



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS**  
**RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

**LUCAS DANIEL QUINTEIRO DE OLIVEIRA**

---

---

**INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CINNAMOMUM***  
***CASSIA* E *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* SOBRE A**  
**SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM**  
**LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

---

---

**Goiânia**  
**2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE  
TESES E  
DISSERTAÇÕES 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:**

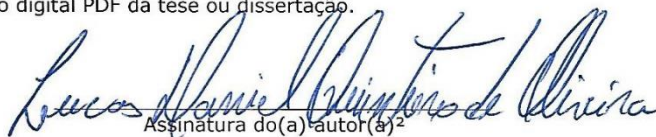
Nome completo do autor: Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira

Título do trabalho: INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CINNAMOMUM CASSIA* E *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* SOBRE A SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

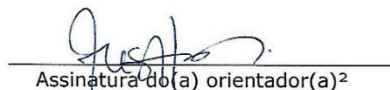
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

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)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 15 / 12 / 2017

<sup>1</sup> 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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**LUCAS DANIEL QUINTEIRO DE OLIVEIRA**

---

**INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CINNAMOMUM*  
*CASSIA* E *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* SOBRE A  
SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM  
LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biologia  
das Relações Parasito-Hospedeiro da  
Universidade Federal de Goiás para  
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Kioko  
Hasimoto e Souza

**Goiânia**

**2017**

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

Daniel Quinteiro de Oliveira, Lucas  
INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINNAMOMUM  
CASSIA E CYMBOPOGON FLEXUOSUS SOBRE A  
SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM LEVEDURAS  
DO COMPLEXO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS [manuscrito] /  
Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira. - 2017.  
XX, 105 f.

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto  
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós  
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.  
Bibliografia. Anexos. Apêndice.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de  
figuras, lista de tabelas.

1. Cinamomum cassia . 2. Cybopogom flexuosus . 3.  
Cryptococcus neoformans . 4. Fatores de virulência. I. Kioko  
Hasimoto e Souza, Lúcia , orient. II. Título.

CDU 582.28



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUCAS DANIEL QUINTEIRO DE OLIVEIRA** - Aos vinte e seis dias do mês de outubro do ano de 2017 (26/10/2017), às 14:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LÚCIA KIOKO HASIMOTO E SOUZA, BENEDITO RODRÍGUES DA SILVA NETO e ORIONALDA DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES, 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: “INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINNAMOMUM CASSIA (CANELA DA CHINA) E CYMBOPOGON FLEXUOSUS (CAPIM LIMÃO) SOBRE A SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM LEVEDURAS DO COMPLEXO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS”, em nível de MESTRADO, de autoria de LUCAS DANIEL QUINTEIRO DE OLIVEIRA, 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. LÚCIA KIOKO HASIMOTO E SOUZA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato 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 o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. 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 o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto

Profa. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

	Aprovado / Reprovado
Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes	<u>Aprovado</u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato habilitado, (Habilitado ou não Habilitado), 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 16 h 45 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:

Influência dos óleos essenciais de Cinnamomum cassia e Cymbopogon flexuosus sobre a suscetibilidade e fatores de virulência em leveduras do complexo Cryptococcus neoformans.

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

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto (IPTSP/UFG)

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

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura  
  
 Prof. Dr. Menira Borges de Lima Dias e Souza  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro  
 IPTSP/UFG

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS  
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

**BANCA EXAMINADORA PARA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

**Aluno: Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza**

**Membros:**

**1: prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes**

**2: prof Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto**

**Data: 26/10/2016**

**“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados, pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.**

**(Albert Einstein)**

## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico a meus pais (In Memoriam) que sempre desejaram e apoiaram os meus estudos.  
Ao meu irmão, pelo apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço a Deus a oportunidade de realizar, com empenho e sabedoria, todo o percurso da pós-graduação;

Meus sinceros agradecimentos a orientadora Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza por ter me orientado de forma profissional e respeitosa, pela dedicação, paciência e compreensão. Sem a presença dela não poderia ter realizado esta trajetória;

Aos professores do laboratório de micologia: Dras. Maria do Rosário e Carolina Rodrigues, e ao Dr. Evandro Leão que sempre estiveram a disposição para me ajudar e instruir na concretização deste trabalho;

A prof<sup>a</sup> Dra. Orionalda Fernandes e prof Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto, por participarem da banca examinadora;

Aos meus pais por terem instruído e incentivado a minha formação acadêmica e pessoal. Por terem me ensinado a ser persistente e acreditar nos meus sonhos;

Ao meu irmão Marcos pelo apoio, companheirismo e amizade nesta caminhada;

Aos meus queridos amigos e colegas do laboratório do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP): Hildene, Andressa, Fernanda, Thaisa, Fabiola, Raissa, Nathane, Maísa, Cícero e Fábio, por terem participado da minha formação acadêmica, me auxiliando nos experimentos, tornando-os, a cada dia, uma experiência prazerosa;

A Universidade Federal de Goiás (UFG), IPTSP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro pela oportunidade de realizar este mestrado acadêmico;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) que auxiliou financeiramente a realização deste trabalho;

A Lorena Gomes pelo carinho, dedicação, paciência, respeito e compreensão durante a conclusão deste momento importante da minha vida.

# SUMÁRIO

---

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS .....	vii
SUMÁRIO.....	viii
TABELAS .....	xi
FIGURAS .....	xii
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xv
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 . Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	2
1.1.1. Taxonomia.....	2
1.1.2. Aspectos morfológicos e biológicos .....	3
1.2. Fatores de virulência.....	5
1.2.1. Temperatura .....	5
1.2.2. Cápsula polissacarídica .....	6
1.2.3. Melanina.....	11
1.2.4. Produção de enzimas.....	14
1.2.4.1. Fosfolipase.....	15
1.2.4.2. Proteinase .....	16
1.2.4.3. Urease .....	16
1.2.4.4. Hemolisinas .....	18
1.2.4.5. DNase .....	18
1.3. Criptococose .....	19
1.3.1. Diagnóstico.....	20
1.3.2. Tratamento .....	21
1.3.3. Resistência aos antifúngicos.....	24
1.4. Produtos naturais.....	25
1.4.1. Óleos essenciais.....	26
1.4.2. <i>Cinnamomum cassia</i> .....	27
1.4.3. <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	28
2. JUSTIFICATIVA .....	30
3. OBJETIVOS.....	31
	viii

3.1. Geral.....	31
3.2. Específico.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Microrganismos .....	32
4.2 Óleos essenciais .....	32
4.2.1. Processamento dos óleos essenciais.....	32
4.3. Antifúngicos.....	32
4.4. Inóculo .....	33
4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	33
4.6. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	34
4.7. Cinética de crescimento (Curva de morte).....	35
4.8. Ação dos OEs sobre os fatores de virulência.....	36
4.8.1. Produção de cápsula de polissacarídica .....	36
4.8.2. Síntese de Melanina .....	37
4.8.3. Avaliação da atividade da fosfolipase.....	38
4.8.3.1. Inóculo .....	38
4.8.4. Produção da fosfolipase .....	39
4.8.5. Produção de Proteinase .....	40
4.8.6. Produção de Urease.....	41
4.8.8. Produção de Dnase .....	43
4.8.9. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Determinação da CIM e CFM .....	45
5.2. Cinética de crescimento (Curva de morte).....	46
5.3. Avaliação dos fatores de virulência sob ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> .....	48
5.3.1. Cápsula polissacarídica.....	48
5.3.2. Melanina.....	52
5.3.4. Fosfolipase .....	53
5.3.3. Urease.....	57
5.3.5. Proteinase .....	58
5.3.6. Hemolisinas.....	59
5.3.7. DNase.....	62
6. DISCUSSÃO .....	64

7. CONCLUSÃO.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
9. APÊNDICE .....	102
9.1 Tabela de resultados de CIM e CFM dos OEs <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> sob isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . .....	102
10. ANEXOS .....	103
10.1. Parecer do comitê de ética .....	103
10.2 Laudo técnico do óleo essencial de <i>C. cassia</i> .....	104
10.3 Laudo técnico do óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> .....	105

## TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Classificação das duas espécies do complexo <i>C. neoformans</i> .....	3
<b>Tabela 2.</b> Características dos genes relacionados com a produção de cápsula pelo complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	10
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> inibidos sob ação de diferentes concentrações dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> .....	46
<b>Tabela 4.</b> Ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> na produção de melanina e urease por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> , após ação do OE na CIM.....	53
<b>Tabela 5.</b> Valores de Pz para a avaliação de atividade da fosfolipase de <i>C. neoformans</i> após exposição ao OE de <i>C. cassia</i> .....	55
<b>Tabela 6.</b> Atividade da fosfolipase de <i>C. neoformans</i> após exposição ao OE de <i>C. flexuosus</i> .....	57
<b>Tabela 7.</b> Produção de hemolisinas e DNase em isolados do complexo <i>C. neoformans</i> , após ação do OE de <i>C. cassia</i> .....	60
<b>Tabela 8.</b> Produção de hemolisinas e DNase por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> , após ação do OE de <i>C. flexuosus</i> .....	62

## FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Componentes da estrutura da cápsula polisacarídica. GXM-glicuroxilomanana e GalXM-galactomanana.....	7
<b>Figura 2.</b> Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma que atravessam a parede celular para formarem a cápsula.....	8
<b>Figura 3.</b> Modelos de síntese da cápsula polissacarídica por <i>C. neoformans</i> , através da união de subunidades e via seguimentos de polímeros.....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema da melanogênese em <i>C. neoformans</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Células de <i>C. neoformans</i> melanizadas visualizadas em tinta da China.....	13
<b>Figura 6.</b> Melanina na parede da célula de <i>C. neoformans</i> forma uma barreira física entre o meio exterior e a membrana da célula, protegendo-a de agressões letais.....	14
<b>Figura 7.</b> Locais de clivagem da enzima fosfolipase.....	15
<b>Figura 8.</b> Célula de <i>C. neoformans</i> secretando enzimas.....	16
<b>Figura 9.</b> Papel da enzima urease durante infecção fúngica nos pulmões.....	17
<b>Figura 10.</b> Ciclo da criptococose.....	20
<b>Figura 11.</b> Estrutura química da AmB.....	22
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de ação da AmB que se liga ao ergosterol da membrana levando a formação de poros.....	23
<b>Figura 13.</b> Estrutura química do FLC.....	24
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de ação do FLC.....	24
<b>Figura 15.</b> <i>Cinnamomum cassia</i> .....	28
<b>Figura 16.</b> <i>Cymbopogon. flexuosus</i> .....	29
<b>Figura 17.</b> Placa de microdiluição em caldo para avaliar a suscetibilidade <i>in-vitro</i> .....	35
<b>Figura 18.</b> Esquema do ensaio para determinar a CFM de isolados de <i>C. neoformans</i> sob ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> .....	36
<b>Figura 19.</b> Esquema para avaliar a cinética de crescimento das leveduras de <i>C. neoformans</i> sob ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> .....	37
<b>Figura 20.</b> Esquema do ensaio para avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> sobre o diâmetro da cápsula de isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	38
<b>Figura 21.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> na produção de melanina por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	39

<b>Figura 22.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> da produção de fosfolipase por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	40
<b>Figura 23.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> da produção de proteinase por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	41
<b>Figura 24.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> da produção de urease por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	42
<b>Figura 25.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> da produção de hemolisina por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	43
<b>Figura 26.</b> Esquema da avaliação da ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> da produção de DNase por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> .....	45
<b>Figura 27.</b> Cinética de crescimento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/mL) de <i>C. neoformans</i> sob ação de diferentes concentrações do OE de <i>C. cassia</i> .....	48
<b>Figura 28.</b> Cinética de crescimento de <i>C. gattii</i> ATCC 24065 após ação de diferentes concentrações do OE de <i>C. cassia</i> .....	48
<b>Figura 29.</b> Cinética de crescimento de <i>C. neoformans</i> sob diversas concentrações do OE de <i>C. flexuosus</i> .....	49
<b>Figura 30.</b> Cinética de crescimento de <i>C. gattii</i> sob ação do OE de <i>C. flexuosus</i> .....	49
<b>Figura 31.</b> Cápsula formada por <i>C. neoformans</i> (L2) em: (a) - meio indutor (controle positivo) e (b) - CSD (controle negativo) em tinta da nanquim (400X).....	50
<b>Figura 32.</b> Cápsula formada pelo isolado L2 de <i>C. neoformans</i> após exposição aos: (a) - OEs de <i>C. cassia</i> e (b) - <i>C. flexuosus</i> (b) em tinta da nanquim (400X).....	51
<b>Figura 33.</b> Cápsula formada pelo isolado L2 de <i>C. neoformans</i> após exposição à: (a) - AmB e (b) - FLC (b) em tinta da nanquim (400X).....	51
<b>Figura 34.</b> Média dos diâmetros das cápsulas produzidas por isolados do complexo <i>C. neoformans</i> após ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> , AmB e FLC. Controle positivo (meio indutor) e controle negativo (CSD).....	52
<b>Figura 35.</b> Comparação dos resultados do diâmetro da cápsula de <i>C. neoformans</i> expostas aos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> , com o controle positivo (meio indutor) (***) $p < 0,0001$ .....	52
<b>Figura 36.</b> Porcentagem de redução da cápsula dos isolados do complexo <i>C. neoformans</i> sob ação dos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> , comparados com o controle positivo.....	53

<b>Figura 37.</b> Avaliação da produção de Dnase em isolados ATCC14990 C+ ( <i>Saphylococcus aureus</i> ), ATCC 90112, ATCC 24065, ATCC 90028 C- ( <i>Candida albicans</i> ), L14, L18, L20 e L21 após ação do OE de <i>C. flexuosus</i> em CIM e 2XCIM.....	53
<b>Figura 38.</b> Placas das culturas do isolado L28 em ágar niger após 7 dias de incubação sob a ação de 128 ug/mL do OE de <i>C. flexuosus</i> , demonstrando não produção de melanina – (a) e cepas controle positivo <i>C. gattii</i> ATCC24065 e negativo <i>C. albicans</i> ATCC 90028 – (b).....	54
<b>Figura 39.</b> Avaliação da síntese de urease, isolado L15 sob ação da CIM do OE de <i>C. flexuosus</i> . (C+): <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 e (C-): <i>C. albicans</i> ATCC 90065.....	55
<b>Figura 40.</b> Avaliação da atividade de fosfolipase com formação de halos precipitação: (a) - cepa <i>C. gattii</i> ATCC24065 exposta ao FLC; (b) - isolado L2 exposto a <i>C. flexuosus</i> e (c) - cepa L1, L2, L3, L4 e L7 sob ação da CIM de <i>C. cassia</i> . Controle positivo <i>C. albicans</i> ATCC90028 (C+).....	57
<b>Figura 41.</b> Média dos valores de Pz da atividade de fosfolipase em isolados do complexo <i>C. neoformans</i> (p=0,0002) sob ação do OE de <i>C. cassia</i> .....	59
<b>Figura 42.</b> Média dos valores de Pz da atividade de fosfolipase de isolados do complexo <i>C. neoformans</i> (p=0,0005) sob ação do OE de <i>C. flexuosus</i> .....	61
<b>Figura 43.</b> Atividade de proteinase em isolados do complexo <i>C. neoformans</i> L1, L2, L3, L4; controle positivo <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019/ <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e controle negativo <i>C. neoformans</i> 90112/ <i>C. gattii</i> 24065.....	61
<b>Figura 44.</b> Avaliação da atividade hemolítica em isolados do complexo <i>C. neoformans</i> : (a) - expostos a CIM do OE de <i>C. cassia</i> , (b) - controle sem OE.....	62
<b>Figura 45.</b> Atividade hemolítica dos isolados do complexo <i>C. neformans</i> sob ação da CIM e 2 X CIM dos OEs de <i>C. cassia</i> (p=0,2068) e <i>C. flexuosus</i> (p<0,0001).....	65
<b>Figura 46.</b> Produção de DNase em isolados do complexo <i>C. neoformans</i> : (a) - Meio de cultura contendo CIM do OE de <i>C. flexuosus</i> , (b) - Meio de cultura sem o OE <i>Saphylococcus aureus</i> ATCC14990 (controle postivo) e <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (controle negativo). <i>C. neoformans</i> ATCC 90112, <i>C. gattii</i> ATCC 24065.....	65
<b>Figura 47.</b> Média de diâmetro dos halos resultante da ação da DNase em isolados de <i>C. neoformans</i> após ação aos OEs de <i>C. cassia</i> e <i>C. flexuosus</i> .....	66

## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

<b>AmB</b>	Anfotericina B
<b>ATCC</b>	<i>AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION</i>
<b>ASD</b>	Ágar Sabouraud Dextrose
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CGB</b>	Canavanina Glicina Bromotimol
<b>CLSI</b>	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
<b>CSD</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>Dc</b>	Diâmetro da colônia
<b>Dcp</b>	Diâmetro total da colônia
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilssulfoxido
<b>FAPEG</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
<b>FLC</b>	Fluconazol
<b>GalXM</b>	Galactoxilomanana
<b>GXM</b>	Glicoronoxilomanana
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>IPTSP</b>	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>L-DOPA</b>	<i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
<b>MOPS</b>	Ácido Morfolino Propanosulfônico
<b>MPs</b>	Manoproteínas
<b>OE</b>	Óleos Essencias
<b>PBS</b>	Tampão Salina Fosfato
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PI</b>	Fosfatadilinositol
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias
<b>UFG</b>	Universidade Federal de Goiás
<b>YCB</b>	<i>Yeast Carbon Base</i>

## RESUMO

---

O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende duas espécies, responsáveis por causar criptococose, sendo a principal manifestação a meningoencefalite em imunocomprometidos. Sua patogenicidade está relacionada aos fatores de virulência. O tratamento desta enfermidade é dificultado devido aos fármacos apresentarem alta toxicidade, resistência do fungo e pouca eficiência terapêutica. Pesquisa com produtos naturais biologicamente ativos tem demonstrado que os óleos essenciais (OEs) apresentam importante atividade antifúngica. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia como antifúngico e ação sobre os fatores de virulência em espécies do complexo *C. neoformans* dos OEs de *Cinamomum cassia* (Canela da China) e *Cytopogon flexuosus* (Capim limão). Por meio da técnica de microdiluição em caldo, os OEs apresentaram CIM variando entre 8 a 256 µg/ml e CFM de 16 a 512 µg/ml. *C. cassia* promoveu uma redução de 47,8% no tamanho da cápsula e inibiu a síntese de melanina em 30% dos isolados. A avaliação deste OE sobre a atividade das exoenzimas fosfolipase, urease e DNase demonstrou inibição em 15%, 30% e 25% dos isolados avaliados respectivamente. *C. flexuosus* reduziu o tamanho da cápsula em 48,7%, inibiu a produção de melanina, urease, fosfolipase e DNase em 30%, 30%, 25% e 15% respectivamente. Os dados demonstraram que os isolados não produziram proteinase e a atividade hemolítica foi reduzida em 15% para *C. cassia* e 45% *C. flexuosus*. Os resultados enaltecem o potencial desses OEs no tratamento da criptococose assim como na inibição dos fatores de virulência. Esses dados são promissores, sendo necessário pesquisas mais aprofundadas para o desenvolvimento de um novo fármaco.

## ABSTRACT

---

The *Cryptococcus neoformans* complex comprises two species responsible for causing cryptococcosis, the main manifestation being meningoencephalitis in immunocompromised hosts. Its pathogenicity is related to virulence factors. The treatment of this disease is difficult because the drugs present high toxicity, resistance of the fungus and little therapeutic efficiency. Research with biologically active natural products has shown that essential oils (OEs) have important antifungal activity. Thus, the present study had as objective to evaluate the antifungal efficacy and action on the virulence factors in *C. neoformans* complexes of OEs of *Cinamomum cassia* (Cinnamon of China) and *Cymbopogon flexuosus* (Lemon Grass). By means of the microdilution technique in broth, OEs had MIC ranging from 8 to 256 µg / ml and CFM from 16 to 512 µg / ml. *C. cassia* promoted a 47.8% reduction in capsule size and inhibited melanin synthesis in 30% of the isolates. The evaluation of this OE on the activity of exoenzymes phospholipase, urease and DNase demonstrated inhibition in 15%, 30% and 25% of the evaluated isolates respectively. *C. flexuosus* reduced the size of the capsule by 48.7%, inhibited the production of melanin, urease, phospholipase and DNase by 30%, 30%, 25% and 15% respectively. The data demonstrated that the isolates did not produce proteinase and the hemolytic activity was reduced by 15% for *C. cassia* and 45% *C. flexuosus*. The results highlight the potential of these OEs in the treatment of cryptococcosis as well as the inhibition of virulence factors. These data are promising, and further research is needed to develop of a new drug.

## 1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA

---

O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende um grupo de leveduras patogênicas, apresentando como principal e mais grave manifestação clínica processos infecciosos do sistema nervoso central (SNC), resultando em elevados índices de mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Chang & Kwon-Chung 1994; Durski et al. 2013; Meya et al. 2015). Atividade desta levedura no organismo do hospedeiro provoca alterações em consequência da ação de diversos fatores de virulência, que supostamente estão envolvidos na manutenção da infecção e são os responsáveis por desencadear a sintomatologia (Buchanan & Murphy 1998).

Atualmente o tratamento das infecções é realizado com o uso de alguns antifúngicos, sendo que os principais são fluconazol (FLC) e itraconazol do grupo do azólicos e o poliênico, anfotericina B (AmB) (Severo et al. 2009; Ravikant et al. 2015). Estes fármacos apresentam mecanismos de ação específico no ergosterol, que é o esterol componente da membrana celular do fungo, causando desequilíbrio desta estrutura e morte celular (Brajtburg et al. 1996; Li et al. 2015). A utilização destes fármacos causa efeitos colaterais devido a elevada toxicidade e, em consequência ao mal-estar provocado, pode prejudicar a continuidade do tratamento (Saag et al. 2000; Ellis 2002; Davis et al. 2015). Outro inconveniente relacionado à terapia desta doença é o aparecimento de resistência intrínseca (adquirida) de determinados isolados de *C. neoformans* (Ravikant et al. 2015).

Portanto, é necessário a descoberta de novos fármacos, como alternativa, que propiciem um tratamento eficaz com redução dos efeitos colaterais e uma melhor aceitabilidade pelos pacientes (Saag et al. 2000; Perfect et al. 2010).

A equipe de pesquisadores do Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) tem sido estimulada a avaliar o potencial antifúngico de diversos derivados naturais, tais como extratos de plantas, tinturas e óleos essenciais (OEs) (Passos et al. 2002; Souza et al. 2002; Assal et al. 2014).

Alguns destes estudos tem destacados os OEs, por apresentarem relevante atividade antifúngica, inibindo o crescimento de fungos filamentosos e leveduras (Souza et al. 2003; Lemos et al. 2005).

O presente estudo almeja avaliar a atividade antifúngica dos OEs de *Cinamomum cassia* e *Cybopongom flexuosus* em isolados do complexo *Cryptococcus neoformans* e

sua ação sobre os fatores de virulência produzidos por estas leveduras, como a produção da cápsula, melanina e enzimas, para que assim seja possível abrir novas perspectivas para o tratamento da criptococose.

## 1.1 . Complexo *Cryptococcus neoformans*

Criptococose é uma micose de natureza sistêmica, causada por fungos do complexo *C. neoformans* que compreende duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung & Varma 2006).

### 1.1.1. Taxonomia

O complexo *Cryptococcus neoformans* por décadas foi agrupado em duas variedades que incluíam 5 sorotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (Ikeda et al 1982; Kwon-Chung et al. 1992; Lengeler et al. 2001; Xu & Mitchell et al. 2003). Quando os teleomorfos das duas espécies foram descobertos, classificaram-se no gênero *Filobasidiella*, sendo *F. neoformans* (sorotipo A e D), e *F. bacillispora* (sorotipo B e C), na família *Filobasidiaceae*, na ordem *Filobasidiales* no filo *Basidiomycota* (Kwon-Chung et al. 1975 & 1976).

A seguir, o uso de ferramentas moleculares classificou as espécies do sorotipo A como uma variedade separada, *C. neoformans* var. *grubii*, de espécies de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), baseado na divergência na sequência do gene *URA5* (Franzot et al. 1999; Kwon-Chung 2002)

A genotipagem de numerosas espécies globais de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), *PCR-fingerprinting*, com os primers M13 e (GACA)<sub>4</sub> e (GTG)<sub>5</sub> demonstrou que cada espécie é composta por 4 sub-grupos geneticamente diversos: *C. neoformans* VNI a VNIV e *C. gattii* VGI a VGIV (Meyer et al. 1993 & 1999; Lin & Heitman 2006; Kwon-Chung et al. 2014)

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), realizada por Boekhout et al (2001), revelaram dois principais agrupamentos genotípicos, correspondendo as espécies *C. neoformans* (genótipos AFLP 1 a 3) e *C. gattii* (genótipos AFLP 4 a 6).

Baseados em diferenças fenotípicas, genéticas, patogênicas e ecológicas, atualmente a taxonomia das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* foi revisada, e a classificação sugerida está representada na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação das duas espécies do complexo *C. neoformans*

<i>C. neoformans</i>	Sorotipo	Genótipo
<i>C. neoformans</i>	A	AFLP1/VNI, AFLP1A/VNB/VNII e AFLP1B/VNII
<i>C. deneoformans</i>	D	AFLP2/VNIV
<b><i>C. gattii</i></b>		
<i>C. gattii sensu stricto</i>	B	AFLP4/VGI
<i>C. bacillisporus</i>	C	AFLP5/VGIII
<i>C. deuterogattii</i>	B	AFLP6/VGII
<i>C. tetragattii</i>	C	AFLP7/VGIV
<i>C. decagattii</i>	B	AFLP10
<b>Híbridas</b>		
<i>C. neoformans/C. deneoformans</i>	AD	AFLP3/VNIII
<i>C. gattii sensu stricto/ C. deneoformans</i>	BD	AFLP8
<i>C. gattii sensu stricto/C. neoformans</i>	AB	AFLP9

Fonte (Bovers 2006 & 2008; Hagen et al. 2015 & 2016).

### 1.1.2. Aspectos morfológicos e biológicos

O complexo *C. neoformans* é composto de células que apresentam forma esférica a ovoide, medindo aproximadamente 3 a 8 µm de diâmetro, envolvidas por uma cápsula polissacarídica. São leveduras não fermentativas sendo caracterizadas pela habilidade de assimilar inositol como única fonte de carbono, além de produzirem urease (Casadevall & Perfect 1999; Liu et al 2013).

No cultivo em meios de cultura, com ágar Sabourand dextrose (ASD), após 3 dias em temperatura de 25°C a 37°C, a análise macroscópica mostra colônias de cor branca a bege, brilhante com textura cremosa mucoide e margem lisa (Reolon et al. 2004). São observadas algumas diferenças morfológicas, biológicas, bioquímicas e moleculares entre as duas espécies que compõem este complexo (Kwon-Chung et al. 1982).

As espécies do complexo *C. neoformans* produzem leveduras haploides que se reproduzem assexuadamente (forma anamórfica) por brotamento em vida parasitária

ou no meio ambiente, e sexuadamente (forma teleomófica) com formação de hifa, basídio e basidiósporos (Kwon-Chung et al. 1976; Mansour et al. 2011).

No meio ambiente as leveduras do complexo *C. neoformans* são encontradas em diversos nichos ecológicos. *C. neoformans* possui distribuição cosmopolita, sendo encontrados em locais contaminados com excretas de aves, ricas em fontes de nitrogênio, ureia e creatinina (Kwon-Chung et al. 1984; Gomes et al. 2010). *C. gattii* é encontrado predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, estando normalmente associado a árvores e resíduos de matéria orgânica vegetal dispersos no ambiente. Foi inicialmente isolados de *Eucalyptus camaldulensis* e posteriormente em árvores tropicais como *cássia* e *ficus* (Ellis & Pfeiffer 1990; Lazera et. 1998).

Além da habilidade de assimilar o inositol, as leveduras do complexo *C. neoformans* utiliza duas vias metabólicas, a síntese ou catabolismo para converter o inositol em ácido hialurônico, utilizando a inositol exogenase ao substituir as manoses estruturais para a formação da cápsula polissacarídica, que também auxilia na virulência (Molina et al. 1999). Além do inositol, assimilam outros carboidratos como glicose, maltose, sacarose e galactose (Benham 1955; Bowman & Ahearn 1976; Reolon et al. 2004). Ambiente de pH alcalino favorece a produção de amônia, a partir da atividade da enzima creatinina deaminase, degradando a creatinina em metidationa e amônia (Kwon-Chung et al. 1982).

