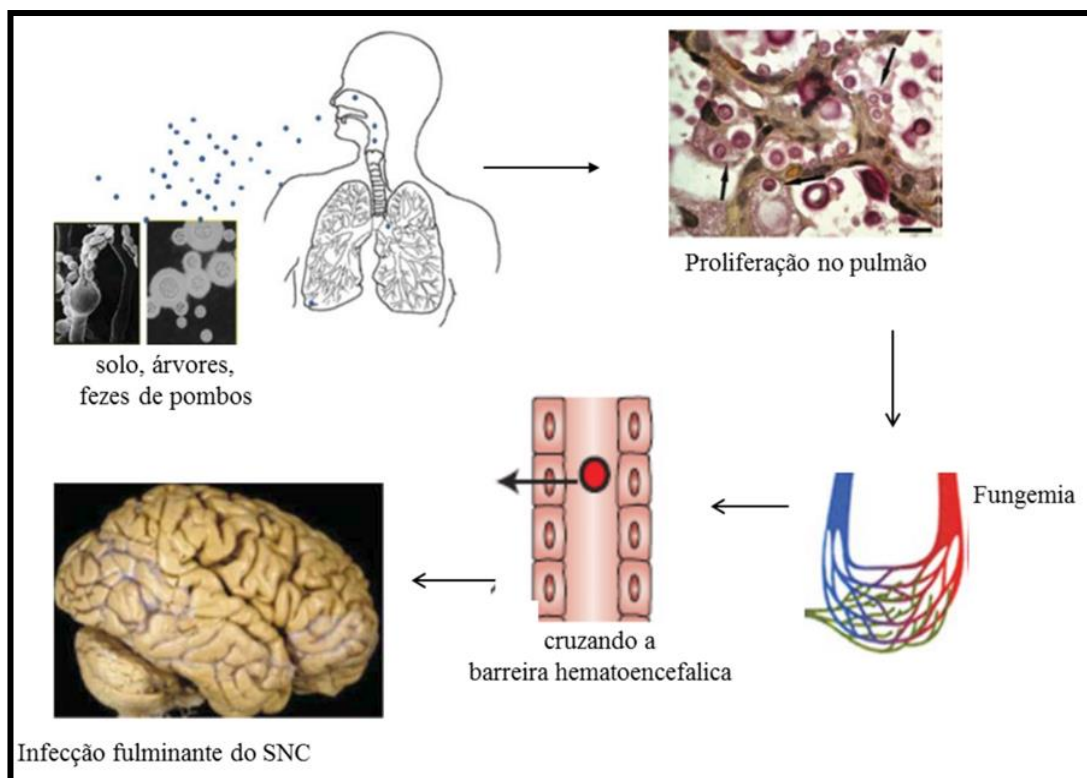


Figura 6. Ciclo de infecção das espécies do complexo *C. neoformans*: células criptocócicas do meio ambiente são inaladas pelo hospedeiro, prolifera no pulmão e dissemina pelo sangue para o cérebro (Adaptado de Kwon-Chung et al. 2014).

1.6. Epidemiologia

A incidência da criptococose antes incomum, aumentou com o aparecimento da SIDA, tornando-se uma das micoses oportunistas mais significativas devido a mortalidade e morbidade nestes pacientes. Entretanto, com o advento da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART), que consiste no uso de inibidores de protease (IP-HAART) e da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN-HAART), eficazes no controle da replicação viral, observou-se uma redução do número de casos de criptococose (Warkentien & Crum-Cianflone 2010, Granich et al. 2012, Rodríguez-Cerdeira et al. 2014).

Nos países desenvolvidos a disponibilidade da terapia antirretroviral (ART) tem contribuído para melhora no sistema imunológico de pessoas com vírus da imunodeficiência humana (HIV) permitindo, que estes não se tornem vulneráveis à infecção pelo *Cryptococcus neoformans*. Em países com menor

indicador de desenvolvimento, a meningite criptocócica ainda é um fator de muito risco e perigo em consequência a alta prevalência do HIV e o limitado acesso aos cuidados de saúde nesta população (Park et al. 2009, Vidal et al. 2013, Mitiku et al. 2015).

A meningite criptocócica é descrita como uma das principais causas de morte em adultos infectados com HIV/AIDS na África sub-saariana, sendo responsável em até 70% dos casos fatais ao longo das duas últimas décadas (Veltman et al. 2014, Grossman & Casadevall 2016).

Há uma estimativa da ocorrência de um milhão de casos de meningite criptocócica anualmente no mundo (Warkentien & Crum-Cianflone 2010, Heitman et al. 2011, Veltman et al. 2014). Park et al. (2009) avaliaram casos de meningite criptocócica entre as pessoas com HIV/AIDS em diferentes regiões do mundo, e demonstram uma incidência variando de 0,04 a 12% da doença por ano. A África Subsaariana apresentou uma estimativa mais elevada, com 720.000 casos (3,2%), em seguida o Sul e Sudeste Asiático com 120.000, 7.800 casos registrados na América do Norte, Norte da África e Oriente Médio 6.500 notificações. Na Europa Ocidental observou uma menor incidência, com 500 casos, acompanhado da Oceania com 100 casos registrados.

Nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, a criptococose tem se mostrado reduzida entre pessoas com HIV/AIDS devido à disponibilidade da HAART para estes pacientes, com o índice de mortalidade em média de 12% (Cogliati 2013). No entanto, mesmo que a introdução da HAART tenha contribuído para redução desta infecção oportunista o número de mortes e a taxa de mortalidade continua elevada.

A América Latina representa a terceira região do mundo com o maior número de casos de meningite criptocócica relacionada à SIDA, com uma estimativa anual de 54.400 casos, com elevada taxa de mortalidade (55%) (Sifuentes-Osornio et al. 2012, Vidal et al. 2013).

De acordo com estimativas do World Health Organization (WHO 2015) e Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS 2015), há aproximadamente 36,9 milhões de pessoas no mundo que contraíram HIV até o final 2014, e destes 2,6 milhões eram crianças com idade inferior a 15 anos.

Relatos na literatura avaliando meningite criptocócica em diferentes regiões do Brasil são descritos, confirmando a associação desta doença fúngica a pacientes com SIDA (Pappalardo & Melhem 2003, Leal et al. 2008, Lindenberg et al. 2008, Prado et al. 2009, Souza et al. 2013)

Dados do Ministério da Saúde (2002), relatam que de 215.810 casos de AIDS notificados no Brasil, em um período de vinte e dois anos (1980 a 2002), 6% dos pacientes apresentavam criptococose no momento da notificação (Prado et al. 2009).

Entre 1998 a 2006, ocorreram 125.633 óbitos de pessoas com AIDS no Brasil, sendo que destes, 3000 mortes ocorreram por criptococose, correspondendo 2,4% dessa população (Pappalardo & Melhem 2003).

Na cidade do Rio de Janeiro entre 1994 a 2004 foi relatada uma incidência de 0,45 casos de criptococose por 100.000 habitantes, apresentando um índice de letalidade em 51,8%, e destes 61,2% envolvia pacientes com SIDA (Leimann & Koifman 2008). No Rio Grande do Sul, foram registrados no período entre 2000 e 2005, 126 pacientes com meningite criptocócica, dos quais 95% eram infectados pelo HIV (Leal et al. 2008).

No Mato Grosso do Sul, 123 casos de criptococose entre 1995 e 2005 foram registrados, com uma taxa de mortalidade de 49,6%, destes, 84,5% estavam associados a pacientes HIV, e neste grupo o índice de mortalidade foi 51% (Lindenberg et al. 2008).

No Estado de Goiás, Souza et al. (2013), no período de um ano (2009-2010), identificaram leveduras do complexo *C. neoformans* em 62 pacientes apresentando quadro clínico de meningite, com o índice de mortalidade de 48,4% sendo 53 pacientes portadores do HIV.

Em São Paulo, durante o ano de 2003, dos 219 pacientes infectados pelo HIV e com doenças oportunistas do sistema nervoso central, 24% eram acometidos de meningite criptocócica (Vidal et al. 2008).

Com o advento da SIDA, a meningite criptocócica tornou-se uma doença importante no Estado do Amazonas, todavia, somente em meados de 1986 com um ápice em 2008 que, esta doença foi associada com o HIV/AIDS. Uma redução do número de casos da micose foi observada entre 2011 e 2012, o que provavelmente seja atribuído a uma assistência de melhor qualidade à saúde

dos pacientes portadores do HIV/AIDS, restringindo assim a ocorrência de doenças oportunistas (Saraiva et al. 2015).

Em um estudo realizado por Prado et al. (2009) entre 1996-2006, demonstraram que o índice de morte em diferentes regiões do Brasil em consequência a micoses sistêmicas como, paracoccidioidomicose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmoses, candidíase, aspergilose, e zigomicose, alcançaram um patamar 3.583 casos, porém quando a SIDA foi considerada uma condição associada na causa básica de morte, a criptococose foi responsável por 50,9% dos óbitos, seguida por candidíase (30,2%) e histoplasmoses (10,1%).

No Brasil, a mortalidade por criptococose atinge 45 a 65% dos pacientes na presença ou não de fatores predisponentes (Pappalardo & Melhem 2003). Além das condições do hospedeiro, o processo de invasão e de disseminação do fungo, está intimamente relacionado a um complexo mecanismo de adaptação, seleção e virulência do microrganismo (Wormley & Perfect 2005). O diagnóstico precoce associado a um tratamento adequado são importantes para uma diminuição nos índices de mortalidade.

1.7. Agentes antifúngicos e tratamento

A ocorrência frequente das doenças fúngicas invasivas, vem contribuindo para alterações importantes na terapêutica antifúngica. Os fármacos antifúngicos sistêmicos em geral são classificados pela sua estrutura química e mecanismo de ação ao patógeno conforme mostrado na figura 7.

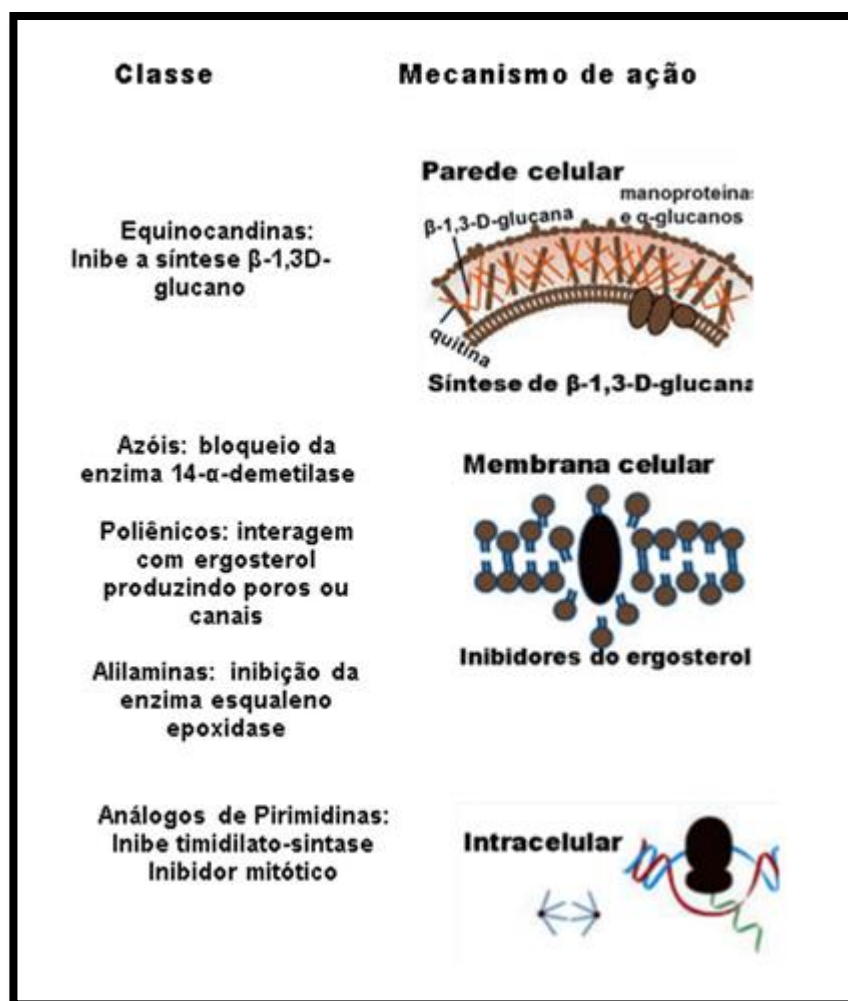


Figura 7. Principais classes de antifúngicos e seus respectivos sítios de ação na célula.

Os agentes antifúngicos poliênicos, alilaminas e azóis representam três classes de antifúngicos que têm como alvo a membrana celular, visando o ergosterol, ou etapas enzimáticas da sua biossíntese (Chen & Sorrell 2007, Idowu & Adeoye 2015).

O ergosterol é o esterol predominante na membrana citoplasmática, sendo o principal componente da membrana de fungos e essencial para o crescimento e desenvolvimento destes microrganismos. Está envolvido em diversas funções biológicas, tais como a fluidez da membrana, na regulação, atividade e a distribuição de proteínas integrais de membrana, bem como o controle do ciclo celular. Este esterol é o principal alvo dos antifúngicos usados para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Gooday 1995, Alcazar-Fuoli & Mellado 2013).

Os poliênicos desempenham atividade fungicida, especialmente em fungos que estão na fase estacionária do crescimento, unindo-se por interações hidrofóbicas ao ergosterol, produzindo poros ou canais, que interferem na permeabilidade da membrana, gerando perda de nutrientes e íons essenciais, determinando assim a lise e morte da célula (Groll & Kolve 2004, Prasad et al. 2016). Um dos principais membros dessa classe é a anfotericina B (AmB), antifúngico de efeito fungicida, potente e de largo espectro. Seu uso é limitado por importantes efeitos adversos, entre eles a nefrotoxicidade, que é amenizada através de sua preparação em formulações lipídicas: complexo lipídico, dispersão coloidal e lipossomal (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas 2009). Gray et al. 2012, sugerem que a simples aderência da AmB ao ergosterol já promove a morte celular e que, a formação de canais na membrana representa um segundo mecanismo complementar que estimula ainda mais a potência do fármaco.

O grupo das alilaminas interfere na fase inicial da biossíntese do ergosterol, em consequência do seu mecanismo específico de inibição da enzima esqualeno epoxidase (Erg1), que é catalizador da conversão do esqualeno em lanosterol, precursor do ergosterol (Espinel-Ingroff 2008). Observações confirmam que fungos tratados com terbinafina, fármaco da classe das alilaminas, acumulam elevada concentração de esqualeno ao tornar-se deficiente em ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana levando em ruptura a célula (Ryder 1992, Minnebruggen 2010). Essa classe de antifúngico está fortemente associada com a função da membrana, assim como na síntese da parede celular dos fungos (Ryder 1992).

Os azóis constituem um grupo de agentes antifúngicos com amplo espectro de atividade, e representam a maior classe de antimicóticos sintéticos. Os principais fármacos disponíveis são os imidazóis, cetoconazol e miconazol; os triazóis, fluconazol, itraconazol, voriconazol, e uma nova geração de azóis que inclui posaconazol, isavuconazole, e albaconazol (Sanglard & Odds 2002, Carrillo-Muñoz et al. 2006). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima do citocromo P450, a lanosterol 14 α -desmetilase, também denominada de CYP51, responsável pela desmetilação oxidativa do lanosterol, essencial na produção de esteróis (Georgopapadakou & Walsh 1996, Edwards et al. 2013).

Como consequência ocorre a interrupção da síntese de membrana, bem como uma depleção de ergosterol, que leva a um aumento em precursores de esteróis metilados tóxicos na membrana celular e interferência na ação das enzimas associadas à membrana (Minnebruggen 2010, Idowu & Adeoye 2015).

Leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans* são suscetíveis aos polienos, flucitosina e aos azóis. Entre estes fármacos, os azóis exibem a menor atividade fungicida. O tratamento antifúngico para a criptococose varia de acordo com a extensão da doença, a gravidade, bem como o estado imunológico do hospedeiro (Perfect et al. 2010). Embora existam algumas diferenças clínicas entre a criptococose causada por *C. neoformans* e a causada por *C. gattii*, os regimes de tratamento recomendados para ambas as espécies são atualmente idênticos. Os antifúngicos anfotericina B e fluconazol são componentes-chaves para o tratamento da meningite criptocócica, o primeiro é utilizado para indução, enquanto que o segundo é utilizado para consolidação e manutenção. Porém, alguns especialistas sugerem que uma maior duração da terapia de indução e consolidação deve ser utilizada na infecção por *C. gattii* (Chen et al. 2013, 2014, Grossman & Casadevall 2016).

Outros azóis, tais como itraconazole, voriconazole, posaconazole, e isavuconazole, também possuem atividade anti-criptocócica. Entretanto, dada a escassez de estudos de eficácia clínica, interações medicamentosas potenciais, penetração do SNC e biodisponibilidade, eles são reservados apenas para casos refratários (Barchiesi et al. 2004, Pitisuttithum et al. 2005).

A resistência aos antifúngicos anteriormente já foi rara. No entanto, relatos recentes descreveram o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados de *C. neoformans* para o fluconazol e, em menor grau, para a anfotericina B na última década (Chen et al. 2014, Smith et al. 2015). Resistência microbiológica refere-se à não-sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico através de testes de suscetibilidade *in vitro*, nos quais a CIM do fármaco excede o ponto de interrupção de suscetibilidade para esse organismo. A resistência de diversos patógenos foi descrita para praticamente todos os agentes antifúngicos, incluindo espécies de *Candida* e *Aspergillus*. A maioria dos mecanismos de resistência também foram elucidados a nível

molecular nestes agentes patogênicos a partir de genes de resistência a drogas na identificação de mutações genômicas (Sanglard 2016).

1.8. Produtos naturais e bioativos

As plantas através do seu metabolismo, produzem muitas substâncias ativas agrupadas como metabólitos primários e secundários. Os primeiros são representados por carboidratos, lipídeos e aminoácidos. Eles são destinados a formação de proteínas e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais das plantas, onde a ausência ou a deficiência desses compostos poderá causar a morte da mesma (Rojas et al. 2014). Já os metabólitos secundários, também conhecidos como fitoquímicos, são originados por vias sintéticas modificadas de metabólitos primários, ou através do compartilhamento de substratos dessa mesma classe de metabólito (Kabera et al. 2014, Ncube & Van Staden 2015).

Os metabólitos secundários são constituídos por uma grande variedade de produtos naturais com estrutura química altamente diversificada, em contraste com os metabólitos primários, essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, já foram considerados como "resíduos" sem função fisiológica para a planta. No entanto, é evidente que esses produtos naturais cumprem funções importantes na interação entre as plantas e seu ambiente biótico e abiótico (Kabera et al. 2014). Representam uma expressiva fonte de fármacos ou precursores para a síntese desses, e outras categorias de produtos como, cosméticos, suplementos dietéticos e produtos de saúde natural (Arif et al. 2009, Springob & Kutchan 2009, Ncube & Van Staden 2015). Possuem também uma grande variedade de componentes medicinais com atividade antimicrobiana (Negri et al. 2014), cuja a aplicação na terapia das doenças é tão antiga quanto à humanidade. Seus benefícios contribuem significativamente para a divulgação de suas propriedades farmacológicas, independente do conhecimento ou não de seus constituintes químicos (Silva & Fernandes Júnior 2010).

Os metabólitos secundários são agrupados conforme sua composição química, solubilidade a vários solventes, ou pela via em que são sintetizados.

O sistema de classificação inclui três vastos grupos: terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (Irchhaiya et al. 2014, Kabera et al. 2014). Estes grupos possuem uma grande variedade de fitoquímicos de acordo com sua estrutura específica, entre os quais os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos e lignanas menos comuns, contudo, profícuos na medicina (Verpoorte 1998, Wink 2003, Nair et al. 2005, Kabera et al. 2014).

