

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Pós-Graduação em Biologia de Fungos

CRISDIANO SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE METABÓLITOS
BIOATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE**

RECIFE
2016

CRISDIANO SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE METABÓLITOS
BIOATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araújo, Crisdiano Santos Ferreira de

Potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* de metabólitos bioativos de plantas medicinais do Nordeste / Crisdiano Santos Ferreira de Araújo-Recife: O Autor, 2016.

72 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientador: Luiz Alberto Lira Soares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências e anexo

1. *Cryptococcus* 2. Metabólitos 3. Agentes antifúngicos 4. Plantas medicinais I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (orient.) II. Soares, Luiz Alberto Lira (coorient.) III. Título

579.55

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-367

CRISDIANO SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE METABÓLITOS
BIOATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 19/02/16

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto/UFPE

Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo/UFPE

Dra. Rejane Pereira Neves/UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder força, coragem e determinação de seguir sempre em frente.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Micologia, por disponibilizar e conceder a oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado em Biologia de Fungos.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

A meu orientador Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, pelo exemplo de profissional, pela orientação, dedicação, paciência, disponibilidade, apoio e amizade, indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Alberto Lira Soares, pela coorientação, por também ser um exemplo de profissional e por toda contribuição científica e amizade.

Aos (as) Professores (as) do departamento de Micologia Médica da UFPE Prof. Armando Marsden Lacerda Filho, Prof^a. Rejane Pereira Neves e Prof^a. Oliane Maria Correia Magalhães por toda ajuda, contribuição científica e amizade.

Aos professores das disciplinas cursadas durante o mestrado, contribuindo significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial Rubens Moraes (*in memoriam*).

A todos os colegas que fazem parte do Departamento de Micologia, especialmente do Laboratório de Micologia Médica, aos colegas de turma e a todos que conheci durante o Mestrado, e amizades formadas. Em especial a Flávio Bomfim e Magda Ferreira pela grande ajuda durante a fase experimental.

Aos meus pais José Ferreira de Araújo e Maria Vaneide Santos de Araújo pela paciência e por estarem sempre ao meu lado me dando apoio, força e coragem para seguir em frente, aos quais serei eternamente grato.

A minha esposa Nayara Nunes de Assis Silva, por estar sempre comigo, pela paciência e compreensão, além de colaboração neste trabalho.

A toda minha família, pelo apoio, em especial a minha irmã Chrisjacele Santos Ferreira de Araujo, minha avó Maria José dos Santos e meu tio Jaudiano Antônio por me incentivarem em todas as minhas escolhas.

“Nem tão longe que eu não possa ver. Nem tão
Perto que eu possa tocar. Nem tão longe que
eu não possa crer que um dia eu chego lá.”
Humberto Gessinger, 1997.