O mecanismo de infecção no homem ocorre a partir da inalação de leveduras dessecadas ou de basidiósporos dispersos no meio ambiente, que atingirão as vias respiratórias e estabelecerão um processo infeccioso nos pulmões (Del Poeta & Casadevall 2012). Em hospedeiros normais, a resposta imune efetiva ocorre através de macrófagos alveolares ativados, eliminando a maioria das células fúngicas inaladas (Del Poeta & Casadevall 2012). Por outro lado, em hospedeiros imunocomprometidos, as células criptocócicas desenvolvem infecção local ou proliferam e disseminam através da via hematogênica, apresentando um tropismo pelo SNC, onde se adaptam e causam a meningoencefalite (Severo et al. 2009)

*C. neoformans* acomete indivíduos com alteração no sistema imunológico celular, principalmente aqueles acometidos com Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), leucemia, linfomas, corticoterapia, diabéticos, sendo considerado um patógeno oportunista. *C. gattii* pode acometer hospedeiros humanos, não levando em consideração a integridade imunológica dos indivíduos susceptíveis (Ellis & Pfeiffer 1990; Mitchell & Perfect 1995).

Diante das condições específicas do hospedeiro, o processo de invasão e disseminação que permite o estabelecimento da infecção, pode estar relacionado a um complexo de mecanismos que envolve adaptação e virulência apresentados por estes microrganismos.

## **1.2. Fatores de virulência**

As infecções fúngicas geralmente são encontros acidentais no ciclo de vida do fungo e é provável que existam muitos fatores que permitam a sua sobrevivência e multiplicação no hospedeiro, importantes para sua capacidade patogênica. Estes fatores são estratégias para sobrepor o ambiente hostil do hospedeiro e são denominados de fatores de virulência.

A presença de fatores de virulência são características clássicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, pois estão vinculados com a patogenicidade e regulados através do controle genético (Steinbach et al. 2007). Dentre estes fatores, destaca-se a capacidade de crescimento da levedura em ambiente com temperatura em 37°C, cápsula polissacarídica, produção da melanina e algumas enzimas, tais como: fosfolipase, proteinase, urease, hemolisinas e DNase (Buchanan & Murphy 1998).

### **1.2.1. Temperatura**

O crescimento em elevadas temperaturas é uma das características de virulência de *C. neoformans*, que tem seu crescimento a 37°C associado a uma atmosfera de aproximadamente 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e pH entre 7,3 a 7,4 (kwon-Chung et al. 2014). Um gene que codifica a subunidade catalítica da calcineurina A, *CNA1* está relacionado a esta característica que permite sobrevivência a esta temperatura. A relação do gene *CNA1* com a capacidade de crescimento a 37°C foi avaliada em leveduras com e sem deleção deste gene, em temperaturas de 24°C, 37°C e 39°C. Ao analisar a expressão gênica através da técnica de PCR na ausência deste gene, foi observado que o crescimento das leveduras de *C. neoformans* sem a presença gene, foi abolido em temperaturas elevadas (Odom 1997).

A calcineurina A é uma serina-treonina fosfatase específica, que é ativada pelo cálcio calmodulina (Ca<sup>+</sup>) e está envolvida em resposta ao estresse em leveduras, apresentando papel fisiológico importante também nos fungos filamentosos

(Rasmussen et al. 1994; Yoshida et al. 1994). A deleção do gene que codifica a subunidade catalítica da calcineurina A em *C. neoformans*, leva a inibição do crescimento em temperaturas elevadas (Odom 1997).

A calcineurina possui uma proteína efetora (*cts1*) codificada pelo gene *CTS1*, que tem sido relacionada como essencial para a virulência desta levedura. Sugere-se que a associação das duas atue na regulação do crescimento em 37°C (Steinbach et al. 2007).

Outro gene que favorece o crescimento de *C. neoformans* é o *CNBI*, sendo observado que mutantes sem este gene foram sensíveis a temperatura de 37°C e avirulentos em modelo animal de meningite criptocócica (Fox et al. 2001).

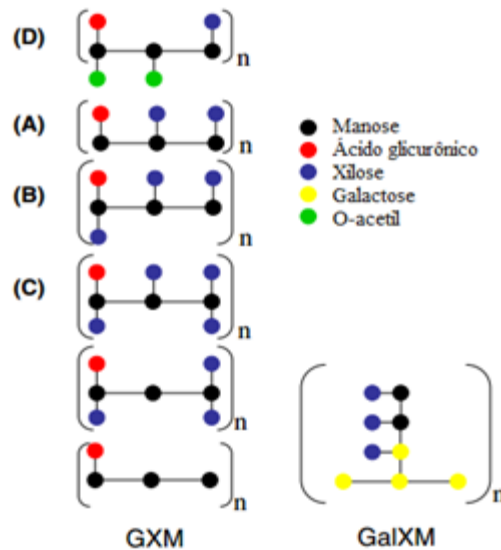
### 1.2.2. Cápsula polissacarídica

Uma característica que difere as espécies do complexo *C. neoformans*, de outras leveduras de importância médica é a presença da cápsula polissacarídica (Mitchel & Perfect 1995; Frases et al. 2008; Kumar et al. 2011). A presença desta estrutura é determinante para virulência de *C. neoformans*, favorecendo a sua sobrevivência e, que associada a outros fatores, possibilitando o estabelecimento da infecção (Kwon-Chung 1986).

A cápsula é formada por mecanismos complexos que utilizam diversas moléculas com propriedades auto degradantes, que influenciam na constituição da sua estrutura (McFadden 2006). Polímeros de polissacarídeos são os principais componentes, sendo que a glucuronoxilomanana (GXM) representa em 90% da estrutura e galactoxilomanana (GalXM) 7% e possui ainda 3% de manoproteínas (MP) (Bose 2003; Zaragoza 2009). A GXM possui peso molecular variando entre 2000 a 7000 kDa, enquanto a GalXM aproximadamente 100 kDa (Coenjaerts 2006).

A estrutura GXM é constituída por cadeias  $\alpha$ -1,3 manose,  $\beta$ -D-xilopiranosil,  $\beta$ -D-glicoronosil e 6-O-acetil, enquanto a GalXM possui  $\alpha$ -1,6 galactose ligada a resíduos de  $\beta$ -1,3galactose,  $\alpha$ -1,2-manose e  $\alpha$ -4,4-xilose (Figura 1) (Cherniak 1994; Janbon 2004).

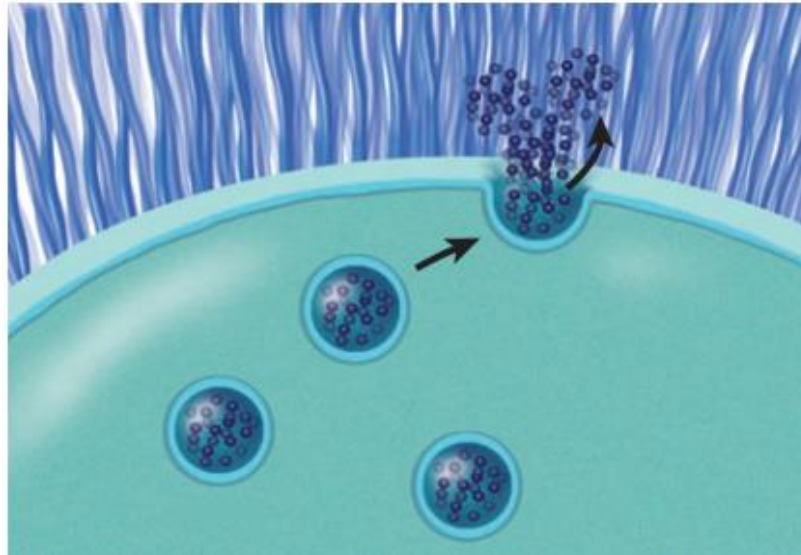
A diversidade molecular da cápsula polissacarídica caracteriza as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* em variedades sorotípicas (Zaragoza 2009) (Figura 1). O sorotipo D apresenta a GXM com uma cadeia  $\beta$ -1,2 ligada a resíduos de xilose, o sorotipo A duas ligações  $\beta$ -1,2 ligada a resíduos de xilose e os sorotipos B e C possuem  $\beta$ -1,4 ligada a resíduos de xilose e  $\beta$ -1,2-ácido glicurônico está presente em todos os sorotipos (Klutts 2007).



**Figura 1.** Componentes da estrutura da cápsula polissacarídica. GXM-glicuroxilomanana e GalXM-galactomanana (adaptado de Janbom 2001).

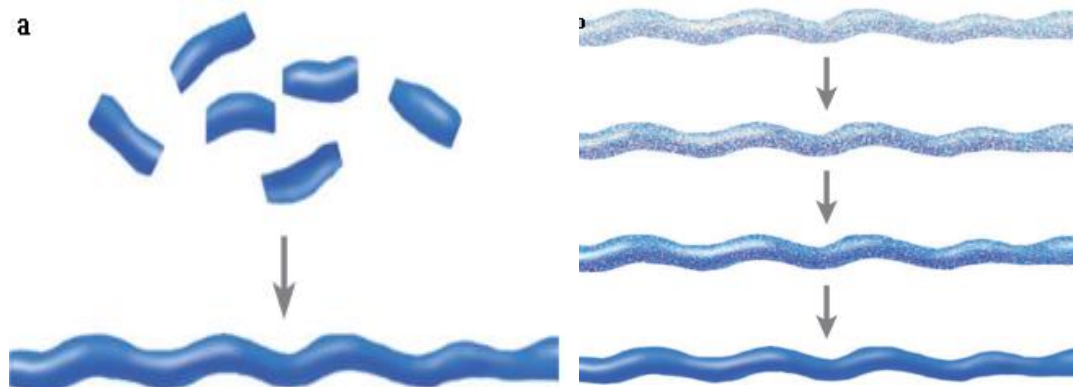
As manoproteínas (MPs) são glicoconjugados que usualmente contém 80 a 90% de manoses, expressas na superfície do fungo e liberada durante o crescimento. São conhecidas duas MPs isoladas de *C. neoformans* (MP1 e MP2) que são responsáveis por induzir uma resposta imunológica pelos monócitos humanos, produzindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 12 (IL12) (Pietrella 2005).

A montagem da estrutura capsular é realizada através de produtos sintetizados no citoplasma celular e após, são direcionados para o meio extracelular, onde ocorrerá a formação da cápsula (Figura 2) (McFadden 2006; Rodrigues 2008). Este transporte é realizado por vesículas de conteúdo heterogêneo, contendo inúmeras moléculas de natureza proteica, lipídica e carboidratos que auxiliam na produção da cápsula (Rodrigues 2008).



**Figura 2.** Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma que atravessam a parede celular para compor a cápsula (adaptado de Doering 2009).

Doering (2009) sugere que a síntese da cápsula polissacarídica pode ser realizada através de subunidades individuais de GXM que são geradas e interligam-se, ou pela formação de segmentos de polímero que podem ser gerados, quer na forma madura ou como um precursor (Figura 3).



**Figura 3.** Modelos de síntese da cápsula polissacarídica no *C. neoformans*, através da união de subunidades (a) e via segmentos de polímeros (b) (Doering 2009).

Quando as leveduras estão expostas no ambiente, a cápsula fornece proteção a dessecação e/ou contra predadores naturais como nematoides ou amebas e, entre estes

a *Acanthamoeba castellanii* que é responsável por fagocitar e matar as espécies *C. neoformans* e *C. liquenfaciens* (Araujo et al. 2012; Almeida et al. 2015).

Em hospedeiros mamíferos, a cápsula polissacarídica exerce diversas funções como atividade antifagocitária e oxidativa contra células da imunidade, além de favorecer a formação de biofilme (Martinez & Casadevall 2006; Araujo et al. 2012; Almeida et al. 2015).

Ao ser fagocitado *C. neoformans* libera vesículas contendo polissacarídeos, que interagem ao redor do fagossoma promovendo uma disfunção e ocasionando a morte dos macrófagos. Estes resultados relacionam a cápsula como uma agressina intracelular e os polissacarídeos como um componente envolvido na citotoxicidade de macrófagos (Feldmesser et al. 2000).

A cápsula confere proteção contra espécies oxigênio reativa (ROR), que são importantes moléculas antifúngicas produzidas pelos macrófagos durante a fagocitose. Além disso o aumento da cápsula também aumenta a sobrevivência celular na presença de radicais e moléculas antifúngicas, como defensinas e AmB (Zaragoza 2009).

O GXM é o principal constituinte da cápsula de *C. neoformans*, sendo também o constituinte da matriz polimérica extracelular do biofilme. Estudos comprovam que o polissacarídeo capsular é necessário para a formação do biofilme (Martinez & Casdevall 2007). Experimentos de deleção do gene *CAP59*, que levam a formação de células acapsulares, perderam a capacidade de desenvolver o biofilme, mesmo com a adição de polissacarídeo exógeno em cultura, não foi suficiente para compensar a falta de produção capsular na formação do biofilme (Martinez & Casdevall 2005).

O organismo do hospedeiro pode induzir algumas mudanças na célula fúngica, especificamente na estrutura da cápsula (Charlier 2005). Em estudos das infecções pulmonares primárias foi observado que as leveduras apresentaram alterações estruturais em seu diâmetro, que variaram até 100 µm, denominadas de células titãs. Essa mudança morfológica no tamanho das células afeta a patogenicidade do fungo por diminuir a fagocitose, reduzindo sua disseminação ao SNC, aumentando a resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo (Okagaki 2010).

A síntese da cápsula é realizada através da expressão dos genes, após sinalização da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), resultante de estímulos externos como pH ácido, presença de dióxido de carbono, carbono, nitrogênio, soro e baixa concentração de ferro (Zaragoza 2009).

A complexidade da estrutura da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* e sua biossíntese requer produtos de alguns genes. Estudos genéticos e técnicas bioquímicas tem sido aplicado para elucidar a via sintética. A tabela 2 mostra os 4 genes relacionados à produção da cápsula, *CAP10*, *CAP59*, *CAP60* e *CAP64*, (Chang & Kwon-Chung 1994; Chang & Kwon-Chung 1999).

**Tabela 2.** Características dos genes relacionados com a produção de cápsula pelo complexo *Cryptococcus neoformans*

Gene	Proteína	Localização	Função	Referência
<i>CAP10</i>	cap10	Citoplasma	Formação da cápsula Auxilia a atividade da xilosiltransferase	(Tefsen et al. 2014)
<i>CAP59</i>	cap59	Desconhecida	Formação da cápsula Secreção de componentes incluindo o GXM	(García-Rivera et al. 2004)
<i>CAP60</i>	cap60	Membranas nuclear e plasmática parede celular	Formação da cápsula	(Janbon 2004)
<i>CAP64</i>	cap64	Desconhecida	Formação da cápsula	(Chang et al. 1996)

Produtos específicos desses genes *CAP* na biossíntese da cápsula ainda não estão bem estabelecidos, mas todos compartilham homologia com enzimas envolvidas na biossíntese de polissacarídeo (glicosiltransferase) e/ou modificações. As glicosiltransferases catalisam a transferência de fração de monossacarídeos de um doador de açúcar ativado, para um diferente acceptor molecular em ligação particular, e este processo ocorre frequentemente dentro da via retículo endoplasmático-Golgi. A modificação dos polissacarídeos capsulares também pode ocorrer no citosol e polissacarídeos transportados em vesículas (Thompson et al. 1999; Rodrigues et al. 2007; Rodrigues et al. 2008; Tefsen et al. 2014).

Os genes *CAP10*, *CAP60* e *CAP64* tem sido abordados como genes essenciais para a manutenção da virulência do fungo, possibilitando a formação e estabilização da cápsula, sendo que a deleção destes genes resulta em leveduras acapsulares (Chang & Know Chung 1998). Isoladamente foi observado que ambos os genes *CAP59* e *CAP64* quando expressos, favorecem a síntese da enzima  $\alpha$ -1,3- manosiltrasferase, responsável

por atuar na formação da estrutura de GXM através da organização das ligações de manoses (Chang et al. 1996; Sommer 2003).

Foram identificados seis genes homólogos de *CAP64*, denominados *CAS3*, *CAS31*, *CAS32*, *CAS33*, *CAS34* e *CAS35*, no genoma de *C. Neoformans*, a comparação das sequências do gene *CAS* revelou a presença de uma região conservada, que é essencial para a atividade de diferentes glicosiltransferases (Moyrand et al. 2004). Estes genes estão envolvidos no processo de ligação e acetilação de xilose e o *CAS1* está presente na estruturação dos sorotipos capsulares, mediante a adição de resíduos de O-acetil para a formação de GXM (Janbon et al. 2001; Moyrand et al. 2004). Os estudos demonstraram que estas atividades estão relacionadas com as proteínas sintetizadas *cas1*, *cas 3*, *cas 31*, *cas 32*, *cas 33*, *cas 34* e *cas 35* (Moyrand et al. 2004).

O gene *CXT1*, similar ao *CAP10*, está envolvido na formação da cápsula, por intermédio da síntese da proteína *cxt1* que é requerida para a adição de xilose na GalGXM (Tefsen et al. 2014).

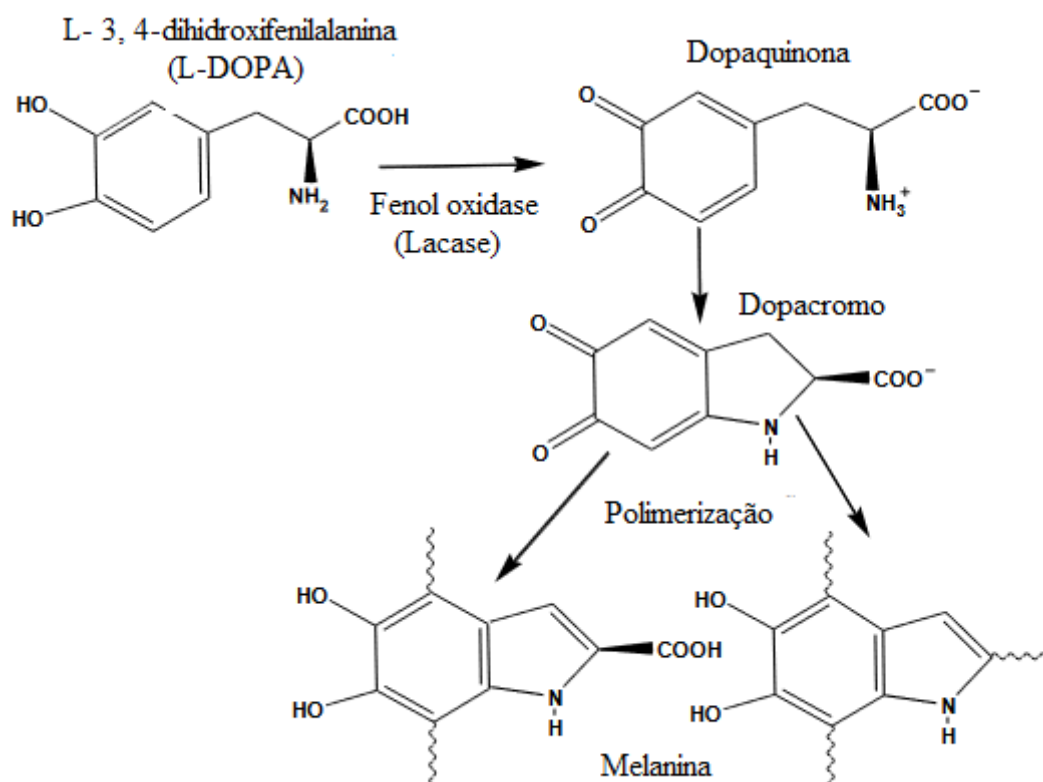
A atividade de outros genes tem demonstrados importância na formação capsular e sobrevivência da levedura, tais como o *MAN1* e *USX1*. O gene *MAN1* é específico para a síntese da enzima fosfomanose isomerase, fazendo a ligação de manoses para a formação da GXM, e a sua deleção resulta em morte da célula fúngica (Wills et al. 2001). O gene *USX1* está relacionado com a síntese da enzima UDP-xilose sintetase, que promove a xilosilação de moléculas de xilose, na estruturação de GXM (Moyrand et al. 2002).

### **1.2.3. Melanina**

A melanina é um polímero de capacidade multifuncional, caracterizado por ser de coloração variável (preto/ marrom a amarelada), sendo formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou endólicos. É classificada como eumelanina, formada por polimerização de radicais livres, a feomelanina é derivada de moléculas de tirosina ou cisteína e alomelanina constituída de derivados livres de azoto (Hamilton & Gomez 2002). O esquema de biossíntese da melanina está representado na figura 4.

A habilidade de sintetizar este pigmento através da catalise realizada pela lacase na presença de substratos fenólicos, como a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), dopaquinona, noraepinefrina e epinefrina resulta na formação de melanina (Casadevall et al. 2000). A expressão dos genes *LAC1* e *LAC2* são responsáveis pela produção da

síntese da enzima lacase, sendo que o *LACI* considerado como principal (Pukkila-Worley et al. 2005).

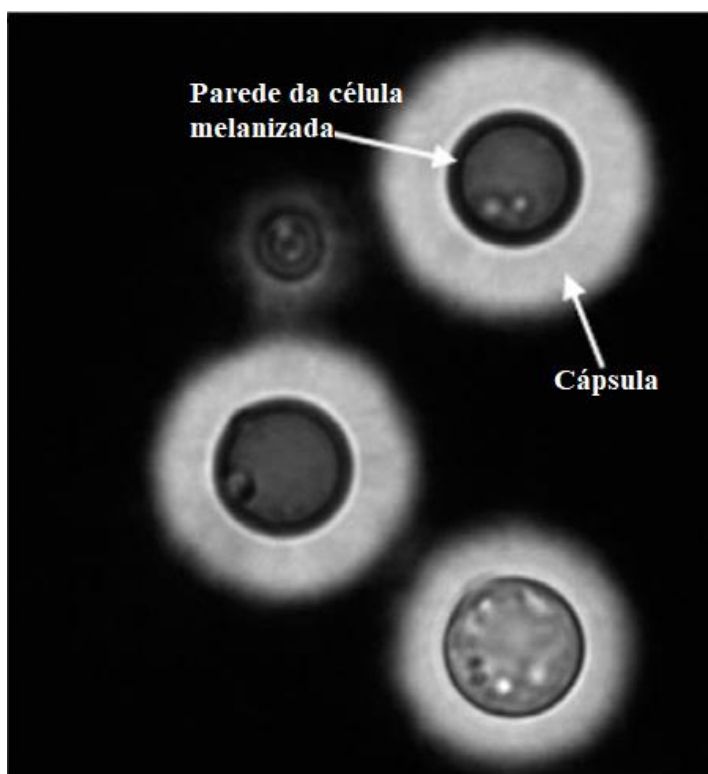


**Figura 4.** Esquema da melanogênese em *C. neoformans* (adaptado de Williamson et al. 1998).

A melanina é formada por moléculas com alto peso molecular, carregadas negativamente, resistentes a corrosão ácida e sensível a degradação por soluções alcalinas fortes. Possui propriedades hidrofóbicas, insolúveis em soluções aquosas e solventes orgânicos (Casadevall et al. 2000; Urán & Cano 2008). A sua estrutura é composta por grânulos de aproximadamente 40 a 130nm de diâmetro e distribuídos em camadas concêntricas, envolvendo aproximadamente 75% da parede celular (Figura 5) (Eisenman et al. 2005). As partículas de melanina se arranjam formando poros que são necessários para permitir a aquisição de nutrientes, estando envolvidos no transporte de substâncias, anticorpos, moléculas de glicose e aminoácidos (Mandal et al. 2007).

Segundo Eisenman et al. (2005), utilizando a técnica de ressonância nuclear magnética foi identificado a medida de tamanho dos poros entre 10Å a 20Å de diâmetro. A interação de moléculas de melanina (grânulos) e anticorpos, causam redução no tamanho dos poros para valores menores que 20Å. A inabilidade da AmB

de penetrar a parede celular é devido ao limite do diâmetro dos poros, prejudicando a ação efetiva contra as células melanizadas.

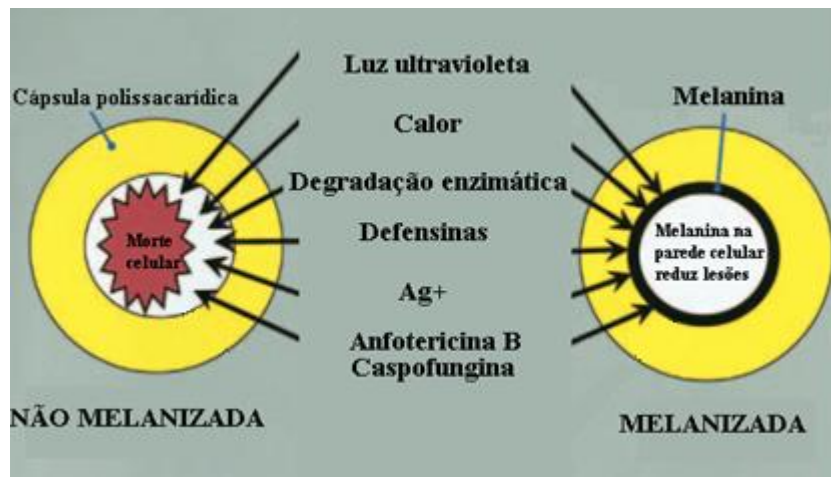


**Figura 5.** Células de *C. neoformans* melanizadas visualizadas em tinta da China (adaptado de Radames et al. 2017)

A produção de melanina por células de *C. neoformans* possui importância na proteção, manutenção da patogenicidade e aumento da virulência (Pedroso et al. 2007; Mandal et al. 2007; Menezes et al. 2011).

Este pigmento auxilia a levedura na proteção contra fatores ambientais como a biodegradação, ação de enzimas líticas, exposição à radiação ultravioleta (UV), temperaturas extremas, predação por microrganismos e ação de metais pesados (Figura 5) (Butler et al. 2005; Urán & Cano 2008).

Em modelo experimental *in vitro*, foi descrito que este pigmento proporciona mecanismo de resistência contra as células efetoras de defesa e moléculas oxidantes, peptídeos microbicidas (Casadeval et al. 2000).



**Figura 6.** Melanina na parede da célula de *C. neoformans* forma uma barreira física entre o meio exterior e a membrana da célula, protegendo-a de agressões letais (adaptado de Nosanchuk & Casadevall 2003).

A produção de melanina atua de forma imunomoduladora possuindo propriedades pró e anti-inflamatórias, protegendo a célula fúngica dos mecanismos de ação dos macrófagos, interferindo na via alternativa do complemento. Participam ainda da imunidade mediada por células, através da diferenciação das células T do tipo T2 que é responsável por mediar as respostas contra as infecções causadas por *C. neoformans* (Mednick 2005).

#### 1.2.4. Produção de enzimas

Diferentes enzimas têm sido detectadas em células de *C. neoformans*, assim como no sobrenadante de meios de cultura, contendo o fungo. Enzimas como proteases, lipases e superóxido dismutase são associadas com a virulência de muitos microrganismos. No meio ambiente o fungo elabora essas enzimas para obter nutrientes. Entretanto, quando secretadas durante a infecção, podem destruir tecidos, interferir nos mecanismos de defesas do hospedeiro e contribuir para a virulência (Casadevall & Perfect 1998).

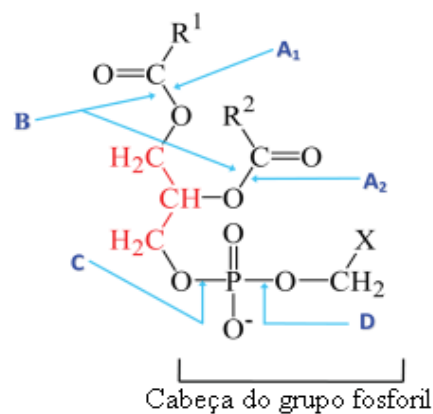
A atividade da fosfolipase e proteinase é considerada importante fator, relacionado com a atividade patogênica de *C. neoformans* (Chen et al. 1997; Vidotto et al. 2000), assim como outras exoenzimas como a Dnase extracelular, hemolisinas (Luo et al. 2001; Sánchez & Colom 2010) e urease (Olszewski et al 2004).