Portanto, dentre as fontes de pesquisa em produtos naturais bioativos para descobertas de novos medicamentos, os vegetais merecem relevância, pelo seu teor em destaque as diferentes classes de flavonoides. Esta classe é composta por um grupo de substâncias polifenólicas, notáveis por sua diversificada ação: biológica, inibindo fungos e bactérias (Abed et al. 2015, Filho et al. 2016), farmacológica como anti-inflamatório em doenças infecciosas causadas por bactérias e vírus (Arif et al. 2009, Ahmad et al. 2015) assim como seu desempenho sobre o sistema imunológico e também com função antioxidante (Silva & Fernandes Júnior 2010, Kumar & Pandey 2013, Akinpelu et al. 2015, Cao et al. 2015, Chikezie et al. 2015).

1.8.1. Flavonoides

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias de diferentes grupos funcionais, a maioria dos quais são fenóis ou os seus derivados substitutos de oxigênio, com propriedades antifúngicas. Os flavonóides consistem num grande grupo de compostos polifenólicos e estão presentes de forma ubíqua em plantas Kumar & Pandey 2013.

Os flavonoides, representam o mais extensivo dos compostos fenólicos (Arif et al. 2009, Kumar & Pandey 2013). De baixo peso molecular, constituem substâncias aromáticas, presentes nas frutas, legumes, nozes e sementes, assim como no mel e em alimentos processados como chá e vinho (Dai & Mumper 2010, Pontis et al. 2014).

Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum contendo 15 átomos de carbono, caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C) formando um sistema C6-C3-C6 (Tapas et al. 2008, Pereira & Cardoso 2012).

Muitos flavonoides que ocorrem na natureza foram descritos e classificados a partir de suas estruturas químicas, de acordo com o grau de oxidação no anel C, onde a variação estrutural em cada subgrupo é, em parte, devido a ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica da cadeia antocianidinas (Dai & Mumper 2010). As principais classes de flavonoides consistem em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, auronas, antocianinas e antocianidinas (Dai & Mumper 2010, Pereira & Cardoso 2012). A figura 8 mostra a estrutura química de algumas classes de flavonoides.

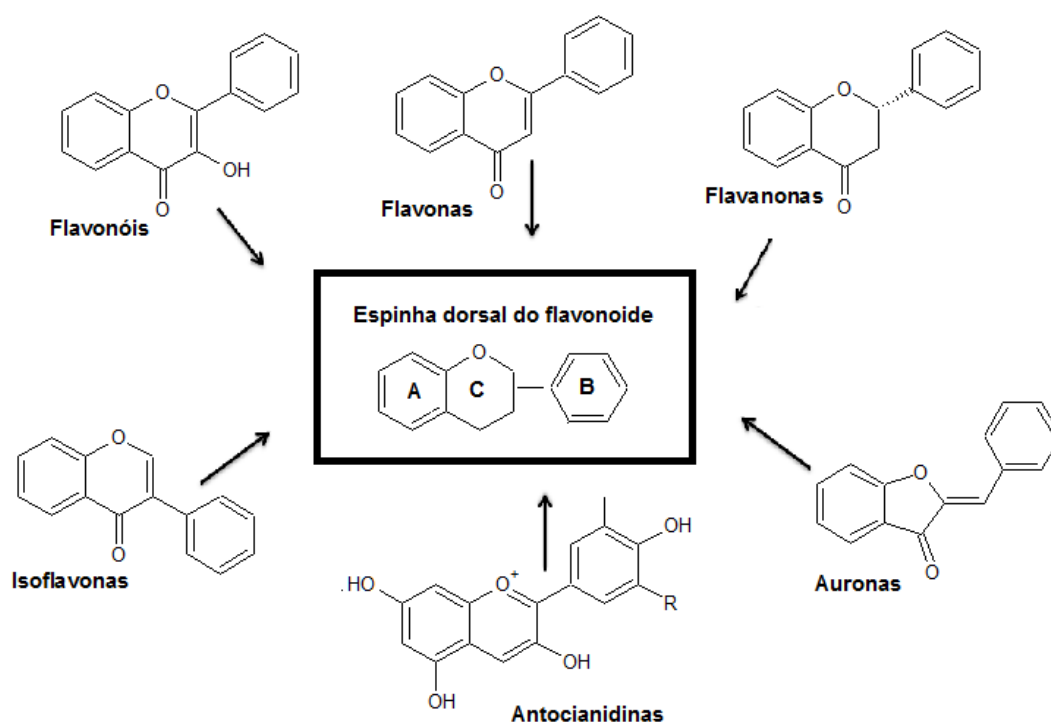


Figura 8. Fórmula estrutural de várias classes de flavonoides (Adaptado de Tsao (2010)).

1.8.1.1. Curcumina

Dentre os flavonoides a curcumina (diferuloilmetano), de nome científico *Curcuma longa* Lin, pertencente à família Zingiberaceae, constitui um dos principais fitoquímicos derivado do rizoma da cúrcuma, figura 9. Também é conhecida popularmente como açafrão ou gengibre dourado, (Padhye et al.

2010, Prasad & Aggarwal 2011, Ghosh et al. 2015) e expressa duas formas estruturais denominadas ceto (forma sólida) e enol (forma líquida) conforme demonstrado por Manolova et al. (2014).

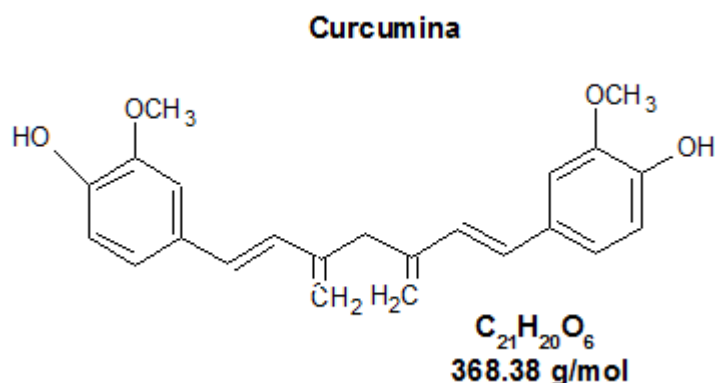


Figura 9. Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da curcumina (Adaptado de Palve et al. 2012).

Nativa do sul da Ásia, porém com muitas outras espécies identificadas por todo mundo com denominações que variam de acordo com sua origem, tem relevância pelas diferentes aplicações demonstrada (Srinivasan et al. 2006, Basnet & Skalko-Basnet 2011, Prasad & Aggarwal 2011, Irchhaiya et al. 2014, Nisar et al. 2015). A cor amarela brilhante da cúrcuma deve-se principalmente, a pigmentos polifenólicos lipossolúveis, conhecidos como curcuminóides, tendo a curcumina como constituinte mais ativo, assim como a demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina. Óleos voláteis como natlantone, zingibereno e turmerone, proteínas, açúcares e resinas são encontrados na composição (Sharma et al. 2005, He et al. 2015).

Os pigmentos curcuminóides, de acordo com Péret-Almeida et al. (2005), se diferenciam pelo número de grupos metóxi (CH₃) ligados a sua estrutura, conforme indicado na figura 10.

Além de seu uso como especiarias e corante na culinária, a cúrcuma tem sido utilizada na Índia para fins medicinais, durante séculos no tratamento de várias afecções (Srinivasan et al. 2006, Akaram et al. 2010, Irchhaiya et al. 2014). Evidências de que a curcumina dispõe de propriedades anti-inflamatória, anti-cancerígeno, e expressivo potencial antimicrobiano em vários patógenos, tem contribuído para o interesse científico em avaliar sua potencialidade para

prevenir e tratar doenças (Akaram et al. 2010, Palve & Nayak 2012, Nisar et al. 2015).

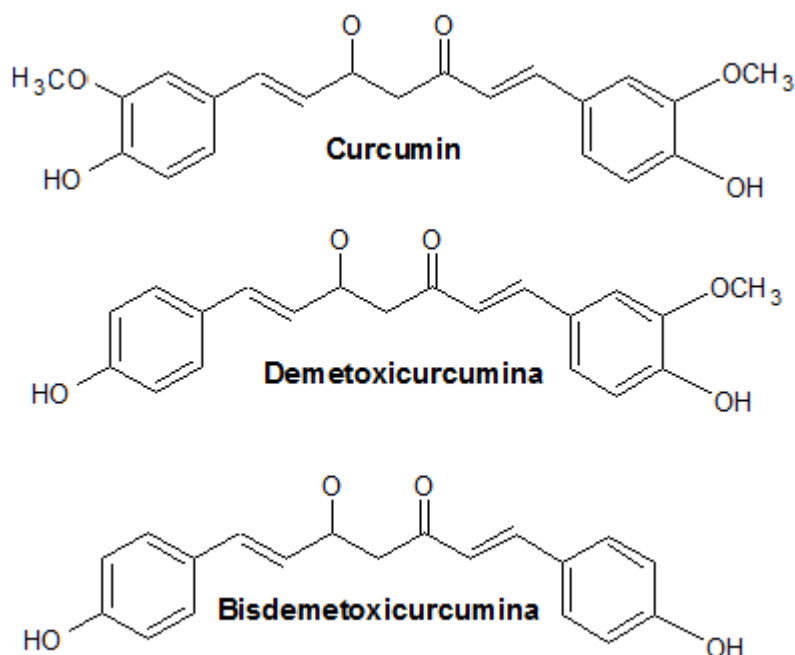


Figura 10. Estrutura química da curcumina, desmetoxicurcumina e bis-desmetoxicurcumina mostrando o número de grupos metóxi (CH₃) de cada composto (Adaptado de Lee et al. (2013)).

1.8.1.2. Morina

A morina (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone), é um flavonoide natural de pigmento amarelo, originalmente isolado a partir de membros da família Moraceae, como exemplo amora (*Chlorophora tinctoria*), pau-d'arco (*Maclura pomifera*) amêndoa (*Prunus dulcis*), e membros da família Myrtaceae, como a goiabeira (*Psidium guajava*) (Wijeratne et al. 2006) (figura 11). Constituinte de muitas plantas, frutas e vinho, atuam como um potente antioxidante protegendo as células contra os danos radicais de oxigênio, na atividade da xantina oxidase, uma enzima geradora de radicais livres, apresentando vários efeitos biológicos e bioquímicos, incluindo ação anti-inflamatória e inibidor de ácido graxo sintase (Tian 2006, Xie et al. 2006, Zhang et al. 2010, Al-numair et al. 2014, Hussain et al. 2014). Hussain et al. (2014) em experimentos para avaliar bioatividade de morina em espécies de *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium*

globosum e *Alternaria alternate*, observaram vários componentes extraídos deste flavonoide que em diferentes concentrações inibiram estes fungos.

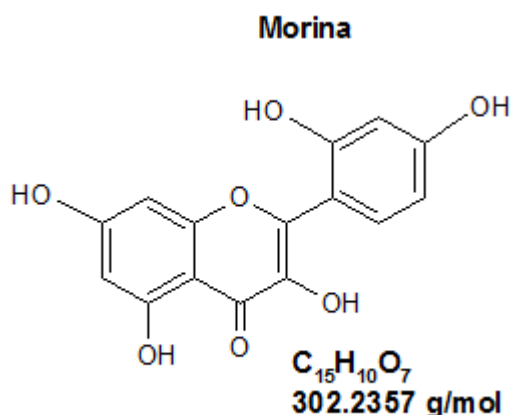


Figura 11. Estrutura química, fórmula molecular e massa molar da morina (Adaptado de Zhang 2010).

Ainda que os vegetais expressem imensa capacidade em sintetizar substâncias com uma variedade de grupos funcionais, apenas uma pequena parte tem sido estudada quanto a seus componentes. Compostos puros ou em extratos, oferecem um enorme potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (Vila et al. 2013). Nesse contexto, compostos naturais como a curcumina e a morina, foram avaliados, buscando verificar ação de inibição sobre as leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans*.

1.9. Avaliação da atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, tem sido evidenciado um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de várias fontes, no intuito de conter a resistência dos microrganismos, assim como avaliar sua eficiência no combate às doenças. Portanto, uma maior atenção à triagem e aos métodos de avaliação de atividade antimicrobiana, tem sido facultado (Das et al. 2010, Pereira Rosa & Silva 2014, Balouiri et al. 2015, El-baky 2016).

Vários bioensaios podem ser empregados para avaliar a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos tais como, método de macro e microdiluição em caldo, ágar-diluição, etest®, disco-difusão em ágar,

método de bioautografia, sistemas automatizado (Vitek®, Walk-Away®, BD Phoenix™), que são métodos laboratoriais bem conhecidos e comumente usados. Outros, não tão amplamente utilizados, mas que fornecem resultados rápidos dos efeitos do agente antimicrobiano e uma melhor compreensão do seu impacto sobre os danos e viabilidade celular infligido ao microrganismo, como citometria de fluxo e métodos bioluminescente podem ser aplicados (Jenkins & Schuetz 2012, Balouiri et al. 2015, Vocat et al. 2015). Além disso, testes como checkerboard, que consiste na associação de antimicrobianos para avaliar o efeito da combinação entre substâncias, criando alternativas no tratamento das enfermidades, também podem ser empregadas (Chang et al. 1995, Jenkins & Schuetz 2012, Matuschek et al. 2014, Sasidharan et al. 2014).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) denominado anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicou uma série de documentos padronizando os testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos (CLSI 2002, 2008a, 2012), levando em consideração alguns parâmetros como pH do meio, inóculo do microrganismo, período e temperatura de incubação, concentração dos antifúngicos e o critério de leitura do teste.

O método aceito como referência para avaliar a suscetibilidade *in vitro*, é o de diluição em caldo preconizado pelo CLSI (2002, 2008, 2012) nos documentos M27-A2, M27-A3 e M27-S4 para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e o documento M38-A2, para fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Pseudallescheria boydii*, *Sporotrix schenckii* e *Rhizopus* spp (CLSI 2008b).

Denominados de macro e microdiluição, metodologia em tubos e em placas respectivamente, são procedimentos laboratoriais comumente usados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos, fármacos e de outras substâncias que matam (ação fungicida) ou inibem (ação fungistática) (Wiegand et al. 2008).

O teste de microdiluição, também conhecido como método de microtitulação em placa, é uma adaptação do método de macrodiluição em caldo, em que os ensaios são realizados utilizando pequenos volumes de componentes como soluções, compostos e microrganismos, e permite que

maior número de agente microbiano seja avaliado muito rapidamente, oferecendo menor risco de erros no procedimento do teste (Pfaller et al. 2012, Nasir et al. 2015).

Com o advento do elevado número de patógenos multirresistentes, juntamente com o déficit em desenvolvimento de novos antimicrobianos, a terapêutica medicamentosa combinada tem contribuído para alguns sucessos clínicos contra muitos agentes de doenças humanas (Ahmad & Aqil, Boyd & Nailor 2011, Tängdén 2014). Algumas estratégias são conduzidas para o êxito deste propósito, através de combinações entre fármacos convencionais ou associados a moléculas adjuvantes, associações de dois ou mais antimicrobianos, ou a compostos naturais bioativos, com intuito de averiguar a possível atividade sinérgica entre substâncias farmacológicas, como estratégias alternativas no tratamento das doenças (Sasidharan et al. 2014, Dziedzic et al. 2015).

O teste de checkerboard tem sido aplicado para determinar a atividade de combinações de antimicrobianos. Baseia-se no protocolo de microdiluição (M27-A3 e M27-S4) desenvolvido pelo CLSI, no qual são determinadas as CIMs de duas substâncias farmacológicas, isoladamente e em associação, em concentrações superiores e inferiores da CIM obtida no teste individual de cada fármaco (Cuenca-Estrella 2004).

A interpretação dos resultados consiste de valores encontrados denominado índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), obtida através da fórmula $ICIF = ICIFA + ICIFB = [A]/CIMA + [B]/CIMB$, onde [A] e [B] correspondem CIM dos diferentes fármacos avaliados em combinação, CIMA e CIMB correspondendo a CIM dos fármacos avaliados isoladamente (Odds 2003, O'Shaughnessy et al. 2006).

Esta metodologia através do ICIF mostra quantitativamente que combinações entre diferentes fármacos podem manifestar efeitos inibitórios maiores ou menores que a soma de seus efeitos individuais, fenômenos denominados de sinergismo e antagonismo respectivamente (Odds 2003).

Tão importante quanto constatar a ação antifúngica de um fármaco, é essencial, identificar como este atua na célula fúngica. A citometria de fluxo entra então nesse contexto para analisar o mecanismo de ação do fármaco,

determinando se este atua inibindo metabolismo ou se é capaz de lesionar a célula do fungo (Tian et al. 2012, Valiante et al. 2015).

1.10. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um recurso que permite uma análise quantitativa, prática e célere de células (Józwa & Czaczyk 2012, Xue et al. 2016), o que justifica a expansão de sua aplicação em laboratórios clínicos nos últimos tempos. É considerada uma metodologia eficaz no estudo sobre os efeitos de compostos naturais ou sintéticos em microrganismo patogênico (Sánchez & Kouznetsov 2010, El-Assal et al. 2014).

Refere-se a um método analítico que permite avaliar um número elevado de células em seus parâmetros intrínsecos, como o tamanho e complexidade celular separadamente, a expressão de antígenos celulares, contagem absoluta de células, assim como separação de populações celulares com fenótipos específicos, através da intensidade da fluorescência emitida pelas células marcadas com substâncias fluorescentes. Uma variedade de tecidos, incluindo o sangue periférico, aspirados de medula óssea, biópsias de pele, e linhas celulares de cultura de tecidos podem ser processados por esta técnica (Comas-Riu & Rius 2009, O'Donnell et al. 2013).

O princípio da citometria de fluxo, consiste em aspirar através do citômetro, aparelho utilizado na metodologia, um elevado número de células ou partículas de uma suspensão previamente preparada, e forçá-la a passar por uma câmara especial (flow cell). Isto permite as células manterem-se envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (sheath fluid), saindo em seguida uma após outra desta câmara, de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser (Davey & Kell 1996, Álvarez-Barrientos et al. 2000, Bergquist et al. 2009)

Uma vez capturada pelo laser, uma parte da luz é disperso (scatter) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula, e dois tipos de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações acerca da célula, onde Forward Scatter (FS) se relaciona com o tamanho da célula e o Side Scatter (SS) com a granularidade da célula ou partícula (Bergquist et al. 2009).

A figura 12 esquematiza o processamento, em que uma suspensão de célula obtida por centrifugação e/ou filtração, é "marcada" com substâncias fluorescentes (fluorocromos), e introduzida no citômetro de fluxo contendo uma solução tampão (fluido de arraste), que direciona as células ao laser, emitindo luz de acordo com suas características fluorescentes, utilizadas para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células (Jahan-Tigh et al. 2012).

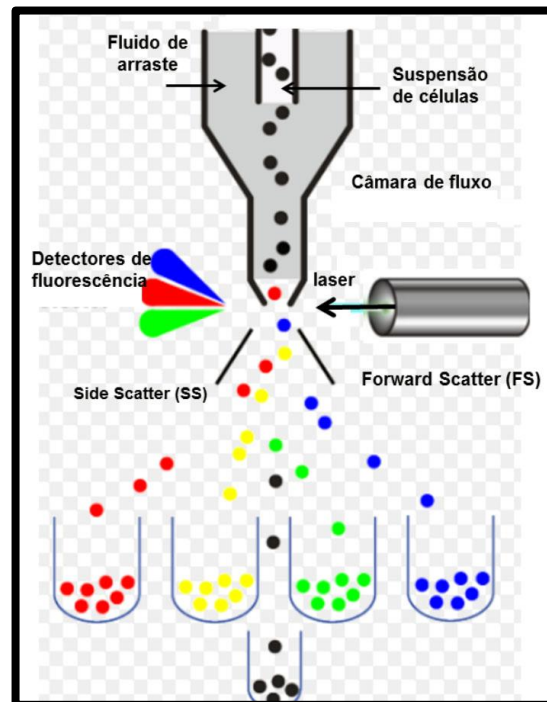


Figura 12. Representação esquemática de um citômetro de fluxo (Adaptada de Jahan-Tigh et al. 2012).

2 JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas invasivas estão se tornando uma causa cada vez mais importante de mortalidade e morbidade humana, particularmente para a população imunocomprometida. Os patógenos fúngicos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* contribuem coletivamente para mais de 1 milhão de mortes humanas anualmente (Robins et al. 2016). Assim a importância da terapêutica antifúngica segura e eficaz para a prática da medicina moderna nunca foi tão relevante.