RESUMO

O complexo *Cryptococcus* compreendem leveduras capsuladas que causam a criptococose, fungos estes que já apresentaram relatos de resistência aos antifúngicos disponíveis, tornando-se um problema de saúde pública. Foi avaliado o potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos presentes em plantas medicinais do Nordeste brasileiro. Trata-se de uma pesquisa experimental e analítica. Os vegetais pesquisados foram *Eugenia uniflora* L., *Libidibia ferrea* Mart., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi. frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (n=30) e *Cryptococcus gattii* (n=05), estocados da Coleção de Culturas URM da UFPE. Os isolados foram confirmados por taxonomia clássica e espectrometria de massas, através da técnica de MALDI-TOF MS. Para o teste de sensibilidade *in vitro*, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas seguindo o protocolo M27-A3. A avaliação do sinergismo seguiu o método de *Checkerboard*. Em seguida, a atividade antifúngica *in vivo* seguiu o modelo de infecção experimental de criptococose sistêmica, em cinco grupos com oito ratos *Wistar* cada, obtidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia da UFPE, a seguir: Grupo 1 (G1) = apenas imunossuprimido; G2 = imunossuprimido infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato vegetal que apresentou menores valores de CIM's. Os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida, infectados via veia caudal com 100µL de uma suspensão de 10^7 células/mL e acompanhados por 28 dias para determinação da taxa de sobrevivência. A Significância estatística foi determinada segundo análise não paramétrica de Kaplan-Meier com $p < 0,5$. E a toxicidade do composto foi determinada por DL₅₀. Todos os testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados em duplicata. O extrato de *Eugenia uniflora* não apresentou atividade antifúngica. Os extratos obtidos de *Libidibia férrea* e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) apresentaram atividade inibitória entre 8-2.048 µg.mL⁻¹. Compostos de *Schinus terebinthifolius* apresentaram as menores CIM com valores entre 4 a 512 µg.mL⁻¹. A avaliação combinada entre anfotericina B e o extrato de *Schinus terebinthifolius* se apresentou antagonica para dez isolados de *C. neoformans*, cinco de *C. gattii* e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, entretanto a combinação com fluconazol se demonstrou aditiva para sete isolados de *C. neoformans* e a ATCC 22019, e indiferente para três isolados de *C. neoformans* e cinco *C. gattii*. O ácido gálico padrão, em combinação com fluconazol ou anfotericina B, demonstrou-se indiferente ou antagonico respectivamente, frente aos isolados de *C. neoformans*, *C. gattii* e ATCC 22019. Na criptococose experimental, a imunossupressão foi eficaz, pois os ratos apresentaram leucograma de 0,11 a $0,52 \cdot 10^3/\mu\text{L}$. G5 apresentou valores significantivos de Log-rank quando comparados aos G3 e G2 ($p=0,0001$). Marcadores séricos não evidenciaram comprometimento renal ou hepático após o tratamento com *Schinus terebinthifolius*. *Schinus terebinthifolius* não apresentou toxicidade. Plantas medicinais constituídas por compostos bioativos são promissoras para a formulação de novos fármacos, podendo atuar como alternativa terapêutica no tratamento da criptococose.

Palavras-chave: Complexo *Cryptococcus*. Criptococose. Sensibilidade antifúngica. Alternativas terapêuticas. Plantas medicinais. Sinergismo.