### 1.2.4.1. Fosfolipase

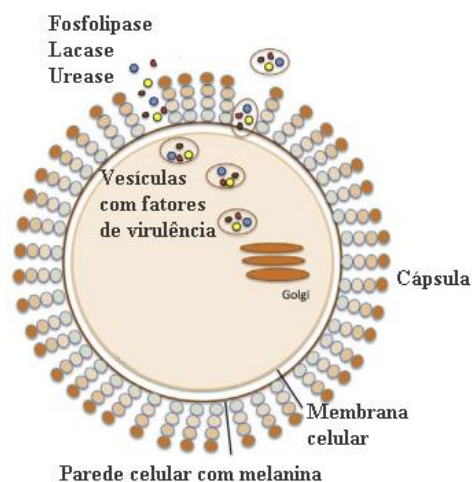
A fosfolipase é formada por um grupo heterogêneo de enzimas, que hidrolisam uma ou mais ligações éster, dos glicerofosfolipídeos que são os maiores componentes da membrana celular e do surfactante pulmonar (Djordjevic 2010).

A atividade da fosfolipase auxilia o microrganismo na obtenção de nutrientes e, quando infecta o hospedeiro, causa lesões teciduais por intermédio da hidrólise de fosfolipídios da membrana. Dessa forma esta enzima atua interferindo nos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como contribui para invasão tecidual e disseminação hematogênica do fungo (Casadeval & Perfect 1999; Santangelo et al. 2004)

Estudos relacionados a essa enzima produzida por *C. neoformans* determinaram atividade de 5 tipos de fosfolipasas: A1, A2, B, C e D, sendo que a B e C estão associadas no desenvolvimento da patogenicidade (Figura 7) (Djordjevic 2010).



**Figura 7.** Locais de clivagem da enzima fosfolipase (adaptado Djordjevic 2010).



**Figura 8.** Representação esquemática da formação dos principais fatores de virulência por *C. neoformans* (adaptado de Coelho et al. 2014).

Segundo Evans et al. (2015) a expressão do gene *PLB1* favorece a síntese da fosfolipase B (PLB) por *C. neoformans*, atuando de forma multifuncional em processos infecciosos localizados no pulmão, onde degrada o principal componente do surfactante pulmonar, o dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC), favorecendo a instalação da doença (Ganendren et al. 2006).

A fosfolipase C (PLC) é produto da expressão dos genes *PLC1* e *PLC2* (Chayakulkeeree et al. 2008), e esta enzima juntamente com o fosfolípido fosfatidilinositol (PI), atua na remoção de grupos polares de PI ancorados nas proteínas da membrana e parede celular fúngica, que interferem na imunomodulação do hospedeiro (Djordjevic 2010).

#### **1.2.4.2. Proteinase**

As proteinases são descritas como importantes para a virulência de patógenos bacterianos e fúngicos, tendo sido descrito em isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (Brueske 1986; Casadevall & Perfect et al. 1998; Ruma-Haynes et al. 2000).

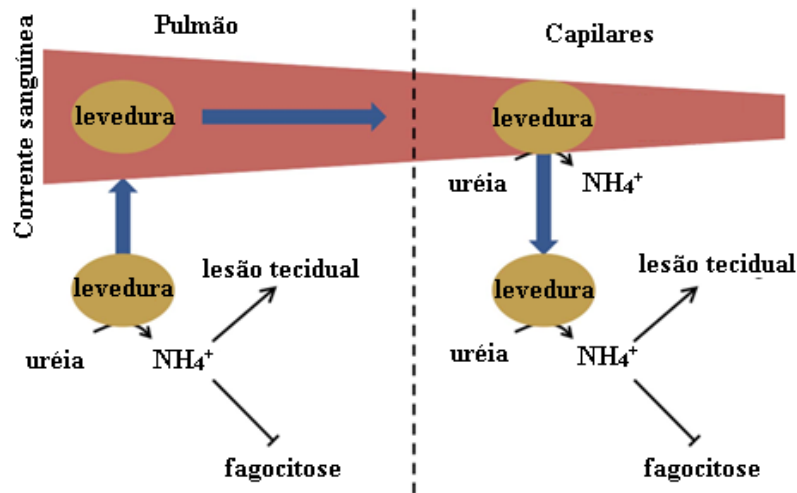
A atividade da proteinase está relacionada com a patogenicidade de *C. neoformans* por degradar proteínas, como colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento (Chen et al. 1996), causando danos nos tecidos do hospedeiro (Salkowski & Balish, 1991) e fornecendo nutrientes ao patógeno (Naglik et al. 2003). Esta degradação dos componentes celulares do hospedeiro pode proteger *C. neoformans* da resposta imune, bem como auxiliar as células fúngicas a escapar dos fagolisossomos (Chen et al. 1996).

Dessa forma, a proteinase é considerada um fator determinante para a manutenção da infecção e disseminação fúngica no hospedeiro (Chen et al. 1996; Kwon-Chung & Varma 2006; Junior et al. 2013).

#### **1.2.4.3. Urease**

A urease é uma enzima que atua hidrolisando a ureia em amônia e carbamato com liberação de nitrogênio pelo microrganismo (Cox et al. 2000). Em consequência ocorre um aumento de pH do tecido infectado, causando lesão celular, levando a uma alteração da permeabilidade e transmigração tecidual (figura 9) (Rappleye & Goldman 2006; Shi et al. 2010).

A ureia está presente no fluido de revestimento epitelial dos pulmões e a ação da urease produzida por *C. neoformans*, ao converter em amônia, promove inibição da função imunológica, por prejudicar a função fagocitária, e causando danos no tecido pulmonar (Rutherford 2014).



**Figura 9.** Papel da enzima urease durante infecção fúngica nos pulmões (adaptado de Rutherford 2014).

A produção de urease por *C. neoformans* tem um importante papel na sua disseminação ao SNC causando a meningoencefalite. Esta enzima promove o sequestro de *C. neoformans* dentro dos microcapilares, que parece ser uma etapa crítica para a disseminação. Acredita-se que a produção de amônia, em proximidade direta com as células endoteliais, possa resultar em um aumento na aderência do fungo ao endotélio, através de efeito estritamente mecânico (mudança na forma do microvaso), ou por uma indução da adesão de moléculas na superfície das células endoteliais (Olszewsk et al. 2004).

A amônia promove toxicidade a células endoteliais e/ou afeta astrócitos levando a abertura da junção das células endoteliais e enfraquecendo a integridade da barreira hematoencefálica. *C. neoformans* é o primeiro microrganismo reportado a usar a urease para facilitar sua disseminação ao SNC, via sequestro dentro de microvasos. Diante disso, existe a possibilidade de que a urease possa ser usada por outras espécies de microrganismos para facilitar sua propagação para o SNC (Olszewsk et al. 2004).

#### **1.2.4.4. Hemolisinas**

A habilidade de microrganismos patogênicos de adquirir ferro é de fundamental importância na sua sobrevivência e na capacidade de estabelecer a infecção no hospedeiro. Uma vez que não existe nenhum ferro livre no hospedeiro humano, a maioria dos agentes patogênicos o adquire de forma indireta, através dos compostos de ferro comumente disponíveis, como o hemoglobina. Para isso, o patógeno deve possuir um mecanismo para destruir a fração heme, permitindo a extração do ferro. As enzimas que medeiam essa atividade são classificadas como hemolisinas. Em humanos, a maior quantidade do ferro é encontrado intracelularmente na ferritina ou em compostos contendo heme. Uma pequena quantidade extracelular de ferro é encontrado em proteínas transportadoras, como a transferrina e lactoferrina (Manns et al 1994; Luo et al 2001).

A presença dessas substâncias é importante para manutenção da infecção, principalmente por leveduras de importância médica, como as espécies do complexo *C. neoformans* (Linares et al. 2007). Nas leveduras do gênero *Candida*, sugere-se que as manoproteínas presente na parede celular, estejam relacionadas com a atividade hemolítica contra as células do hospedeiro (Luo et al 2001). O mecanismo utilizado pelos fungos para aquisição do ferro através da hemólise de hemácias ainda é pouco conhecido (Jung et al 2008).

#### **1.2.4.5. DNase**

A DNase é produzida por *C. neoformans* e sua virulência está relacionada a degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA), que é secretado por neutrófilos como parte da resposta imune inata do hospedeiro e fornecendo nucleotídeos (Sánchez & Colom, 2010). Pesquisa envolvendo vários tipos de leveduras, sugere a correlação entre atividade de urease, e a produção de DNase está relacionada com a virulência dos fungos (Sen et al., 1979). A DNase pode ser importante em combinação com outras exoenzimas para degradar o DNA de outros microrganismos no microambiente, especialmente bactéria, facilitando a colonização dos sítios, reduzindo a competição microbiana (Riceto et al. 2015).

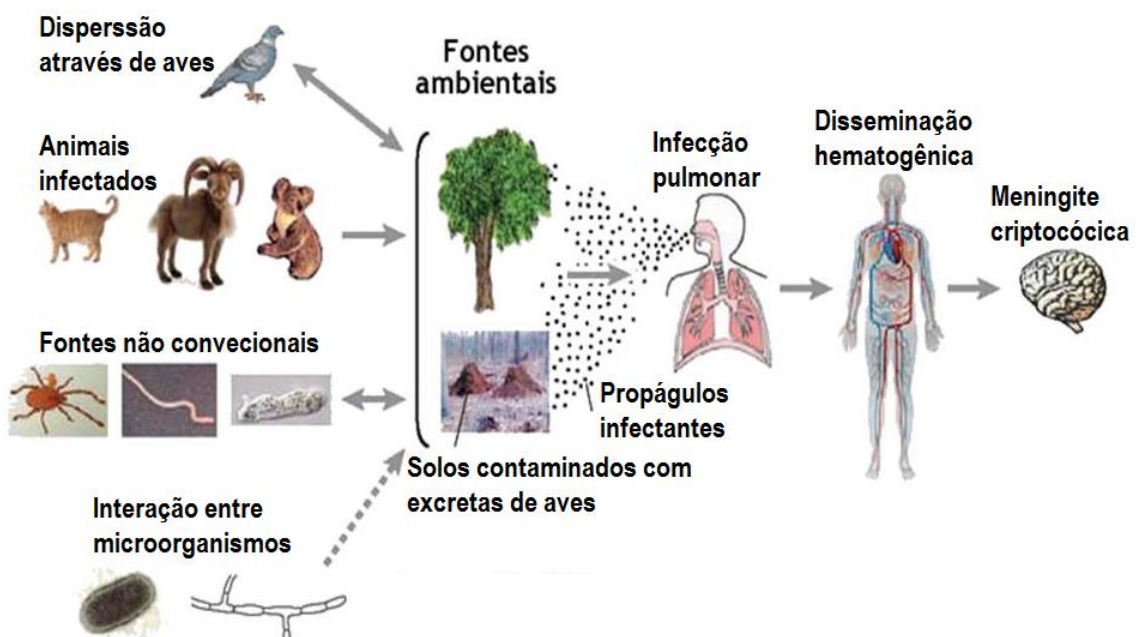
A comparação da produção de DNase entre isolados ambientais e clínicos demonstram que os últimos possuem uma maior atividade dessa enzima, sugerindo que

a DNase pode desempenhar um papel como fator de virulência (Sánchez & Colom, 2010).

### 1.3. Criptococose

A criptococose é uma doença fúngica causada por leveduras do complexo *C. neoformans* que caracteriza-se por ser uma das principais causas de meningite/meningoencefalite fúngica com evolução grave e fatal em pacientes imunocomprometidos (Li & Mody 2010).

Após a inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos disperso no ambiente, o hospedeiro pode desenvolver quadro assintomático ou sintomático (Severo et al. 2009). A infecção primordialmente ocorre nos pulmões ou o fungo pode manter-se latente, com formação de nódulos granulomatosos ou disseminar por via hematogênica e de alcançar outros tecidos (Figura 10) (Severo et al. 2009).



**Figura 10.** Ciclo de infecção de *Cryptococcus* – ambiente e hospedeiro (modificado de Li & Mody 2010).

O patógeno pode desenvolver processos inflamatórios em tecidos do SNC, acompanhado ou não de lesão pulmonar, suprarrenal, rins, ossos, pele e entre outros (Kon et al. 2008).

A principal complicação da doença ocorre em processo devido ao acometimento do SNC, causando meningoencefalite, com sinais clínicos de febre, mal-estar, cefaleia, distúrbio visual, confusão mental, papiloedema, alterações de nervos cranianos e aumento da pressão do fluido cerebral (Feldmesser et al. 1996; Jarvis & Harrison 2007).

Os indivíduos que apresentam maior predisposição para adquirir a doença são aqueles em tratamento com imunossupressores, imunocomprometidos, especialmente os indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Ishii et al. 2015). Em pacientes com SIDA as manifestações cutâneas são mais frequentes, podendo apresentar sintomas de múltiplas lesões, de forma acneiforme, nodulares, herpetiniforme, tipo celulite e queloides com presença de eritema (Nasser & Filho 2011). Pode ser observado comprometimento dos olhos, causando infecção da coróide e endoftalmite, assim como de outros tecidos como a próstata, desenvolvendo prostatite também podem ser observadas (Subramanian & Mathai 2005).

### **1.3.1. Diagnóstico**

O diagnóstico da criptococose é realizado através do auxílio de exames laboratoriais, utilizando técnicas como o exame direto (ED), cultura, histopatológico, sorologia, diagnóstico molecular e exames de imagem.

As amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico são: líquido cefalorraquidiano (LCR), escarro, biopsia de tecidos, lavado brônquico, sangue, raspado de lesões cutâneas, urina, secreção prostática e amostra de medula (Mitchell & Perfect 1995; Gazzoni et al. 2008).

O exame direto é realizado utilizando a tinta da China ou tinta nanquim que permite visualizar a cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. Este método é mais acessível, pois é de baixo custo, com sensibilidade de 80% em casos de meningite criptocócica em pacientes imunocomprometidos com SIDA (Severo et al. 2009; Perfect 2014).

A cultura é realizada em meio de ágar Sabouraud dextrose (ASD), para o isolamento de espécies do complexo *C. neoformans*. Após a incubação entre 25°C e 37°C, por 72 horas, se observa o crescimento de colônias mucoides com coloração creme ou branca. A diferenciação entre as duas espécies deste complexo baseia-se na habilidade do *C. gattii* em assimilar a glicina, apresentando resistência à canavanina quando submetido em meio canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). A cultura

de LCR para pesquisa de *Cryptococcus* é positiva em 89% dos pacientes sem infecção pelo HIV e em 95-100% dos pacientes acometidos por SIDA (Kon et al. 2008).

A partir do exame histopatológico é possível observar microestruturas específicas de *Cryptococcus*, através das colorações de hematoxilina eosina (HE), coloração pela prata Gomori (GMS), mucicarmim de Mayer e Fontana Masson (Gazzoni et al. 2009).

A sorologia é realizada pela a detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus*, através da reação de aglutinação em látex, pode ser realizada utilizando LCR e soro, onde a positividade é maior que 90% nos pacientes com SIDA (Kon et al. 2008).

*C. neoformans* e *C. gattii* podem ser detectados e identificados a partir de espécimes clínicos e culturas, baseado em sequências específicas de genes. Entre as principais técnicas de identificação estão a hibridação, que foi pioneira na identificação molecular do fungo e no desenvolvimento de sondas específicas para detecção de patógenos; PCR e outros métodos baseados em PCR, sequenciamento de regiões genômicas específicas, que são amplificadas através de PCR são úteis para o diagnóstico da criptococose (Sorrell et al. 1996; Lin & Heitman 2006).

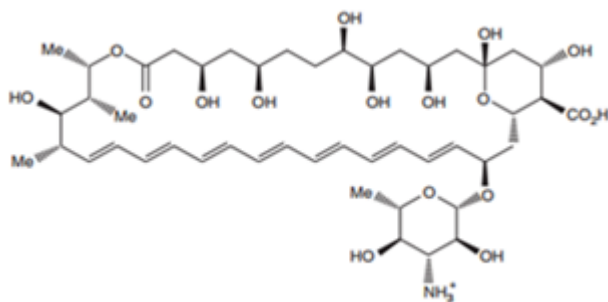
Os exames de imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética são ideais para visualização de complicações, do tipo hidrocefalia ou lesões em massa (Subramanian & Mathai 2005).

### **1.3.2. Tratamento**

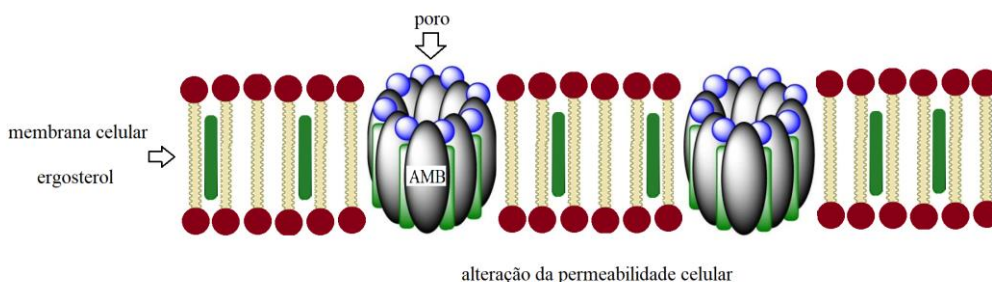
O tratamento dos pacientes com diagnóstico de criptococose deve ser realizado de acordo com as manifestações clínicas. Os fármacos mais utilizados são a AmB e os derivados azólicos, como FLC e Itraconazol (Saag et al. 2000).

AmB, com estrutura química representada na figura 11, e a anfotericina na forma lipossomal (constituída do complexo lipídico) são os derivados polienos disponíveis para o tratamento de criptococose (Nooney et al. 2005; Valdés 2005). Estes fármacos apresentam como mecanismo de ação, a ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, desencadeando a sua despolarização, disruptura, alterando a permeabilidade com a perda de componentes essenciais para a sobrevivência celular (Figura 12) (Davey et al. 1998; Chen et al. 2015).

Administração deste fármaco é recomendado em situações de alta gravidade, principalmente em casos de comprometimento do SNC, mas é necessário levar em consideração o risco de efeitos colaterais, como nefrotoxicidade (Perfect et al. 2010).



**Figura 11.** Estrutura química da AmB (adaptado de Roemer & Krysan 2014).



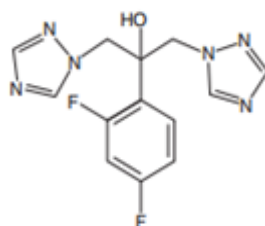
**Figura 12.** Mecanismo de ação da AmB que se liga ao ergosterol da membrana levando a formação de poros (adaptado de Palacios et al. 2011).

Atividade tóxica da AmB tem sido relacionada com a ligação deste fármaco com o colesterol da membrana celular, sendo este o responsável por manter a estabilidade e integridade da célula humana, podendo desenvolver toxicidade aguda ou crônica (Hoeprich 1992).

A nefrotoxicidade é considerada um fator de grave comprometimento nas terapias antifúngicas, devido ao desenvolvimento da insuficiência renal que é considerada de alta gravidade para os pacientes (Deray 2002).

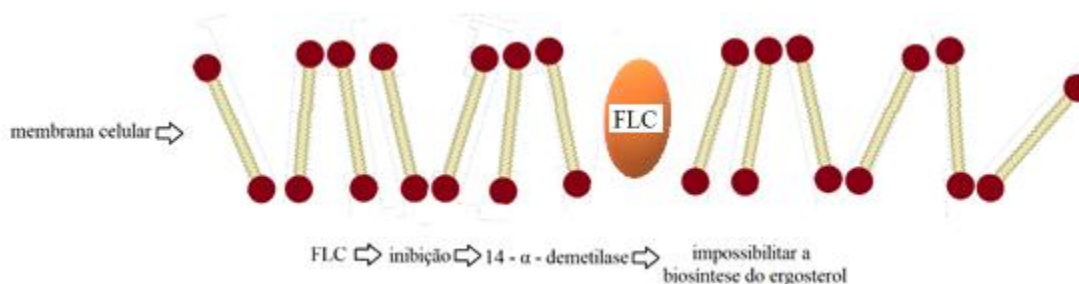
Foi observado que AmB em dispersão coloidal é bem tolerada em administração de dose única em voluntários saudáveis. Entretanto, o aumento progressivo da concentração causa o aumento da ocorrência de efeitos colaterais, como vômitos, náusea, calafrio, taquicardia e febre (Sanders et al. 1991; Filippin & Souza 2006).

O FLC é um derivado do grupo dos azólicos, com ação fungistática, cujo mecanismo de ação é promover uma alteração da biossíntese do ergosterol (figura 13), através da inibição da lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, que é responsável pela desmetilação oxidativa do lanosterol impedindo a formação do ergosterol, desta forma ocorre a formação de uma membrana celular fungica defeituosa prejudicando a sua sobrevivência (Figura 14) (Nooney et al. 2005; Giavini & Menegola 2010; Ferreira et al. 2013).



**Figura 13.** Estrutura química do FLC (adaptado de Roemer & Krysan 2014).

A utilização deste fármaco apresenta algumas limitações, como a pouca eficiência contra fungos filamentosos, resistência natural em *Candida Krusei* e resistência adquirida contra espécies de *Candida* e *C. neoformans* (Fica 2004).



**Figura 14.** Mecanismo de ação do FLC na membrana celular (adaptado de Palacios et al. 2011).

A prescrição do FLC é recomendável para paciente na fase inicial da infecção, especificamente quando as manifestações clínicas estão localizadas a nível pulmonar (Santos et al. 2014). Este fármaco é considerado de baixa toxicidade (Fica 2004), sendo que os principais efeitos adversos estão envolvidos com a intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade (Martinez 2006). Este fármaco tem sido administrado como profilático no controle de infecções fúngicas (Logu et al. 2005) e, como consequência, o risco dos isolados adquirirem resistência, contribuindo para insucesso do tratamento.

Jacobson et al. (1994) relataram toxicidade em paciente com SIDA e criptococose, quando submetido a terapia oral com FLC 400mg por 3 semanas, observando o desenvolvimento de hepatotoxicidade com fibrose hepática e óbito.

### **1.3.3. Resistência aos antifúngicos**

A falha no tratamento da criptococose pode ocorrer, e está relacionada com diversos fatores como as doenças subjacentes, intolerância aos fármacos, comprometimento da farmacocinética do medicamento e a resistência primária ou secundária de *C. neoformans* aos antifúngicos (Perfect & Cox 1999).

A resistência primária do microrganismo é caracterizada por desenvolver de forma natural, sem que haja exposição aos fármacos, e a secundária acontece de forma adquirida, ocorrendo mediante a exposição ao antifúngico ou dependente de alterações genéticas (Kanafani & Perfect 2008). A utilização indiscriminada e prolongada dos medicamentos antifúngicos tem contribuído também no desenvolvimento de casos de resistência (Bicanic et al. 2006).

A resistência ao FLC pode estar associada com a mutação do gene *ERG11* (Sanglard 2002) e segundo Posteraro et al. (2003) o gene *CNAFr1* também tem relação com a resistência aos fármacos azóis.

A interferência no sistema de transporte do fármaco, pode proporcionar resistência múltipla aos fármacos (MDR), podendo haver envolvimento com a superfamília ABC transportadora (proteínas de membrana), codificada pelo gene CDR, influenciando no mecanismo de resistência (Perea & Patterson 2002). A alta concentração intracelular de azóis, que ao interagir com as moléculas enzimáticas, induz a substituição de aminoácidos da composição das enzimas, alterando sua função. Isto resulta em prejuízo do mecanismo de efluxo do fármaco, propiciando a diminuição da afinidade aos derivados azólicos (Perea & Patterson 2002).

Alterações no *ERG3* ou *ERG6* estão envolvidas na resistência a AmB, pois este gene possui função na biossíntese do ergosterol e sua expressão está relacionada ao acúmulo de outros esteróis na membrana fúngica. Os isolados de *Cryptococcus* resistentes a este polieno têm um teor de ergosterol relativamente baixo, em comparação com os isolados susceptíveis (Dick et al. 1980; Pemán et al. 2009; Vandeputte et al. 2012) Segundo Kelly et al. (1994) a resistência de AmB pode ocorrer também devido a

mutação do gene *ERG2*, que leva a algumas alterações na enzima esterol isomerase, que está envolvida no processo da biossíntese de esteróis.

Pedroso et al. (2006), ao avaliar a suscetibilidade de 16 isolados de *C. neoformans* var. *neoformans*, 17 *C. albidus*, 14 *C. laurentii* e 3 *C. uniguttulatus*, à AmB demonstraram que os isolados de *C. neoformans* e *C. laurentii* apresentaram MIC de 2 µg/ml, considerados cepas resistentes.

Neste cenário torna importante a busca de alternativas para o sucesso na terapia da criptococose, e as plantas se apresentam como grande potencial.

#### 1.4. Produtos naturais

A utilização de plantas com fins medicinal tem apresentando grande importância médica, principalmente no continente Sul Americano, como no auxílio na assistência básica de saúde, mesmo que muitas vezes não tenha comprovação científica (Pessini et al. 2003).

A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos e OEs de plantas, tem evidenciado a importância dos derivados naturais como antifúngico (Negri et al 2014).

A atividade antimicrobiana do extrato de folhas e óleo essencial (OE) de *Pimenta pseudocaryophyllus* foi avaliada em isolados de *Candida* por Assal et al. (2014), utilizando a técnica de microdiluição. Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) variaram de 64 a 256 µg/ml e concentração fungicida mínima (CFM) de 256 a > 1024 µg/ml, demonstrando possuir atividade antifúngica sobre essas leveduras.

Extrato bruto etanólico, fração acetato de etila, cera apicuticular e óleo de amêndoas de *Caryocar brazilienses*, demonstraram atividade antifúngica *in vitro* em 19 isolados *C. neoformans* e 4 *C. gattii*, sendo que 89,5% apresentaram CIM igual ou menor de 1000µg/ml. A cera em concentração correspondente 15,6µg/ml e 250µg/ml inibiu 42,1% e 73,7% do isolados respectivamente (Passos et al. 2002).

Souza et al. (2002) avaliaram a susceptibilidade antifúngica *in vitro* dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* e *Hyptis ovalifolia* em isolados clínicos de dermatófitos. O extrato de *H. ovalifolia* inibiu o crescimento de *M. canis* em CIM entre 15,6 a 250µg/ml, para *M. gypseum* variou de 62,5 a 1000µg/ml, *T. rubrum* 62,5 a 250µg/ml e *T. mentagrophytes* com 250 a 1000 µg/ml. *E. uniflora* demonstrou valores de CIM de

500 a 1000  $\mu\text{g/ml}$  para *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, enquanto para *T. rubrum* a CIM foi 500  $\mu\text{g/ml}$ .

A atividade antifúngica do OE de folhas da *Ocimum gratissimum* foi avaliada em 25 isolados de *C. neoformans* e os resultados obtidos demonstraram que a concentração de 125 $\mu\text{g/ml}$  inibiu o crescimento de 8% dos isolados (Lemos et al. 2005)

Muito pouco se tem descrito sobre a ação de produtos de plantas sobre fatores de virulência dos fungos. Na literatura só há dados relacionados a resultados de extratos de plantas sobre a formação de biofilmes em espécies de *Candida*. Extratos de *Malva sylvestris*, *Myracrodruon urundeuva* e *Psidium guajava* foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes por isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* e demonstraram que todas as 3 espécies de plantas inibiram de forma significativa a formação de biofilmes (Alves et al. 2009).

Dentre os derivados naturais das plantas, os OEs demonstram significativa ação antifúngica, tornando-se uma possível solução para problemas de resistência e efeitos colaterais, podendo ser empregado em associação com os fármacos convencionais, afim de reduzir a dose administrada (Shin & Lin 2004).

#### 1.4.1. Óleos essenciais

Os OEs são naturalmente formados a partir do metabolismo secundário das plantas, constituído por compostos voláteis, possui odor forte e apresenta várias funções biológicas, inclusive na defesa contra microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. São utilizados devido a suas propriedades medicinais como analgésico, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico, anestésico e antimicrobiano (Bakkali et al. 2008). As substâncias derivadas do metabolismo secundário apresentam características farmacológicas devido a presença de compostos fitoquímicos, classificados funcionalmente em grupos, como os terpenos, fenólicos e compostos contendo nitrogênio (Castillo et al 2012).

Vale-Silva et al. (2010) avaliaram o OE de *Thymus viciousi* sobre a espécie *C. neoformans* e em algumas leveduras do gênero *Candida* que foram inibidos em CIM de 0,8  $\mu\text{g/mL}$  e 0,32  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, demonstrando a atividade antifúngica deste óleo. OE de *Lippia sidoides* inibiu o crescimento de algumas espécies de *Candida* (64 a 256 $\mu\text{g/mL}$ ) e também promoveu uma redução da formação da pseudohifa, uma importante característica de virulência desta levedura (Brito et al. 2015).