A terapêutica antifúngica de escolha para o tratamento das doenças fúngicas, ainda apresenta algumas restrições, sendo comprometida pela alta taxa de toxicidade ao hospedeiro, pela atividade fungistática ou pelo aparecimento da resistência aos fármacos em populações de patógenos (Robins et al. 2016).

Apesar da escassez de novas classes de antifúngicos que chegaram ao mercado nos últimos anos, abordagens inovadoras para a descoberta de drogas tem impulsionado investigações sobre estratégias terapêuticas alternativas (Khan et al. 2006, Lombardi et al. 2015). A este respeito, as plantas e seus compostos bioativos, têm se mostrado muito promissoras como candidatos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

As plantas têm sido utilizadas por várias gerações, como tratamento de primeira escolha para várias doenças, incluindo infecções fúngicas. As primeiras civilizações, embora, não conhecesse a natureza dos constituintes das plantas, estabeleceram o potencial terapêutico do vegetais, considerando as reações manifestadas pelos indivíduos na presença destes produtos, de acordo com a dose administrada (Halberstein 2005, Petrovska 2012). Assim, grande parte do conhecimento era empírico, passando de geração em geração, mas sem uma base sólida de seu uso e prescrição (Halberstein 2005, Petrovska 2012).

Atualmente, é bem reconhecido que centenas de compostos bioativos estão presentes em caule, raiz, folha e frutos dos vegetais, como consequência do metabolismo secundário, atuando em sinergismo e conferindo uma ampla variedade de atividades, sendo objetivo de interesse científico crescente (Agarwal et al. 2010, Rana et al. 2011, Alves-Silva et al. 2013) (Maciel et al. 2002,

Amin et al. 2015). Diante disso, os polifenóis curcumina e morina, foram testados, buscando averiguar a capacidade de inibição ou não, sobre as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*, bem como verificar o mecanismo de ação destes compostos na célula fúngica.

3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antifúngica e biológica dos compostos naturais curcumina e morina sobre leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da curcumina e morina sobre leveduras de *Cryptococcus neoformans*.
- Avaliar a interação dos compostos com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B através do teste checkerboard.
- Avaliar possíveis alterações morfológicas no fungo frente aos compostos.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos sobre as hemácias.
- Verificar a ação dos compostos naturais curcumina e morina sobre a produção de ergosterol e membrana da célula fúngica.

4 MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Foram utilizadas 18 amostras de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*, sendo 14 *C. neoformans* e 4 *C. gattii* pertencentes à Micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP- UFG) previamente identificadas segundo Kurtzman & Fell (1998) pelas suas características macromorfológicas através do crescimento no meio Agar Sabouraud dextrose (ASD) e meio de di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA), micromorfológicas com presença de elementos arredondados e cápsula, fisiológicas através da produção de urease e bioquímicas por meio da assimilação de fontes de carbono.

Estes isolados foram obtidos do líquido céfalo-raquidiano (LCR) de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, provenientes do Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT). Duas cepas padrão (American Type Culture Collection) *C. neoformans* ATCC 90112, *C. gattii* ATCC 24065, foram também avaliadas.

Todos os isolados foram armazenados a 4°C em ASD (difco) e subcultivados neste mesmo meio por 72 horas antes da realização dos testes. As leveduras foram subcultivadas por duas vezes para assegurar sua pureza e viabilidade. Os isolados utilizados foram obtidos do projeto de pesquisa de protocolo nº 004/03 aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HDT, de acordo com o anexo 1.

4.2. Compostos naturais e fármacos

Os produtos naturais boldina, curcumina, hesperetina, morina e derivados sintéticos de N-acilhidrazona com diferentes pesos moleculares, foram submetidos testes de suscetibilidade antifúngica em isolados de leveduras de *Cryptococcus neoformans* e uma cepa padrão de *C. gattii* ATCC 24095. Todos os compostos foram gentilmente cedidos pela professora Dr^a. Valéria de Oliveira do Laboratório de Bioconversão da Faculdade de Farmácia da UFG para a realização da triagem.

A atividade antifúngica dos produtos naturais, assim como dos antifúngicos anfotericina B (Squibb, USA) e fluconazol (Pfizer, USA) foi avaliada *in vitro* em amostras do complexo *C. neoformans*. Os antifúngicos e os compostos naturais foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e diluídos em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co) com L- glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co). As concentrações testes foram de 512 µg/mL para os compostos, 32 µg/mL para o fluconazol e 16 µg/mL para anfotericina B.

4.3. Testes de Suscetibilidade *in vitro*

4.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de suscetibilidade *in vitro*, foi realizado utilizando a técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 e M27-S4 do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2008, CLSI 2012), que permite determinar a menor concentração fármaco capaz de inibir isolados testados.

4.3.2. Preparo dos antifúngicos e compostos bioativos

Os antifúngicos e os compostos naturais foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e diluídos a metade em caldo RPMI 1640 (Sigma

Chemical Co) com L- glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co). As concentrações avaliadas variaram de 64 a 0,06 µg/mL para fluconazol, 32 a 0,03 µg/mL para anfoterina B, e 1024 a 1 µg/mL para os compostos bioativos.

4.3.3. Preparação do inóculo

A suspensão de cada amostra de fungo foi preparada em 5 mL de solução salina esteril a 0,85%. A densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530nm, correspondendo aproximadamente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A suspensão contendo o inóculo foi diluída a 1:50 e a 1:20 em caldo RPMI 1640 para obter concentração final de células de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.3.4. Procedimento do teste

Na placa de microtitulação contendo 96 orifícios foram colocados na primeira coluna 200 µL do fármaco ou do composto natural e nos demais orifícios 100µL de meio RPMI 1640, e realizada a diluição seriada menos no controle do inóculo e do meio de cultura. Em seguida, foi adicionado 100µL do inóculo em cada orifício. O controle das substâncias testadas, do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640), foi realizado em cada teste. A figura 13 mostra o esquema do teste de suscetibilidade *in vitro*. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade. As placas foram incubadas a 35° C por 72 horas e os ensaios realizados em duplicata.

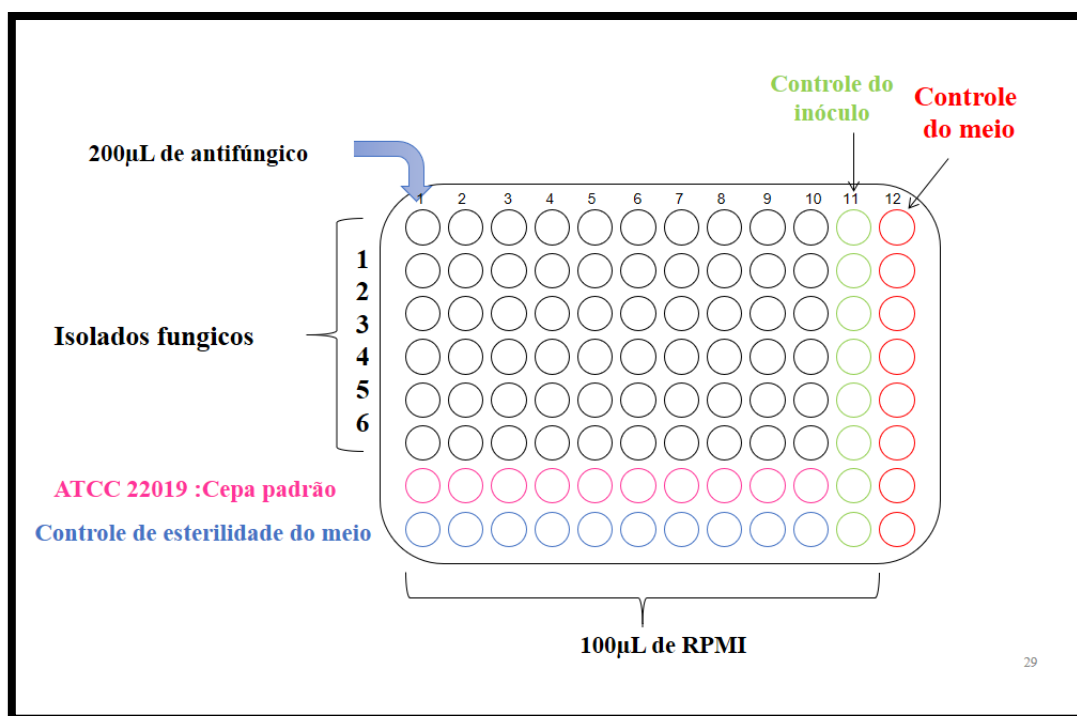


Figura 13. Placa de microtitulação esquematizando o procedimento do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo (CLSI 2008, CLSI 2012).
Fonte: Autoria própria.

4.3.5. Leitura e Interpretação

A leitura das placas para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente, após 72 horas de incubação. Para a anfotericina B e os compostos bioativos, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visual, enquanto para o fluconazol a menor concentração, capaz de inibir 50% do crescimento quando comparado com o controle livre do fármaco.

4.3.6. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) das leveduras, 10 µL da solução contendo a CIM, 2x CIM e 4x CIM obtidas no teste de suscetibilidade, foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud-Dextrose (ASD). As placas foram incubadas a 35° C por 72 horas, e a CFM foi definida como a menor concentração dos fármacos que inibiu o

crescimento total do fungo ou no máximo até o crescimento de duas colônias (Barchiesi et al. 1995, Manohar et al. 2001). Todos os testes foram realizados em duplicata. A figura 14 esquematiza a determinação da CFM.

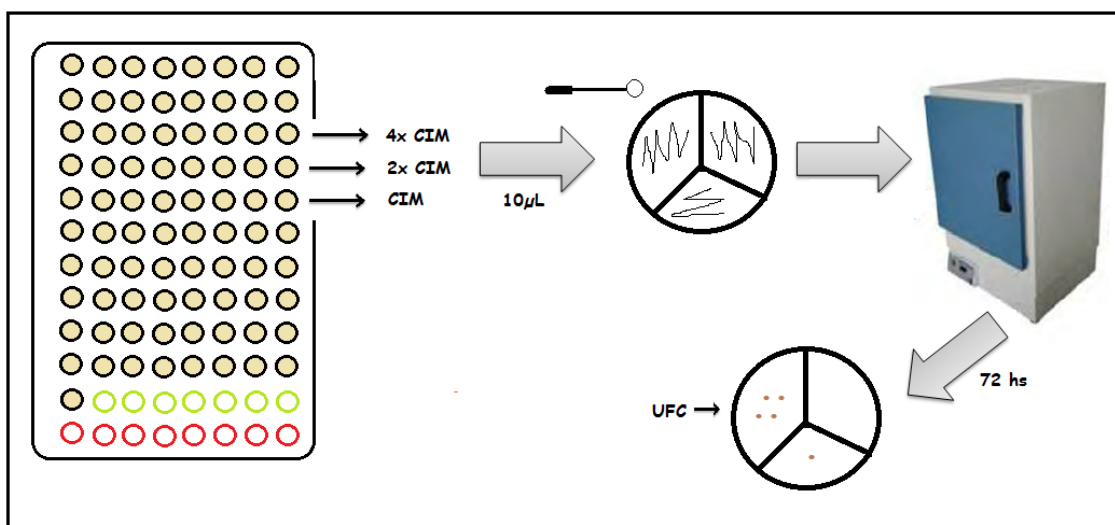


Figura 14. Esquema representativo da determinação da CFM. Fonte: Autoria própria.

4.4. Avaliação da associação entre os compostos curcumina e morina com fluconazol e anfotericina

Os testes de suscetibilidade por combinação foram realizados para observar a associação entre os compostos fenólicos curcumina e morina, e os fármacos fluconazol e anfotericina B.

Utilizou-se o método de microdiluição em placas (documento M27-A3 CLSI 200, M27-S4 CLSI 2012) para avaliar as CIMs isolada de cada substância (antifúngicos e compostos), complementando o teste, com a técnica de Checkerboard, segundo técnica proposta por Ernst & Rogers (2008) para determinar as CIMs em cada associação entre os compostos e fármacos.

Essa técnica permite o cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) que demonstra se a CIM de uma substância (fármaco/composto) está reduzida (sinérgico), inalterada (indiferente) ou aumentada (antagonista) na presença de outra substância.

4.4.1. Preparação do inóculo

O inóculo de todas os isolados foram preparados conforme descrito no item 4.3.3.

4.4.2. Procedimento do teste “Checkerboard”

Para realização do teste, tomou-se como base a CIM dos compostos curcumina e morina avaliados isoladamente, assim como os antifúngicos fluconazol e anfotericina B sobre os isolados fúngicos. Os compostos foram diluídos 4x a concentração que se pretendia iniciar. Em uma (placa A) foram feitas diluições seriadas no eixo vertical em concentrações superiores e inferiores da CIM, obtida no teste de microdiluição (item 4.3.4), (4X, 2X, CIM, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$). Em outra (placa B) o mesmo procedimento foi realizado no sentido horizontal, utilizando a solução antifúngica. Após este procedimento, 50 μ L da diluição dos orifícios da placa A e da placa B, foram transferidos aos orifícios exatamente correspondentes, a uma terceira placa (placa C). Foram adicionados 100 μ L do inóculo das amostras, aos orifícios da placa C, que continham combinações do composto e antifúngico, conforme a figura 15. A concentração final avaliada na placa C foi a menor concentração capaz de inibir o fungo.

Para controle de viabilidade do inóculo, uma fileira da placa foi preenchida com 100 μ L de inóculo e 100 μ L de RPMI, e outra para o controle de esterilidade do meio, contendo 200 μ L de RPMI.

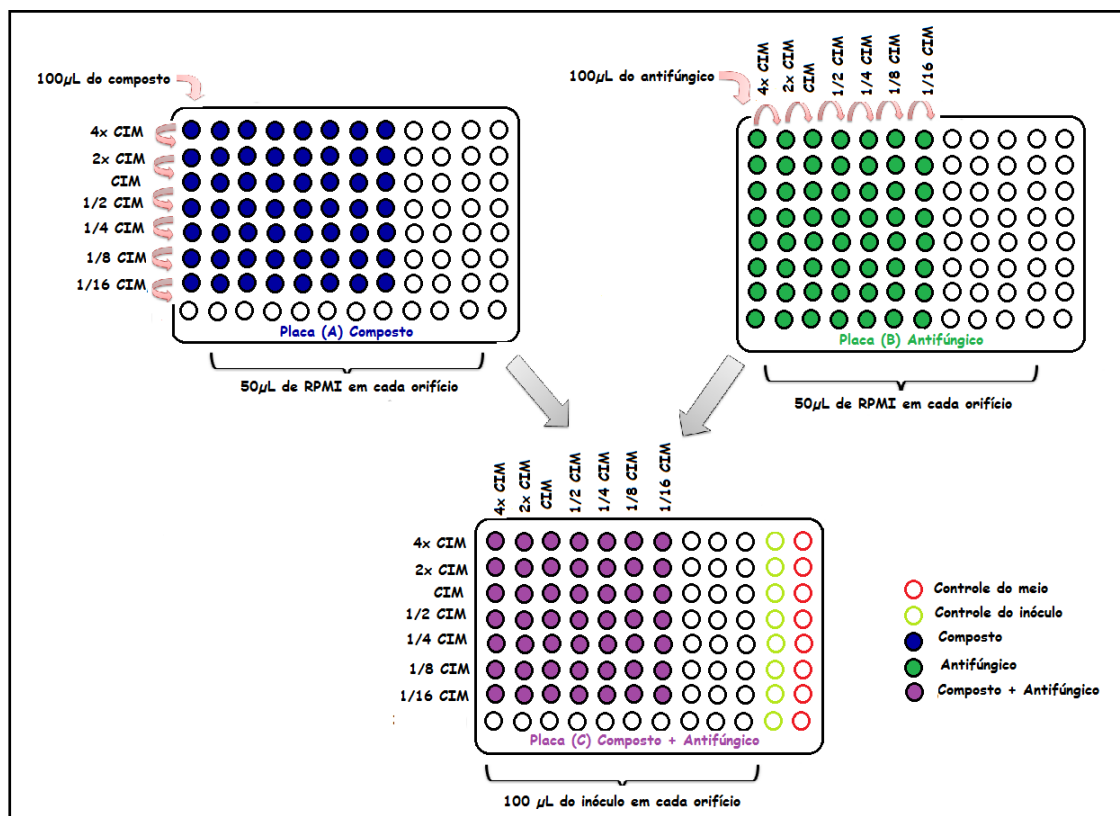


Figura 15. Esquema da associação dos compostos com e antifúngicos. Fonte: autoria própria.

4.4.3. Leitura dos resultados

A leitura dos ensaios foi realizada após 72 horas de incubação em estufa a 35° C, determinando a concentração inibitória (CIM) da combinação do fármaco e do composto, que corresponde a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo quando comparado ao controle.

A interpretação dos resultados consistiu dos valores encontrados ditos, índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), obtida através da formula $ICIF = ICIFA + ICIFB = [A]/CIMA + [B]/CIMB$, onde [A] e [B] correspondem CIM dos diferentes fármacos ou compostos avaliados em combinação, CIMA e CIMB correspondendo a CIM de cada fármacos ou compostos, avaliados isoladamente. De acordo com os resultados classificou-se sinergismo ($ICIF \leq 0.5$), antagonismo ($ICIF > 4.0$) e não interação ($ICIF > 0.5-4.0$) (Odds 2003, O'Shaughnessy et al. 2006).

4.5. Efeito dos compostos sobre a cinética de crescimento das leveduras

O tempo da ação antifúngica dos compostos foi avaliado com a cepa padrão de *C. gattii* ATCC 24065, através da cinética de crescimento conforme descrito por Pappalardo et al. (2009) com modificações. *C. gattii* ATCC 24065 foi subcultivado em placa de ágar Sabouraud dextrose, e após 72h, colônias individuais (≥ 1 mm) foram suspensas em salina estéril a 0,9% e o inóculo inicial foi ajustado à 85% de transmitância ao comprimento de onda de 530 nm por espectrofotometria, correspondendo a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Quinhentos microlitros da suspensão de células fúngicas foram adicionados a Erlenmeyers contendo 4,5 mL de meio RPMI resultando em uma concentração 10^5 UFC/mL. Foram feitas diluições seriadas até que o inóculo atingisse a concentração de 10^2 UFC/mL e acrescentou-se o composto nas concentrações 4x, 2x, CIM, $\frac{1}{2}$ CIM. O controle positivo foi realizado com AMB e o negativo com caldo Sabouraud e o fungo. Os Erlenmeyers foram incubados sob agitação à temperatura ambiente. Alíquotas de 10 μ L de cada Erlenmeyer foram retiradas nos tempos 0h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h, e plaqueados em ASD. Após 72h a 35°C, a contagem de colônias foi realizada. Os experimentos foram feitos em duplicata. Os dados da contagem de colônias (em $\log_{10}$ UFC/mL) foram plotados em função do tempo para cada composto, a figura 16 ilustra o procedimento realizado.