ABSTRACT

The *Cryptococcus* complex comprises encapsulated yeasts that cause cryptococcosis, which have had reports of resistance to the available antifungal agents, becoming a public health problem. The *in vitro* and *in vivo* antifungal potential of bioactive compounds from medicinal plants of the Brazilian Northeast were evaluated. This is an experimental and analytical research. The studied plants were *Eugenia uniflora* L., *Libidibia ferrea* Mart., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi. in contrast to clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* (n=30) and *Cryptococcus gattii* (n=05), stocked at the URM Culture Collection of UFPE. The isolates were identified by classical taxonomy and mass spectrometry by MALDI-TOF MS technique. For the sensitivity test *in vitro*, the minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined following the M27-A3 protocol. Synergism was evaluated following the Checkerboard method. *In vivo* antifungal activity followed the model of experimental infection of systemic cryptococcosis in groups of eight conventional Wistar rats obtained from the Department of Pharmacology and Physiology CCS/UFPE, in which: Group 1 (G1) = immunosuppressed rats; G2 = infected immunosuppressed rats; G3 = infected immunosuppressed rats treated with fluconazole; G4 = infected immunosuppressed rats treated with amphotericin B and G5 = infected immunosuppressed treated with plant extrat that presented lower values of MIC. The animals were immunosuppressed with cyclophosphamide and infected via the tail vein with 100 μ L of a suspension of 10⁷ cells/mL. They were accompanied for 28 days to determine the survival rate. Statitical significance was determined by non-parametric analysis of Kaplan-Meier, and its toxicity by LD₅₀. All realized tests were in duplicated. *Eugenia uniflora* extrats did not present antifungal activity. All compounds obtained from *Libidibia ferrea* and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) showed inhibitory activity ranging from 8-2.048 μ g.mL⁻¹. *Schinus terebinthifolius* compounds had the lowest MIC values from 4 to 512 μ g.mL⁻¹. When combined with amphotericin B, *Schinus terebinthifolius* extracts presented antagonistic activity for ten strains of *C. neoformans*, five *C. gattii* and ATCC 22019 *Candida parapsilosis*, however the combination with fluconazole has demonstrated additive activity to seven isolates of *C. neoformans* and ATCC 2219 *C. parapsilosis*, and indifferent activity for three isolates of *C. neoformans* and five *C. gattii*. Standard Gallic acid when combined with fluconazole or amphotericin B has demonstrated indifferent or antagonistic activity respectively, to isolates of *C. neoformans*, *C. gattii* and ATCC 22019 *C. parapsilosis*. In the experimental model *in vivo*, the immunosuppression was effective, as the rats showed white blood cells counting ranging from 0.11 to 0,52x10³/ μ L. G5 group compared to G3 and G2 groups presented significant values of Log-rank (p=0.0001). Serum values showed that there was no kidney or liver impairment mice after treatment with *Schinus terebinthifolius*. *Schinus terebinthifolius* has showed no toxicity. Medicinal plants with bioactive compounds are promising for the development of new drugs, which can act as a therapeutic alternative for the treatment of cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus* complex. Cryptococcosis. Antifungal sensitivity. Therapeutic alternatives. Medicinal plants. Synergism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>Cryptococcus</i> . A PARTE SUPERIOR DA IMAGEM MOSTRA O CICLO COM FUSÕES DE LEVEDURAS <i>MATING TYPE</i> A E A OPOSTO. NA PARTE INFERIOR A IMAGEM MOSTRA A FRUTIFICAÇÃO QUE OCORRE ENTRE FUNGOS COM O MESMO <i>mating type</i>	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ANFOTERICINA B	28
FIGURA 3 – ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO DA ANFOTERICINA B	29
FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES	37
FIGURA 5 – ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DE DUAS DROGAS DIFERENTES PARA AVALIAÇÃO DO SINERGISMO	44
FIGURA 6 – MÉTODO DE <i>CHECKERBOARD</i> RESULTANTE DA COMBINAÇÃO DE DUAS DROGAS.....	44
FIGURA 7 – MÉTODO E-TEST PARA A DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA DE DOIS FÁRMACOS DIFERENTES.	46
FIGURA 08 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> POR CLAE-DAD	47
FIGURA 09 – CULTURA DE SANGUE FEITA 48 HORAS SEGUINTE A INFECÇÃO	53
FIGURA 10 – SOBREVIVÊNCIA ACUMULADA A PARTIR DO PRIMEIRO DIA DA INFECÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS... ..	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSE DE COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS EM PLANTAS DE ACORO COM SUAS ESTRUTURAS	34
TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	48
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) DE COMPOSTOS DE PLANTAS MEDICINAIS, ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL FRENTE AOS ISOLADOS FÚNGICOS <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> E <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	50
TABELA 4 –AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i> E ÁCIDO GÁLICO COMBINADO COM ANFOTERICINA B (AMB) E FLUCONAZOL (FLU). FRENTE A ISOLADOS FÚNGICO DE <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> E <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	51
TABELA 5 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR ANTES DA INFECÇÃO. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA $\pm$. DESVIO PADRÃO E (N) – NÚMERO DE ANIMAIS	52
TABELA 6 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR REALIZADOS NO NONO DIA APÓS A INFECÇÃO. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA $\pm$. DESVIO PADRÃO E (N) – NÚMERO DE ANIMAIS	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	- Anfotericina B
ATCC	- American Type Culture Collection
CCS	- Centro de Ciências da saúde
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CGB	- Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLSI	- <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DL	- Dose letal
DMSO	- Dimetilsulfoxido
EB	- Extrato bruto
FAE	- Fração acetato de etila
FAQ	- Fração aquosa
FICI	- Índice da Concentração Inibitória Fracionária
FLU	- Fluconazol
GXM	- Glucuronoxylomannan
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
LCR	- Líquido cefalorraquidiano
MALDI	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
mL	- mililitro
Mg	- Miligrama
MS	- <i>Mass Spectrometer</i>
TOF	- <i>Time of Fligh</i>
ITC	- Itraconazol
RPM	- Rotação por minuto
SNC	- Sistema Nervoso Central
UFC/mL	- Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
µL	- Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO.....	15
1.2	OBJETIVOS.....	15
1.2.1	Objetivo Geral.....	15
1.2.2	Objetivos Específicos.....	15
1.3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	16
1.3.1	ISOLADOS FÚNGICO.....	16
1.3.1.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS).....	16
1.3.2	MATERIAL VEGETAL.....	17
1.3.2.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	17
1.3.2.2	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO AQUOSA (FAQ).....	17
1.3.2.3	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	18
1.3.3	ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS.....	18
1.3.3.1	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO PELO MÉTODO DE <i>CHECKERBOARD</i>	19
1.3.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VIVO</i>	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	COMPLEXO <i>cryptococcus</i> sp.....	22
2.2	CRÍPTOCOCOSE.....	23
2.2.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL.....	25
2.2.2	TRATAMENTO DA CRÍPTOCOCOSE.....	27
2.2.2.1	ANFOTERICINA B.....	28
2.2.2.2	FLUCONAZOL.....	30
2.3	RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA DE <i>Cryptococcus</i> sp.....	30
2.4	PRODUTOS NATURAIS E NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	31
2.4.1	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	33
2.4.2	FLAVONÓIDES.....	35
2.4.3	TANINOS.....	36
2.5	ESPÉCIES VEGETAIS.....	37
2.5.1	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.).....	38
2.5.2	<i>Eugenia uniflora</i> L.	39
2.5.3	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart ex Tul).....	42
2.5.4	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	41
2.6	SINERGISMO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO.....	42
2.6.1	MÉTODO DE <i>CHECKERBOARD</i>	43
2.6.2	MÉTODO DE TIME-KILL.....	45
2.6.3	MÉTODO EPSILOMÉTRICO (E-TEST).....	45
3	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI.....	47
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF MS).....	48
3.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICAS <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS DE INTERESSE.....	49