As literaturas descrevem que os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* possuem atividade antifúngica em leveduras do gênero *Candida* (Kamble 2014) e fungos filamentosos (Shahi et al. 2003) porém ainda não existe relatos utilizando leveduras do gênero *Cryptococcus*.

#### 1.4.2. *Cinnamomum cassia*

O gênero *Cinnamomum* apresenta aproximadamente 250 espécies e entre elas, duas são de maior importância, *C. verlum* que é cultivada no Srilanka e sul da Índia e a *C. cássia* conhecida como *C. aromaticum*, cultivada no Vietnam, Indonésia e China (Figura 15) (Mohandas & Ballal 2011).

*C. cassia* pertencente à família da *Lauracea*, cujo produto comumente utilizado é a canela. Esta planta é extraída a partir da casca interna da planta e é empregada como agente antimicrobiano, aromatizante e no preparo de chás (Mohandas & Ballal 2011; Medagama 2015). Na indústria alimentícia seu uso está relacionado a capacidade de manter e preservar os alimentos. Na medicina popular são conhecidos para o tratamento de artrite, diarreia e disfunções gastrointestinais (Medagama & Bandara 2014).



**Figura 15.** *Cinnamomum cassia* (Fonte: (a)-[www.growsonyou.com](http://www.growsonyou.com) e (b)-[www.eridianbotanicals.com](http://www.eridianbotanicals.com)).

Os principais componentes do OE *C. cassia* são o eugenol, cinnamaldeído (aldeído cinâmico) e taninos, que são os responsáveis pelas atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral (Wickenberg et al. 2014).

Estudos demonstram que o OE desta planta apresenta atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella typhimurium*), fungos filamentosos e leveduras (Ooi et al. 2006).

A atividade antifúngica do OE de *C. cassia* foi demonstrada em 15 isolados de *C. albicans* por Almeida et al. (2012). Através da técnica de microdiluição seriada, obteve resultados de CIM de 64µg/ml para a maioria dos isolados, sugerindo considerável ação contra essas leveduras.

### 1.4.3. *Cymbopogon flexuosus*

O gênero *Cymbopogon* pertence à família *Poaceae* e contém 140 espécies encontradas por todas regiões do mundo e na Índia foram descritas cerca de 45 espécies (Padalia et al. 2011). É encontrada também em regiões de clima tropical e subtropical, espalhadas pela Ásia, África e pelas Américas, especificamente em regiões de solo montanhoso, arenosos e em pastagens (Padalia et al. 2011). Espécie *C. flexuosus* (Figura 16) é uma planta conhecida popularmente como lemongrass (capim limão), lemongrass do leste da Índia, Malabar e Grama (Paranagama et al. 2003).



**Figura 16.** *Cymbopogon. flexuosus* (Fonte: (a)- [www.levypreserve.org](http://www.levypreserve.org) e (b)- [www.mfrural.com.br](http://www.mfrural.com.br)).

Países como a China utilizam as folhas deste vegetal como tempero e na Índia as folhas frescas são colocadas no ambiente para perfumar (Ganjewala 2009) e para

combater fungos patogênicos (Shahi et al. 2003). Na medicina tradicional, o chá das folhas de *C. flexuosus* é utilizado como calmante (Silva et al. 2010).

Das folhas é possível extrair o OE, que é constituído de substâncias como o citral representado por 83,9% de sua concentração e outras em menor quantidade, o geraniol e o neral, pertencentes ao grupo dos terpenos (Singh et al. 1989). Este óleo é altamente rico em aldeído, devido grande presença do citral em sua composição, sendo este originado a partir da conversão do geraniol (Akhila 1985).

A atividade antimicótica de OE de *C. flexuosus* foi observada em estudos realizados por Pandey et al. 2003, para alguns fungos filamentosos como o *Trichophyton mentagrophytes* e *Fusarium oxysporum*. Esta atividade também foi demonstrada através da inibição do crescimento fúngico para algumas espécies como *Alternaria alternata*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Helminthosporium* e *Rhizopus Phoma* (Shahi et al. 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

---

As infecções fúngicas tem apresentado importância no quadro de doenças causadas por microrganismos que comprometem a qualidade de vida humana, contribuindo para o aumento dos índices de morbidade e mortalidade.

Entre estas doenças, a criptococose tem demonstrado importância médica, pois esta é caracterizada como uma doença sistêmica, oportunista e com elevado índice letalidade, principalmente quando acomete indivíduos imunocomprometidos, especialmente paciente com SIDA, com doenças subjacentes ou submetidos a terapia imunossupressora (Chen et al. 2008; Srikanta et al. 2014). Estima-se que no mundo existem aproximadamente 1 milhão de casos anualmente, e mais de 600000 mortes causadas pelo agravamento da doença (Park 2009), em consequência aos mecanismos de virulência das espécies do complexo *C. neoformans*.

O tratamento é realizado com fármacos comercialmente disponíveis, porém a sua utilização apresenta elevada toxicidade, proporcionando mal-estar nos pacientes, que associado ao alto custo e desenvolvimento de resistência por alguns microrganismos, compromete a eficácia e a continuidade da terapêutica (Saag et al. 2000)

Na natureza existem espécies de plantas que apresentam propriedades medicinais e são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de doenças. A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias em extratos e OEs de plantas tem demonstrado atividade antifúngica. Estes compostos apresentam uma baixa toxicidade quando utilizados em concentrações adequadas e proporcionam o mínimo de efeitos colaterais (Chao et al. 2000; Sousa et al. 2008). O estudo da atividade antifúngica destes OEs, associado à pesquisa de uma possível interferência sobre a produção dos fatores de virulência, poderão fundamentar em alternativa para um tratamento eficaz e com menos riscos de efeitos colaterais, possibilitando melhor aceitabilidade pelos pacientes.

Diante disso, neste trabalho foi analisado a atividade biológica dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* em espécies do complexo *C. neoformans*, com o objetivo de avaliar a ação antifúngica e sua ação sobre os fatores de virulência destes fungos.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. Geral**

Avaliar ação OEs de *Cinnamomum cassia* e *Cymbopogon flexuosus* na suscetibilidade e fatores de virulência de isolados do complexo *Cryptococcus neoformans*.

#### **3.2. Específico**

1. Determinar a suscetibilidade *in vitro* de isolados do complexo *C. neoformans* através da determinação da CIM, CFM e cinética de crescimento sob a ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*.

2. Avaliar a ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* sobre produção fatores de virulência como cápsula polissacarídica, melanina e enzimas urease, fosfolipase, proteinase, hemolisinas e DNase pelos isolados do complexo *C. neoformans*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1. Microrganismos**

Os estudos foram realizados utilizando 18 isolados do complexo *C. neoformans* de origem clínica, pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia do IPTSP/UFG. Todos os isolados foram obtidos de líquido de pacientes com SIDA de um hospital de referência, localizado na cidade de Goiânia-Goiás (comitê de ética protocolo nº 004/3 - anexo 1). *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 24065 foram utilizadas como controle. Todas as amostras biológicas foram armazenadas em tubos contendo Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e mantidos a -15°C, até o uso. Os isolados foram subcultivados em ASD para a realização dos testes.

### **4.2 Óleos essenciais**

Os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Limitada, Vargem Grande, São Paulo (Anexos 2 e 3). Foram armazenados na temperatura - 4°C a fim de manter a integridade estrutural e conservar todos os compostos fitoquímicos.

#### **4.2.1. Processamento dos óleos essenciais**

Os OEs foram solubilizados em dimetilssulfoxido 0,1% (DMSO) e diluídos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma, EUA), com glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponados a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). A concentração final da solução mãe foi de 20000 µg/mL dos OEs e a solução inicial utilizada nos testes foi 2048 µg/mL.

### **4.3. Antifúngicos**

Os antifúngicos AmB (Squibb, USA) e FLC (Pfizer, USA) foram utilizados para avaliar a suscetibilidade *in vitro* das amostras do complexo *C. neoformans*. Foram preparados de forma a obter concentrações iniciais de 32 µg/mL e 64 µg/mL para AmB e FLC respectivamente.

#### **4.4. Inóculo**

Os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* cultivados por 72 horas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) foram utilizados para a realização dos testes de suscetibilidade. Foram diluídas em solução salina 0,85%, ajustadas em espectrofotômetro a 530nm e 85% de transmitância. Posteriormente foram realizadas duas diluições de 1:50 e 1:20 em meio de RPMI para se obter a concentração final de  $1 \cdot 5 \times 10^6$  UFC/mL, correspondente à escala de 0,5 McFarland (CLSI 2008 & 2012). Este inóculo foi utilizado no período máximo de 15 minutos em temperatura ambiente, devido a manutenção da viabilidade das leveduras.

#### **4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Foi realizado de acordo com os protocolos M27-A2, M27-A3 e M27-S4 do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (CLSI 2002; 2008; 2012). Na primeira coluna das placas de microtitulação, contendo 96 poços, foi distribuído 200 µL do OE de *C. cassia*, *C. flexuosus*, FLC, ou da AmB, de acordo com o ensaio realizado.

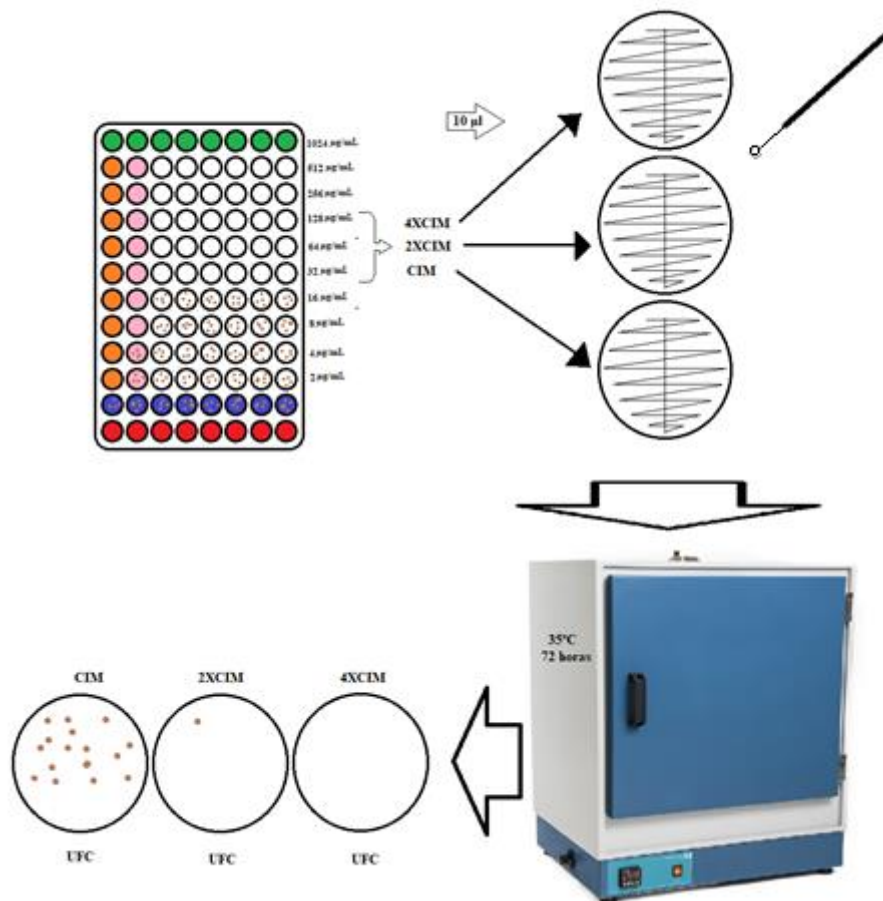
A partir da segunda até a 12ª colunas foram adicionados 100 µL de caldo RPMI em cada orifício, e em seguida realizada a diluição seriada ao dobro. Do inóculo previamente preparado (item), 100 µL foram colocados em cada orifício. Como controle foi avaliado o FLC em *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (figura 17). As placas foram incubadas a 35°C por 72 horas. A leitura dos resultados permitiu a determinação da CIM, que foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível da levedura.



**Figura 17.** Placa de microdiluição em caldo para avaliar a suscetibilidade *in-vitro* de isolados do complexo *C.neoformans* aos OEs de *C.cassia* e *C.flexuosus*.

#### 4.6. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM foi determinada a partir do teste de microdiluição em caldo onde se obteve a CIM. Foram retirados 10 µL de cada poço contendo o correspondente a CIM, 2XCIM, 4XCIM e semeados em placas de Petri contendo meio de cultura ASD. Após incubação a 35°C por 72 horas, foi realizada a contagem de colônias formadas (figura 18). A CFM foi considerada a menor concentração do OE que inibiu o crescimento total do fungo, representando a morte de mais de 99% do microrganismo (Logu et al. 2005;Lubian et al. 2010).



**Figura 18.** Esquema do ensaio para determinar a CFM de isolados de *C. neoformans* sob ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*.

#### 4.7. Cinética de crescimento (Curva de morte)

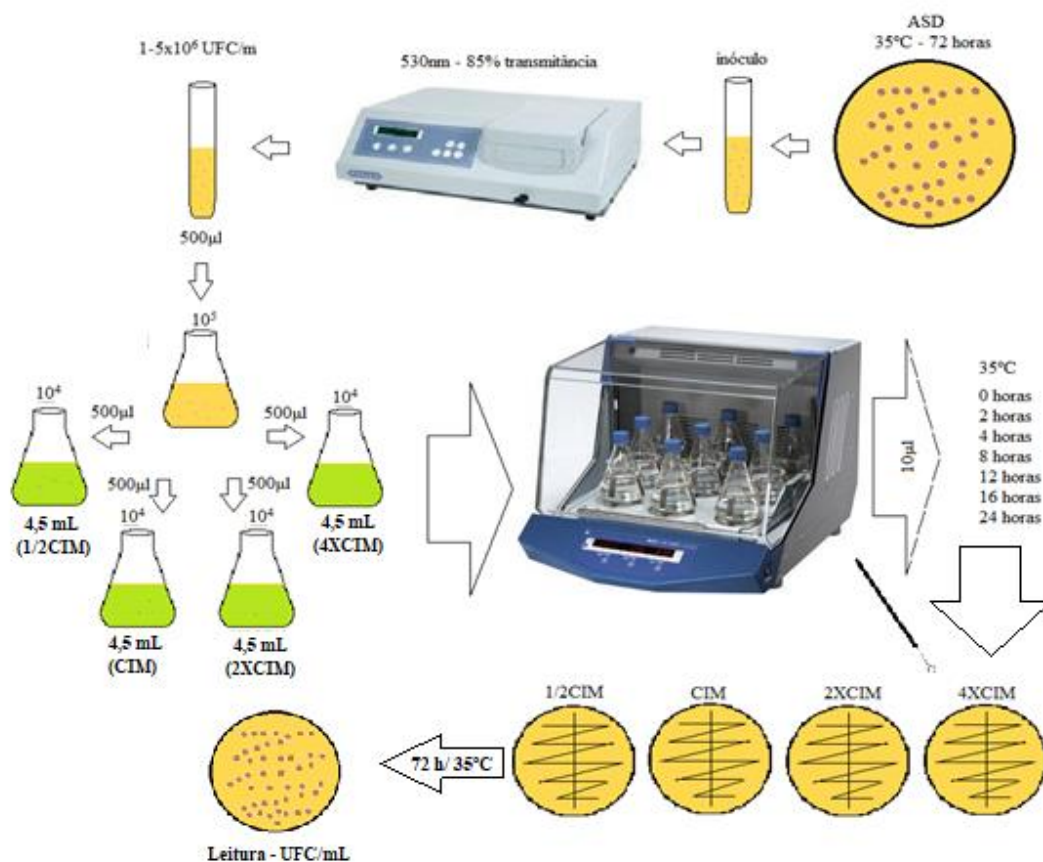
A avaliação da cinética de crescimento se baseia na contagem das colônias viáveis de *C. neoformans* na presença do composto e em diversos intervalos de tempo.

Para realizar o ensaio foi utilizado isolados repicados em ASD e incubadas em temperatura ambiente por 72 horas, a fim de obter leveduras com crescimento recente e viáveis. O inóculo foi preparado em solução salina a 0,85% e ajustando em transmitância de 85% por espectrofotometria a 530 nm, correspondendo a  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente foram realizadas diluições em CSD para se obter uma concentração de células correspondentes a  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL (Klepser et al. 1997 & 1998).

Do inóculo preparado, 500 µL foi adicionado em 4,5 mL da solução de OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* diluídos em CSD nas concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$  CIM,

CIM, 2XCIM e 4XCIM, resultando em uma concentração final de  $1-5 \times 10^4$ . A incubação foi realizada à  $35^\circ\text{C}$  sob agitação (200rpm) e nos intervalos de 0h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h foi retirado  $10\mu\text{l}$  desses meios e inoculado em placas contendo ASD. Após 72 horas de incubação a  $35^\circ\text{C}$ , foi realizado a contagem de UFC/mL (Figura 19).

Utilizou-se como controle negativo o CSD e positivo CSD contendo FLC/AmB em suas respectivas CIMs. Este ensaio foi realizado em duplicata e a média da contagem de colônias de cada diluição, nos diferentes tempos, foi inserida em um gráfico de log por UFC/mL, para a análise dos resultados obtidos (Leite et al. 2007).



**Figura 19.** Esquema para avaliar a cinética de crescimento das leveduras de *C. neoformans* sob ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*

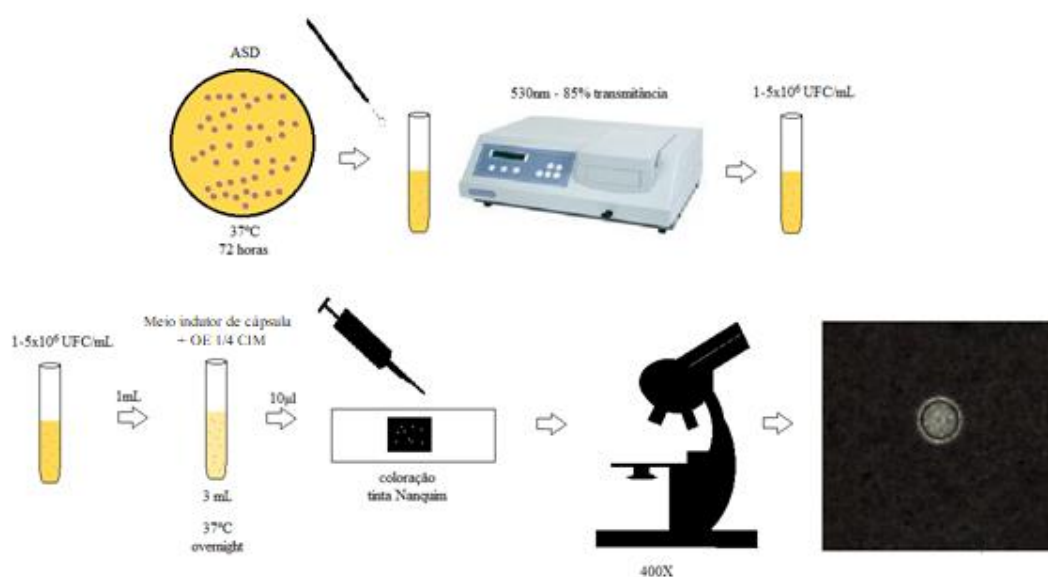
#### 4.8. Ação dos OEs sobre os fatores de virulência

##### 4.8.1. Produção de cápsula de polissacarídica

A produção da cápsula foi realizada a partir da inoculação de isolados de *C. neoformans* em meio indutor (1,5 g de glicose, 0,5 g peptona, 0,25 g extrato de

levedura, 0,5 g de ágar e 50 mL de água destilada), diluído na proporção 1:10 de CSD em tampão ácido morfolinopropanosulfônico 50mM (MOPS) (Sigma, EUA). A solução de MOPS foi preparada utilizando 2,09 g em 180 mL de água destilada, pH 7,3 e esterilizado em membrana de 0,22µm (Milipore, EUA). A este meio foi adicionado OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* em concentrações correspondentes a ¼ CIM (Zaragoza & Casadevall, 2004). Neste meio, a um volume de 3mL foi colocado 1 mL de suspensão de *C. neoformans* ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) e incubados em 37C° por 24 h.

Para verificar a ação dos OEs sobre a produção de cápsula, foi preparado uma lâmina com coloração de tinta Nanquim, para medir os diâmetros total com e sem cápsula das leveduras (100 células). Utilizou-se o microscópio Leica ICC50HD em objetiva de 400X e as medidas dos diâmetros foram fornecidas pelo software LAZ EZ (Leica, EUA). O tamanho da cápsula foi calculado a partir da diferença entre o diâmetro total da célula e o das leveduras sem cápsula (Figura 20).



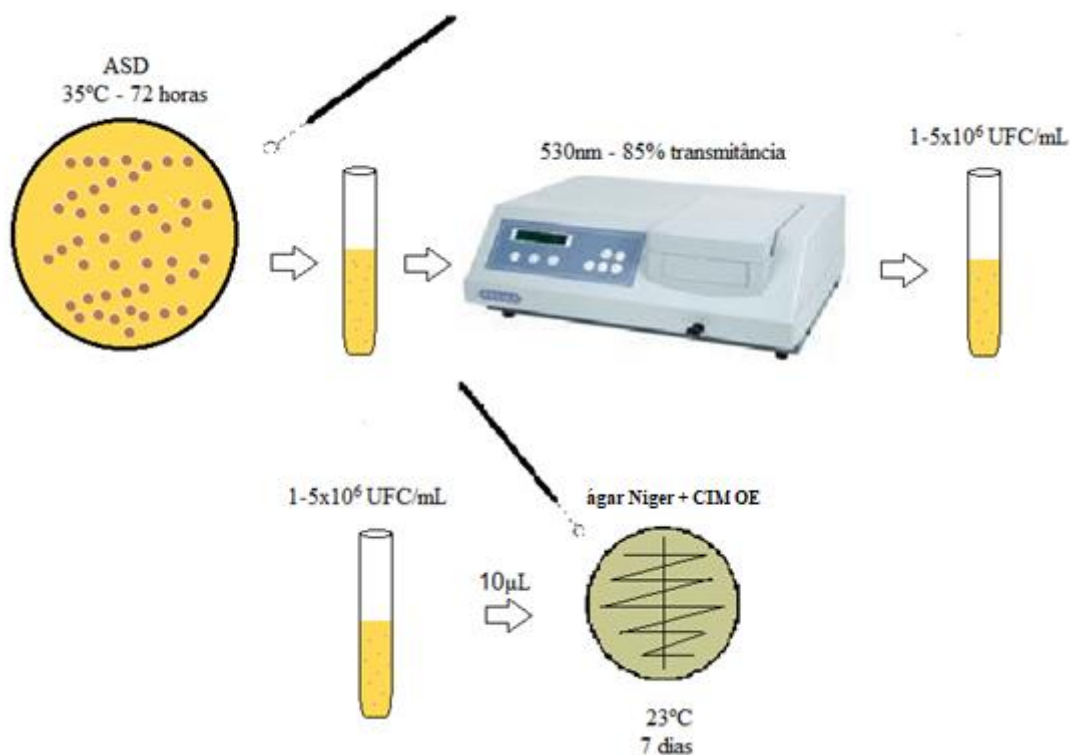
**Figura 20.** Esquema do ensaio para avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* sobre o diâmetro da cápsula de isolados do complexo *C. neoformans*.

#### 4.8.2. Síntese de Melanina

A avaliação da produção de melanina foi realizada de acordo Paliwal & Randhawa (1978) utilizando o meio de cultura ágar niger (50g de sementes de *Guizotia abyssinica*, 1g de glicose, 1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g creatinina, 15g de ágar e 1000mL de água destilada). A este meio foi adicionados os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*

correspondentes a CIM. ASD e ágar niger sem OE foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente.

Uma suspensão de  $1-5 \times 10^6$  dos isolados de *C. neoformans*/*C. gattii* foram inoculados na superfície do ágar niger (Figura 21) e as placas foram incubadas em temperatura ambiente pelo período de até 7 dias. A leitura realizada pela observação da formação de colônias com pigmentação escura, comparados aos controles.



**Figura 21.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de melanina por isolados do complexo *C. neoformans*.

### 4.8.3. Avaliação da atividade da fosfolipase

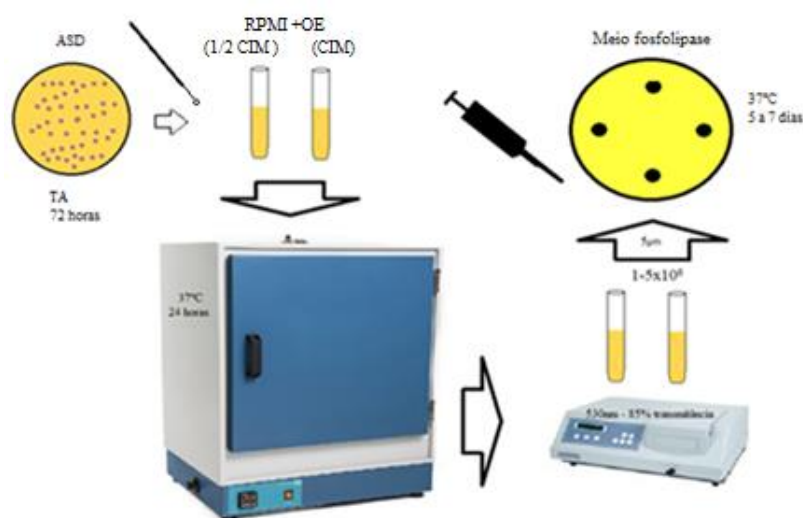
#### 4.8.3.1. Inóculo

O inóculo foi preparado segundo método de Budzyńska et al. (2014) com modificações. Isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram previamente semeados em ASD por 72 horas. Em seguida foram subcultivados em RPMI contendo concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$  CIM e CIM de cada OE (*C. cassia* e *C. flexuosus*) incubados a 37°C por 24 horas. Após este procedimento, as soluções foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS) (8,8 g de NaCl; 0,991 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,27g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

#### 4.8.4. Produção da fosfolipase

A detecção da atividade de fosfolipase foi realizada segundo Price et al. (1982) com modificações. O meio de cultura constituído de 10,0g de peptona, 20,0g de glicose, 53,30g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio, 20,0g de ágar e 1000ml de água destilada foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em temperatura aproximada de 50°C foi adicionado 10% emulsão de ovo, homogeneizado e distribuídos em placas de Petri.

Na superfície das placas contendo meio de fosfolipase, foram colocados de forma equidistantes discos de papel filtro esterilizados e alíquotas de 5µl do inóculo ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) foram colocadas nos discos. Controle negativo e positivo foi utilizado isolados de *C. neoformans* não tratados e *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizada como controle positivo (Figura 22). A leitura foi realizada após incubação por 5 a 7 dias a temperatura de 37°C, e a formação de um halo de precipitação ao redor dos discos indicou atividade de fosfolipase. Foram medidos o diâmetro da colônia (Dc) e o diâmetro da colônia mais o halo de precipitação total (Dcp).



**Figura 22.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de fosfolipase por isolados do complexo *C. neoformans*.

Os resultados da atividade da fosfolipase (Pz) foram obtidos através do seguinte cálculo:

$$Pz = Dc/Dc + Dcp$$

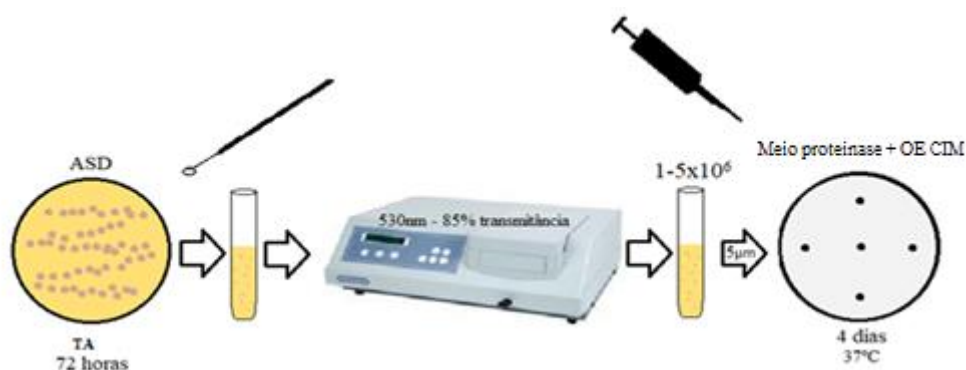
Os isolados foram classificados de acordo com resultados dos valores de atividade da fosfolipase (Pz) onde:

- Pz = 1 sem atividade
- Pz < 1 e  $\geq 0,64$  atividade positiva
- Pz < 0,64 atividade fortemente positiva

#### 4.8.5. Produção de Proteinase

Avaliação da atividade da proteinase dos isolados foi realizada por meio da técnica de Ruchel et al. (1982). O meio de albumina bovina, constituído de 11,7 de ágar Yeast Carbon Base (YCB) (Difco, EUA), 2,0g de albumina bovina (BSA), fração V, (Sigma, EUA), 2,5 mL de complexo de vitaminas Protovit (Bayer, UE) e 100mL de água destilada, foi preparado e filtrado em membrana 0,22 $\mu$ m. Este meio, mais os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* nas respectivas CIMs, foram adicionados ao meio base (18,0g de ágar dissolvido em 900ml de água destilada) esterilizado, resfriado a 50°C e distribuídos em placas de Petri.