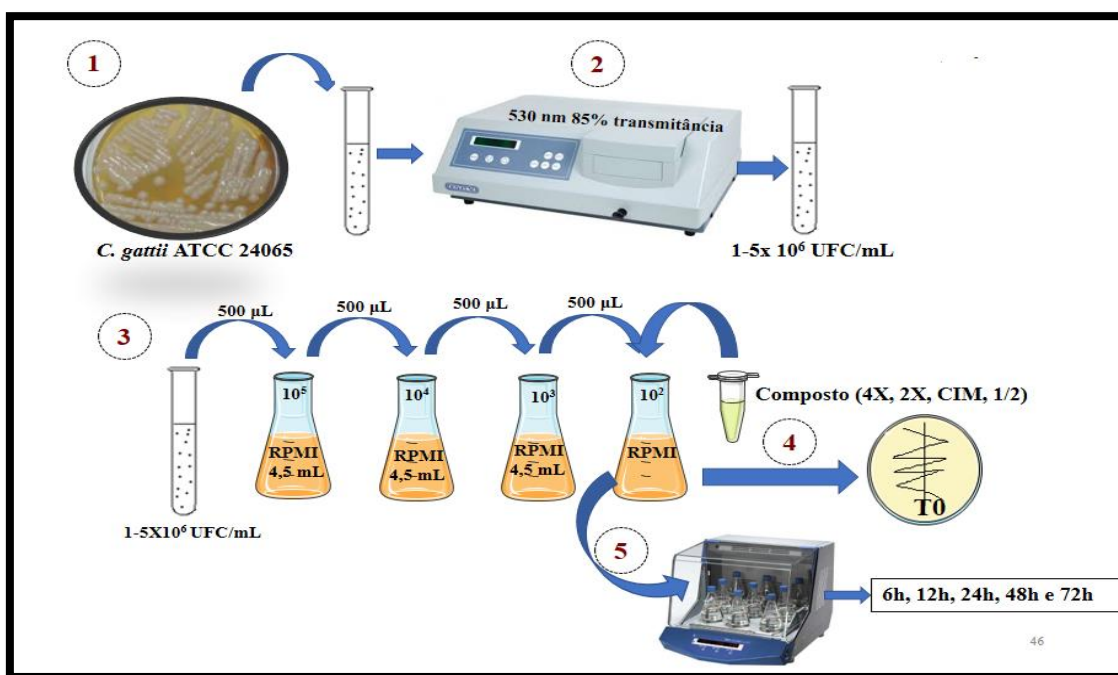


Figura 16. Procedimento utilizado para cinética de crescimento fúngico.

4.6. Estudo da micromorfologia das leveduras

Para o estudo da micromorfologia das células fúngicas, sob a ação da curcumina e morina, foram utilizadas lâminas de vidro estéreis e adicionados 10 µL de solução salina a 0,9%, 10 µL de cada suspensão fúngica preparada no ensaio para determinação da CIM (item 4.3.3) de cada composto após 24, 48, e 72 horas de incubação e em seguida foram adicionadas 10 µL de tinta da nanquim para evidenciar a cápsula da levedura, conforme esquematizado na figura 17. Foi realizado um controle negativo, apenas com o inóculo sem tratamento e como controle positivo AMB em CIM. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico na objetiva de 40X para se observar possíveis alterações da morfologia das leveduras. Também foi realizada uma contagem das leveduras em cinco campos de cada lâmina (Queiroz 2012).

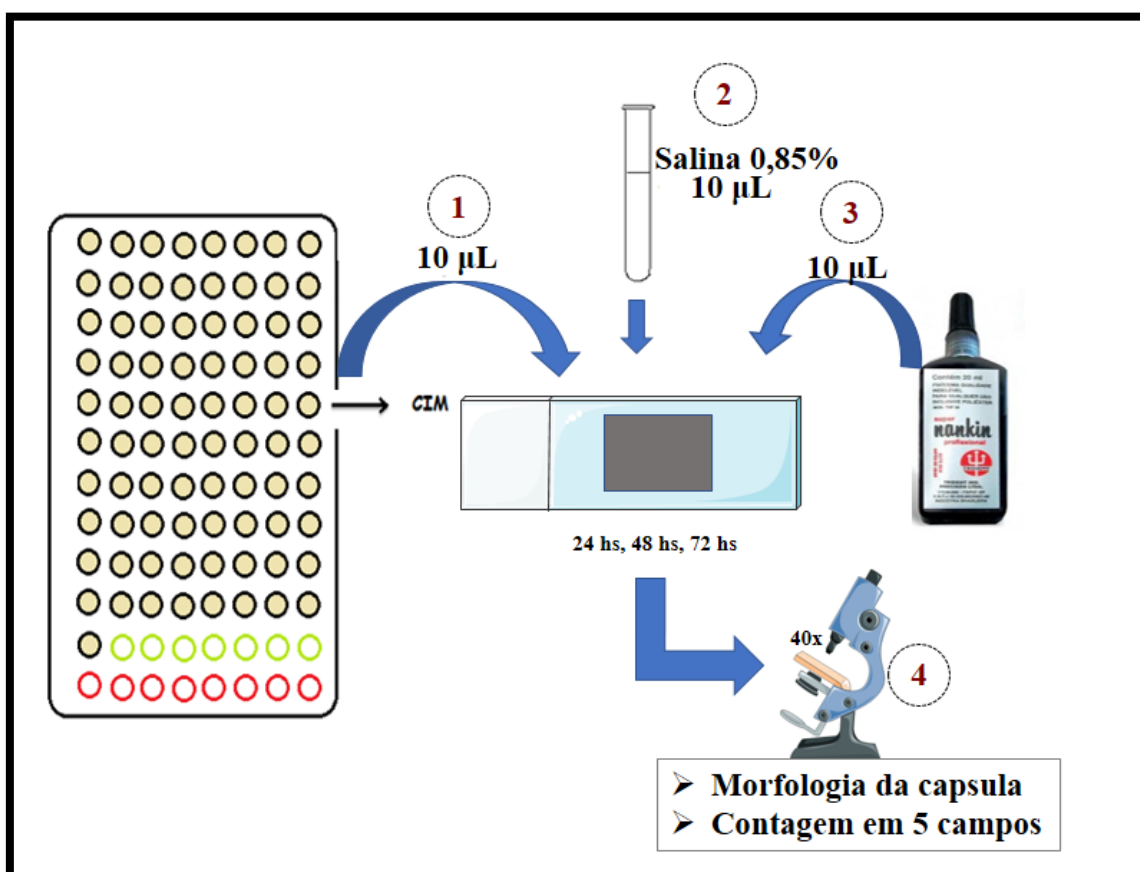


Figura 17. Teste de micromorfologia.

4.7. Avaliação da citotoxicidade

Os compostos curcumina e morina foram avaliados quanto sua capacidade citotóxica em hemácias sendo determinada através do ensaio de atividade hemolítica de acordo com (He et al. 2007) com algumas modificações. Foram centrifugados 5 mL de sangue de carneiro desfibrando (Newprov), e lavado uma vez com tampão fosfato salino(PBS) pH 7,4. As hemácias foram diluídas em 20 mL do mesmo tampão (diluição 1:5). Os compostos foram diluídos em tampão PBS pH 7,4 em concentrações de 1024 a 4 µg/mL e armazenados em tubos eppendorff. Foram adicionados 50 µL da solução de hemácias a 50 µL de cada concentração dos compostos. A suspensão foi incubada a 37°C sob agitação durante 30 minutos, centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e, 80 µL do sobrenadante de cada suspensão foi colocado em placa de microtitulação de 96 poços. O experimento foi realizado em duplicata, e como controle positivo da hemólise foi utilizado Triton x-100 a 1% e a solução de hemácias com PBS pH 7,4 como controle negativo. O aparelho Multiskan Thermo Labsystems® foi utilizado para realização da leitura a 450 nm para determinação da absorbância de cada amostra, conforme mostra a figura 18. A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Hemólise\%} = \frac{\text{Abs composto} - \text{CN}}{\text{Abs CP} - \text{Abs CN}} \times 100$$

Onde: CN - controle negativo

CP= controle positivo

Abs= absorbância

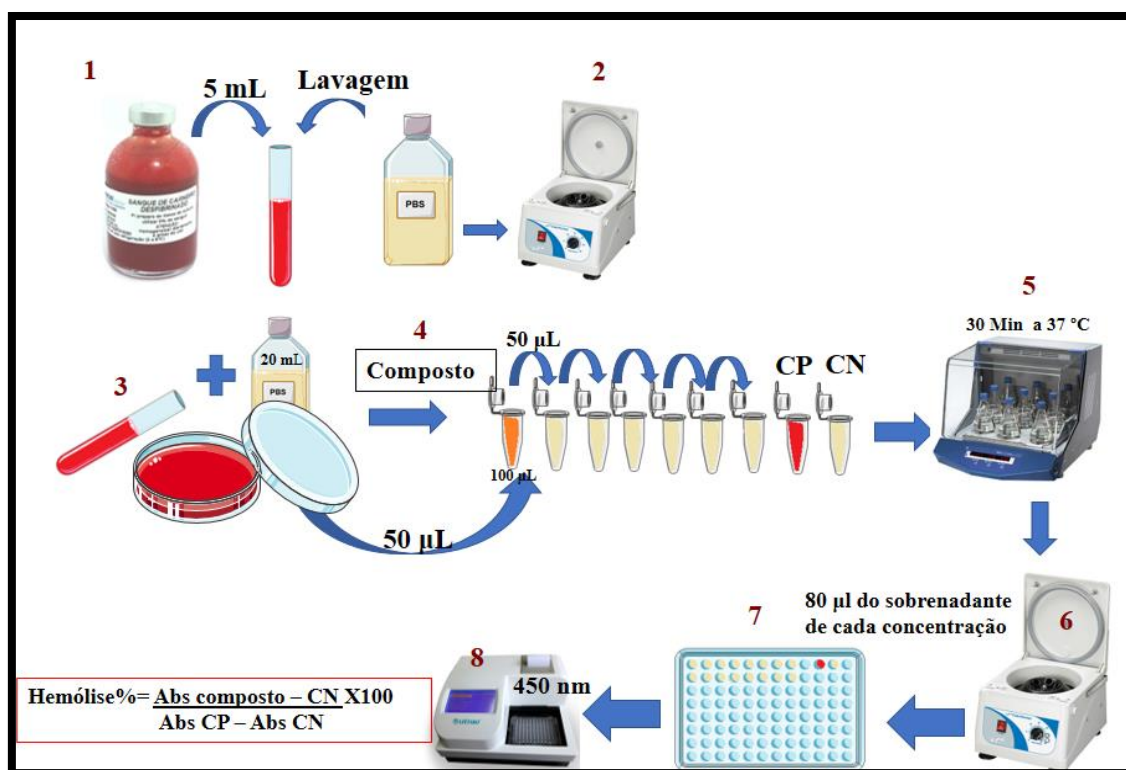


Figura 18. Ensaio de toxicidade em hemácias.

4.8. Doseamento do ergosterol

A metodologia utilizada para a extração do ergosterol das leveduras de *C. neoformans* foi realizada de acordo com Arthington-Skaggs et al. (1999) com algumas modificações. Uma alíquota correspondendo $1-5 \times 10^6$ do fungo, *C. gattii* ATCC 24065, previamente crescido ágar Sabouraud dextrose, foi transferida para Erlenmeyer contendo 50mL de caldo Sabouraud dextrose (CSD) Difco contendo curcumina e morina nas concentrações correspondentes a CIM e $\frac{1}{2}$ CIM. Como controle positivo foi avaliado o fluconazol e como controle negativo CSD com fungo.

Todos os ensaios permaneceram em agitação constante por 72 horas a 200 rpm, e após a incubação a 35°C, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o peso úmido ("pellet") foi determinado pelas células conservadas no tubo em temperatura ambiente.

Os tubos com as células foram pesados, e o valor obtido foi subtraído do peso do tubo vazio. Três mililitros de solução alcoólica de potássio (25g KOH,

35mL água e álcool 100% qsp 100mL), foram adicionados e agitados por 1 minuto e incubado em banho-maria, por 4 horas a 85 °C. Este procedimento corresponde ao processo de saponificação, que consiste na hidrólise básica de lipídeos isto é, a lise dos fosfolipídeos, (moléculas que contêm ácidos graxos), mas, não do ergosterol, mediante a adição de uma base forte (hidróxido de potássio), que atua como catalisador da reação, facilitado pelo aquecimento (Kaplan 2015). Após a incubação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente.

Para a extração dos esteróis, foi adicionado a suspensão de células, 1mL de água destilada esterilizada e 3mL de n-heptano que foram mantidos sob agitação por 3 minutos em vórtex. Os tubos permaneceram em temperatura ambiente, para a formação das fases aquosa e lipofílica. Por apresentarem o mesmo caráter hidrofóbico, o heptano saturado em água, e o ergosterol, unem-se na fase lipofílica, formando uma camada distinta da outra já formada, que contém água e outros resíduos celulares.

Alíquotas de 200µL referente à camada superficial rica em ergosterol foi transferida para eppendorf de 2 mL, contendo 800µL de etanol, obtendo-se uma diluição 1:5 e em seguida foi transferido para um tubo de vidro e submetida a leitura de absorbância em dois intervalos entre comprimentos de onda 240 e 300 nm. A espectrofotometria de varredura foi realizada no aparelho de Cary®so UV-Vis Varian. A figura 19 ilustra do procedimento para o doseamento do ergosterol. Esta técnica possibilita a extração de dois esteróis: o ergosterol e seu intermediário 24(28) DHE (dehydroergosterol) que é um componente da cascata bioquímica de formação do ergosterol (Quain & Haslam 1979, Arthington-skaggs et al. 1999).

Ainda que o ergosterol, quanto o 24(28)-DHE sejam absorvidos a 281.5nm, apenas 24 (28) DHE, mostra uma intensa banda de absorção em 230 nm. A quantidade total desses esteróis presentes na célula do fungo foi calculada como porcentagem do peso úmido das células através da equação (Breivik & Owades 1956).

$$\% \text{ ergosterol} + \% 24(28) \text{ DHE} = [(A_{281,5}/290) \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% 24(28) \text{ DHE} = [(A_{230}/518) \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + 24(28) \text{ DHE} - \% 24(28) \text{ DHE}.$$

F é o fator de diluição em etanol, e 290 e 518 são os coeficientes de extinção representado em porcentagem ou por centímetro E (1%. 1 cm.), determinado respectivamente para ergosterol cristalino e 24(28) DHE, obtidos pela espectrofotometria.

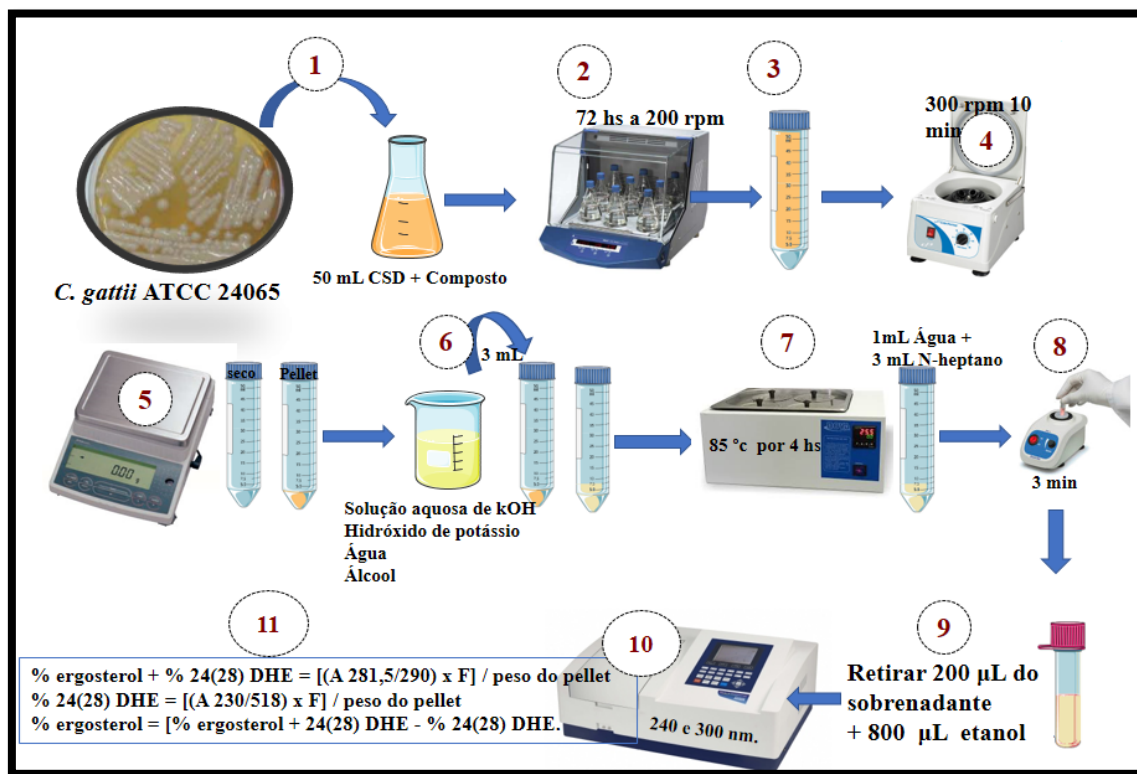


Figura 19. Técnica de doseamento do ergosterol.

4.9. Avaliação da ação dos compostos sobre a membrana das leveduras por citometria de fluxo

A avaliação do mecanismo de ação dos bioativos em teste, foi realizada de acordo com Ahmad et al. (2011), com modificações.

4.9.1. Preparo do composto

Os compostos naturais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido

morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co), para obter concentrações variando de 512 a 1 µg/mL.

4.9.2. Preparo do inóculo

Células de *C. gattii* ATCC 24065 foram cultivadas em ASD por 72 horas e inoculados em 10 ml de meio RPMI e incubados a 35 °C overnight em agitação a 200 rpm. O inóculo foi ajustado conforme o item 4.3.3.

4.9.3. Procedimento do teste

O inóculo foi adicionado a 5 ml de caldo RPMI acrescido do composto em concentração 4x CIM, 2x CIM, CIM e ½ CIM e incubados a 35°C por 2 horas. Em seguida as células foram centrifugadas a por 5 minutos a 5000 rpm, o pellet foi ressuscitado em 5 ml de tampão fosfato (PBS: 8,77 g de NaCl, 1,02 g de Na₂HPO₄, 0,34 g de NaH₂PO₄/L, pH 7,2), centrifugado novamente por 5 minutos a 5000 rpm e o conteúdo após agitado em vórtex foi transferido para eppendorfs. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 200 µl de PBS. A figura 20 ilustra o procedimento do teste.

Para a marcação celular, 5 µg/mL de iodeto de propídio (PI- Sigma), marcador de integridade de membrana, foi adicionado em todas as células tratadas e nos controles negativos. A suspensão obtida com marcador foi mantida a 35° C por 30 minutos, na ausência de luz e posteriormente submetida à análise pelo citômetro Accuri C6 (Becton Dickinson Biosciences), sendo analisados 10.000 eventos em uma população determinada (gate), e utilizada a fluorescência da luz vermelha em detector FL2 para PI. O PI é um marcador de integridade de membrana, com capacidade de atravessar membrana celular lesionada, portanto, dentro da célula liga-se aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha, quando associada à célula de membrana íntegra este marcador não emite fluorescência (Pina-Vaz et al. 2001, Vale-Silva et al. 2006).

4.9.4. Controle de qualidade

Como controle de viabilidade celular, foi utilizado leveduras não tratadas com marcador e sem o bioativo. Para confirmar a validade do teste foram utilizadas leveduras tratadas com álcool 70% e marcadas marcador PI como controle positivo, e leveduras tratadas com anfotericina B na concentração de 2 µg/mL, concentração capaz de lesionar a membrana citoplasmática do fungo.

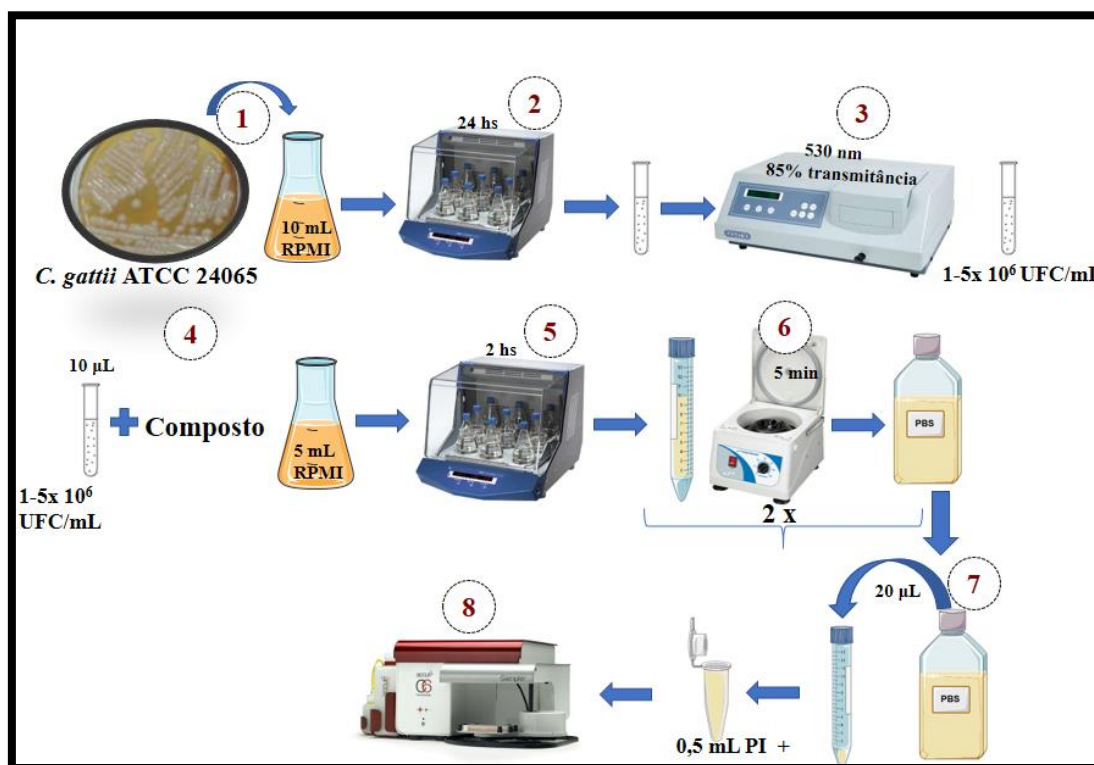


Figura 20. Procedimento de avaliação de lesão de membrana por citometria de fluxo.