3.3.1	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS E ÁCIDOGÁLICO EM COMBINAÇÃO COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL.....	51
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICAS <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO BRUNTO DE <i>Schinus terebinthifolius</i>	52
3.4.1	TOXIDADE DE <i>Schinus terebinthifolius</i>	55
4	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	72

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções por fungos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, acarretando altos índices de mortalidade que atingem até 60% dos pacientes acometidos, sendo criptococose a quarta infecção oportunista mais incidente em pacientes com o vírus da Imunodeficiência Humana. Consequentemente, torna-se fundamental o seguimento clínico e laboratorial micológico destes pacientes (CASALI et al., 2001; CONSENSO, 2008).

Leveduras do Complexo *Cryptococcus* se apresentam como capsuladas, as quais podem ser encontradas em diversos nichos ecológicos principalmente em excretos de pombos e troncos de árvores (CONSENSO 2008; FARIA et al., 2010; REOLON et al., 2004; SEVERO et al., 2009).

De contágio inicial por via respiratória e causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, fungos oportunistas que acometem humanos e animais, a criptococose estar diretamente ligada a infecções de pessoas com o sistema imune comprometido, mas não exclusivamente, podendo também atingir pessoas com o sistema imunológico normal (CONSENSO, 2008; FARIA et al., 2010).