Em cada placa foram distribuídos de forma equidistantes discos de papel de filtro esterilizados e 5 $\mu$ l do inóculo ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) foi aplicado em cada disco. Controle negativo foi realizado com isolados de *C. neoformans* não tratados e *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizado como controle positivo (Figura 23).



**Figura 23.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de proteinase por isolados do complexo *C. neoformans*.

Após incubação a 37°C por 4 dias, a atividade de proteinase (Pz) foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia. Os halos foram medidos sendo Dc, o diâmetro da colônia e Dcp o diâmetro total da colônia e o halo de precipitação.

$$Pz = Dc/Dc + Dcp$$

Os isolados foram classificados segundo Price et al. (1982) de acordo com resultados dos valores de Pz onde:

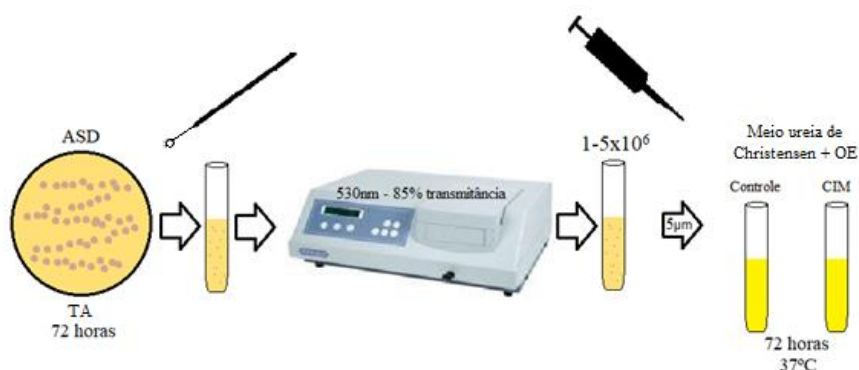
- Pz = 1 sem atividade
- Pz < 1 e  $\geq 0,64$  atividade positiva
- Pz < 0,64 atividade fortemente positiva

#### 4.8.6. Produção de Urease

A atividade da urease foi avaliada utilizando o ágar ureia de Christensen (95% de ágar base e 5% de solução de uréia a 40%), de acordo com Gomes et al. (2010). Ao meio foram adicionados os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*, nas concentrações correspondentes a CIM.

A ação da urease foi avaliada a partir da inoculação de 10 $\mu$ l das amostras de *C. neoformans* em (1-5x10<sup>6</sup> UFC/mL) na superfície do meio de cultura e incubados por 72 horas a 37°C. Controle negativo foi realizado com isolados de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. neoformans* não tratados e foi utilizado como controle positivo (Figura 24).

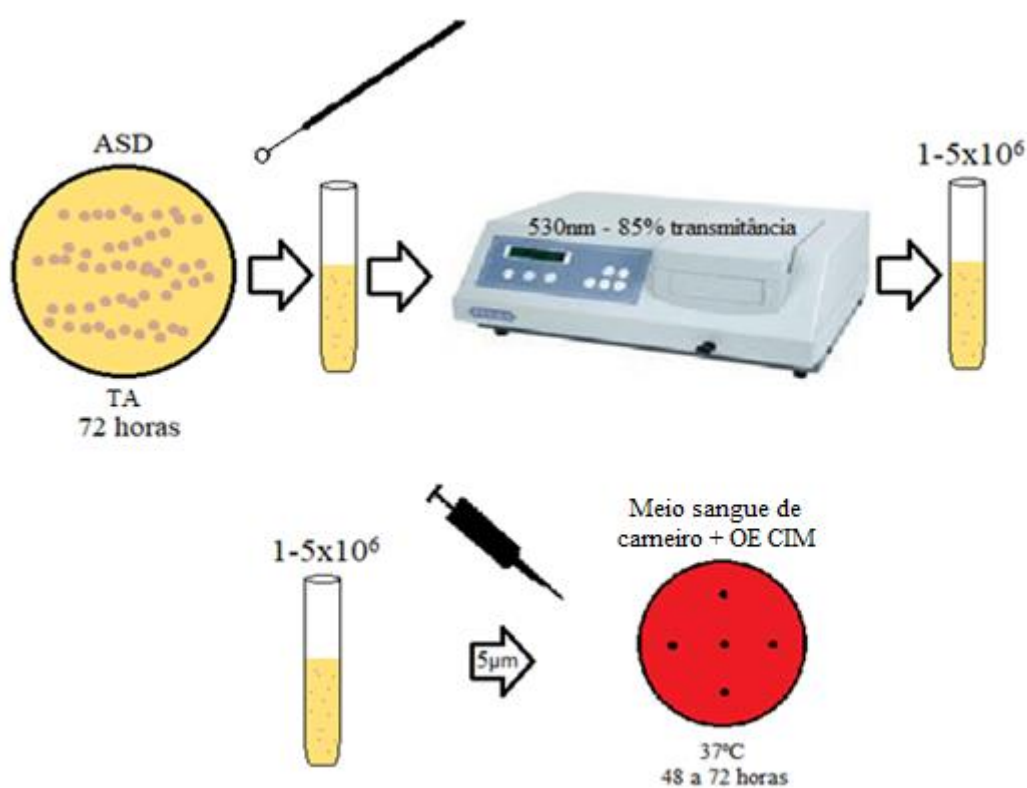
A atividade enzimática foi observada a partir da mudança pH em consequência da degradação da uréia e formação de amônia, alcalinizando o meio de cultura, modificando a cor inicial amarela para rosa pink (Singh et al. 2013).



**Figura 24.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de urease por isolados do complexo *C. neoformans*.

#### 4.8.7. Atividade de hemolisinas

A detecção da ação de enzimas hemolíticas dos isolados do complexo *C. neoformans* foi realizado segundo a técnica de Luo et al (2001). Cada amostra foi inoculada na superfície do meio de cultura contendo ASD com 3% de glicose, adicionado de 7% de sangue de carneiro desfibrilado, pH 5,6 com os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* nas concentrações correspondente a CIM. Para controle positivo foi utilizado *C. albicans* ATCC 90028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 11522, e como controle negativo com *S. epidermidis* ATCC 14990. A leitura dos resultados foi realizada após incubação a 37°C por 48 a 72 horas (Figura 25).



**Figura 25.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de hemolisina por isolados do complexo *C. neoformans*.

A atividade hemolítica foi observada pela presença de halo de hemólise ao redor das colônias. Halo transparente corresponde à hemólise total ou beta hemólise, a hemólise parcial leva a formação de um halo de coloração esverdeado e determina alfa hemólise e ausência de halo, gama hemólise. Os halos formados foram medidos e o fator hemolítico foi calculado utilizando a razão entre o diâmetro total da colônia (halo de hemólise) e diâmetro da colônia.

$$\text{Hemólise} = Dc/Dc + Dcp$$

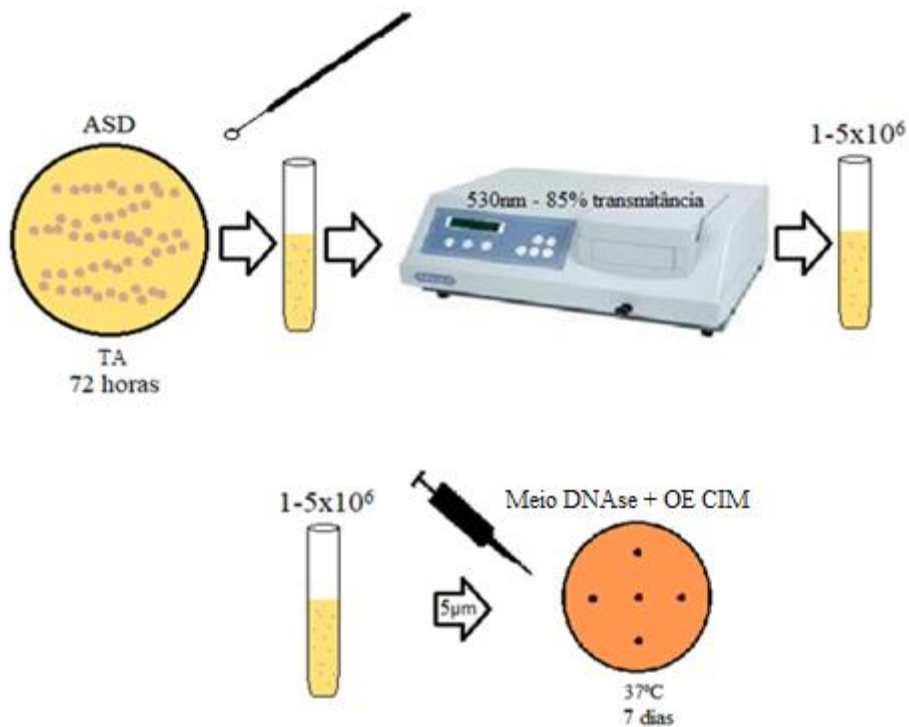
- Pz = 1 sem atividade
- Pz < 1 e  $\geq 0,64$  atividade positiva
- Pz < 0,64 atividade fortemente positiva

#### 4.8.8. Produção de Dnase

O meio de DNase é usado para detectar a degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA), presente no meio de cultura pelo *C. neoformans*, que possui esta enzima, a desoxirribonuclease, responsável pela reação. A enzima quebra o DNA em subunidades compostas de nucleotídeos, que é visualizada com ácido clorídrico (HCl) que provoca a precipitação do DNA polimerizado, tornando o meio opaco. Uma zona transparente em volta da área de crescimento indica a degradação do DNA. Se o isolado não produzir DNase, o HCl reagirá com o ácido nucleico intacto, formando um precipitado (Weckman & Catlin et al. 1957; Fusillo & Weiss 1959).

O ensaio para avaliar a produção de Dnase em isolados de *C. neoformans* foi realizada no meio ágar Dnase (Merk, Alemanha) (triton 2%, cloreto de sódio 0,5%, ácido desoxirribonucleico 0,2% e ágar 1,5%). O meio de cultura foi hidratado na proporção de 42g/L, conforme indicado pelo fabricante e após a esterilização foi resfriado e adicionado os OEs na CIM. Foi distribuído 10 $\mu$ L do inóculo ( $1-5 \times 10^6$ ) em discos de papel filtro dispersos de forma equidistante no meio e incubados a 35°C por 7 dias (Figura 26).

Para a leitura dos resultados, uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1N foi adicionado, recobrando a toda superfície do meio e após 1 minuto foi observado a formação de uma zona transparente ao redor da colônia, indicando reação positiva devido ação da DNase.



**Figura 26.** Esquema da avaliação da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de DNase por isolados do complexo *C. neoformans*.

#### 4.8.9. Análise estatística

Para análise estatística os dados deste estudo foram processados utilizando o software Graph Prism 5.01 (San Diego, CA, EUA), expressos em média e desvio padrão. Os valores obtidos em cada grupo foram analisados pelos testes de análise de variância ANOVA (dados paramétricos), Mann-Whitney (não paramétricos) e pós teste o Tukey. Foi estabelecido como parâmetro de resultados significativos o  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinação da CIM e CFM

Para os 20 isolados do complexo *C. neoformans*, incluindo as cepas *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 24065, o OE de *C. cassia* apresentou valores de CIMs que variaram entre 8 a 64 µg/mL. Os resultados demonstraram que a concentração de 16µg/ml inibiu 53,8% dos isolados, enquanto a concentração de 32 µg/ml exerceu a atividade inibitória para 69,2% dos isolados.

Para *C. gattii* a CIM ≤ 16 µg/mL inibiu 66,6% os isolados avaliados e 50% destes apresentaram CFM de 32 µg/ml do OE de *C. cassia*. Estes resultados estão apresentados na (Tabela 3). De acordo estes dados a CIM<sub>50</sub> foi de 16 µg/mL e para CIM<sub>90</sub> foi observado a concentração de 32µg/mL.

A avaliação da atividade antifúngica do OE de *C. flexuosus* em 13 isolados de *C. neoformans* mostrou CIMs entre 64 e 256 µg/mL, onde 53,8% apresentou 16 µg/ml. As CFMs variaram entre 128 e 512 µg mL, demonstrando que 46,1% dos isolados de *C. neoformans* foram inibidos em 256 µg/mL. Para 6 isolados de *C. gattii* observou-se CIMs entre 16 e 128 µg/ml, sendo que 66,6% foram inibidos a 128 µg/mL e os dados obtidos para CFMs mostraram que na concentração de 128 µg/mL, não se observou crescimento em 50% dos isolados. Os valores da CIM<sub>50</sub> foi de 128µg/mL e na CIM<sub>90</sub> foi 256µg/mL.

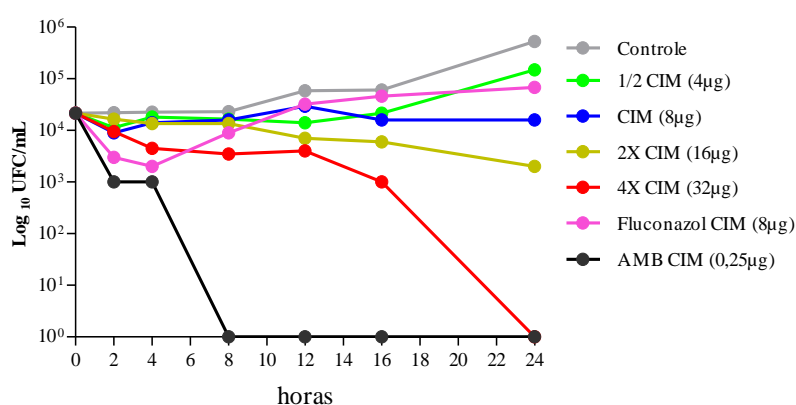
A susceptibilidade dos 20 isolados avaliados juntamente com *C. neoformans* ATCC90112 e *C. gattii* ATCC24065 submetidos aos antifúngicos convencionais, como FLC, apresentaram valores de CIM entre 1 e 8 µg/mL e a AmB com 0,125 a 0,5 µg/ml. Os resultados do controle com *C. parapsilosis* ATCC 22019 se mostraram dentro dos valores de referência, segundo o protocolo CLSI.

**Tabela 3.** Porcentagem de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* inibidos sobre ação de diferentes concentrações dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*

Isolados (%)	<i>C. cassia</i>			<i>C. flexuosus</i>			
	CIM (µg/mL)	isolados (%)	CFM (µg/mL)	Isolados (%)	CIM (µg/mL)	isolados (%)	CFM (µg/mL)
50	16	55	32	55	128	40	256
35	32	40	64	25	256	35	128
10	64	5	16	15	64	20	512
5	8			5	16	5	32

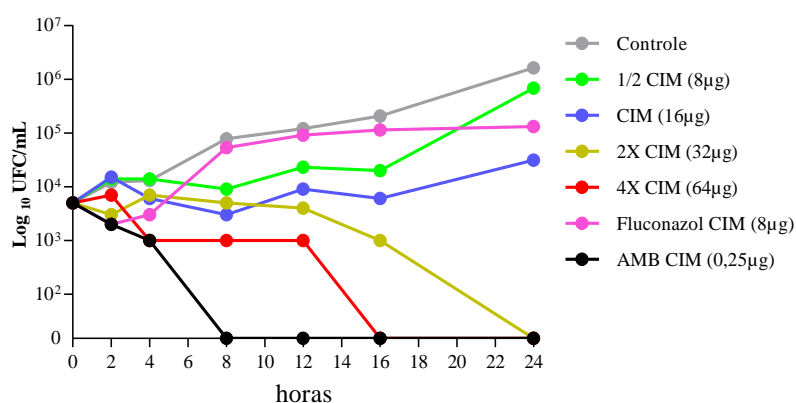
## 5.2. Cinética de crescimento (Curva de morte)

A avaliação da cinética de crescimento para a cepa de *C. neoformans* ATCC 90112 submetida a ação do OE de *C. cassia*, nas concentrações correspondentes à 2XCIM e 4XCIM, demonstraram que houve uma redução do crescimento da levedura de acordo ao tempo de exposição ao óleo. Observou-se que na concentração correspondente a 4XCIM não houve crescimento de colônias, após a incubação por 24 horas (Figura 27).



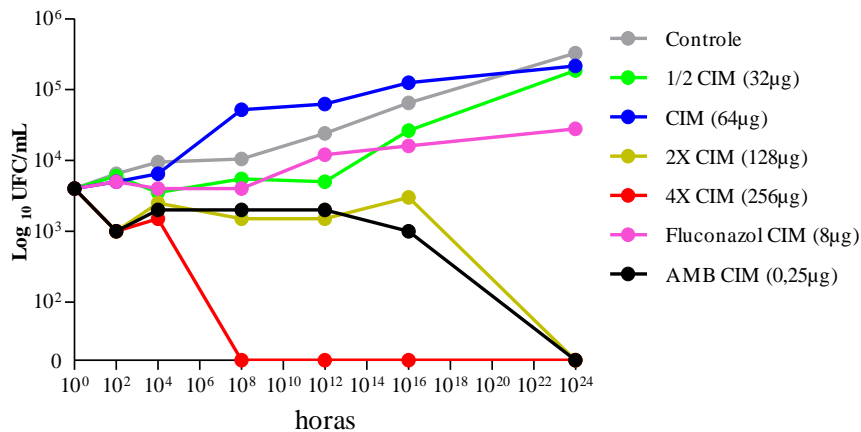
**Figura 27.** Cinética de crescimento de *C. neoformans* sob ação de diferentes concentrações do OE de *C. cassia*

A análise curva de crescimento das leveduras de *C. gattii* ATCC 24065 expostas a ação do OE de *C. cassia* mostrou que houve uma redução na contagem de colônias nas concentrações de 2XCIM e 4XCIM. Não foi observado crescimento de leveduras após 24 horas quando exposta a concentração correspondente a 2XCIM e 16 horas a 4XCIM (Figura 28).



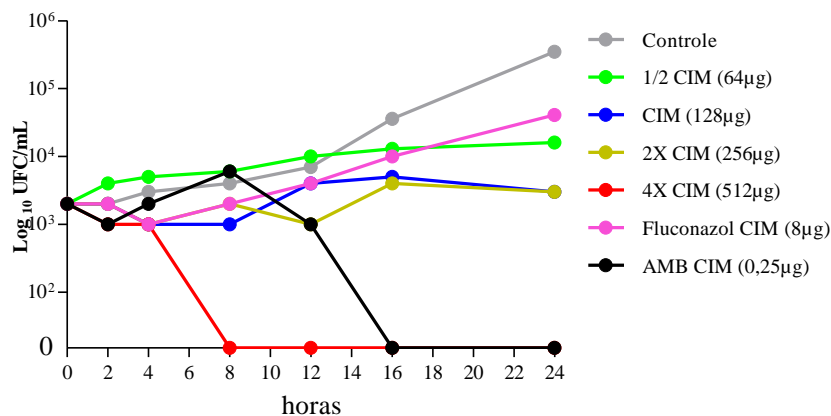
**Figura 28.** Cinética de crescimento de *C. gattii* ATCC 24065 após ação de diferentes concentrações do OE de *C. cassia*.

A ação do OE de *C. flexuosus* sob o crescimento em leveduras de *C. neoformans* ATCC 90112 demonstraram que houve uma diminuição na contagem de colônias nas concentrações de 2 X CIM e 4 X CIM. Em uma concentração correspondente a 2 X CIM após 20 h, não se observou o crescimento de colônias, o mesmo ocorrendo após 6 horas submetidas à 4 X CIM (Figura 29).



**Figura 29.** Cinética de crescimento de *C. neoformans* sob diversas concentrações do OE de *C. flexuosus*.

Ação da *C. flexuosus* sob o crescimento da cepa de *C. gattii* ATCC 24065 demonstrou que 8 horas de exposição inibiu o crescimento total na concentração de 4XCIM. Quando submetido à concentrações inferiores, não houve inibição o crescimento do fungo (Figura 30).



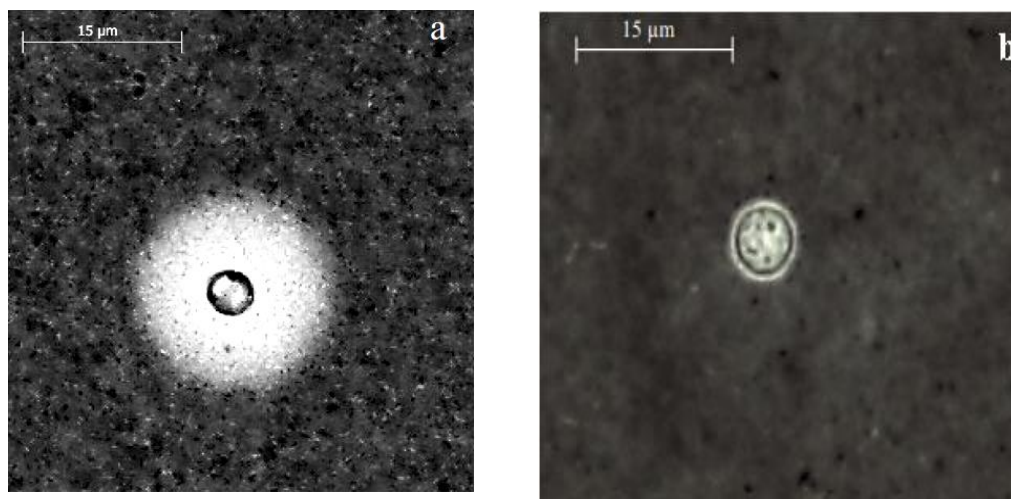
**Figura 30.** Cinética de crescimento de *C. gattii* sob ação do OE de *C. flexuosus*

### 5.3. Avaliação dos fatores de virulência sob ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*

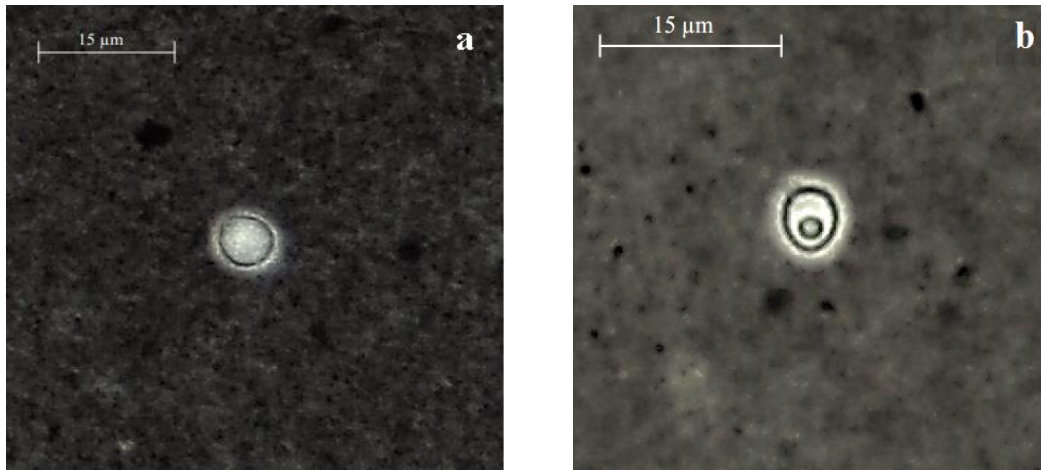
#### 5.3.1. Cápsula polissacarídica

Os resultados da ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na avaliação do de cápsula produzida por *C. neoformans*, demonstraram que na concentração de  $\frac{1}{4}$  CIM, a média dos diâmetros foi 5,38  $\mu\text{m}$  e 5,29  $\mu\text{m}$  respectivamente. No controle positivo contendo o meio indutor de cápsula, o diâmetro foi 10,30 $\mu\text{m}$ , no controle negativo, com CSD foi 4,72 $\mu\text{m}$ . A ação dos antifúngicos AmB o diâmetro da cápsula produzida foi 2,83 $\mu\text{m}$  e para o FLC 2,93 $\mu\text{m}$ .

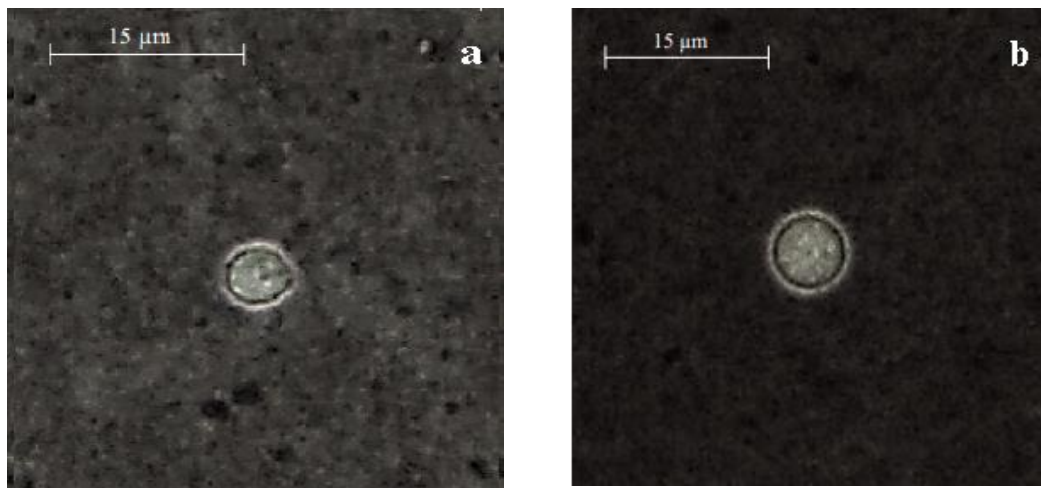
As figuras 31 a 33 mostram as cápsulas formadas por *C. neoformans* expostas a ação dos antifúngicos, dos OEs das plantas avaliadas e dos antitúngicos.



**Figura 31.** Cápsula formada por *C. neoformans* (L2) em: (a) - meio indutor (controle positivo) e (b) - CSD (controle negativo) em tinta da nanquim (400X).

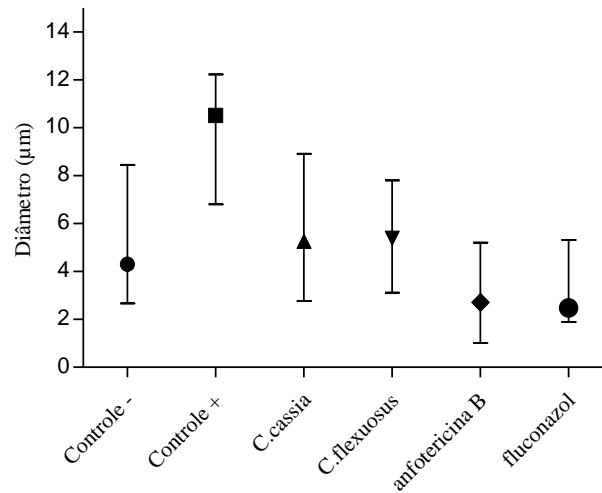


**Figura 32.** Cápsula formada pelo isolado L2 de *C. neoformans* após exposição aos: (a) - OEs de *C. cassia* e (b) - *C. flexuosus* (b) em tinta da nanquim (400X).