4.10. Análise estatística

O programa GraphPad Prism 5.0 Software (San Diego, CA, EUA) foi usado para tabulação dos dados e a variação entre grupos foi analisada utilizando análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni. Foi estabelecida significância estatística de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Teste de suscetibilidade *in vitro* CIM e CFM

Os resultados iniciais mostraram que dentre os compostos naturais, a curcumina, a morina e os derivados N-acilhidrazona, com diferentes pesos moleculares, apresentaram boa atividade antifúngica quando avaliados em leveduras pertencentes ao complexo *C. neoformans*. A partir destes resultados optamos por continuar nossos estudos apenas com os compostos de origem natural, curcumina e morina.

Os resultados de suscetibilidade *in vitro* aos compostos bioativos curcumina e morina, mostraram que estes, exerceram atividade antifúngica ao inibir o crescimento das 20 amostras de leveduras do complexo *C. neoformans* na pesquisa, em concentrações de 8 a 256 µg/mL para o flavonoide morina, enquanto para a curcumina, a concentração mostrou-se bem mais inferior, entre 2 a 64 µg/mL.

A concentração fungicida mínima para verificar se a inibição foi reversível ou permanente, foi avaliada em valores a partir da concentração inibitória mínima de cada isolado, e para os dois compostos foi pelo menos de quatro vezes superiores as suas respectivas concentrações inibitórias.

As concentrações inibitória e fungicida dos compostos naturais curcumina e morina e os antifúngicos fluconazol e anfotericina B sobre as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* encontram-se na tabela 1. E na tabela 2 os resultados da CIM₅₀ e CIM₉₀.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e fungicida ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos morina e curcumina sobre os 20 isolados de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*.

Compostos Bioativos/ Antifungicos ($\mu\text{g/mL}$)								
Isolados de <i>C. neoformans</i>	Morina		Curcumina		Fluconazol		Anfotericina B	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
L2	64	256	64	128	2	8	0,25	0,25
L3	64	256	8	32	1	4	0,25	0,25
L4	16	32	16	32	2	8	0,25	0,25
L5	32	128	8	32	2	4	0,125	0,125
L7	16	64	8	32	2	8	0,25	0,25
L14	32	128	16	64	1	4	0,5	0,5
L15	32	128	16	64	2	8	0,125	0,25
L18	256	512	16	64	4	16	0,5	0,5
L21	64	256	16	64	2	8	0,125	0,125
L23	256	512	8	32	4	8	0,25	0,25
L24	32	128	16	64	1	4	0,25	0,25
L28	64	256	32	128	2	8	0,25	0,25
L29	64	256	16	64	2	8	0,25	0,25
L30	32	128	64	128	4	8	0,125	0,25
Isolados de <i>C. gattii</i>								
L1	8	32	2	8	0,5	4	0,125	0,25
L9	16	64	8	32	2	4	0,25	0,25
L20	16	64	16	64	4	16	0,25	0,25
L48	16	64	4	16	2	8	0,125	0,125
ATCC 90112 <i>C. neoformans</i>	64	256	32	128	2	8	0,125	0,25
ATCC 24065 <i>C. gattii</i>	32	128	32	128	2	8	0,125	0,25
ATCC 22019 <i>Candida parapsilosis</i>	512	512	128	512	2	2	0,5	0,5

Tabela 2. Variação da Concentração inibitória mínima, (CIM50 e CIM90) e variação da concentração fungicida mínima da curcumina e morina.

Compostos	Variação de CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Variação de CFM
Curcumina	2 – 64	16	64	8 – 128
Morina	8 – 256	32	64	32 – 512
Fluconazol	0,5 – 4	2	4	16 – 2
Anfotericina B	0,062 - 0,125	0,125	0,125	0,125 - 0,5

5.2. Associação entre os compostos curcumina e morina aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B

Os resultados dos índice de concentração inibitória fracionária (ICIFs) obtidas da combinação entre o antifúngico fluconazol e os compostos flavonoides obtiveram variação de 0,37 a 2,0 para a curcumina e 0,25 a 2,0, para morina, avaliadas em 20 isolados de *C. neoformans*. Essa interação exerceu um efeito sinérgico em 30% (6/20) nos isolados estudados quando se tratando da morina, e 15% (3/20), na análise da curcumina, potencializando o efeito do fármaco, porém, demonstrando um número representativo de isolados 70% e 85% respectivamente indiferentes a essa associação (gráfico 1). Um efeito sinérgico é considerado quando ICIF é $\leq 0,5$ e indiferente ≤ 4 (Odds, 2003). Ficou demonstrado, que ambos os compostos não apresentaram antagonismo quando em combinação com o antifúngico fluconazol.

Também foi testada a interação dos compostos com o antifúngico anfotericina B, onde todos os resultados se mostraram indiferentes na associação com a curcumina, e 70% dos isolados apresentaram sinergismo com a morina (gráfico 2). Os compostos também não apresentaram antagonismo nesta combinação.

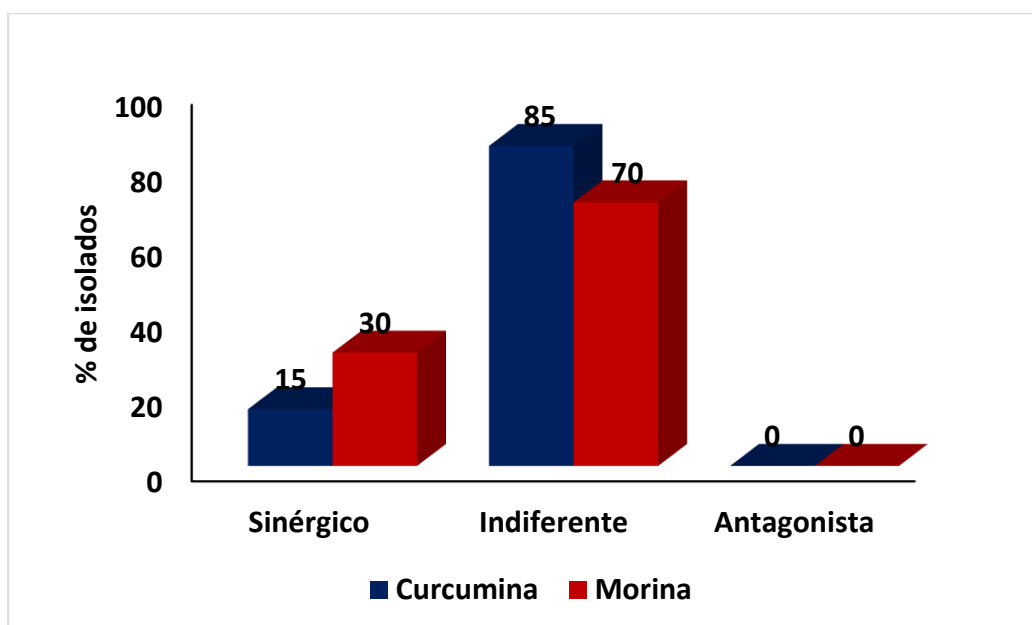


Gráfico 1. Interação entre os compostos curcumina e morina ao fluconazol em isolados *C. neoformans*.

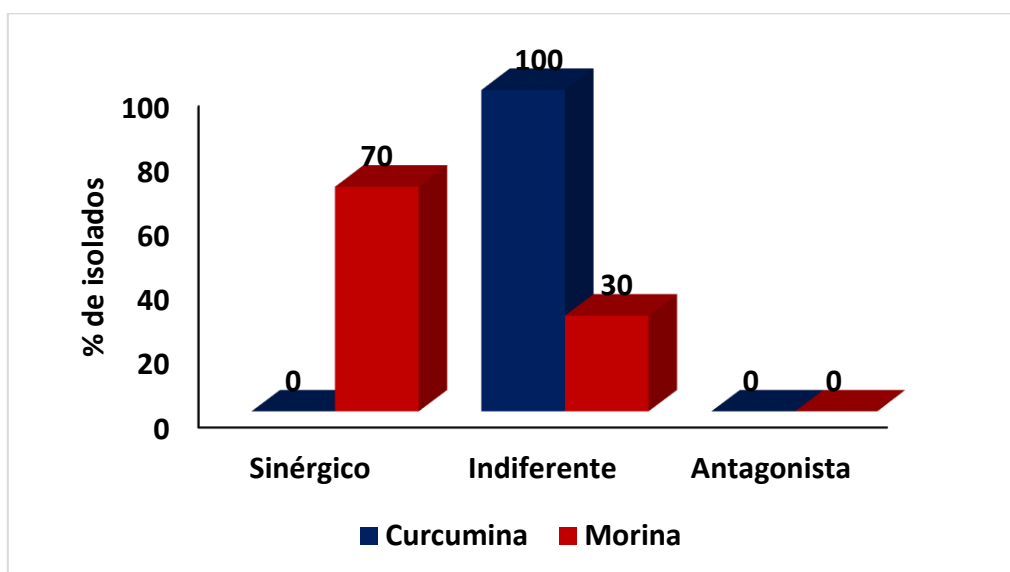


Gráfico 2. Interação entre os compostos curcumina e morina com anfotericina B em isolados *C. neoformans*.

5.3. Efeito dos compostos sobre a cinética de crescimento das leveduras

Para avaliação da viabilidade fungica foi utilizada a cepa padrão de *C. gattii* ATCC 24065 sob a ação dos compostos curcumina e morina nas concentrações correspondente a 4X CIM, 2X CIM, CIM e ½ CIM. Foi constatado um decréscimo na contagem de colônias do fungo de acordo com o tempo de incubação quando comparado ao controle negativo (inóculo sem tratamento). A figura 21 mostra a quantidade de colônias, em log₁₀ UFC/mL, versus o tempo de exposição na presença dos compostos em suas respectivas concentrações. Também verificou-se um aumento crescente do número de colônias do controle negativo ao decorrer do tempo de incubação, assim como a inibição do crescimento apresentada no controle positivo com o antifúngico anfotericina B a partir de 6 horas de tratamento. Os resultados estatísticos mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e a concentração 4x (128 µg/mL) a partir de 12 horas de tratamento com o composto curcumina. Para a morina as concentração 4x (128 µg/mL) e 2x (64 µg/mL) também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) a partir de 24 horas de tratamento.

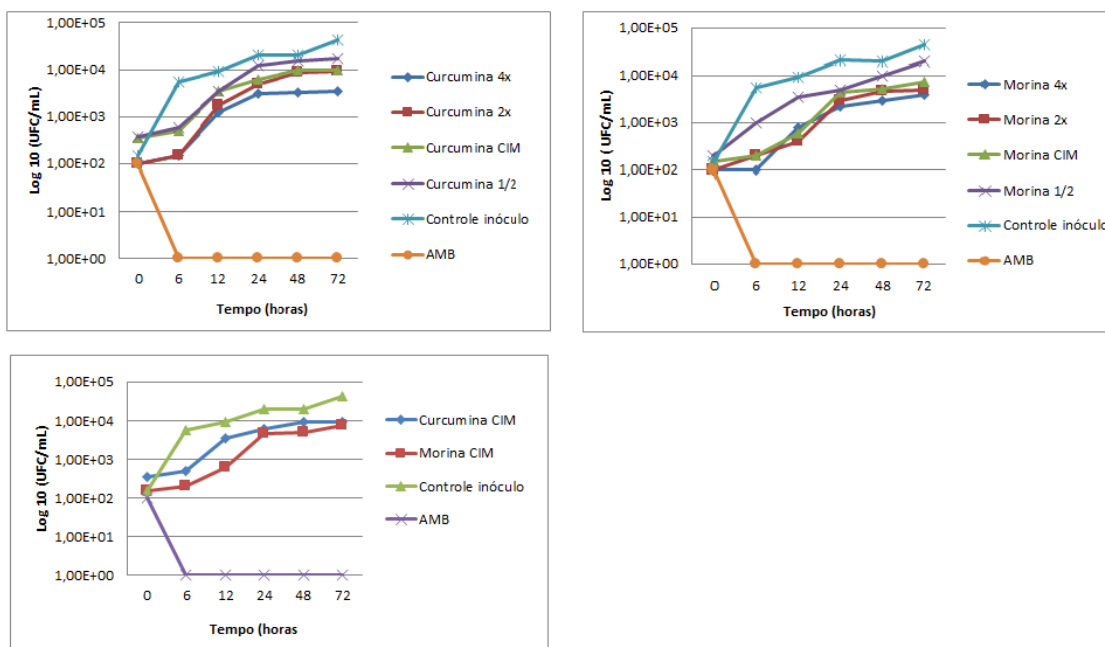


Figura 21. Viabilidade fúngica de isolados *C. gattii* ATCC 24065 sob efeito da curcumina (A) e morina (B) em suas concentrações 4x CIM, 2X CIM, CIM, e ½ CIM, e em (C) ambos os compostos e controle na concentração inibitória mínima.

5.4. Estudo da micromorfologia das leveduras

No estudo da micromorfologia das leveduras foi observada alterações no tamanho das cepas *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 24065. Ocorreu uma diminuição no tamanho no decorrer das 72 horas de tratamento, assim como uma notável redução da capsula polisacarídica, conforme mostra a Figura 22. Em relação contagem das células, foi constatada uma redução do número de células tratadas em relação ao controle não tratado, porém não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$). Dados apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de leveduras viáveis de por campo (objetiva de 40X) no estudo da micromorfologia

Cepas	ATCC 90112			ATCC 24065		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Tempos de incubação	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Controle inóculo	35	130	390	26	120	320
Controle AMB CIM	5	3	3	6	3	1
Curcumina CIM	21	40	37	20	49	31
Morina CIM	11	41	29	19	28	20

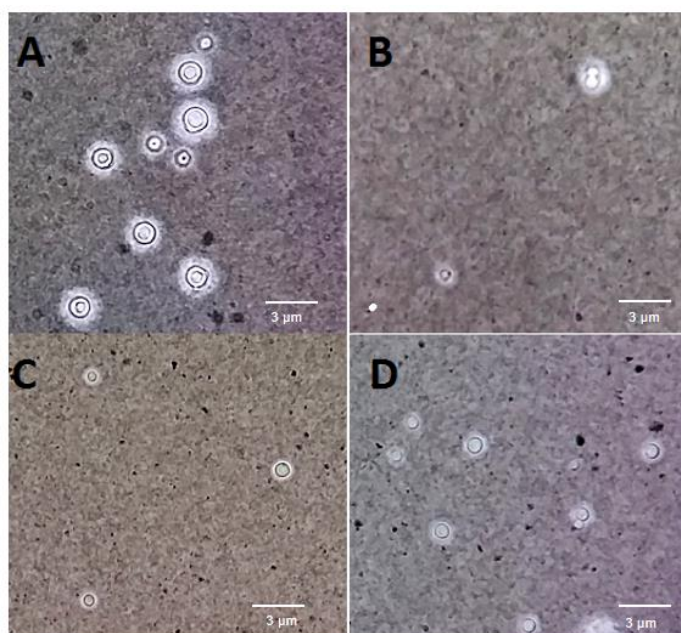


Figura 22. *C. neoformans* ATCC 90112 após 72 horas de exposição aos compostos e antifúngico. A: controle do inóculo, B: controle AMB CIM, C: curcumina CIM, D: morina CIM . Objetiva 40x (aumento 100x). Fonte: arquivo pessoal.

5.5. Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade em hemácias, realizados em placas de microtitulação, mostraram que em concentrações $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ o composto curcumina não promoveu hemólise (gráfico 3) e para morina concentrações $\leq 8 \mu\text{g/mL}$.

A anfotericina B também foi avaliada quanto a sua capacidade hemolítica demonstrando que nas concentrações $2 \mu\text{g/mL}$ a $0,312 \mu\text{g/mL}$ não ocorreu lise das hemácias.

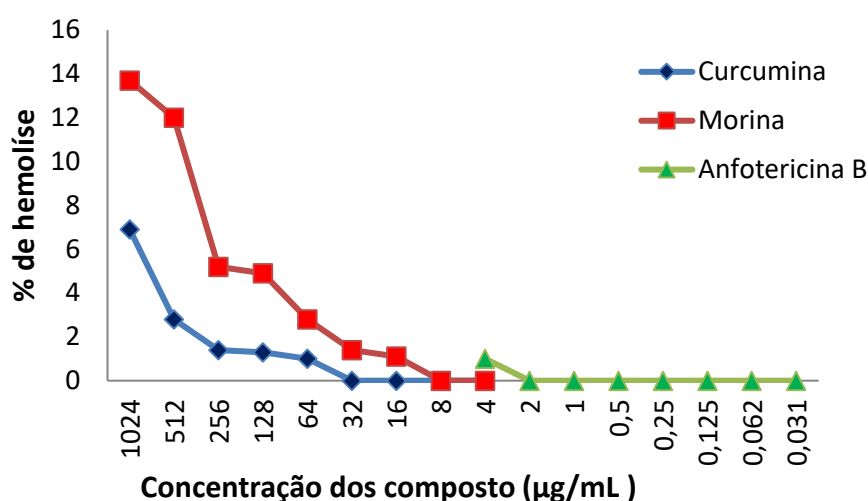


Gráfico 3. Resultados da ação dos compostos curcumina, morina e anfotericina B sobre hemácias.

5.6. Doseamento do ergosterol

A inibição da biossíntese do ergosterol foi avaliada através da quantificação do ergosterol celular, demonstrando que na CIM de $32 \mu\text{g/mL}$ de curcumina e morina houve uma redução na sua produção de 53,73% e de 59,65% respectivamente (tabela 4). O fluconazol, utilizado como controle positivo, apresentou redução do ergosterol na CIM ($2 \mu\text{g/mL}$) de 53,08%. Os resultados estatísticos não mostraram diferenças significativas quando os compostos foram comparados ao fluconazol ($p > 0,05$).

Tabela 4. Dosagem do ergosterol *C. gattii* ATCC 24065 sob a ação dos compostos curcumina e morina e antifúngico fluconazol

Compostos	% de redução	
	CIM	$\frac{1}{2}$ CIM
Curcumina	53,73	12,39
Morina	59,65	59,43
Fluconazol	53,08	40,14

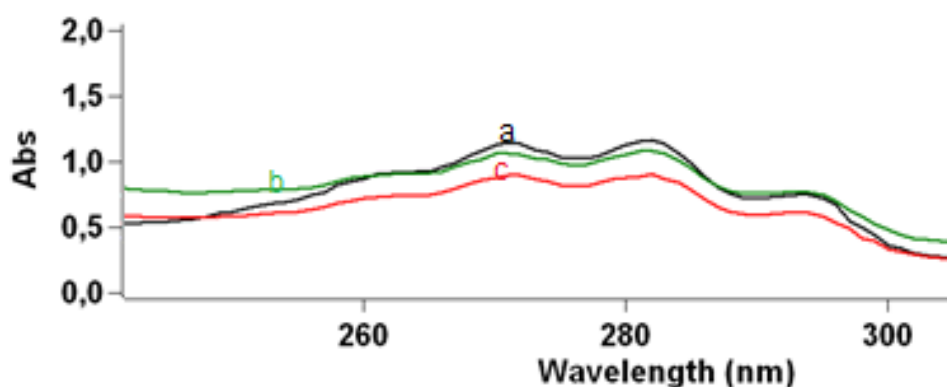


Figura 23. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de *C. gattii* ATCC 24065, sem tratamento (a) e após tratamento com o composto curcumina nas concentrações (µg/mL) 16 (b), 32(c).