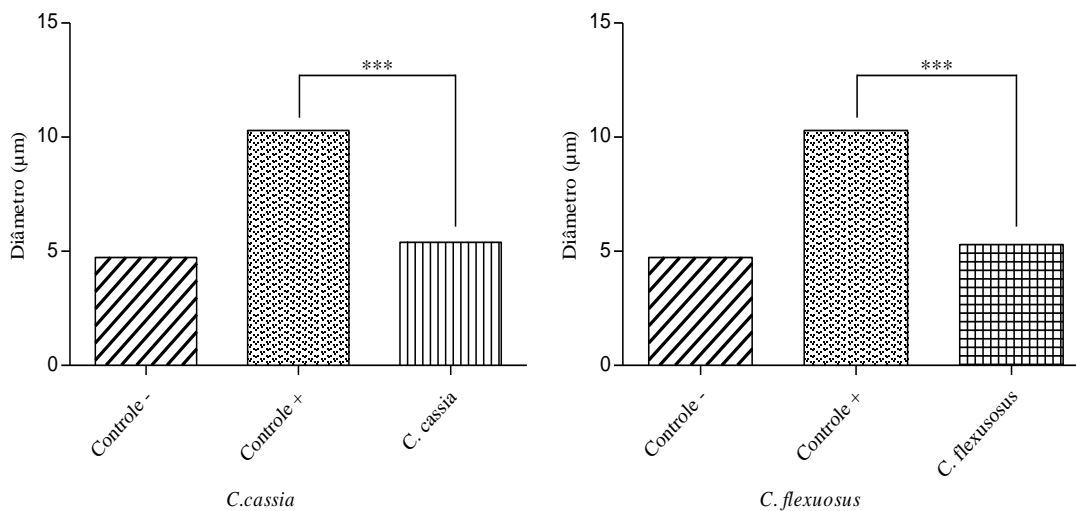
**Figura 33.** Cápsula formada pelo isolado L2 de *C. neoformans* após exposição à: (a) - AmB e (b) - FLC (b) em tinta da nanquim (400X).

A média dos resultados para diâmetro da cápsula dos isolados de *C. neoformans* após ação de  $\frac{1}{4}$  CIM do OE de *C. cassia*, demonstrou que os valores variaram de 2,76 a 8,92  $\mu\text{m}$  e para *C. flexuosus* de 3,11 a 7,80  $\mu\text{m}$ . A média dos resultados estão apresentados na figura 34.



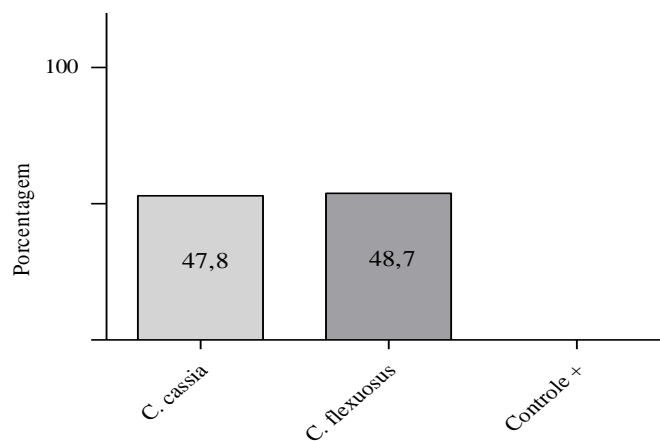
**Figura 34.** Média dos diâmetros das cápsulas produzidas por isolados do complexo *C. neoformans* após ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*, AmB e FLC. Controle positivo (meio indutor) e controle negativo (CSD).

A comparação dos valores obtidos das médias das cápsulas de *C. neoformans* submetidas a ação de *C. cassia* e *C. flexuosus*, demonstraram que houve uma redução significativa no diâmetro em comparação com o controle positivo ( $p < 0,0001$ ) (Figura 35).



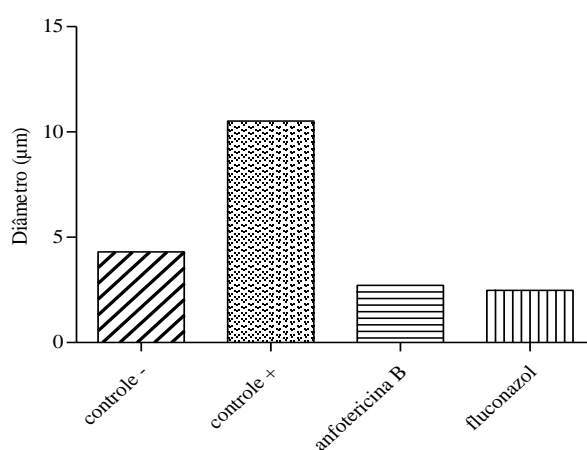
**Figura 35.** Comparação dos resultados do diâmetro da cápsula de *C. neoformans* expostas aos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*, com o controle positivo (meio indutor) (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ).

Os resultados de tamanho da cápsula após a ação dos OEs, em relação ao controle positivo (100%), mostraram que houve uma redução de 47,8% para *C. cassia* ( $p < 0,0001$ ) e 48,7% em *C. flexuosus* ( $p < 0,0001$ ) (Figura 36).



**Figura 36.** Porcentagem de redução da cápsula dos isolados do complexo *C. neoformans* sob ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*, comparados com o controle positivo.

Os isolados de *C. neoformans* após a exposição aos antifúngicos comerciais FLC e AmB demonstraram que o tamanho das cápsulas sofreu redução significativa, ao comparar com o diâmetro do controle positivo ( $p < 0,0001$ ) (Figura 37).



**Figura 37.** Valores dos diâmetros das cápsulas em isolados do complexo *C. neoformans* sob ação de AmB e FLC.

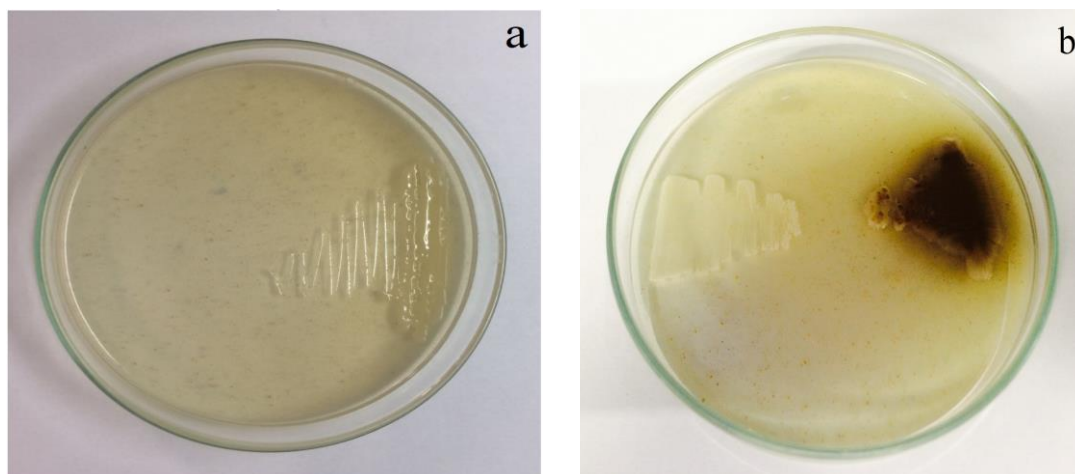
### 5.3.2. Melanina

Os valores obtidos na avaliação da produção de melanina, após exposição ao OE de *C. cassia* em CIM não permitiu que seis isolados realizassem a síntese deste pigmento. Porém o óleo de *C. flexuosus* (CIM) obteve melhores resultados, inibindo a produção em 12/20 dos avaliados. Ao observar a ação da AmB em CIM não permitiu 11 produzissem. Enquanto o FLC (CIM) somente inibiu a melanina em dois isolados. A figura 38 mostra os isolados produtores e não produtores de melanina em ágar (Tabela 4).

**Tabela 4.** Ação dos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na produção de melanina e urease por isolados do complexo *C. neoformans*, após ação do OE na CIM

<i>C. neoformans</i> /CIM µg/ml <sup>(1/2)</sup>	Melanina		Urease	
	<i>C. cassia</i> <sup>1</sup>	<i>C. flexuosus</i> <sup>2</sup>	<i>C. cassia</i> <sup>1</sup>	<i>C. flexuosus</i> <sup>2</sup>
<b>L2</b> (32/128)	-	-	-	-
<b>L3</b> (32/128)	-	-	-	-
<b>L4</b> (32/256)	+	-	+	+
<b>L5</b> (32/128)	+	-	-	+
<b>L7</b> (32/256)	+	-	+	-
<b>L14</b> (32/128)	+	+	-	+
<b>L15</b> (16/256)	+	-	+	+
<b>L18</b> (16/128)	-	+	-	+
<b>L21</b> (16/128)	+	-	+	+
<b>L23</b> (16/128)	+	+	+	+
<b>L24</b> (16/64)	+	+	+	+
<b>L28</b> (16/16)	+	-	-	+
<b>L30</b> (16/64)	+	-	+	+
<b>L41</b> (64/128)	+	+	+	+
<b>ATCC 90112</b> (8/64)	-	+	-	-
<b><i>C. gattii</i></b>				
<b>L1</b> (32/128)	-	-	+	+
<b>L9</b> (32/256)	+	+	+	+
<b>L20</b> (16/128)	+	-	-	-
<b>L48</b> (64/256)	-	-	+	-
<b>ATCC 24065</b> (16/128)	+	+	+	+

n = 20; CIM (concentração inibitória mínima)

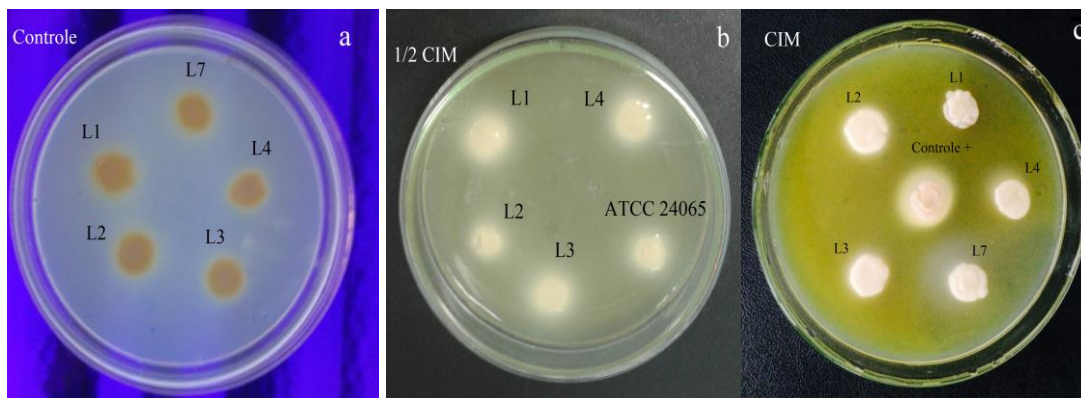


**Figura 38.** Placas das culturas do isolado L28 em ágar niger após 7 dias de incubação sob a ação de 128 ug/mL do OE de *C. flexuosus*, demonstrando – (a) não produtora de melanina e – (b) cepas controle positivo *C. gattii* ATCC24065 e negativo *C. albicans* ATCC 90028.

#### 5.3.4. Fosfolipase

Avaliação da atividade da fosfolipase foi realizada em 20 isolados de espécies do complexo *C. neoformans*, caracterizada pela formação de um halo de precipitação, conforme demonstrado na Figura 40.

Para *C. neoformans*, após exposição em diferentes concentrações do OE de *C. cassia*, observou-se que 85 % dos isolados produziram a enzima na concentração de  $\frac{1}{2}$ CIM (positiva). Além disso 5% foram fortemente positivos e 10% não houve a formação de halos característicos de ação da fosfolipase. Na CIM os resultados foram similares aos obtidos na  $\frac{1}{2}$  CIM. Os resultados estão expressos na tabela 5.



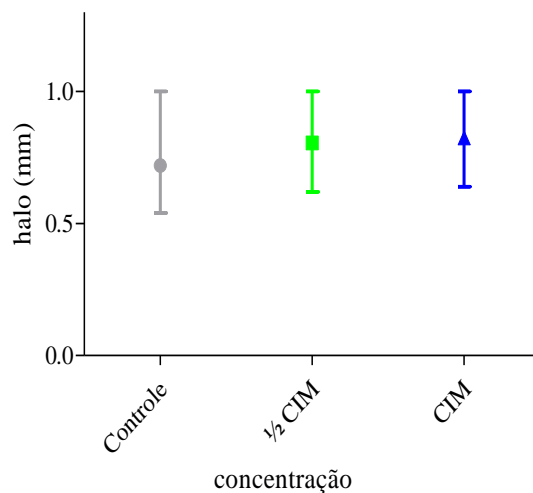
**Figura 40.** Avaliação da atividade de fosfolipase com formação de halos precipitação: (a) – Isolados L1, L2, L3, L4 e L7 sem ação de OEs; (b) – isolados L1, L2, L3, L4 e *C. gattii* ATCC24065 após ação de 1/2CIM de *C. cassia* e (c) – L1, L2, L3, L4 e L7 após a atividade da CIM de *C. cassia*. Controle positivo *C. albicans* ATCC90028 (C+).

**Tabela 5.** Valores de Pz para a avaliação de atividade da fosfolipase de *C. neoformans* após exposição ao OE de *C. cassia*.

<i>C. neoformans</i> /CIM µg/ml <sup>(1/2)</sup>	Controle	1/2 CIM	CIM
L2 (32/128)	0,75	0,85	0,92
L3 (32/128)	0,70	0,71	0,76
L4 (32/256)	0,73	0,85	0,84
L5 (32/128)	0,55	0,66	0,64
L7 (32/256)	0,89	1,00	1,00
L14 (32/128)	0,75	0,81	0,88
L15 (16/256)	0,71	0,62	0,71
L18 (16/128)	0,66	0,68	0,76
L21 (16/128)	0,78	0,64	0,73
L23 (16/128)	0,64	0,64	0,73
L24 (16/64)	0,58	0,73	0,68
L28 (16/16)	0,60	1,00	1,00
L30 (16/64)	0,66	0,80	0,81
L41 (64/128)	0,77	0,82	0,86
ATCC 90112 (8/64)	0,9	0,92	0,91
<b><i>C. gattii</i></b>			
L1 (32/128)	0,93	0,93	1,00
L9 (32/256)	0,54	0,65	0,65
L20 (16/128)	0,55	0,70	0,64
L48 (64/256)	0,85	0,87	0,84
ATCC 24065 (16/128)	0,86	0,86	0,93

n = 20; CIM (concentração inibitória mínima)

A análise da média dos valores de Pz demonstraram que houve uma redução na atividade da enzima fosfolipase nos isolados do complexo *C. neoformans* ( $p=0,0002$ ), expostos a ação do OE de *C. cassia* (Figura 41).



**Figura 41.** Média dos valores de Pz da atividade de fosfolipase em isolados do complexo *C. neoformans* ( $p=0,0002$ ) sob ação do OE de *C. cassia*.

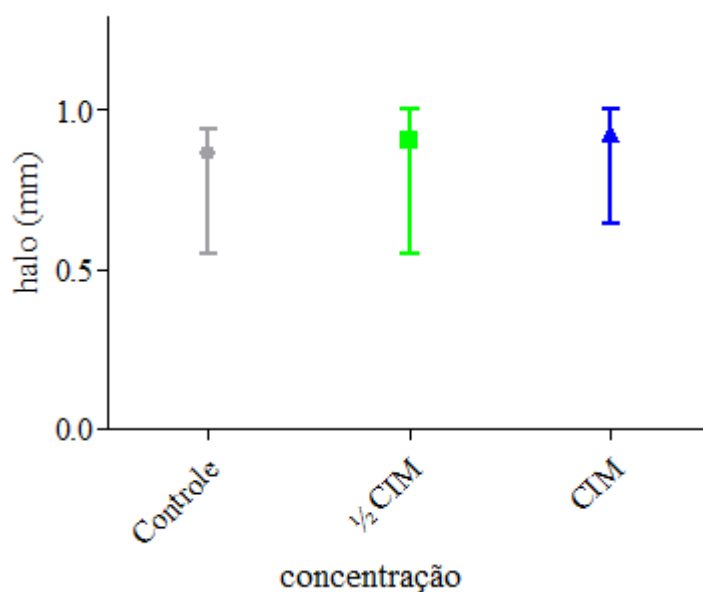
Nos experimentos com os isolados expostos à 1/2 CIM ao OE de *C. flexuosus*, observamos que 90% dos isolados produziram esta enzima, enquanto 10% não apresentaram atividade da fosfolipase. Considerando a CIM 15% dos isolados mostraram ausência de ação enzimática. Estes dados estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Atividade da fosfolipase de *C. neoformans* após exposição ao OE de *C. flexuosus*.

<i>C. neoformans</i> /CIM µg/ml <sup>(1/2)</sup>	Controle	1/2 CIM	CIM
<b>L2 (32/128)</b>	0,92	0,92	0,92
<b>L3 (32/128)</b>	0,81	0,80	0,82
<b>L4 (32/256)</b>	0,94	0,95	1,00
<b>L5 (32/128)</b>	0,65	0,75	0,66
<b>L7 (32/256)</b>	0,87	1,00	1,00
<b>L14 (32/128)</b>	0,90	0,90	0,90
<b>L15 (16/256)</b>	0,80	0,81	0,90
<b>L18 (16/128)</b>	0,93	0,93	0,93
<b>L21 (16/128)</b>	0,81	0,84	0,93
<b>L23 (16/128)</b>	0,91	0,91	0,91
<b>L24 (16/64)</b>	0,84	0,92	0,93
<b>L28 (16/16)</b>	0,91	0,93	0,91
<b>L30 (16/64)</b>	0,55	0,55	0,64
<b>L41 (64/128)</b>	0,60	1,00	1,00
<b>ATCC 90112 (8/64)</b>	0,93	0,92	0,91
<b><i>C. gattii</i></b>			
<b>L1 (32/128)</b>	0,86	0,86	0,93
<b>L9 (32/256)</b>	0,87	0,87	1,00
<b>L20 (16/128)</b>	0,93	0,93	1,00
<b>L48 (64/256)</b>	0,90	0,93	0,93
<b>ATCC 24065 (16/128)</b>	0,77	0,82	0,86

n = 20; CIM (concentração inibitória mínima)

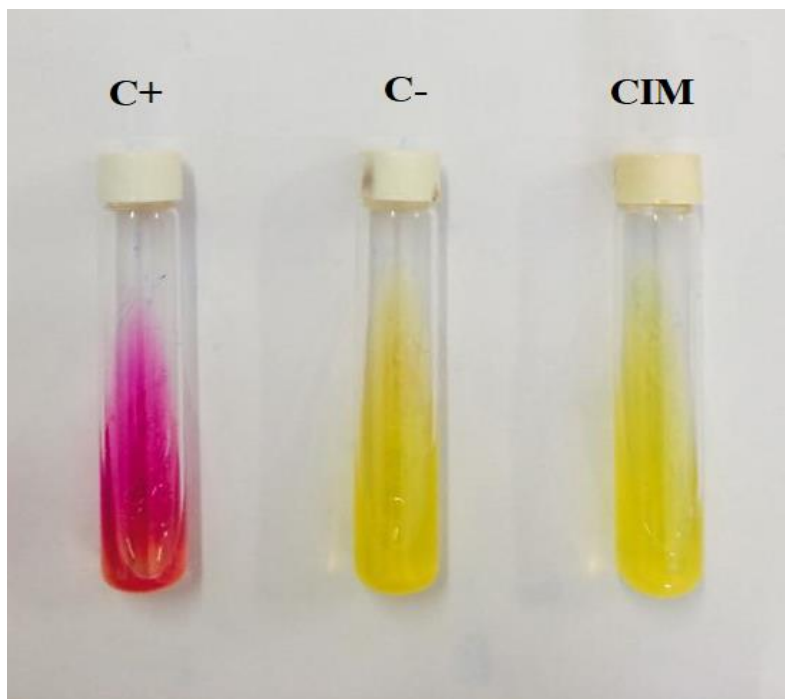
A análise da média dos valores de Pz demonstraram que houve uma redução na atividade da enzima fosfolipase pelos isolados de *C. neoformans* ( $p=0,0005$ ), submetidos a ação do OE de *C. flexuosus* (Figura 42).



**Figura 42.** Média dos valores de Pz da atividade de fosfolipase de isolados do complexo *C. neoformans* ( $p=0,0005$ ) sob ação do OE de *C. flexuosus*.

### 5.3.3. Urease

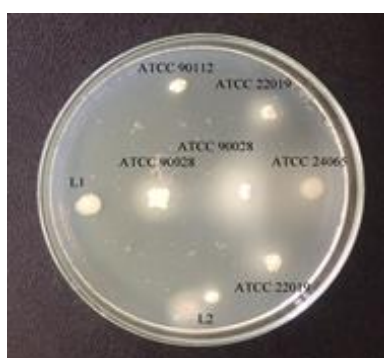
Os resultados obtidos na avaliação da produção de urease demonstraram que os isolados L1, L2, L3, L18, L48 e *C. neoformans* ATCC 90112 não apresentaram a capacidade de produzir esta enzima quando expostos à CIM do OE de *C. cassia* (Figura 39). *C. flexuosus* nesta mesma concentração (CIM) também inibiu a produção da urease em 12/20 isolados avaliados (tabela 4). A análise dos resultados para AmB, observamos que todos os isolados foram urease negativo, ao contrário do FLC em que todos foram positivos.



**Figura 39.** Avaliação da síntese de urease, isolado L15 sob ação da CIM do OE de *C. flexuosus*. (C+): *C. neoformans* ATCC 90112 e (C-): *C. albicans* ATCC 90065

### 5.3.5. Proteinase

As análises dos resultados para avaliar a produção de proteinase pelos isolados de *C. neoformans* mostraram que não houve a produção dos halos característicos de atividade desta enzima. Os resultados de alguns isolados avaliados e dos controles positivos e negativos estão na figura 43.



**Figura 43.** Atividade de proteinase em isolados do complexo *C. neoformans* L1, L2, L3, L4; controle positivo *C. parapsilosis* ATCC 22019/*C. albicans* ATCC 90028 e controle negativo *C. neoformans* 90112/*C. gattii* 24065.

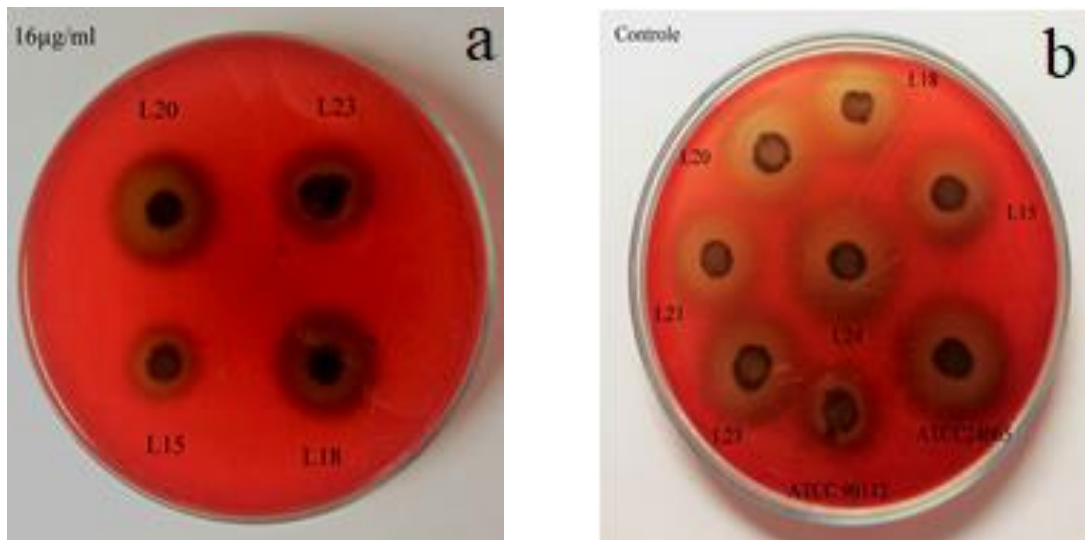
### 5.3.6. Hemolisinas

A análise dos resultados de atividade das hemolisinas mostrou que 3 isolados não apresentaram halo indicativo de atividade, quando expostos a CIM do OE de *C. cassia* (Figura 44). Os dados estão demonstrados na tabela 7. Os resultados comparados com o controle sem o OE, não mostraram alterações significativas ( $p < 0,2068$ ) (Figura 44).

**Tabela 7.** Resultados da avaliação da produção de hemolisinas e DNase em isolados do complexo *C. neoformans*, após ação do OE de *C. cassia*.

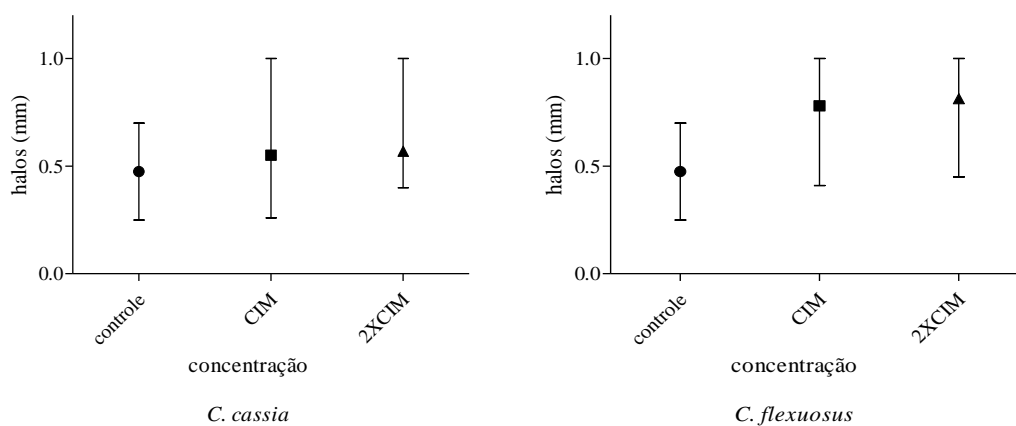
<i>C. neoformans</i> /CIM $\mu\text{g/ml}$	Hemolisinas		DNase	
	Controle	CIM	Controle	CIM
<b>L2 (32)</b>	0,63	1	+	-
<b>L3 (32)</b>	0,55	0,56	+	+
<b>L4 (32)</b>	0,54	0,58	+	-
<b>L5 (32)</b>	0,31	0,6	+	+
<b>L7 (32)</b>	0,5	0,53	+	-
<b>L14 (32)</b>	0,38	1	+	+
<b>L15 (16)</b>	0,35	0,4	+	-
<b>L18 (16)</b>	0,41	0,47	+	+
<b>L21 (16)</b>	0,41	0,42	+	+
<b>L23 (16)</b>	0,5	0,53	+	+
<b>L24 (16)</b>	0,57	0,6	+	+
<b>L28 (16)</b>	0,54	0,58	+	+
<b>L30 (16)</b>	0,44	0,5	+	+
<b>L41 (64)</b>	0,41	0,58	+	+
<b>ATCC 90112 (8)</b>	0,7	0,7	+	-
<b><i>C. gattii</i></b>				
<b>L1 (32)</b>	0,5	1	+	+
<b>L9 (32)</b>	0,54	0,56	+	+
<b>L20 (16)</b>	0,4	0,45	+	+
<b>L48 (64)</b>	0,42	0,58	+	+
<b>ATCC 24065 (16)</b>	0,56	0,6	+	+

n = 20; CIM (concentração inibitória mínima)



**Figura 44.** Avaliação da atividade hemolítica em isolados do complexo *C. neoformans*: (a) - expostos a CIM do OE de *C. cassia*, (b) - controle sem OE.

O OE de *C. flexuosus* inibiu a atividade de hemolisinas em 9 /20 (45%) isolados avaliados na sua correspondente CIM (tabela 8). Quando comparado com os resultados do controle sem o OE, observamos que houve uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 45). Os antifúngicos AmB e FLC em CIM não demonstraram a formação de halos de hemólise.



**Figura 45.** Atividade hemolítica dos isolados do complexo *C. neoformans* sob ação da CIM e 2XCIM dos OEs de *C. cassia* ( $p=0,2068$ ) e *C. flexuosus* ( $p < 0,0001$ ).

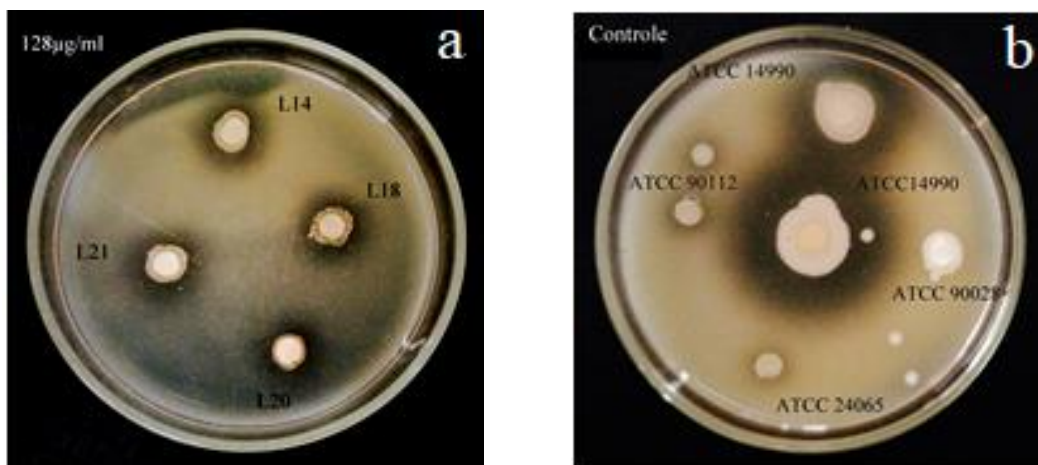
**Tabela 8.** Produção de hemolisinas e DNase por isolados do complexo *C. neoformans*, após ação do OE de *C. flexuosus*.

<i>C. neoformans</i> /CIM µg/ml	Hemolisinas		DNase	
	controle	CIM	controle	CIM
<b>L2 (128)</b>	0,63	1	+	+
<b>L3 (128)</b>	0,55	1	+	+
<b>L4 (256)</b>	0,54	0,8	+	+
<b>L5 (128)</b>	0,31	1	+	+
<b>L7 (256)</b>	0,5	0,56	+	-
<b>L14 (128)</b>	0,54	0,56	+	+
<b>L15 (256)</b>	0,38	1	+	+
<b>L18 (128)</b>	0,35	1	+	+
<b>L21 (128)</b>	0,41	1	+	+
<b>L23 (128)</b>	0,41	1	+	+
<b>L24 (64)</b>	0,5	0,58	+	+
<b>L28 (16)</b>	0,57	0,63	+	+
<b>L30 (64)</b>	0,42	0,63	+	+
<b>L41 (128)</b>	0,7	0,71	+	+
<b>ATCC 90112 (64)</b>	0,5	1	+	+
<b><i>C. gattii</i></b>				
<b>L1 (128)</b>	0,4	1	+	+
<b>L9 (256)</b>	0,54	0,71	+	+
<b>L20 (128)</b>	0,44	0,66	+	+
<b>L48 (256)</b>	0,41	0,72	+	-
<b>ATCC 24065 (128)</b>	0,56	0,59	+	-

n = 20; CIM (concentração inibitória mínima)

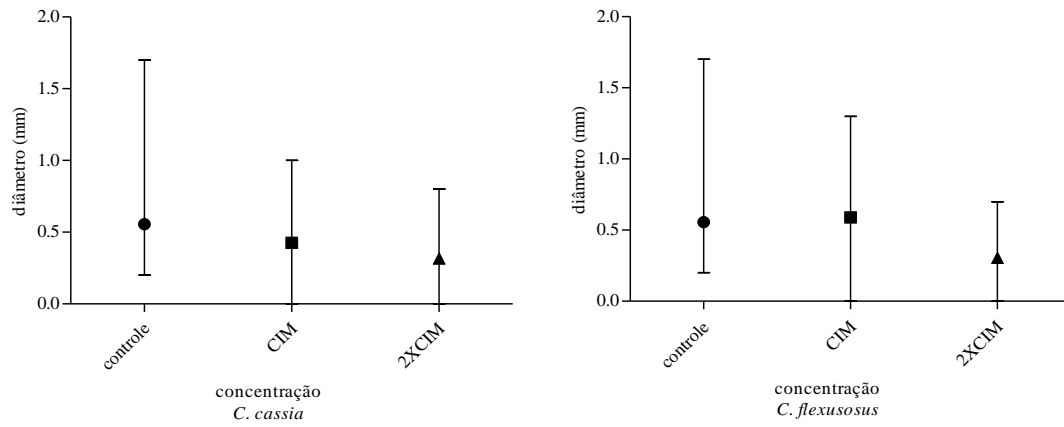
### 5.3.7. DNase

Os resultados da produção de DNase demonstraram que esta enzima foi inibida em 5/20 isolados em presença do OE de *C. cassia* e 3/20 para *C. flexuosus* correspondendo a 25 e 15% respectivamente (Figura 46).



**Figura 46.** Produção de DNase em isolados do complexo *C. neoformans*: (a) - Meio de cultura contendo CIM do OE de *C. flexuosus*, (b) - Meio de cultura sem o OE *Saphylococcus aureus* ATCC14990 (controle positivo) e *C. albicans* ATCC 90028 (controle negativo). *C. neoformans* ATCC 90112, *C. gattii* ATCC 24065.

Os resultados para produção de DNase (Tabela 7 e 8), mostraram que o diâmetro dos halos formados pelos isolados do complexo *C. neoformans* variaram de 0,2 a 1mm sob a ação da CIM do OE de *C. cassia*, enquanto o controle sem o OE foi de 0,25 a 0,7mm ( $p = 0,2202$ ). Foi observado que *C. flexuosus* apresentou diâmetro variando de 0 a 1,3 mm para CIM do OE e sem ação do óleo foi de 0,25 a 0,7mm ( $p = 0,0427$ ) (Figura 47). Para os antifúngicos AmB e FLC, não houve a formação de halos nas correspondentes CIM avaliadas.



**Figura 47.** Média de diâmetro dos halos resultante da ação da DNase em isolados de *C. neoformans* após ação aos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*.

## 6. DISCUSSÃO

---

As infecções fúngicas, com o decorrer dos anos, se tornaram importante em relação ao comprometimento da qualidade de vida do paciente (Del Poeta & Casadevall 2012). Diante deste contexto, as infecções causadas por leveduras do complexo *C. neoformans* se tornaram uma preocupação, devido ao desenvolvimento de patologias graves como a meningite criptocócica associada a alta morbidade e mortalidade (Park et al. 2009; Galisteu et al. 2015; Bielska & May 2016). Estes fungos apresentam comportamento oportunista, acometendo principalmente os indivíduos imunocomprometidos, especialmente pacientes portadores de HIV e com SIDA. Sendo o diagnóstico precoce o tratamento chave para o sucesso da sobrevivência do paciente (Srichatrapimuk & Sungkanuparph 2016).

O tratamento da patologia utiliza diversos fármacos, levando em consideração o estado evolutivo da infecção. O FLC é recomendável em casos de infecção primária sem comprometimento do SNC enquanto a AmB pode ser utilizado em situação de maior gravidade (Saag et al. 2000). Embora sejam algumas das alternativas atualmente oferecidas aos pacientes acometidos pela infecção causada pelo *C. neoformans* (Grossman & Casadevall 2017). A utilização destes fármacos pode proporcionar sérios riscos à saúde, devido a elevada toxicidade (hepatotóxico e nefrotóxico), proporcionando mal-estar, resistência, além do tempo prologando da terapia, que resultam na dificuldade em manter a terapêutica (Boulos 1993; Ferreira et al. 2013; Sloan & Parris 2014; Grossman & Casadevall 2017).

A utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças é conhecida há algum tempo e a contribuição das plantas devido as suas propriedades terapêuticas, ainda é muito utilizada na medicina popular (Silva & Fernandes 2010). Os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* avaliados neste trabalho foram selecionados considerando a relação com propriedades antimicrobianas (Melo et al. 2015; Adukwu et al. 2016).

Neste trabalho foi observado atividade antifúngica do OE de *C. cassia* em isolados das espécies do complexo *C. neoformans*. O OE de *C. cassia* demonstrou ser capaz de inibir o crescimento de leveduras como espécies de *Candida* (Almeida et al. 2012; Kamble et al. 2014) e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Kocevski et al. 2013; Pekmezovic et al. 2015), *Fusarium*, *Microsporium* e *Trichophyton* (Ooi et al. 2006).

A importância deste trabalho está relacionada a ser um dos primeiros relatos sobre atividade antifúngica *in-vitro* do OE de *C. cassia* em leveduras do complexo *C. neoformans*.

A avaliação da CIM demonstrou valores menor que 64 µg/mL para os isolados avaliados, CIM<sub>50</sub> de 16 µg/mL e CIM<sub>90</sub> com 32 µg/mL, mostrando uma ação antifúngica do OE de *C. cassia* em baixas concentrações. Este óleo foi avaliado em outras espécies de leveduras por Almeida et al. (2012), que consideraram como eficiente agente antifúngico, com CIM entre 64 e 128 µg/mL, ao avaliar isolados clínicos de *C. albicans*. Kamble (2014) demonstrou CIM de 0,02 a 0,062 µg/mL deste óleo, para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Em fungos filamentosos a ação foi avaliada em *A. flavus* e *A. oryzae* (Kocevski et al. 2013). Os dados acima mostram que o OE de *C. cassia* apresenta forte poder antifúngico frente aos isolados do complexo *C. neoformans*.

OE de *C. flexuosus* em concentrações menores que 256 µg/mL e 128 µg/mL foi capaz de inibir o crescimento dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* respectivamente, com CIM<sub>50</sub> de 128 µg/mL, confirmando os dados na literatura, embora raros, que mostram a atividade antifúngica sobre fungos filamentosos. Shahi et al. (2003), observaram que a CIM menor que 0,3µg/mL inibiu o crescimento de *Alternaria alternata*, *Penicillium italicum*, *P. implicatum*, *P. minio-lutem*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*, fungos do meio ambiente. Em outras espécies, como *Cymbopogon citratus*, tem sido relatado ação antifúngica em espécies de *Candida*, especialmente em *C. albicans* e *C. tropicalis* (Silva et al. 2009). Estudos de Oliveira et al. (2015) avaliaram a ação do OE de *C. winterianus* e observaram CIM de 625 µg/mL para *C. albicans*. Desta forma, as evidências sobre atividade do OE de *C. flexuosus* associada com os resultados em outras espécies de *Cymbopogon*, confirmam a atividade antifúngica deste óleo.

A busca por alternativas no tratamento de infecções fúngicas tem levado a inúmeras pesquisas utilizando produtos naturais com potencial antifúngico, entretanto dificuldades para se obter valores padronizados de CIM, que possam ser utilizados para classificar a efetividade do composto.

Holetz et al. (2002) pesquisando plantas utilizadas na medicina popular através da microdiluição em caldo, considerou boa atividade os extratos com CIM ≤ 100 µg/mL, valores entre 100 a 500 µg/mL foram classificados como moderada, entre > 500 a 1000 µg/mL como atividade fraca e resultados > 1000 µg/mL como inativa. Aligiannis et al.

(2001) ao avaliarem o OE de *Origanum sp* classificaram os resultados de CIM < 500 µg/mL como forte atividade, valores entre 600 a 1500 µg/mL como moderada e > 1600 µg/mL como fraca atividade; valores próximos a estes são também utilizados por (Sartoratto et al. 2004). Valores menores são critérios considerados por Scorzoni et al (2007), em que compostos com CIM ≤256 µg/mL são relevantes para a pesquisa de substâncias com fins terapêuticos.

Diante disso os resultados de CIM observados por meio dos testes de susceptibilidade *in-vitro* dos OEs *C. cassia* e *C. flexuosus*, sobre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, corroboram com relatos da literatura que mostram propriedade antimicrobiana dos OEs proveniente de produtos naturais, tornando estes compostos promissores na busca de novos antifúngicos (Kamble 2014; Ojo et al. 2014)

O OE de *C. cassia* apresentou a sua ação fungicida em 2 e 4X a CIM, sendo que 65% dos isolados apresentaram CFM em 2XCIM. Os estudos relacionados com este OE para avaliar CFM sobre as leveduras de *Cryptococcus* ainda não foram relatados, embora outras leveduras, como espécies de *Candida*, tenham sido avaliadas, como demonstrou Kamble (2014) que avaliou o OE de *C. cassia* em 75 isolados clínicos de espécies de *Candida*, obtendo valores de CIM similares aos de CFM. Crockett et al. (1992), avaliaram o extrato aquoso de outra espécie de *Cinnamomum* e observaram CFM entre 0,39 mg/mL a 0,60 mg/mL em *C. albicans* isoladas de pacientes com SIDA. A análise dos resultados deste estudo, comparados com outras pesquisas, confirmam efeito fungicida em uma concentração de 2XCIM para *C. cassia* sobre espécies de *Cryptococcus*.

Pesquisas utilizando o OE de *C. flexuosus* como antifúngico não são relatadas, dificultando a comparação de valores de CFM. Adjou (2017) realizou experimentos avaliando a ação do OE de *Cymbopogon citratus* sobre alguns gêneros de fungos filamentosos como *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium*, observando CFM entre 0,15 a 0,25 µl/mL<sup>-1</sup>. Estes resultados são menores que os obtidos para *C. flexuosus* em *C. neoformans* e *C. gattii*, podendo ser explicados por se tratar de fungos filamentosos e outra espécie do gênero *Cymbopogon*.

Bons resultados da cinética de crescimento dos fungos sob ação OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* por um período de 24 horas de incubação foram obtidos, uma vez que se observou em 2XCIM do OE de *C. cassia* não haver crescimento de colônias de *C. gattii* e, nessa mesma concentração de *C. flexuosus* inibiu o crescimento de *C. neoformans*. A atividade fungicida foi executada na concentração 4XCIM de ambos os OEs

avaliados, em 24 e 8 horas para *C. neoformans* e *C. gattii*. Além disso os ensaios para avaliação da cinética de crescimento para os isolados avaliados, mostraram resultados distintos que variaram de acordo com OE, sua concentração e tempo exposição do fungo. Na CIM de ambos OEs, houve crescimento de colônias durante todo período de exposição caracterizando assim, ação fungistática nesta concentração. Estes resultados não encontram dados comparativos, uma vez não há na literatura relatos descrevendo a ação destes OEs em leveduras do complexo *C. neoformans*, nem mesmo em outras leveduras assim como em fungos filamentosos.

Os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade nos encorajaram a avaliar o efeito desses OEs sobre os fatores de virulência.

A cápsula polissacarídica é uma estrutura de *C. neoformans*, relacionada com a virulência desta levedura, responsável por proporcionar proteção contra fagocitose, ação oxidativa das células de defesa, defensinas e alterar a susceptibilidade a antifúngico (Zaragoza 2009; Almeida et al. 2015). Portanto, a descoberta de produtos naturais que atuem na redução do tamanho da cápsula é extremamente importante, uma vez que pode diminuir a sua virulência (Cardoso et al. 2016).

Os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* proporcionaram uma diminuição significativa no tamanho da cápsula polissacarídica ( $p < 0,0001$ ), comparado com o controle positivo, que contém o meio que favorece a formação desta estrutura. Para *C. cassia* houve uma redução de 48,65% no tamanho da estrutura e para *C. flexuosus* foi 47,8%. Segundo Jabom et al. (2001), um mecanismo que poderia explicar essa alteração na espessura da cápsula, pode estar relacionada com as diferentes proteínas envolvidas em sua biossíntese.

Esses resultados corroboram com relatos prévios de pesquisas com o extrato de *Pimenta pseudocaryophyllus*, que foi analisado por Fernandes et al. (2012) sobre isolados de *C. neoformans* exposto em CIM (64mg/L), demonstrando uma redução do volume capsular de 61,9% a 42,83% em leveduras do complexo *C. neoformans*. A diminuição do tamanho da cápsula foi também confirmada para o OE de *Ocimum basilicum* sobre isolados de *C. neoformans*, com redução da cápsula de 16,94% (Cardoso et al. 2016).

Analisando a ação de alguns antifúngicos convencionais, como a AmB e FLC, evidenciamos que a exposição em concentrações subinibitórias sobre leveduras de *C. neoformans*, reduziu a formação da cápsula polissacarídica em 74,1% e 76,4%, respectivamente. Nosanchuk et al. (1999), sugerem que AmB e FLC podem alterar a

estrutura capsular e demonstraram que a diferença no tamanho é acompanhada pela mudança da carga elétrica da membrana celular, volume das células e quantidade de polissacarídeos.

A melanina é um fator de virulência do *C. neoformans* responsável pela proteção contra células de defesa, moléculas oxidantes e resistência a fármacos como a AmB (Casadeval et al. 2000).

Os ensaios para avaliação de produção de melanina mostraram que 30% dos isolados do complexo *C. neoformans* não produziram este pigmento sob ação da CIM de *C. cassia*, enquanto na mesma concentração do OE de *C. flexuosus* não houve a síntese de melanina em 60% dos isolados avaliados.

A produção de melanina tem sido avaliada em presença de antifúngicos como o voriconazol que na CIM (0,5 µg/mL) inibiu a sua síntese em isolados de *C. neoformans* (Martinez et al. 2007). A AmB na concentração de 2 µg/mL foi avaliada através de teste de disco difusão, onde se observou a formação de halos de inibição do pigmento (Dalisay et al. 2011). Segundo Chou et al. (2013) o OE de *C. cassia* e seu principal fitoquímico o cinamaldeído, não somente reduziram o conteúdo de melanina e atividade antirosinase, como também regularam a expressão da tirosinase, sem exibir citotoxicidade.

Estes dados são importantes uma vez que a melanina interfere em numerosos mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo a inibição de produção poderá contribuir para que ocorra uma alteração nos efeitos imunomodulatórios sobre a resposta do hospedeiro, como inibição de fagocitose, supressão da imunidade por células, tolerância imunogênica, resistência a antifúngicos como AmB, caspofungina e levando assim a uma diminuição da virulência do microrganismo (Dalisay et al. 2011).

A produção e atividade da fosfolipase esta envolvida na capacidade de causar danos ao tecido do hospedeiro através da degradação dos fosfolipídios da membrana celular, além de favorecer a invasão e disseminação do fungo e interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Santangelo et al. 2004).

Os dados para atividade da fosfolipase em isolados do complexo *C. neoformans* após ação do OE de *C. cassia* mostrou que nas concentrações avaliadas (½ CIM e CIM) houve que 25% dos isolados apresentaram diminuição da atividade desta enzima, sendo que 5% não produziu. Para *C. flexuosus* observamos que 10% e 25% dos isolados não produziram fosfolipase em concentrações correspondentes a ½ CIM e CIM, respectivamente.

Quando comparados ao controle, observamos o OE de *C. flexuosus* diminuiu a significativamente a produção de fosfolipase entre os isolados avaliados ( $p=0,0046$ ).

A importância da fosfolipase como fator de virulência é determinado pelo fato que a maioria dos isolados apresentam atividade desta enzima. Em 16 amostras clínicas de espécies do complexo *Cryptococcus* onde todos os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram resultados de Pz variando de 0,59 e 0,90 (positivos) (Pessoa et al. 2012). Chen et al. (1997) realizaram um estudo com 50 isolados de *Cryptococcus* verificando que todos eram produtores da enzima e com aumento no tamanho dos halos característicos, de acordo ao tempo de exposição ao meio de cultura. Vidotto et al. (1996) analisaram 23 amostras de paciente com SIDA e conseguiram observar que 95,6% das leveduras de *C. neoformans*, apresentavam atividade desta enzima com Pz entre 0,271 a 0,949. Análises realizadas por Campos & Baroni (2010) caracterizou 166 isolados de origem veterinária, como positivos com resultados de atividade de Pz entre 0,40 a 0,70. Estes estudos reforçam e demonstram a importância dos dados desse trabalho sobre a produção desta enzima, uma vez que o OE de *C. flexuosus* inibiu a produção da fosfolipase em 25% dos isolados. A inibição desse importante fator virulência dificulta a capacidade das espécies do complexo *C. neoformans* de invadir e estabelecer a infecção no hospedeiro.

Vários resultados são observados na literatura mostrando que as espécies de *Cryptococcus* produtores ou não desta enzima. Segundo Staib (1965) nenhum dos 32 isolados do gênero *Cryptococcus* produziram esta enzima, Chan & Tay (2010) em 73 isolados clínicos, evidenciaram que a maioria (90,4%) mostraram positividade à enzima e Campos & Baroni (2010) mostraram que a maioria de 116 isolados de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*, de origem veterinária, apresentaram atividade fortemente positiva. A produção de proteinase em isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na presença dos OEs, não foi detectada pela metodologia utilizada neste trabalho. *C. neoformans* tem baixa atividade proteolítica, mas possuem papel importante na patogenicidade por sua capacidade de causar danos tecidual, favorecer a sobrevivência do patógeno e inibir proteínas do sistema imunológico do hospedeiro (Chen et al. 1996).

A capacidade de promover a sobrevivência nas células de defesa do hospedeiro e favorecer a disseminação ao SNC são as principais características de virulência relacionadas a produção da enzima uréase dos fungos do complexo *C. neoformans* (Olszewsk et al. 2004; Rutherford 2014). Estudos em amostras de origem animal,

clínico e ambiental, confirmam a produção da urease pelos isolados de *C. neoformans* avaliados (Reolon et al. 2004; Junior et al. 2013). Esses dados tornam os resultados do nosso trabalho relevante, uma vez que os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* na CIM, inibiram a produção desta enzima em 40% e 30% dos isolados respectivamente. Esta inibição poderia estar relacionada com a presença dos principais componentes dos OEs, entre eles do cinamaldeído descrito como capaz de inibir a produção de urease na bactéria *Proteus mirabilis* (Anyanwu & Okoye 2017).

A ação de enzimas hemolíticas das leveduras do complexo *C. neoformans* tem função de causar danos nas hemácias com o objetivo de liberar as moléculas de ferro para que sejam utilizadas pelas leveduras (Jung et al. 2008).

As análises dos resultados do controle mostram que a produção de hemolisinas é comum nas espécies do complexo *C. neoformans*. A exposição de *C. neoformans* e *C. gattii* ao OE de *C. cassia*, em concentração correspondente à CIM, promoveu uma inibição da atividade da hemolisina em 15% dos isolados. Enquanto para *C. flexuosus* observou-se que 45% dos isolados não apresentaram atividade e 20% apresentou diminuição na intensidade da atividade hemolítica. O padrão de hemólise observado nestes isolados foi de destruição parcial, provavelmente devido ao fator alfa hemolítico gerado pelas colônias de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. É pequeno o conhecimento sobre a atividade hemolítica exibida por espécies de *Cryptococcus*, assim como, a natureza do fator alfa hemolítico é pouco compreendido. As hemolisinas são conhecidas como fator chave de virulência que contribui para a patogênese de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Luo et al. 2001).

A enzima DNase de *Cryptococcus neoformans* pode participar da virulência do fungo por degradar o DNA do hospedeiro, suprindo o fungo com nucleotídeos (Casadevall & Perfect 1998) A relação da atividade extracelular da DNase como fator de virulência não está bem esclarecido e, hipóteses sugerem que a DNase atue na sobrevivência do fungo por promover a evasão do sistema imunológico, prevenindo a morte da levedura pelo neutrófilo (Riceto et al. 2015).

Os resultados do controle positivo no teste confirmam que as espécies de *Cryptococcus* produzem DNase. Sánchez e Colom (2010) analisaram a produção desta enzima em 85 amostras do complexo *C. neoformans* e identificaram que todos os isolados de origem clínica, ambiental e veterinária mostraram atividade da DNase. Esta enzima também é produzida por outras leveduras como do gênero *Candida* (Riceto et al. 2015) e por dermatófitos como, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*,

*Microsporium canis* e *M. gypseum* (Sharifzadeh et al. 2016). O OE de *C. cassia* em CIM inibiu a ação da DNase em 25% dos isolados de complexo de *Cryptococcus neoformans* avalidos, demonstrado pela ausência de zona de degradação do DNA no meio de cultura. Para *C. flexuosus* a pesquisa desta enzima foi negativa em 15% dos isolados. Estes resultados mostraram a capacidade que estes OEs possuem de inibir a degradação do DNA, um interessante atributo que deve ser considerado no estudo de patogenicidade deste gênero.

O estímulo para a realização deste trabalho foram as dificuldades relacionadas a limitada opção de agentes terapêuticos e a complexidade de seus mecanismos de ação, pouca solubilidade dificultando a administração, a elevada toxicidade e desenvolvimento de resistência. Diante disso torna-se necessário a pesquisa de novos agentes antifúngicos, com diferentes mecanismos de ação alternativo, apresentando um amplo espectro de ação, com poucos efeitos colaterais e menor custo financeiro. A ação dos OEs sobre os fatores de virulência foi motivada pelos bons resultados obtidos nos testes de suscetibilidade e a ação dos OEs especialmente a cápsula, demonstraram que estes podem atuar nos mecanismos que permitem a sobrevivência do patógeno e colonização no hospedeiro. Desta forma se tornam potenciais para atuar na inibição da patogênese das infecções criptocócicas

## 7. CONCLUSÃO

---

De acordo os resultados deste estudo, conclui-se que:

1. Os OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus* apresentaram ação antifúngica sobre as leveduras do complexo *C. neoformans*. Os valores de CIM observados para *C. cassia* classificam-se como um composto que apresenta forte atividade e *C. flexuosus* com moderada atividade. Isso torna esses OEs como potenciais compostos, na busca de novos fármacos a serem empregados na terapia da criptococose.

2. Os valores obtidos de CIM e CFM demonstram que estes OEs possuem características de um agente fungistático, sendo que o efeito fungicida é observado em concentrações de até 4XCIM.

3. A cinética de crescimento dos isolados expostos aos OEs de *C. cassia* e *C. flexuosus*, mostraram uma redução no número de células viáveis, de acordo o período de exposição e em concentrações maiores que a CIM. Os dados demonstram que estes OEs interferem na cinética do crescimento microbiano, exercendo efeito fungistático.

4. A ação dos OEs foi capaz de reduzir o tamanho da cápsula polissacarídica, dos isolados do complexo *C. neoformans* de forma significativa. A redução do tamanho da cápsula é um fator importante porque durante a infecção esta levedura se torna mais vulnerável, diante as defesas do hospedeiro.

5. A produção de melanina sofreu maior interferência quando expostos aos OEs, especialmente *C. flexuosus*, em que a maioria dos isolados do complexo *C. neoformans* teve sua produção inibida (60%). Este resultado é importante uma vez que a ausência de melanina pode facilitar a atividade de fármacos como AmB, assim como a ação de células de defesa.

6. A urease teve a sua produção inibida sob a ação do OE de *C. Cassia* (40%) e *C. flexuosus* (25%), dado importante uma vez que pode dificultar a sobrevivência e disseminação, impedindo que o fungo atinja o SNC.

7. A avaliação da atividade de fosfolipase sob a ação do OE de *C. flexuosus* mostrou que 25% dos isolados não produziram esta enzima, cuja principal função é promover lesão e invasão tecidual. Desta forma esta OE atua diminuindo a patogenicidade das espécies de *Cryptococcus*.

8. Nenhum isolados do complexo *C. neoformans* produziu a proteinase, sendo esta uma característica comum na maioria das leveduras deste gênero.

9. A redução na capacidade de lisar hemáceas em alguns isolados sob ação de *C. flexuosus* (45%), sugere que este OE possui a característica de diminuir a ação de *C. neoformans* sobre a integridade das hemácias. A capacidade hemolítica fornece uma estratégia de sobrevivência durante infecções, pela liberação de ferro que é importante no metabolismo fúngico. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar a sensibilidade das hemácias (citotoxicidade) frente a esse OE.

10. Os dados sobre a produção de DNase, demonstraram que o OE de *C. cassia* inibiu a degradação do DNA dos isolados do complexo *C. neoformans* (25%), o que dificultaria a levedura de extrair nitrogênio para o seu metabolismo e impedindo a sua manutenção e viabilidade.

11. A análise geral dos resultados mostrou que esses OEs apresentaram relevante atividade antifúngica e ação sobre a produção de importantes fatores de virulência, tornando de grande importância a continuidade dos estudos sobre estes compostos, buscando novos alvos de ação, como os fatores de virulência, assim como outros princípios ativos que representem alternativas para o tratamento da criptococose.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adjou E, Ahousi ED, mongazi C, Soumanou MM. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Cymbopogon citratus* leaves on the quality of fresh orange juice. *Int. J. of Health, Animal science and Food safety*. 1–12, 2017.

Adukwu EC, Bowles M, Edwards-Jones V, Bone H. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 9619–9627, 2016.

Akhila A. Biosynthetic relationship of citral-trans and citral-cis in *cymbopogon flexuosus* (lemongrass). *Phytochemistry*. 24: 2585–2587, 1985.

Aliyiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49: 4168–4170, 2001.

Almeida F, Wolf J M, Casadevall A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 14: 1173–1185, 2015.

Almeida, L. Atividade Antifúngica e Alterações Morfológicas Induzidas pelo Óleo Essencial de *Cinnamomum cassia* frente cepas de *Candida albicans* isoladas de Pacientes HIV Positivos. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 12: 393–398, 2012.