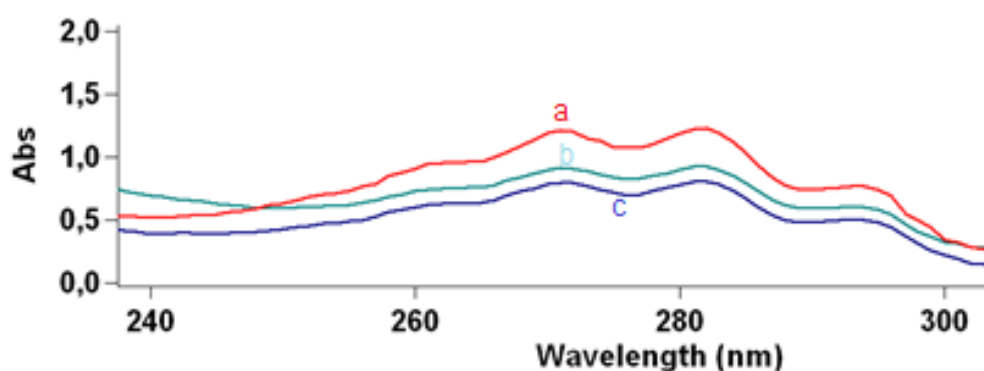


Figura 24. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de *C. gattii* ATCC 24065, sem tratamento em (a) e após tratamento com o composto morina nas concentrações (µg/mL) 16 (b), 32(c).

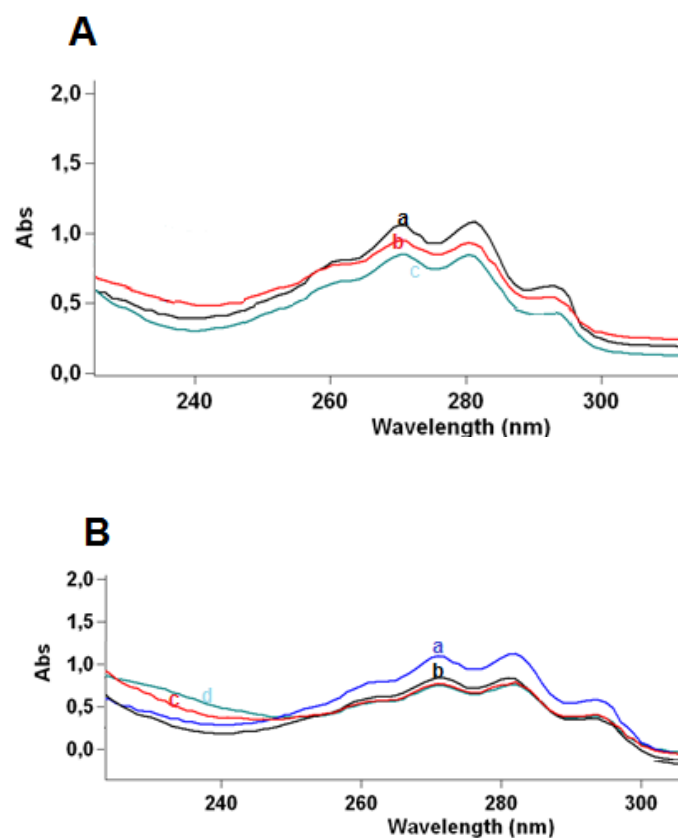


Figura 25. Perfil espectrofotométrico dos esteróis de *C. gattii* ATCC 24065 sem tratamento em (a) e após tratamento com o antifúngico fluconazol (A) nas concentrações (µg/mL) 1(b), 2(c). (B) Comparação entre as absorbâncias nas concentrações inibitórias mínimas da morina (b) e curcumina (c) e fluconazol (d).

5.7. Avaliação da ação dos compostos sobre a membrana das leveduras por citometria de fluxo

O efeito dos compostos curcumina e morina sobre a membrana plasmática fúngica foi avaliado através da citometria de fluxo pela análise das células marcadas com o marcador PI. Como controle positivo foi utilizado o álcool etílico 70% e anfotericina B na concentração de 2 µg/mL sobre as células de *C. gattii* ATCC 24065. O álcool etílico 70% ocasionou lesão de membrana em 99,8% das células analisadas conforme mostra a figura 26 no histograma B, e a anfotericina apresentou 26,8 % de morte fungica conforme mostra a figura 26 histograma C. O controle negativo foi realizado com *C. gattii* não tratado, marcado com o PI, evidenciando 0,0% de células com lesão de membrana (Figura 26, histograma A). Após período de incubação de 2h a 37°C para curcumina e morina, foi observado que os compostos lesaram, em média, 58,8% das células sob a ação da curcumina, enquanto que a morina promoveu lesão em, em média, 45,5% das células de *C. gattii* 24065, conforme mostra a figura 27.

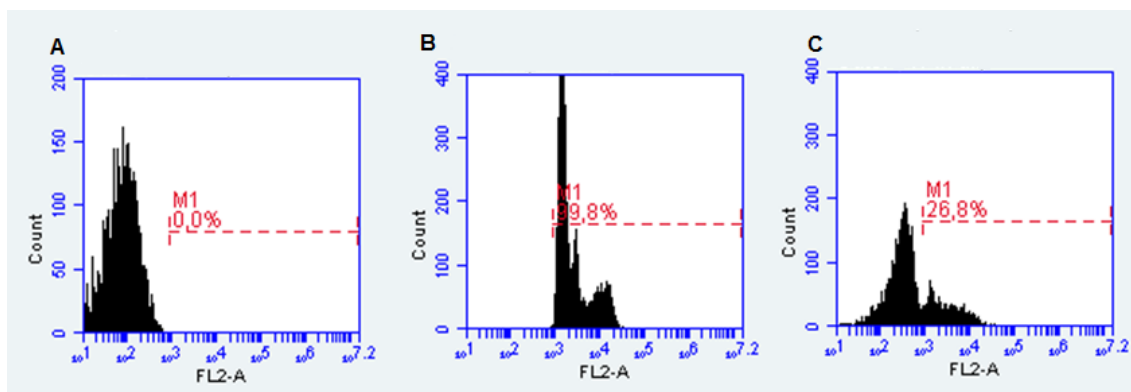


Figura 26. Histogramas mostrando as células de *C. gattii* ATCC 24065. (A) Controle de autofluorescência, (B) Controle com álcool 70%, (C) Anfotericina B na concentração de 2 ug/ml. O eixo X mostra, em escala logarítmica, a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI.

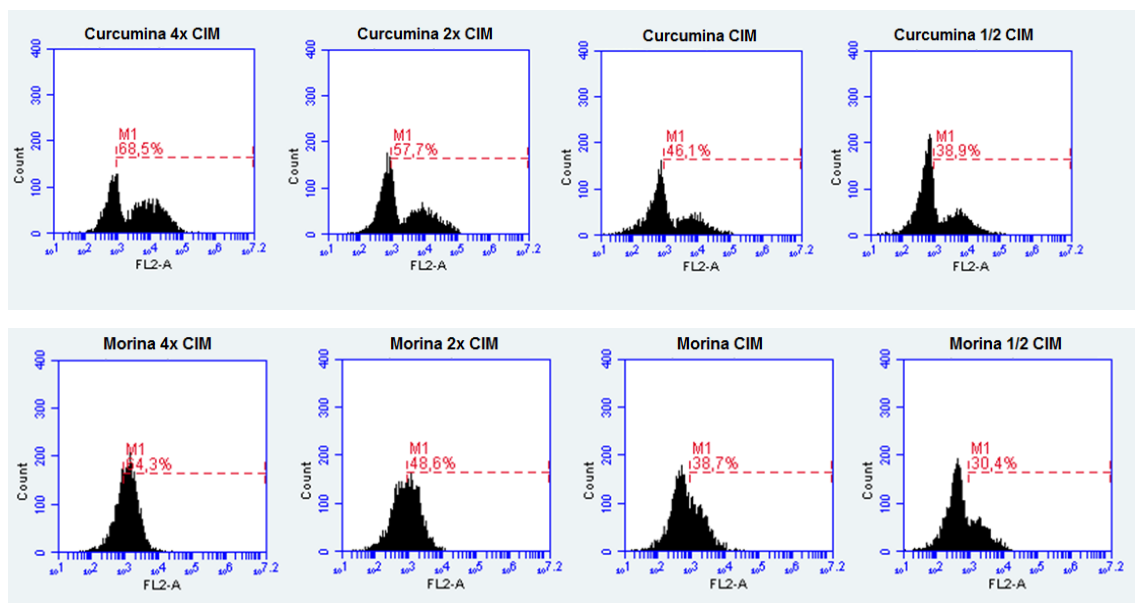


Figura 27. Histogramas de *C. gattii* ATCC 24065 tratado com diferentes concentrações dos compostos curcumina e morina. O eixo X mostra, em escala logarítmica, a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI. O gate M1 mostra a porcentagem de células não células não viáveis, marcadas com PI.

6 DISCUSSÃO

A criptococose tem sido uma das infecções oportunistas mais comuns com causas de mortalidade entre os pacientes, especialmente em países com recursos e desenvolvimento socioeconômicos limitados (Srichatrapimuk & Sungkanuparph 2016). Estima-se que haja quase um milhão de casos por ano de meningite criptocócica em pacientes com o vírus HIV, levando a mais de 600.000 mortes, com um peso especial na África subsaariana (Grossman & Casadevall 2016).

Os avanços no diagnóstico e tratamento da meningite criptocócica são promissores, e têm contribuído a melhorar a sobrevivência de pacientes criticamente doentes. Porém, o arsenal terapêutico é em grande parte limitada a três antifúngicos usados isoladamente ou em combinação: anfotericina B (e seus derivados lipossomal), 5-fluorocitosina e fluconazol (Perfect and Bicanic 2015), dividido em fases de indução, consolidação e a terapia de manutenção (Sloan & Parris 2014, Abassi et al. 2015). O uso destes destes fármacos deve ser cauteloso, e os pacientes precisam ser monitorados de perto, para avaliar os efeitos hepatotóxicos e de nefrotoxicidade manifestadas por esses fármacos, além do aparecimento de isolados resistentes, levando a um tratamento ineficaz (Srichatrapimuk & Sungkanuparph 2016).

Os compostos naturais curcumina e morina estudados neste trabalho já demonstraram atividade antifúngica como determinada por alguns pesquisadores. Segundo Martins et al. (2009) os efeitos antifúngicos exibidos pela curcumina mostraram-se significativos contra todas as cepas clínicas e padrão de *Candida* testadas em seus experimentos, assim como em *Paracoccidioides brasiliensis* demonstrando em seus resultados este bioativo ser mais eficiente na inibição do crescimento dos fungos patogênicos, do que o agente antifúngico comercial fluconazol. Apesar de não inibir o crescimento de espécies de *Aspergillus*, este mesmo pesquisador relata o efeito inibitório da curcumina contra *C. neoformans* e *Candida dubliniensis*, com um valor de CIM de 32 ug/mL. Este composto também foi avaliado em outros microrganismos, como no estudo de De et al. (2009) que mostraram atividade antibacteriana *in vitro* da curcumina sobre 65 isolados clínicos de *Helicobacter pylori*, com CIMs

de 5 a 50 µg/mL, revelando eficácia do bioativo, em inibir o crescimento dessa bactéria. Reddy et al. (2005), relatam que ao administraram curcumina em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (parasita da malária), e observaram que a parasitemia sanguínea desses animais foi reduzido em 80 a 90%.

O composto natural curcumina em nossa pesquisa apresentou atividade sobre isolados de *C. neoformans* com CIMs iguais ou inferiores a 64 µg/mL. A atividade a curcumina também tem sido citadas em outros gêneros fúngicos além *C. neoformans*, como descrita por Ungphaiboon et al. (2005), ao encontrarem valores de CIMs de 128 µg/mL e 256 µg/mL desse bioativo, com atividade antifúngica em *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* respectivamente.

No estudo feito por (Khan et al. 2012), a atividade anti-Candida da curcumina foi demonstrada contra 38 diferentes cepas de *Candida*, incluindo algumas resistentes ao fluconazol e isolados clínicos, com CIMs variando de 256 a 650 ug/mL. Juntos, estes resultados sugerem que a curcumina pode atuar como um composto alternativo contra fungos resistentes, ao manifestar efeitos inibidores significativos contra esses microrganismos.

Embora a quantidade de estudos acerca da ação da morina sobre *C. neoformans* seja escassa, é possível observar que esse composto de fato possui atividade antifúngica, como demonstrando por Hussain et al. (2014) em *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium globosum* e *Alternaria*, reduzindo o crescimento dessas espécies em concentrações de 50, 200 e 500 µg/mL, respectivamente.

Nós observamos a atividade biológica do composto morina contra leveduras do complexo *C. neoformans*, com CIMs iguais ou inferiores a 256 µg/mL, inibindo 50% (CIM₅₀) desses isolados na concentração de 32 µg/mL. Entretanto na pesquisa de literatura feita durante este trabalho, não foram encontrados estudos de atividade antifúngica da morina em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, tornando de grande importância os dados apresentados neste trabalho.

Estes resultados demonstram que os compostos estudados possuem atividade antifúngica com grande potencial nas pesquisas de substâncias a serem utilizadas no tratamento de criptococose.

Conforme a classificação descrita por Holetz et al. (2002), extratos, frações ou compostos extraídos de plantas com CIM ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentam boa atividade inibitória, de 100-500 $\mu\text{g/mL}$ como atividade inibitória moderada, de 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ como atividade fraca e, maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$, a amostra vegetal é considerada inativa. Esses critérios foram adotados em nosso trabalho, e levando em consideração a CIM₉₀ da curcumina e morina, os compostos apresentaram boa atividade antifúngica, onde a CIM₉₀ da curcumina foi de 32 $\mu\text{g/mL}$ e da morina 64 $\mu\text{g/mL}$.

A CFM pode ser definida como a menor concentração dos fármacos capaz de inibir o crescimento total do fungo ou no máximo até o crescimento de duas colônias em agar (Barchiesi et al. 1995, Manohar et al. 2001). As CFMs encontradas neste estudo foram pelo menos quatro vezes o valor das CIMs tanto para a curcumina quanto para a morina sugerindo um caráter fungistático por parte dos compostos. Não foram encontrados relatos de testes de CFMs desses flavonoides em isolados de *C. neoformans*.

A terapia de combinação é considerada uma abordagem útil para melhorar a eficácia de agentes antifúngicos no tratamento inúmeras doenças (Johnson & Perfect 2010). A combinação de fármacos tem muitos benefícios potenciais, tais como um espectro mais amplo, toxicidade reduzida e uma menor incidência de resistência adquirida, além de interações sinérgicas ou aditivas (Carrillo-Muñoz et al. 2014).

Os compostos fenólicos isolados a partir de fontes naturais têm mostrado promissoras atividades *in vitro* e *in vivo* em várias espécies de fungos (Faria et al. 2011). No entanto, estudos de seu mecanismo isoladamente ou em sinergismo de ação com antifúngicos ou outros antimicrobianos conhecidos apresentam-se limitado. A combinação entre compostos extraídos de plantas e fármacos antimicrobianos pode produzir um efeito sinérgico ou aditivo, que tem sido referido como uma estratégia no combate aos microrganismos (Wagner & Ulrich-Merzenich 2011). Avaliando o comportamento do composto curcumina associada ao antifúngico fluconazol encontramos 15% de sinergismo e 85% de indiferença. Estudos têm demonstrado que a curcumina não só exibe atividades antifúngicas por si só, mas também mostra efeitos sinérgicos promissores quando usado em combinação com agentes antifúngicos existentes, o que deve

ser uma importante via de exploração de novos fármacos antifúngicos (Sharma et al. 2009, 2010a, b). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a curcumina em combinação com diferentes agentes antifúngicos pode exibir atividade antifúngica sinérgica significativa contra infecções fúngicas sistêmicas (Neelofar et al. 2009, Sharma et al. 2010a, Khan et al. 2012). Em um estudo realizado por Sharma et al. (2010a), foram mostrados que a combinação de curcumina e cinco azóis (voriconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e fluconazol) obteve fortes efeitos antifúngicos sinérgicos *in vitro* assim como a terapia combinada foi mais eficaz do que a monoterapia com azole em isolados de *C. albicans* de tipo selvagem e resistentes ao azol. Silva et al. (2016), avaliaram a combinação da curcumina com o fluconazol, e não encontraram antagonismo, além disso, testaram a combinação em um modelo murino e constataram que a terapia de combinação com curcumina e fluconazol foi eficaz na redução significativa da carga fúngica, tanto nos pulmões quanto no cérebro do animal, desempenhando um papel neuroprotetor.

Com relação a morina, quando avaliada com o antifúngico fluconazol apresentou 30% de sinergismo e 70% de indiferença. Estes resultados são semelhantes aos de Silva et al. (2014) que avaliando a interação de flavonoides com o fluconazol, mostraram um efeito sinérgico em cepas de *Candida. tropicalis* resistentes ao fluconazol com ICIFs que variaram de 0,25 a 0,38.

Os compostos também foram avaliados com o antifúngico anfotericina B, e a curcumina apresentou 100% de indiferença nesta associação. Ao contrário o estudo realizado por Sharma et al. (2010a) mostrou o uso concomitante de curcumina e dois polienos (incluindo anfotericina B e nistatina) apresentaram forte atividade antifúngica sinérgica contra 21 isolados clínicos de *C. albicans*.

A combinação entre a morina e a anfotericina B, resultou em uma potencialização da atividade antifúngica em 70% dos isolados. Resultados semelhantes aos obtidos por Oliveira et al. (2016), ao avaliarem quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) e rutina, dois bioativos pertencentes ao grupo dos flavonoides relacionados com a morina. Estes resultados sugerem que este composto é um potencial agente terapêutico para ser utilizado em combinação com a anfotericina B.

O fator de virulência mais bem estudado das leveduras pertencentes ao complexo *C. neoformans* é a sua cápsula polissacarídica. Esta estrutura dinâmica, que pode crescer até várias vezes o diâmetro celular em espessura, confere proteção contra a fagocitose e de outras respostas imunes do hospedeiro, o que caracteriza sua natureza virulenta (Doering 2009b, O'Meara & Andrew Alspaugh 2012, Vecchiarelli et al. 2013). Segundo Duin et al. (2004), o tamanho da cápsula está associado à virulência das leveduras pertencentes ao complexo de *C. neoformans*, e a diminuição do volume capsular resulta na atenuação da virulência. Ele demonstrou isso em seu estudo onde o volume capsular deste fungo foi reduzido na presença do antifúngico voriconazol, afetando o resultado da terapia, melhorando a resposta da célula hospedeira ao fungo. A partir dessa premissa avaliamos a morfologia das estruturas fúngicas de *C. neoformans* na presença da curcumina e morina, e a cápsula como estrutura evidente neste microrganismo pode ser observada nas condições as quais o fungo foi submetido.

Constatamos em nosso estudo que na presença de ambos os compostos, durante 72 horas de exposição, houve uma redução do número de células viáveis assim como, uma diminuição visual do tamanho da capsula, quando comparado ao controle sem tratamento. O mesmo resultado foi obtido no estudo de Fernandes et al. (2012), que mediu a espessura da cápsula de *C. neoformans* sob a ação da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, e encontrou uma redução da mesma. Este simples teste, veio a comprovar os resultados obtidos na cinética de crescimento, onde o número de isolados diminuíram no decorrer do tempo de exposição aos agentes bioativos, quando comparados ao controle, mesmo em proporções baixas por se tratarem de compostos fungistáticos.

A avaliação de agentes antimicrobianos *in vitro* pode ser realizada também através do estudo da cinética de crescimento, procedimento mais apropriado para determinar seu efeito bactericida ou fungicida. É uma ferramenta forte para obter informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e um determinado microrganismo. O teste evidencia o efeito antimicrobiano dependente do tempo e da concentração do mesmo (Pfaller et al. 2004). Neste trabalho a curva de morte da cepa de *C. gattii* ATCC 24065

versus o tempo de exposição aos compostos, mostrou redução da quantidade de leveduras em todos tempos analisados, quando comparados ao controle sem tratamento. Entretanto não mostrou redução $\geq$ que 99% das células, o que permitiu verificar ação fungistática destes compostos. Estudos realizados por Khan et al. (2012) mostraram diminuição significativa no crescimento fúngico de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* na presença de curcumina, onde após 10 horas de incubação ocorreu uma redução de 50,27% das células quando comparadas ao controle, porém não atingindo o valor para ser considerado fungicida. Em nosso estudo verificamos redução de 21,8% no número de células viáveis na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina, após 72 horas de incubação.

Não foram encontrados na literatura dados referentes a curva de morte de microrganismos com o composto morina, entretanto, o mesmo mostrou apenas 17,2% de redução do número de células viáveis na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ em nosso estudo.

Os ensaios hemolíticos são importantes ferramentas utilizadas para avaliar a citotoxicidade de óleos ou composto naturais. Estes são empregados porque os compostos que possuem uma atividade biológica potente, podem não ser úteis em preparações farmacológicas se possuírem efeito hemolítico (Zohra & Fawzia 2014). O testes com eritrócitos tem sido amplamente utilizado, pois apresentam uma indicação direta de toxicidade de formulações, bem como indicação geral da toxicidade da membrana (Zohra & Fawzia 2014). Outra vantagem do ensaio é que o sangue está prontamente disponível e as células são fáceis de isolar, além disso, sua membrana tem semelhanças com outras membranas celulares (Zohra & Fawzia 2014).

Os ensaios de toxicidade realizados em nosso estudo demonstraram que, em concentrações inferiores a 64 $\mu\text{g/mL}$, a curcumina não exerceu atividade hemolítica. Corroborando com nossos estudos Khan et al. (2012) observaram que a curcumina apresentou atividade citotóxica em concentrações a partir de 650 $\mu\text{g/mL}$, causando hemólise em 11,45% dos eritrócitos. Não foram encontrados relatos sobre a ação citotóxica da morina, porem em nossos estudos as porcentagens de hemólise para este composto foram menores que 1% em concentrações inferiores a 16 $\mu\text{g/mL}$. Levando em consideração os resultados da concentração inibitória mínima em 50% dos isolados (CIM_{50}), a

curcumina foi capaz inibir os isolados fúngicos em 16 µg/mL sem causar hemólise. Enquanto a morina, apresentou uma CIM₅₀ de 32 µg/mL, e nesta concentração causou hemólise em apenas 1,4% dos eritrócitos. Esses resultados indicam que os compostos avaliados têm baixa atividade citotóxica sobre eritrócitos.

O ergosterol é o esterol predominante na membrana citoplasmática, sendo o principal componente da membrana de fungos. Está envolvido em diversas funções biológicas, sendo o principal alvo dos antifúngicos usados para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Gooday 1995, Ahmad et al. 2011, Alcazar-Fuoli & Mellado 2013). Diante destas informações buscamos em nosso trabalho quantificar este esterol na presença dos compostos. Nossos resultados foram promissores e obtivemos redução de 53,73% do ergosterol da cepa padrão de *C. gattii* ATCC 24065 quando em contato com a curcumina. Esse resultado da curcumina também foi encontrado em espécies de *Candida* no estudo realizado por Dovigo et al.(2013) ao evidenciar que o mecanismo antifúngico da curcumina pode estar enraizado na alteração das propriedades associadas à membrana, da atividade da ATPase, da biossíntese de ergosterol e da secreção de proteinase, comportando-se como um agente antifúngico promissor. Neelofar et al. (2009) ao quantificar o ergosterol em leveduras de *Candida* na presença do composto curcumina, obtiveram uma redução de 70,53% deste componente celular na concentração de 250 µg/mL.

A nossa avaliação quando se tratando da morina, nos mostrou ação da membrana citoplasmática do fungo, ao reduzir cerca de 59,65% do esterol em sua CIM. Ambos os compostos foram tão representativos a esta atividade quanto o antifúngico convencional fluconazol, que apresentou 53,08% de redução na concentração inibitória mínima.

Os compostos também foram avaliados em sua capacidade de lesionar a membrana plasmática das leveduras de *C. neoformans*. Os resultados obtidos mostraram que estes produtos naturais agiram acarretando lesão de membrana sobre 58,8% das células fúngicas sob a ação da curcumina e 45,5% da morina.

Estudos realizados por Sharma et al. (2013) sugeriram que o polifenol curcumina pode perturbar a regulação genética relacionada ao ergosterol e a homeostase lipídica da membrana fúngica, sugerindo claramente um

mecanismo orientado para este componente celular. Segundo Lee & Lee (2014) a curcumina permeabiliza e despolariza a membrana, causando a ruptura da bicamada lipídica, induzindo assim a formação de micelas, poros transmembranares e poros toroidais, na membrana citoplasmática do fungo, comparando esse mecanismo com o observado ao antifúngico anfotericina B. Portanto, propomos que a curcumina seja considerada um potencial candidato no desenvolvimento de um novo agente antimicrobiano devido à sua importante atividade contra microrganismos.

Em relação a morina, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre mecanismos de ação envolvendo este composto, porém compostos com estruturas semelhantes como a catequina e quercetina, estudados por Da Silva et al. (2014) alteraram a estrutura da membrana celular de *Candida tropicalis*, leveduras resistentes ao fluzonazol, resultando na perda da integridade da membrana plasmática, causando maior permeabilidade da mesma.

Os produtos naturais oferecem diversas atividades biológicas e apresentam grande impacto na descoberta de novos fármacos. Os resultados alcançados em nosso estudo mostraram a existência de atividade antifúngica dos compostos curcumina e morina contra leveduras do complexo *C. neoformans*, assim como possíveis mecanismos de ação destes sobre estas células.

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nas avaliações dos produtos naturais curcumina e morina sobre isolados de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* conclui-se que:

- Os bioativos mostraram-se promissores quanto à atividade antifúngica diante de leveduras estudadas, considerando as variações dos valores da CIM e CFM.
- O composto morina apresentou importante efeito sinérgico entre as combinações avaliadas quando testados com fluconazol e anfotericina B. Assim como a curcumina que apresentou efeito sinérgico na associação ao antifúngico fluzonazol.
- No ensaio da cinética de crescimento, houve diminuição do crescimento das leveduras com o decorrer do tempo de exposição do fungo aos compostos, demonstrando caráter fungistático.
- A ação dos compostos alterou a micromorfologia das leveduras, levando a uma diminuição do principal fator de virulência destas leveduras, a cápsula mucopolissacarídica.
- Os compostos mostraram baixo potencial citotóxico, tornando-se candidatos promissores ao desenvolvimento de antifúngicos.
- O possível mecanismo de ação dos compostos é a redução da síntese do ergosterol desta forma alterando a membrana células das leveduras.

REFERÊNCIAS

- Abassi M, Boulware DR, Rhein J. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. *Curr. Trop. Med. reports* 2: 90–99, 2015.
- Abed IJ, Al-moula R, Abdulhasan GA. Antibacterial effect of flavonoids extracted from seeds of *Silybum marianum* against common pathogenic bacteria. *World J. Exp. Biosci.* 3: 36–39, 2015
- Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 43: 447–451, 2010.
- Ahmad A, Kaleem M, Ahmed Z, Shafiq H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. *Food Res. Int.* 77: 221–235, 2015.
- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 41–50, 2011.
- Akaram M, Uddin S, Ahmed A, Usmanghanil K, Hanna A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma Longa and Curcumin: a Review Article. *Rom. J. Biol. - Plant Biol.* 55: 65–70, 2010.
- Akinpelu DA, Abioye EO, Aiyegoro OA, Akinpelu OF, Okoh AI 2015. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of *alchornea laxiflora* (Benth.) Pax. & Hoffman. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2015.
- Al-numair KS, Chandramohan G, Alsaif MA, Veeramani C, Newehy AS El. Morin, a flavonoid, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Tradity Complement Altern Med* 11: 14–20, 2014.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front. Microbiol.* 3: 1–6, 2013.

- Almeida F, Wolf JM, Casadevall A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 14: 1173–1185, 2015.
- Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.*: 1–4. 2014
- Alp S. Melanin and its role on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mikrobiyoloji bulteni*, 44(3), 519-526, 2010. *Anticancer Res*, 22 (6C) 4179–4181, 2002
- Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-pérez M, Canto R. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology †. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 167–195, 2000.
- Alves-Silva JM, Dias dos Santos SM, Pintado ME, Pérez-álvarez JA, Fernández-López J, Viuda-Martos M. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control* 32: 371–378, 2013
- Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement. Altern. Med.* 15: 59, 2015
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Silva-Vergara ML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biol.* 114: 438–445, 2010.
- Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. Natural products – antifungal agents derived from plants. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11: 621–638, 2009.
- Arthington-skaggs B a, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3332–3337, 1999.

- Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J. Med. Res.* 139: 195–204, 2014.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.:* 1–9, 2015.
- Barchiesi F, Hollis RJ, Messer SA, Sacalise G, Rinaldi MG, Pfaller MA. Eletrophoretic Karyotype and In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates from AIDS patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 99–103, 1995.
- Barchiesi F, Spreghini E, Schimizzi AM, Maracci M, Giannini D, Carle F, Scalise G. Posaconazole and Amphotericin B Combination Therapy against. *Antimicrobial Agents Chemother.* 48: 3312–3316, 2004.
- Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 16: 4567–4598, 2011.
- Bhabhra R, Askew DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med. Mycol.* 43, S87–S93, 2005.
- Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, Winsley T. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 13: 389–401, 2009.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147: 891–907, 2001.
- Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Doering TL, Janbon G. A Yeast under Cover : the Capsule of *Cryptococcus neoformans* Minireview A Yeast under Cover : the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 2: 655–663, 2003.
- Boyd N, Nailor MD. Combination antibiotic therapy for empiric and definitive treatment of gram-negative infections: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 31: 1073–1084, 2011.
- Breivik ON, Owades JL. Spectrophotometric Semimicrodeter- mination of

- Ergosterol in Yeast. *Agric. Food Chemisrty* 537: 360–363, 1956.
- Cadieux B, Lian T, Hu G, Wang J, Biondo C, Teti G, Liu V, Murphy MEP, Creagh AL, Kronstad JW. The mannoprotein *cig1* supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 207: 1339–1347, 2013.
- Cao J, Zheng Y, Xia X, Wang Q, Xiao J. Total flavonoid contents, antioxidant potential and acetylcholinesterase inhibition activity of the extracts from 15 ferns in China. *Ind. Crops Prod.* 75: 135–140, 2015.
- Carrillo-Muñoz AJ, Finkelievich J, Tur-Tur C, Eraso E, Jauregizar N, Quindós G, Giusiano G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. *Rev. Esp. Quimioter.* 27: 141–158, 2014.
- Carrillo-Muñoz a J, Giusiano G, Ezkurra P a, Quindós G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter.* 19: 130–139, 2006.
- Casadevall A, Perfect JR. Book Review *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Chemother.* 17: 378–378, 1999.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 354–358, 2000.
- Chang SC, Chen YC, Luh KT, Hsieh WC. In vitro activities of antimicrobial agents, alone and in combination, against *Acinetobacter baumannii* isolated from blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 23: 105–110, 1995.
- Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-Diphenols: effect of the nitrogen source. *J. Clin. Microbiol.* 1: 509–514, 1975.
- Chen SC, Korman TM, Slavin M a, Marriott D, Byth K, Bak N, Currie BJ, Hajkiewicz K, Heath CH, Kidd S, McBride WJH, Meyer W, Murray R, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clin. Infect. Dis.* 57: 543–551,

2013.

Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. Cryptococcus gattii infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 980–1024, 2014.

Chen YC, Chang TY, Liu JW, Chen FJ, Chien CC, Lee CH, Lu CH. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible Cryptococcus neoformans in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infect Dis.* Jul 22; 15():277, 2015.

Chen SCA, Sorrell TC. Antifungal agents. *New Drugs, Old Drugs* 187: 404–409, 2007.

Chikezie PC, Ibegbulem CO, Mbagwu FN. Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Res. J. Phytochem.* 9: 88–115, 2015.

Cho O, Matsukura M, Sugita T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen Trichosporon asahii is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. *Int. J. Infect. Dis.* 39: 87–88, 2015.

CLSI 2002. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição.*

CLSI 2008. CLSI M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clin. Lab. Stand. Institute, Wayne* 3.

CLSI 2012. CLSI M27-S4: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Fourth Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne* 2012

Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)*. 2013: 675213, 2013.

Comas-Riu J, Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 999–1011, 2009

- Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy - What value are they? *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 854–869, 2004.
- Curbeloa J, Galvána JM, Aspab J. Actualización sobre *Aspergillus*, *Pneumocystis* y otras micosis pulmonares oportunistas Updates on *Aspergillus*, *Pneumocystis* and other opportunistic pulmonary mycoses. 1: 1689–1699, 2015.
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352, 2010.
- Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *J. Med. Plants Res.* 4: 104–111, 2010.
- Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60: 641–696, 1996.
- De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Antimicrobial activity of curcumin against helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 1592–1597, 2009.
- Desnos-Ollivier M, Patel S, Raoux-Barbot D, Heitman J, Dromer F. Cryptococcosis Serotypes Impact Outcome and Provide Evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. *MBio* 6: e00311-15, 2015.
- Doering TL. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 223–247, 2009a.
- Doering TL How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63: 223–247, 2009b.
- Dovigo LN, Carmello JC, Souza Costa CA de, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato

- VS, Pavarina AC chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent.. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med. Mycol.* 51: 243–251, 2013.
- Duin D Van, Cleare W, Zaragoza O, Nosanchuk JD, Casadevall A. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans* Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2014–2020, 2004.
- Dziedzic A, Wojtyczka RDW, Kubina R. Inhibition of oral streptococci growth induced by the complementary action of berberine chloride and antibacterial compounds. *Molecules* 20: 13705–13724, 2015.
- Edwards JA, Kemski MM, Rappleye CA. Identification of an aminothiazole with antifungal activity against intracellular *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4349–4359, 2013.
- Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber JBW, Emerson RJ, Camesano TA, Casadevall A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 44: 3683–3693, 2005.
- El-Assal FE, Paula JAM, Capeletti LS, Abrão FY, Ataídes FS, Sá FA da S, Costa CR, Fernandes OFL de, Souza LKH, Silva MRR do. Pimenta pseudocaryophyllus inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in candida yeast. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 618–623, 2014.
- El-baky RM The Future Challenges Facing Antimicrobial Therapy : Resistance and Persistence. *Am. J. Microbiol. Res.* 4: 1–15, 2016.
- Ernst EJ and Rogers PD. *Antifungal Agents: Methods and Protocols*. Human Press Inc.: New Jersey, 2008.
- Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev.Iberoam.Micol.* 25: 101–106, 2008.
- Faria NCG, Kim JH, Gonçalves LAP, Martins MDL, Chan KL, Campbell BC.

- Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 52: 506–513, 2011.
- Fernandes O de FL, Costa CR, Junior de SL, Ruy Vinaud MC, Hasimoto e Souza LK, Paula JAM de, Rosário Rodrigues Silva M do. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on Melanized and Non-melanized *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 174: 421–428. 2012.
- Filho A, Oliveira H, Sousa J, Meireles D, Maia G, eacute J, Filho M, eacute J, uacute,nior P, Lima E. In vitro anti-*Candida* activity and mechanism of action of the flavonoid isolated from *Praxelis clematidea* against *Candida albicans* species. *J. Appl. Pharm. Sci.* 6: 066–069, 2016.
- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 838–840, 1999.
- Galisteu KJ, Cardoso LV, Furini AA da C, Schiesari Junior A, Cesarino CB, Franco C, Baptista AR de S, Machado RLD. Opportunistic infections among individuals with HIV-1/AIDS in the highly active antiretroviral therapy era at a Quaternary Level Care Teaching Hospital. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48: 149–156, 2015.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 279–291, 1996.
- Gooday GW. Cellmem- brane,”in *The GrowingFungus*, eds N. A.R.Gowand M.G.Geoffrey (London: Chapman&Hall),62–64,1995.
- Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* 83: 111–124, 2015.
- Gilbert AS, Wheeler RT, May RC. Fungal Pathogens: Survival and Replication within Macrophages. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10. 2014.

- Granich R, Crowley S, Vitoria M, Smyth C, Kahn JG, Bennett R, Lo Y, Souteyrand Y, Williams B. transmission : Review of scientific evidence and update. *Curr Opin HIV AIDS* 5: 298–304, 2012.
- Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, Burke MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 2234–2239, 2012.
- Groll AH, Kolve H. Antifungal agents: In vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 256–270, 2004.
- Grossman NT, Casadevall A. Physiological Differences in *C. neoformans* *in vitro* versus *in vivo* and Their Effects on Antifungal Susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.*: AAC.02108-16, 2016.
- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parnmen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78: 16–48, 2015.
- Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.* 15: 686–699, 2005.
- Harris JR, Lockhart SR, Sondermeyer G, Vugia DJ, Crist MB, D'Angelo MT, Sellers B, Franco-Paredes C, Makvandi M, Smelser C, Greene J, Stanek D, Signs K, Nett RJ, Chiller T, Park BJ. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 1620–1626, 2013.
- He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 163: 137–143, 2007.
- He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? *Molecules* 20: 9183–9213. 2015.
- Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus*:

- from human pathogen to model yeast. *Lancet Infect. Dis.* 11: 434, 2011.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 1027–1031, 2002.
- Hung C, Xue J, Cole G, Clemons K, Laniado LR, Stevens D. Virulence mechanisms of Coccidioides: Coccidioidomycosis: Sixth International Symposium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1111: 225– 235, 2007.
- Hussain J, Ali L, Khan AL, Rehman NU, Jabeen F, Kim JS, Al-Harrasi A. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and Morin-3-O- β -D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis* - A wild arabian medicinal plant. *Molecules* 19: 17763–17772, 2014.
- Idnurm A, Bahn Y-S, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 753–764, 2005.
- Idowu AB, Adeoye OO. Disruption of Fungi Cell Membranes by Polyenes, Azoles, Allylamines, Amino Acids and Peptides. *Int. Sci. Res. J.* 1: 108–116, 2015.
- Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Furazawa Y. Chemical Characterization of Capsular Polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* Serotype A-D. *Microbiol. Immunol.* 29: 981–991, 1985.
- Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 16: 22–29, 1982.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol. Immunol.* 47: 271–277 2003.
- Ior CA, Ayanbimpe G, Ior LD, Okechalu J, Chis-Outubor GO. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* in JOS. *Sci. Res. J.* 3: 15–17, 2015.

- Irchhaiya R, Kumar A, Yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N. Metabolites in plants and its classification. *World J. Pharm. Pharm. Sci* 4: 287–305, 2014.
- Jabbari MR, Shokohi T, Abastabar M, Aghili SR, Aliyali M, Mohammadi G, Hashemi E. Coexistence of opportunistic mycosis and mycobacterium tuberculosis in patients attending the Central Tuberculosis Reference Laboratory of Ghaemshahr city, Iran. *Int. J. Mycobacteriology* 4: 129, 2015.
- Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow Cytometry. *J. Invest. Dermatol.* 132: e1, 2012.
- Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, Longley N, Muzooru C, Phulusa J, Taseera K, Kanyembe C, Wilson D, Hosseinipour MC, Brouwer AE, Limmathurotsakul D, White N, Horst C Van Der, Wood R, Meintjes G, Bradley J, Jaffar S, Harrison T. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: Implications for improving outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 58: 736–745, 2014.
- Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.* 87: 290–308, 2012.
- Johnson MD, Perfect JR NIH Public Access. *Curr Fungal Infect Rep* 4: 87–95, 2010.
- Józwa W, Czaczyk K. Flow cytometric analysis of microbial contamination in food industry technological lines - initial study. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11: 111–119, 2012.
- Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2: 377–392, 2014.
- Khan N, Shreaz S, Bhatia R, Ahmad SI, Muralidhar S, Manzoor N, Khan LA. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. *Fitoterapia* 83: 434–440, 2012.