Alves, P. M, Queiroz LMG, Pereira JV, Prerira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42: 222–224, 2009.

Anyanwu M, Okoye R. Antimicrobial activity of nigerian medicinal plants. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 6: 1, 2017.

Araujo GS, Fonseca FL, Pontes B, Torres A, Cordeiro RJB, Zancopé-Oliveira RM, Casadevall A, Viana NB, Nimrichter L, Rodrigues ML, Garcia ES, Souza W, Frases S. Capsules from pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. *PLoS ONE*. 7: 29561, 2012.

Assal FE, Paula MAJ, Capeletti LS, Abrão FY, Ataídes FS, Sá FAS, Costa CR, Silva MRR. *Pimenta pseudocaryophyllus* inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47: 618–623, 2014.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446–475 , 2008.

Benham RW. The genus *Cryptococcus*:The genus *Cryptococcus*: The present status and the criteria identification of species. *Trans. N. Y. Acad. of Sci. Ser. II*. 17: 418-4. 1955

Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic Relapse of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis after Initial Fluconazole Monotherapy : The Role of Fluconazole Resistance and Immune Reconstitution. *Infectious Diseases Society of America*. 43: 1069–1073, 2006.

Bielska E, May RC. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Research*. 16: 106, 2016.

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. A Yeast under Cover : the Capsule of *Cryptococcus neoformans* MINIREVIEW. *Eukaryotic Cell*. 2: 655–663 , 2003.

Boulos M. Tratamento pelo fluconazol de pacientes imuno-comprometidos com graves infeccoes fungicas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1993.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 400–421, 2008.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hybrids between fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res*. 6: 599–607, 2006.

Bowman PI, Ahearn DG. Evaluation of commercial systems for the identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 1: 49–5, 1976.

Brajtburg J, Bolard J. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. *American Society for Microbiology*. 9: 512–531, 1996.

Brito DIV, Moraes-Braga MFB, Cunha FAB, Albuquerque RS, Carneiro JNP, Lima MSF, Leite NF, Souza CES, Andrade JC, Alencar LBB, Lavor AKLS, Figueredo FG, Lima LF, Coutinho HDM. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17: 836–844, 2015.

Brueske C H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 23: 631–633, 1986.

Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerging Infectious Diseases*. 4: 71–83, 1998.

Budzyńska A, Sadowska B, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B. Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. *Acta biochimica Polonica*. 61: 115–21, 2014.

Butler MJ, Gardiner RB, Day A.W. Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silve. *Mycologia*. 97: 312–319, 2005.

Campos FL, Baroni FDA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. *Revista de patologia tropical*. 39: 83–89, 2010.

Cardoso NNR, Alviano CS, Blank AF, Romanos MTV, Fonseca BB, Rozental S, Rodrigues IA, Alviano DS. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2016: 2016.

Chan MY, TAY ST. Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. *Mycoses*. 53: 26–31, 2010.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and cellular biology*. 14: 4912–9, 1994.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*. 181: 5636–5643, 1999.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the Third capsule-associated gene , CAP60 , Required for virulence in *Cryptococcus neoformans* isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 66: 2230–2236, 1998.

Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infection and Immunity*. 64: 1977–1983, 1996.

Chao SC, Young DG, Oberg CJ. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *Journal of Essential Oil Research*. 12: 639–649, 2000.

Charlier C, Chretien F, Baudrimont M, mordelet E, Lortholary O, dromer F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *The American journal of pathology*. 166: 421–432, 2005.

Chayakulkeeree M, Sorrel TC, Siafakas AR, Wilson CF, Pantarat N, Gerik KJ, Boadle R, Djordjevic Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 69: 809–826, 2008.

Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung K. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 755–762, 2008.

Chen LC; Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 3: 570–574, 1996

Chen SC, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrel TC. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. *The Journal of infectious diseases*. 175: 414–420, 1997.

Chen Y, Chang T, Liu J, Chen F, Chen C, Lee C, Chien C, Lu C. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infectious Diseases*. 15; 277, 2015.

Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 62: 1507–1512 , 1994

Chou ST, Chang WL, Chang CT, Hsu CS, Lin Y, Shih Y . *Cinnamomum cassia* essential oil inhibits  $\alpha$ -MSH-induced melanin production and oxidative stress in murine B16 melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 19186–19201, 2013.

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *ASM Press*. Washington, D.C, 1998

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44: 139, 1999.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*. 3: 354–358, 2000.

Castillo F, Hernández D, Gallegos G, Rodríguez R, Aguilar CN. Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. 298,2012

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

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

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada, Segunda Edição. 2002.

Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Elsevier*. 87: 2014.

Coenjaerts F. The sixth international conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *FEMS Yeast Research*. 6: 312–317, 2006.

Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013: 23, 2013.

Cordero RJB, Vij R, Casadevall A. Microbial melanins for radioprotection and bioremediation. *Microbial Biotechnology*. 10, 1186–1190, 2017.

Kon AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO, Wanke B, Telles FQ, Severo LC, Aranha LF, Lazéra MS, Resende MR, Salmito MA, Yasuda MAS, Moretti ML, Ferreira MS, Vergara MLS, Andrade NMP, Trabasso P, Mendes RP, Martinez R, Ponzio V. Consenso em criptococose: 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,41:524–544, 2008.

Cox GM, Mukherjee GTC, Cole GT, Casadevall A, Perfect J . Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity* 68: 443–448, 2000.

Crockett, C.O; Guede-Guina,F.; Pugh D; Vangah-Manda M; Robinson J ; Qlubadewo J.O; Ochillo. Cassia alata and the pre-clinical search for therapeutic agentes for the treatment of oportunistic infections in AIDS patients. *Cell Mol, Biol*, 35: 505-511. 1992.

Dalisay DS, Saludes JP, Molinski TF. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 19: 6654–6657, 2011.

Davey KG, Johnson EM, Holmes AD, Szekely A, Warnock DW. In-vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole and itraconazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 42: 217–20 , 1998.

Davis S, Vincent BM, Endo MM, Whitesell L, Marchillo K, Andes DR, Lindquist S, Burke M. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nature Chemical Biology*. 7; 481–487, 2015.

Del Poeta M, Casadevall A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia*. 173: 303–310, 2012.

Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 37–41, 2002.

Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18: 158–163, 1980.

Djordjevic JT. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*. 1: 1–13, 2010.

Doering TL. How sweet it is! cell wall Biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*. 63: 223–247, 2009

Durski KN, Kuntz KM, Yasukawa K, Virnig BA, Meya DB, Boulware DR. Cost-Effective Diagnostic Checklists for Meningitis in Resource-Limited Settings. *J AIDS- Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 63: 1077-9450, 2013.

Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber BW, Emerson RJ, Camesano TA, Casadeval A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*. 44: 3683–3693, 2005.

Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 7–10, 2002.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of clinical microbiology*. 28: 1642–4, 1990.

Evans RJ, Li Z, Hughes WS, Djordevic JT, Nielsen K, May RC. Cryptococcal Phospholipase B1 Is Required for Intracellular Proliferation and Control of Titan Cell Morphology during Macrophage Infection. *Infection and Immunity*. 83: 1296–1304, 2015.

Feldmesser M, Harris C, Reichberg S, Khan S, Casadevall A. *Clinical Infectious Diseases* 23: 827-830, 1996.

Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*. 68: 4225–4237, 2000.

Fernandes OFL, Costa CR, Junior RSL, Vinaud MC, Souza LKH, Paula JAM, Silva

MRR . Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on Melanized and Non-melanized *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 174: 421–428, 2012.

Ferreira GF, Baltazar LM, Santos JRA, Monteiro AS, Fraga LAO, Resende-Staianoff MA, Santos DA. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*. 68: 1801–1811, 2013.

Fica AC. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primeiras partes: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infectol*. 21: 26-38, 2004

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42, 2006

Fox DS, Cruz MC, Sia EAL, Ke H, Cox GM, Cardenas ME, Heitaman J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 39: 835–849, 2001.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 838–840, 1999.

Frases S, Nimrichter L, Viana NB, Nakouzi A, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryotic Cell*.7: 319–327, 2008.

Fusillo MH, Weiss DL. Qualitative estimation of staphylococcal deoxyribonuclease. *J. Bacteriol*, 78; 520-522, 1959

Galisteu KJ, Cardoso LV, Furin AAC, Junior AS, Cesarino CB, Franco C, Baptista ARS, Machado RLD. Opportunistic infections among individuals with HIV-1/AIDS in the highly active antiretroviral therapy era at a Quaternary Level Care Teaching Hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48: 149–156, 2015.

Ganendren R, Carter E, Sorrel T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 8: 1006, 2006.

García-rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell*, 3: 385–392, 2004.

Gazzoni A, severo CB, Salles FE, Severo CL. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 51: 255–259, 2009.

Gazzoni AF, Pegas KL, Severo LC. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41: 76–78, 2008.

Giavini E, Menegola E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus. *Toxicology Letters.* 198: 106–111, 2010.

Gomes FS, sarmento DN, Santo EPTE, Silva SHM. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde.* 1: 43–49, 2010.

Grossman NT, Casadevall A. Crossm Susceptibility. 61: 1–12, 2017.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Pammen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology.* 78: 16–48, 2015.

Hagen F, Hare JR, Meis JF, Arendruo MC. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark. *Mycoses.* 59: 576–584, 2016.

Hamilton AJ, Gomez BL. Melanins in fungal pathogens. *Journal of Medical Microbiology*. 51: 189–191, 2002.

Hoeprich PD. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. *Clin Infect Dis*. 14: 114-119, 1992.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 1027–1031, 2002.

Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 16: 22–29, 1982.

Ishii M, Matsumoto Y, Sekimizu K. Usefulness of silkworm as a model animal for understanding the molecular mechanisms of fungal pathogenicity. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 9:, 234–237, 2015.

Jacobson ES, Jenkins ND, Todd JM. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infection and Immunity*. 62: 4085–4086, 1994.

Janbon G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Research*. 4: 765–771, 2004.

Janbon G, Himmelreich U, Moyrand F, Improvis L, Dromer F. Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Molecular Microbiology*. 42: 453–467, 2001.

Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. 2119–2129 , 2007.

Junior AMB, Santos BFO, carvalho EO, Melo DLFM, Trindade RC, Stoianoff MAR. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. *J Bras Patol Med Lab*. 49; 160–168, 2013.

Jung WH, Kronstad JW. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cellular microbiology*, 10: 277–284, 2008.

Kakarla S, Ganjewala D. Antimicrobial activity of essential oils of four lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) varieties. *Medicinal and Aromatic Plants Science Biotechnology*. 3: 107-109, 2009.

Kamble VA. International Journal of Pharma and Bio Sciences issn *cassia* essential oil : effective anticandidal and possible therapeutic agent. *Int J Pharm Bio Sc*. 5: 52–60, 2014.

Kanafani Z, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 46: 120–128, 2008.

Kelly SL, Lamb DC, Taylor M, Corran AJ, Baldwin BC, Powderly WG. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiology Letters*. 122: 39–42, 1994.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 29: 227–231, 1997.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA . Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 42: 1207–12, 1998.

Klutts JS, Lavery SB, Doering TL. A 1,2-xylosyltransferase from *Cryptococcus neoformans* defines a new family of glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 17890–17899, 2007.

Kocevski D, Du M, Kan J, Jing C, Lačanin I, Pavlović H. Antifungal effect of allium tuberosum, cinnamomum cassia, and pogostemon cablin essential oils and their

components against population of aspergillus species. *Journal of Food Science*. 78: 731–737, 2013.

Kumar P, Yang M, Haynes BC, Skowrya M, Doering TL. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 21: 597–602 , 2011

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

Kwon-Chung KJ. A new species of Filobasidiella, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*. 68: 943–6, 1976.

Kwon-Chung KJ. Bennett JE. Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology*. 120:123-130, 1984

Kwon-Chung KJ. Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on Filobasidiella species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 25–38, 1982.

Kwon-Chung, KJ. Bennett E. *Medical mycology*. p.397-446, 1992

Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 4: 1–27, 2014.

Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *American Society fopr Microbiology*. 51: 218–223, 1986.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*. 6: 574–587, 2006.

Lazéra MS, Calvacante MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus*

*neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow – evidence for natural habitura related to decaying wood. *Medical Mycology*, 36: 119 – 1122, 1998.

Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43: 121–126, 2007.

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

Lemos J, Passos XS, Fernandes OFL, Paula JR, Ferri PH, Souza LKH, Lemos AA, Silva MRR. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: 55–58, 2005.

Li, L, An M, Shen H, Huang X, Yao X, Liu J, Zhu F, Zhang S, Chen Smin, He L, Zhang J, Zou Z, Jiang Y. The non-Geldanamycin Hsp90 inhibitors enhanced the antifungal activity of fluconazole. 7; 2589–2602, 2015.

Lin X; Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology*. 60: 69–105, 2006.

Linares CEB, Loreto ES, Silveira CP, Pozzatti P, Scheid LA, Santurio JM, Alves SH. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 49: 203–206, 2007.

Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7: 186–196, 2010.

Liu TB, Kim JC, Wang Y, Toffaletti, Eugenin E, Perfect JR, Kim KJ, Xue C. Brain Inositol Is a Novel Stimulator for Promoting *Cryptococcus* Penetration of the Blood-Brain Barrier. *PLoS Pathogens*, 9: 2013.

Logu A. In vitro activity of 2-cyclohexylidenehydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 692–698, 2005.

Lubian CT, Teixeira JM, Lund RG, Nascente PS, Del Pino FAB. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* ( Hill ) Bernh . ( Asteraceae ) sobre espécies orais de *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12: 157–162, 2010.

Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2971–2974, 2001.

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 Journal of Microbiology*, 38: 662–666, 2007.

Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 62: 5154–5156, 1994.

Mansour MK, Vyas JM, Levitz SM. Dynamic Virulence: Real-Time Assessment of Intracellular Pathogenesis Links *Cryptococcus neoformans* Phenotype with Clinical Outcome. *MBio*, 2: e00217-e00217, 2011.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumo*. 32: 449–60, 2006.

Martinez LR, Casadevall A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infection and Immunity*. 73: 6350–6362, 2005.

Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on

surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4592–4601, 2007.

Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50: 1021–33, 2006.

Martinez LR, Ntiamoah P, gacser A, Casadevall A, Nosanchuk JD. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 4396–4400, 2007.

Mcfadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 14: 497–505, 2006.

Medagama AB, Bandara R. The use of Complementary and Alternative Medicines (CAMs) in the treatment of diabetes mellitus: is continued use safe and effective. *Nutrition Journal*, 13: 102, 2014.

Medagama AB. The glycaemic outcomes of *Cinnamon*, a review of the experimental evidence and clinical trials. *Nutrition Journal*, 14: 108, 2015.

Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infection and Immunity*, 73: 2012–2019, 2005.

Melo ADB , Amaral AF, Schaefer G, Luciano F, Andrade C, Costa LB, Rostagno MH et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 79: 285–289, 2015.

Menezes RP, Penatti MPA, Pedroso RS. Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 591–594, 2011.

Meya DB, Okurut S, Zziwa G, Rolfes MA, Kelsey M, Cose S, Joloba M, Naluyima P, Palmer BE, Kambugu A, Mayanja-Kizza H, Bohjanen PR, Eller MA, Wahl SM, Boulware DR., Manabe YC, Janoff EM. Cellular immune activation in cerebrospinal fluid from ugandans with cryptococcal meningitis and immune reconstitution inflammatory syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 211: 1597–606, 2015.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys RJ. *Clin. Microbiol*, 31: 2274–2280, 1993.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiol. *Electrophoresis*. 20: 1790–1799, 1999.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *American Society for Microbiology*, 8: 515–548, 1995.

Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3: 4, 2011.

Molina Y, Ramos S, Douglass T, Klig L. Inositol synthesis and catabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*, 15: 1657–1667, 1999

Moyrand F, Chang YC, Himmelreich U, Kwon-Chung KJ, Janbon G. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryotic Cell*, 3: 1513–1524, 2004.

Moyrand F, Klapproth B, Himmelreich U, Dromer F, Janbon G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 45: 837–849, 2002.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67: 400–28, 2003.

Nasser N, Filho NN. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. *Ass Brass Dermatol*, 86: 1178–1180, 2011.

Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TI, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, 19: 2925–2956, 2014.

Nooney L, Matthews RC, Burnie JP. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checker board and time kill methodologies. *Diagn. Mricroniol. Infect*, 51: 19-29, 2005.

Nosanchuk JD, Cleare W, Franzot SP, Casadevall A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 233–239, 1999.

Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5: 203–223, 2003.

Odom A, Muir S, Lim E, Toffleti D, Perfect J; Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO journal*, 16: 2576–2589, 1997.

Ojo OA, Oladipo SO, Odelade KA. In vitro assessment of fungicidal activity of *Ageratum conyzoides* and *Cybopogon flexuosus* weed extracts against some phytopathogenic fungi associated with fruit rot of water melon (*Citrullus lunatus* Thunb). *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47: 2421–2428, 2014.

Okagaki LH. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 6: 2010.

Oliveira WA, Arrua JMM, Wanderley PA, Lima RB, Lima EO. Effects of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6: 21–26, 2015.

Olszewski MA. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*, 164: 1761–1771, 2004.

Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, Ooi VE. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American journal of Chinese medicine*, 34: 511–522, 2006.

Padalia RC, Verma RS, Chanotiya CS, Yadav A. Chemical fingerprinting of the fragrant volatiles of nineteen Indian cultivars of *Cymbopogon spreng.* (Poaceae). *Records of Natural Products*, 5: 290–299, 2011.

Palacios, D. S., I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock, and M. D. Burke, ‘Synthesis-Enabled Functional Group Deletions Reveal Key Underpinnings of Amphotericin B Ion Channel and Antifungal Activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:, 2011.

Paliwal DK, Randhawa HS. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 346–348, 1978.

Pandey AK, Rai MK, Acharya D. Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41: 421–425, 2003.

Paranagama, P.A, Abeysekera KH, Abeywickrama K, Nugaliyadde L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in*

*Applied Microbiology*. 37: 86–90 , jul. 2003.

Park, Benjamin J, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 23: 525–530, 2009.

Passos, XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFLF, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop*.35: 623–627 , 2002.

Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,40: 566–568, 2007.

Pekmezovic M, Rajkovic K, Barac A, Senerović L, Arsenijevic AV. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*. 99: 131–137, 2015.

Pemán J, Cantón E, Espinel-ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert review of anti-infective therapy*. 7: 453–460, 2009.

Perea S, Patterson TF. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clinical Infectious Diseases*. 35: 1073–1080, 2002.

Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance Updates*. 2: 259–269, 1999.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 50: 291–322, 2010.

Perfect JR. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. *The*

*Journal of Clinical Investigation*. 124; 1–5, 2014.

Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Filho BPD, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 13: 21–24, 2003.

Pessoa CCB, Silva SHM, 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. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 3: 59–65, 2012.

Pietrella D, Corbucci C, Perito P, Bistoni G, Vecchiarelli A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* Promote Dendritic Cell Maturation and Activation. *Infect Immun*. 73: 820–827, 2005.

Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, Sorda M, Boccia S, Romano R, Morace G, Fadda G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular Microbiology*. 47: 357–371, 2003.

Price MF, Wilkinson AND, Gentry LO. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 20: 7–14, 1982.

Pukkila-worley R, Gerrald QD, Kraus PR, Boily M, Davis MJ, Giles SS, Cox GM, Heitman J, Alspaugh JA. Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryotic Cell*. 4: 190–201, 2005.

Rappleye CA, Goldman WE. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. *Annual Review of Microbiology*. 60: 281–303, 2006.

Rasmussen C, Garen C, Brining S, Kincaid RL, Means RL, Means AR. The Calmodulin-Dependent Protein Phosphatase Catalytic Subunit (Calcineurin-a) Is an Essential Gene in *Aspergillus nidulans*. *Embo Journal*. 13: 0261-4189, 1994.

Ravikant KT, Gupte S, Kaur M. A Review on Emerging Fungal Infections and Their Significance. *J. Bacteriol. Mycol*, 1: 9–11, 2015

Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 40: 293–298, 2004.

Riceto EBM, Menezes RP, Penatti MPA, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*. 32: 79–82, 2015.

Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*. 7: 58–67, 2008.

Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*. 6: 48–59, 2007.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal Drug Development : Challenges , Unmet Clinical Needs , and New Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4: 1–14, 2014.

Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *candida albicans*. *Medical Mycology*, 20: 233–244, 1982.

Ruma-haynes P, Brownlee AG, Sorrell TC. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 49: 733–737, 2000.

Rutherford JC. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathogens*, 10: 1–3, 2014.

Saag MS, Graybill JR, Larsen RA, Pappas PG, Perfect, J R, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30: 710–718, 2000.

Salkowski CA, Balish E. Cutaneous cryptococcosis in athymic and beige-athymic mice. *Infection and Immunity*, 59: 1785–1789, 1991.

Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Revista iberoamericana de micología. Organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*, 27: 10–13, 2010

Sanders SW, Buchi KN, Goddard MS, Lang JK, Tolman KG. Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholesteryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:1029–1034, 1991.

Sanglard D. A los antifúngicos en las levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 20: 225–34, 2002.

Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, Wright L, Shounan Y, Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of cryptococcosis in a Murine Model. *American Society for Microbiology*.72: 2229–2239, 2004.

Santos JRA, Holanda RA, Frases S, Bravim M, Araujo GS, Santos PC, Costa MC, Ribeiro MJA, V GF. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. *PLoS ONE*. 9: e112669, 2014.

Sartoratto A, Machado AL, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MC, Rehder VL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 275–280, 2004.

Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*. 28: 25–34, 2007.

Sen K, Komagata K, Komagata K. Distribution of Urease and Extracellular Dnase in Yeast Species. *J. Gen. App. Microbiol*, 25: 127–135, 1979.

Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Criptococose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35; 1136–1144, 2009.

Shahi SK, Patra M, Shukla AC, Dikshit A, . Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. *BioControl*, 48: 223–232, 2003.

Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR. In vitro evaluation of antifungal susceptibility and keratinase, elastase, lipase and DNase activities of different dermatophyte species isolated from clinical specimens in Iran. *Mycoses*, 59: 710–719, 2016

Shi M, Li ZC, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, Kubes P, Mody CH. Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120: 1683–1693, 2010.

Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1289–1296, 2004.

Sidrim JJC, Costa AKF, Cordeiro RA, Brilhante RSN, Moura FEA, Castelo-Branco DSC, Neto MPA, Rocha MFG. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus* : a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 56: 445–458, 2010.

Silva FS, Ferreira TM, Teodoro GR, Costa ACB, Maria A, Junior BM, Salvador MJ,

Paula CR, Khouri S. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 68: 434–441, 2009.

Silva NCC, Fernandes JA. Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16: 402–413, 2010.

Singh A, Robert J, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Rutherford J, Kwon-Chung KJ. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 4: 1–11, 2013

Singh N, Luthra R, Sangwan RS. Effect of Leaf Position and Age on the Essential Oil Quantity and Quality in Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Planta medica*, 55: 254–256, 1989.

Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, 6: 169–182, 2014.

Sommer U, Liu H, Doering TL. An -1,3-Mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 47724–47730, 2003.

Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 247–249, 2002.

Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Júnior JO, Júnior GS, Lisboa OFL, Silva MRR. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 963–965, 2003.

Sousa PJC, Barros CAL, Rocha JCS, Lira DS, Monteiro GM, Maia JGS. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 8: 217–221, 2008.

Sorrell TC, Sharon CAC, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, Brownlee AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1253–1260, 1996.

Srichatrapimuk S, Sungkanuparph S. Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. *AIDS Research and Therapy*, 13: 42, 2016.

Srikanta D, Santiago-tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, 31: 47–60, 2014.

Staib F. Das Verhalten von *Candida albicans*- und *Cryptococcus neoformans*-Stämmen gegenüber human-serum-proteinen. *Mycopathol Mycol Appl*, 26: 209-24, 1965

Steinbach WJ , Reedy JL, Cramer RA , Perfect JR, Heitman J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature reviews. Microbiology* , 5: 418–430, 2007.

Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med*, 51: 21-26, 2005.

Tefsen B, Grijpstra J, Ordonez S, Lammers M, van Die I, de Cock H.. Deletion of the CAP10 gene of *Cryptococcus neoformans* results in a pleiotropic phenotype with changes in expression of virulence factors. *Research in Microbiology*. 165: 399–410, 2014.

Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, Rude TH, Toffaletti DT, John R. Perfect JR, Kurtz M. A glucan synthase *FKSI* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *Journal of Bacteriology*. 181: 444–53, 1999.

Urán ME, Cano E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Infectio*, 12: 128–148, 2008.

Valdés BSG. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39: 2005.

Vale-Silva LA, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E. Antifungal activity of the essential oil of thymus x viciosoi against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Planta Medica*, 76: 882–888, 2010.

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012: 713687, 2012.

Vidotto V, Koga-Ito CY, Canella D, Sinicco A, Di Perri G, Aoki S, Ito-Kuwa S. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Revista iberoamericana de micología*, 17: 14–9, 2000.

Vidotto V, Sinicco A, Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-kuwa S. *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 136: 119–123, 1996.

Wickenberg J, Lindstedt S, Nilsson J, Hlebowicz J. *Cassia cinnamon* does not change the insulin sensitivity or the liver enzymes in subjects with impaired glucose tolerance. *Nutrition journal*. 13: 96, 2014.

Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 180: 1570–1572, 1998.

Wills EA, Roberts IS, Del Poeta M, Rivera J, Casadevall A, Cox GM, Perfect JR. Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, MAN1, and its impact on pathogenicity. *Mol Microbiol*, 40: 610–20, 2001.

Xu Jm, 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, 2017.

Yoshida T, Toda T, Yanagida M. A calcineurin-like gene *ppb1* in fission yeast : mutant defects in cytokinesis , cell polarity , mating and spindle pole body positioning. *Jornal of cell science*. 107: 1725–1735, 1994.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological procedures online*, 6: 10–15, 2004.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009.

## 9. APÊNDICE

---

9.1 Tabela de resultados de CIM e CFM dos OEs *C. cassia* e *C. flexuosus* sob isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.

	<i>C. cassia</i>		<i>C. flexuosus</i>	
<i>C. neoformans</i>	CIM	CFM	CIM	CFM
L2	32	32	128	128
L3	32	32	128	128
L4	32	64	256	512
L5	32	64	128	256
L7	32	64	256	256
L14	32	64	128	256
L15	16	32	256	512
L18	16	32	128	256
L21	16	16	128	256
L23	16	32	128	256
L24	16	32	64	128
L28	16	32	16	32
L30	16	32	64	128
L41	64	64	128	128
ATCC 90112	8	32	64	128
<i>C. gattii</i>				
L1	32	64	128	128
L9	16	32	256	512
L20	16	64	128	256
L48	64	64	256	256
ATCC 24065	16	32	128	512

n = 20; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima

## 10. ANEXOS

---

### 10.1. Parecer do comitê de ética

## 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 R. Silva

Avaliamos o projeto supracitado e consideramos que o mesmo atende as normas preconizadas pelo CONEPE e os preceitos 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.

## 10.2 Laudo técnico do óleo essencial de *C. cassia*



### ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS Óleo Essencial de Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*)

CAS Number: 84961-46-6

	<b>Especificações</b>
Aparência	Líquido
Cor	Marrom
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	1,045 – 1,065
Índice de Refração (20°C)	1,595 – 1,615
Rotação Ótica	[-1° ; +1°]
Principais Componentes (aprox.)	Aldeído cinâmico = 81% Cumarina = 3% Benzaldeído = 3% Álcool cinâmico= 3 % Estireno = 3%

Estrada Mineração Ouro Branco, 2017 • Vargem Grande. Paulista • SP • CEP: 06730-000  
Tel.: 11.4159.1784 / 11.4158.3544 - Fax.: 11.4158.3420  
msn / e-mail: atendimento@ferquima.com.br  
www.ferquima.com.br

**FERQUIMA**  
Ind. e Com. Ltda

### 10.3 Laudo técnico do óleo essencial de *C. flexuosus*



## ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS

### Óleo Essencial de Lemongrass

(*Cymbopogon flexuosus*)

CAS Number: 91844-92-7

	<b>Especificações</b>
Aparência	Líquido Límpido
Cor	Amarelo a Alaranjado
Impurezas	Isento
Odor	Fresco, encorpado, limão
Densidade (20°C)	0,875 – 0,905
Índice de Refração (20°C)	1,475 – 1,495
Rotação Ótica	[-4° ; +1°]
Principais componentes (aprox)	Citral = 70 % (geranial = 40 %; neral = 30 %)