- Khan S, Singhal S, Mathur T, Upadhyany D, Rattan A. Antifungal Susceptibility Testing Method for Resource Constrained Laboratories. *Indian J. Med. Microbiol.* 24: 171–176, 2006.
- Kaplan MCAT. Biochemistry Review, 2015. Disponível em: <http://books.simonandschuster.com/Kaplan-MCAT-Biochemistry->
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. The yeast: a taxonomic study. 4.ed. New York: Elsevier,. 1055p, 1998.
- Krishnamurthy S, Rashid K, Fatemi K, Sabarinathan T. A Study Of Opportunistic Mycosis In Pulmonary Diseases A Study Of Opportunistic Mycosis In Pulmonary Diseases In A Tertiary Care Hospital. *Njirm* 4: 88–90, 2013.
- Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, Geddes JMH, Griffiths EJ, Choi J, Cadieux B, Caza M, Attarian R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: Integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot. Cell* 11: 109–118, 2012.
- Kumar S, Pandey AK. Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J* 4: 32–48, 2013.
- Kwon-Chung KJ, Fraser J a, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn Y-S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4: 1–27, 2014.
- Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans* ? *FEMS Yeast Res.* 6: 574–587, 2006.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW & Diaz M (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804–806, 2002.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin T. Melanin lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150:

1414–1421, 1982.

Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 51: 218–223, 1986.

Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67: 1197–1200, 1975.

Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 68: 943–946, 1976.

Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 26: 223–227, 2009.

Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 166: 71–75, 2008.

Lee W, Lee DG. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. *IUBMB Life* 66: 780–785, 2014.

Lee W-H, Loo C-Y, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 11: 338–378, 2013.

Leimann BCQ, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. *Cad. Saude Publica* 24: 2582–2592, 2008.

Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.* 69: 115–122, 2001.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu.Rev.Microbiol.* 60: 69–105, 2006.

- Lin K-H, Yang Y-Y, Yang C-M, Huang M-Y, Lo H-F, Liu K-C, Lin H-S, Chao P-Y. Antioxidant activity of herbaceous plant extracts protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human lymphocytes. *BMC Res. Notes* 6: 490, 2013.
- Lindenberg ADSC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra MDS, Moncada PMF, Bonfim GF, Nogueira SA, Wanke B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 50: 75–78, 2008.
- Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Populations of. *J. Clin. Microbiol.* 43: 556–564, 2005.
- Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang J. Cryptococcus albidus encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Med. Mycol. Case Rep.* 3: 8–10, 2014.
- Lombardi L, Maisetta G, Batoni G, Tavanti A. Insights into the antimicrobial properties of hepcidins: Advantages and drawbacks as potential therapeutic agents. *Molecules* 20: 6319–6341, 2015.
- Ma H, May RC. *Chapter 5. Virulence in Cryptococcus Species*, 2009.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova* 25: 429–438, 2002.
- Mandal P, Roy TS, Das TK, Banerjee U, Xess I, Nosanchuk JD. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: An electron microscopic study. *Brazilian J. Microbiol.* 38: 662–666, 2007.
- Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 228: 111–117, 2001.

- Manolova Y, Deneva V, Antonov L, Drakalska E, Momekova D, Lambov N. The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 132: 15–20, 2014.
- Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1021–1033, 2006.
- Martins CVB, Silva DL Da, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo L V., Sabino AA, Fátima Â De, Resende MA De. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 337–339, 2009.
- Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: O255–O266, 2014.
- McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, Smith JM, Ory JJ. The Role of Host Gender in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* Infections. *PLoS One* 8: 1–7, 2013.
- McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 14: 497–505, 2006.
- Minnebruggen G Van. A General overview on past, present and future antimycotics. *Open Mycol. J.* 4: 22–32, 2010.
- Ministério da Saúde do Brasil - Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. Disponível em: www.aids.gov.br
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 515–548, 1995.
- Mitiku H, Weldegebreal F, Teklemariam Z. Magnitude of opportunistic infections

- and associated factors in HIV-infected adults on antiretroviral therapy in eastern Ethiopia. *HIV. AIDS. (Auckl)*. 7: 137–144, 2015.
- Molina-Leyva A, Ruiz-Carrascosa JC, Leyva-Garcia A, Husein-Elahmed H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *Int. J. Infect. Dis.* 17: e1232-3, 2013.
- Nair R, Kalariya T, Chanda S. Antibacterial Activity of Some Selected Indian Medicinal Flora. *Turk J Bio* 29: 41–47, 2005.
- Nasir B, Fatima H, Ahmad M, Ihsan-ul-Haq. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J. Microbiol.* 1: 1002, 2015.
- Ncube B, Staden J Van. Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. *Molecules* 20: 12698–12731, 2015.
- Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 337–339, 2009.
- Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TIE, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. *Molecules* 19: 2925–2956, 2014.
- Nisar T, Iqbal M, Raza A. Turmeric : A Promising Spice for Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Am. J. Agric. Envirion. Sci.* 15: 1278–1288, 2015.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology* 149: 1945–1951, 2003.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3519–3528, 2006.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* 51: 561–

570, 2010.

Nweze EI, Kecha FA, Dibua UF, Eze C, Onoja ES. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples in Alicante]. *Rev Iberoam Micol* 14: 63–64, 1997.

O'Donnell E a, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw.* 13: 43–54, 2013.

O'Meara TR, Andrew Alspaugh J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 387–408, 2012.

O'Shaughnessy EM, Meletiadis J, Stergiopoulou T, Demchok JP, Walsh TJ. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 1168–1176, 2006.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 1, 2003.

Oliveira VM, Carraro E, Auler ME, Khalil NM. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. *Brazilian J. Biol.*: 0–0, 2016.

Padhye S, Chavan D, Pandey S, Deshpande J, Swamy KV, Sarkar FH. Perspectives on Chemopreventive and Therapeutic Potential of Curcumin Analogs in Medicinal Chemistry. *Mini Rev Med Chem* 18: 1492–1501, 2010.

Palve Y, Nayak P. Curcumin: A wonder anticancer drug. *Int J Pharm* 3: 60–69, 2012.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45: 299–305, 2003.

Pappalardo MCSM, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, Baez AA, Melhem MSC. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64: 146–151, 2009.

- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappase PG, Chillera TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids* 23: 525–530, 2009.
- Pereira RJ, Cardoso MDG. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotechnol. Biodivers.* 3: 146–152, 2012.
- Pereira Rosa L, Silva FC da. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *J. Med. Microbiol. Diagnosis* 3: 1–7, 2014.
- Péret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Res. Int.* 38: 1039–1044, 2005.
- Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45: 395–404, 2005.
- Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet. Biol.* 78: 49–54, 2014.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen M, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50: 291–322, 2010.
- Pessoa CCB, Silva SHM Da, Gomes FS. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 3: 59–65, 2012.
- Petrovska, BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 6, 1–5, 2012.

- Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM, Killian SB, Knapp CC, Messer SA, Miskou A, Ramani R. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73: 365–368, 2012.
- Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-Oliveira S, Tavares C, Martinez-De-Oliveira J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 609–618, 2001.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 58: 1454–1462, 2009.
- Pitisuttithum P, Negroni R, Graybill JR, Bustamante B, Pappas P, Chapman S, Hare RS, Hardalo CJ. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 745–755, 2005.
- Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 150: 1212–1220, 1982.
- Pontis J a., Costa L a. M a., Silva SJR, Flach a.. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Sci. Technol.* 34: 69–73, 2014.
- Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 513–521, 2009.
- Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, p. 11–31, 2016.
- Prasad S, Aggarwal BB. Turmeric, the Golden Spice: From Traditional Medicine

- to Modern Medicine. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 13, 2011.
- Puebla L. Fungal Infections in Immunosuppressed Patients. In: *Immunol. Microbiol.*, p. 150–176, 2012.
- Quain DE, Haslam JM. The Effects of Catabolite Derepression on the Accumulation of Steryl Esters and the Activity of γ -Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 111: 343–351, 1979.
- Queiroz EO de. Atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* L. (coentro) e *Foeniculum vulgare* Mill. (funcho) sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*, 2012.
- Rana IS, Rana AS, Rajak RC. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian J. Microbiol.* 42: 1269–1277, 2011.
- Rani S, Jiloha PK. In-vitro isolation and identification of pathogens causing opportunistic mycoses in India. *J. Innov. Biol.* 1: 142–146, 2014.
- Ravikant, Kaur T, Gupte S, Kaur M. A Review on Emerging Fungal Infections and Their Significance. *J. Bacteriol. Mycol.* 1: 9–11, 2015.
- Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 472–474, 2005.
- Robbins N, Wright G, Cowen L. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiol Spectrum* 4(5):FUNK-0002-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0002, 2016.
- Rodríguez-Cerdeira C, Arenas R, Moreno-Coutiño G, Vázquez E, Fernández R, Chang P. Systemic Fungal Infections in Patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermosifiliogr.* 105: 5–17, 2014.

- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant Sci.* 5: 17, 2014.
- Rubaihayo J, Tumwesigye NM, Konde-Lule J. Trends in prevalence of selected opportunistic infections associated with HIV/AIDS in Uganda. *BMC Infect. Dis.* 15: 187, 2015.
- Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J. Dermatol* 1, 1992.
- Sánchez JGB, Kouznetsov V V. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazilian J. Microbiol.* 41: 270–277, 2010.
- Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front. Med.* 3: 1–10, 2016.
- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2: 73–85, 2002.
- Saraiva M das GG, Santos ECS, Saraceni V, Rocha LLDS, Monte RL, Albuquerque BC de, Bastos M de S, Santos MC Dos, Monteiro WM, Mourão MPG, Guerra MV de F, Lacerda MVG de. Epidemiology of infectious meningitis in the State of Amazonas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48: 79–86, 2015.
- Sasidharan NK, Sreekala SR, Jacob J, Nambisan B. In vitro synergistic effect of curcumin in combination with third generation cephalosporins against bacteria associated with infectious diarrhea. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Sharma M, Dhamgaye S, Singh A, Prasad R. Lipidome analysis reveals antifungal polyphenol curcumin affects membrane lipid homeostasis. *Front. Biosci.* 4: 1195–1209, 2013.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer* 41: 1955–1968, 2005.

- Sharma M, Manoharlal R, Negi AS, Prasad R. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin i in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Res.* 10: 570–578. 2010a.
- Sharma M, Manoharlal R, Puri N, Prasad R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. *Biosci. Rep.* 30: 391–404. 2010b.
- Sharma M, Manoharlal R, Shukla S, Puri N, Prasad T, Ambudkar S V., Prasad R. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3256–3265. 2009.
- Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA, Akampurira A, Rhein JR, Meysa DB, Boulware DR, Nielsen K. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec; 59(12):7197-204, 2015.
- Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 6: 23–34, 2012.
- Silva CR Da, Andrade Neto JB De, Sousa Campos R De, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HIF, Cavalcanti BC, Gaspar DM, Andrade GM De, Lima ISP, Barros Viana GS De, Moraes MO De, Lobo MDP, Grangeiro TB, Nobre HV. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 1468–1478, 2014.
- Silva CR, Andrade Neto JB De, Sousa Campos R De, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HIF, Cavalcanti BC, Gaspar DM, Andrade GM De, Lima ISP, Barros Viana GS De, Moraes MO De, Lobo MDP, Grangeiro TB, Nobre HV. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin

- gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 1468–1478, 2014.
- Silva NCC, Fernandes Júnior. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16: 402–413, 2010.
- Silva DL, Magalhães TFF, Santos JRA dos, Paula TP de, Modolo L V., Fátima A de, Buzanello Martins C V., Santos DA, Resende-Stoianoff MA de. Curcumin enhances the activity of fluconazole against *Cryptococcus gattii*-induced cryptococcosis infection in mice. *J. Appl. Microbiol.* 120: 41–48, 2016.
- Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clin. Epidemiol.* 6: 169–182, 2014.
- Smith KD, Achan B, Huppler Hullsiek K, McDonald T, Okagaki LH, Akampurira A, Rhein JR, Meya DB, Boulware DR, Nielsen K. Increased Antifungal Drug Resistance in Ugandan Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: AAC.01299-15, 2015.
- Souza LKH e, Costa CR, Fernandes O de FL, Abrão FY, Silva TC, Silva CMT, Rodrigues M do R. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46: 343–347, 2013.
- Springob K, Kutchan TM. Introduction to the Different Classes of Natural Products. In: *Plant-derived Nat. Prod. Synth. Appl.*, p. 1689–1699, 2009.
- Srichatrapimuk S, Sungkanuparph S. Integrated therapy for HIV and tuberculosis. *AIDS Res. Ther.* 13: no pagination. 2016.
- Srinivasan M, Rajendra Prasad N, Menon VP. Protective effect of curcumin on gamma-radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 611: 96–103, 2006.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 5: 667–675, 2003.

- Taj-Aldeen SJ, Chandra P, Denning DW. Burden of fungal infections in Qatar. *Mycoses* 58: 51–57, 2015.
- Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups. J. Med. Sci.* 9734: 149–153, 2014.
- Tapas A, Sakarkar D, Kakde R. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7: 1089–1099, 2008.
- Tian W-X. Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols. *Curr. Med. Chem.* 13: 967–977, 2006.
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One* 7, 2012.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231–1246, 2010.
- UNAIDS. Epidemiological slides – How AIDS Changed Everything report; 2015. Disponível em: <http://files.kff.org/attachment/fact-sheet-the-global-hivaids-epidemi>
- Ungphaiboon S, Supavita T, Singchangchai P, Sungkarak S, Rattanasuwan P, Itharat A. Study on antioxidant and antimicrobial activities of turmeric clear liquid soap for wound treatment of HIV patients. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27: 569–578, 2005.
- Vale-Silva L a, Buchta V, Vokurková D, Pour M. Investigation of the mechanism of action of 3-(4-bromophenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-one against *Candida albicans* by flow cytometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2492–2495, 2006.
- Valiante V, Macheleidt J, Foge M, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signalling pathway: Drug target, compensatory pathways and virulence. *Front. Microbiol.* 6: 1–12, 2015.
- Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, Monari C.

- Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiol.* 8: 1107–1116, 2013.
- Veltman JA, Bristow CC, Klausner JD. Meningitis in HIV-positive patients in sub-Saharan Africa: a review. *J Int AIDS Soc* 17, 2014.
- Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today* 3: 232–238, 1998.
- Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.* 17: 353–362, 2013.
- Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MCDS, Pannuti CS, Trujillo JR. Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 50: 209–212, 2008.
- Vila R, Freixa B, Cañigueral S. Antifungal compounds from plants. *Recent Adv. Pharm. Sci.* III 661: 23–43, 2013.
- Vocat A, Hartkoorn RC, Lechartier B, Zhang M, Dhar N, Cole ST, Sala C. Bioluminescence for assessing drug potency against non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: AAC.00528-15, 2015.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82: 34–37, 2011.
- Warkentien T, Crum-Cianflone NF. An Update on Cryptococcosis Among HIV-Infected Persons Tyler. *Int J STD AIDS* 21: 679–684, 2010.
- Warthe N, Singh SM, Nawange SR, Singh S. Spectrum of Opportunistic Fungal Infections in Cancer / HIV Patients: Emerging Fungal Pathogens from Jabalpur Madhya Pradesh Central India. *Sch. J. Appl. Med. Sci.* 3: 1385–1390, 2015.

- WHO. The Global HIV / AIDS Epidemic. *Glob. HIV / AIDS Epidemic*: 13–14, 2015.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3: 163–175, 2008.
- Wijeratne SSK, Abou-Zaid MM, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J. Agric. Food Chem.* 54: 312–318, 2006.
- Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.* 2: e99–e107, 1997.
- Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3–19, 2003.
- Wormley FL, Perfect JR. Immunology of infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Methods Mol. Med.* 118: 193–198, 2005.
- Xie M-X, Long M, Liu Y, Qin C, Wang Y-D. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1184–1191, 2006.
- Xu J, Mitchell TG. Comparative gene genealogical analyses of strains of serotype AD identify recombination in populations of serotypes A and D in the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 149: 2147–2154, 2003.
- Xue Y, Wilkes JG, Moskal TJ, Williams AJ, Cooper WM, Nayak R, Rafii F, Buzatu DA. Development of a Flow Cytometry-Based Method for Rapid Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* Spp. Using an Oligonucleotide Probe. *PLoS One* 11: e0150038, 2016.
- Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol. Proced. Online* 6: 10–15, 2004.
- Zaragoza O, Rodrigues ML, Jesus M De, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 68: 133–216, 2009.

- Zhang Z, Cao X, Xiong N, Wang H, Huang J, Sun S, Wang T. Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 31: 900–906, 2010.
- Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 5: 1–10, 2004.
- Zohra M, Fawzia A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *Int. J. Pharma Sci. Res.* 5: 495–500, 2014.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA / HDT

PARECER

PROJETO: Variabilidade fenotípica e genotípica de *Cryptococcus neoformans* obtidos do meio ambiente e de amostras clínicas da cidade de Goiânia-GO.

AUTORA: Lúcia Kioko Hashimoto e Souza **ORIENTADORA:** Maria do Rosário P. Silva

Avaliamos o projeto supracitado e consideramos que o mesmo atende as normas preconizadas pelo CONEP e os preceitos éticos vigentes, não havendo, portanto impedimentos para sua condução nesta instituição.
Este é o nosso parecer, salvo melhor juízo.

Goiânia, 25 de Abril de 2003.


Dr. João Alves de Araújo Filho

Anexo 2- Valores da CIM dos compostos e antifúngicos, valores de ICIF e interpretação do teste de associação.

Isolados	CIM fluconazol (µg/mL)	CIM AMB (µg/mL)	CIM Curcumina (µg/mL)	CIM Morina (µg/mL)	Associação Curcumina e fluconazol (ICIF)	Associação Curcumina e AMB (ICIF)	Associação Morina e fluconazol (ICIF)	Associação Morina e AMB (ICIF)
<i>C. neoformans</i>								
L2	1	0,25	32	32	1(I)	2,0 (I)	1(I)	0,24(S)
L3	0,5	0,25	4	32	1(I)	2,0(I)	1(I)	0,12(S)
L4	1	0,25	8	8	1(I)	1,0(I)	1(I)	1,0(I)
L5	1	0,125	4	16	1(I)	0,9(I)	1(I)	2,0(I)
L7	1	0,25	4	8	1(I)	1,0(I)	1(I)	1,0(I)
L14	1	0,5	8	32	1(I)	1,0(I)	2(I)	0,24(S)
L15	2	0,125	8	32	1(I)	0,9(I)	2(I)	0,49(S)
L18	1	0,5	8	64	1(I)	2,0(I)	0,5(S)	0,37(S)
L21	1	0,125	16	32	2(I)	2,0(I)	1(I)	0,49(S)
L23	1	0,25	4	64	1(I)	1,0(I)	0,5(S)	0,15(S)
L24	0,5	0,25	8	16	1(I)	1,0(I)	1(I)	0,49(S)
L28	1	0,25	16	32	1(I)	1,0(I)	1(I)	0,24(S)
L29	1	0,25	8	32	1(I)	1,0(I)	1(I)	0,24(S)
L30	2	0,125	32	16	1(I)	1,0(I)	1(I)	2,0(S)
<i>C. gattii</i>								
L1	0,065	0,125	0,5	2	0,37(S)	2,0(I)	0,25(S)	2,0(I)
L9	2	0,25	8	16	2(I)	1,0(I)	2(I)	0,49
L20	1	0,25	8	4	1(I)	1,0(I)	0,5(S)	1,0(I)
L48	1	0,125	2	8	1(I)	2,0(I)	1(I)	0,9(I)
ATCC 90112	0,5	0,125	8	16	0,5(S)	0,9(I)	0,5(S)	0,24(S)
ATCC 24065	0,5	0,125	8	8	0,5(S)	0,9(I)	0,5(S)	0,24(S)

Interpretação do teste de associação (I) Indiferente, (S) sinérgico e (A) Antagônico).