O antifúngico de escolha depende principalmente do sítio de infecção e das características imunológicas do hospedeiro. Os antifúngicos recomendados e amplamente utilizados são, anfotericina B em uma dosagem de 0,5-1,0 mg/Kg/dia ou combinado com 5-flucitosina (100 mg/kg/dia) e fluconazol (400mg/dia) (PERFECT et al., 2010; SEVERO et al., 2009).

Alternativas terapêuticas a partir de plantas medicinais e seus compostos bioativos, embora, venham ganhando destaque em todo o mundo até o momento não são utilizadas clinicamente na criptococose. Diversos estudos são realizados com a finalidade de avaliar a capacidade antifúngica e antibacteriana de vegetais e seus compostos (OLIVEIRA et al., 2014).

As propriedades terapêuticas observadas em plantas utilizadas na medicina popular comprovam que a biodiversidade vegetal possui numerosos compostos bioativos, promissores na produção de novos fármacos (MORAIS-BRAGA et al., 2013). Além disso, frequente resistência de micro-organismos tem conduzido a busca por novos agentes terapêuticos, envolvendo pesquisas desde Briófitas até Angiospermas quanto às atividades farmacológicas que apresentem alternativas no combate às infecções fúngicas (SANTOS et al., 2010).

Cepas de *Cryptococcus* sp. vem apresentando, frequentemente, resistência as opções dos limitados fármacos disponíveis, como o fluconazol e a anfotericina B associada ou não a flucitosina. Dessa forma, pesquisas são necessárias para desenvolver novas drogas antifúngicas e novas estratégias terapêuticas. (OLIVEIRA et al., 2014; PEREA et al., 2002; SILVA et al., 2008)

Segundo Casali et al. (2001) pacientes com HIV acometidos com a criptococose podem apresentar recorrência após o tratamento, provavelmente devido a reativação da infecção pela linhagem que a originou. Entretanto, estudos também relatam a infecção por outras linhagens.

1.1 Problematização

Paralelo ao aumento do número de casos, e o desenvolvimento de mecanismos de resistência, as espécies como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, frente a fármacos utilizados, a criptococose tem se tornado um problema de saúde pública. Neste contexto, testes de sensibilidade são empregados para prever o sucesso terapêutico (OLIVEIRA et al., 2014; PEREA et al., 2002; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2008).

Os fármacos de escolha no tratamento da criptococose, em grande maioria possuem toxicidade, o que acarreta inúmeros efeitos colaterais, além desses, o surgimento da resistência antifúngica tem tornado constante a busca por novos agentes terapêuticos eficazes, envolvendo compostos bioativos, presentes em plantas medicinais associadas as suas diversas atividades farmacológicas (CHEN et al., 2015; MORAIS-BRAGA et al., 2013).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Obter extratos brutos e frações de plantas medicinais do Nordeste e avaliar seu potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o material vegetal de quatro plantas medicinais do Nordeste;
- b) Obter a fração Acetato de Etila e a Fração Aquosa a partir do extrato bruto das plantas medicinais caracterizadas;
- c) Confirmar a identificação dos isolados clínicos de *Cryptococcus* por espectrometria de massa;
- d) Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos frente aos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

- e) Avaliar o sinergismo a partir da combinação de extratos vegetais com as drogas convencionais anfotericina B e fluconazol.
- f) Avaliar a toxicidade *in vivo* do extrato de interesse;
- g) Avaliar o potencial antifúngico do extrato de interesse através de modelo de criptococcose experimental.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 ISOLADOS FÚNGICOS

Nos ensaios, foram utilizados 30 isolados de *Cryptococcus neoformans* e seis de *Cryptococcus gattii* estocados da Coleção de Cultura URM da Universidade Federal de Pernambuco, e também, uma linhagem de referência *Candida parapsilosis* ATCC 22109 como teste controle.

1.3.1.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS)

Os isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose ágar e incubados durante 48 horas a 37°C. Após o crescimento, três a cinco colônias de levedura foram transferidas para um tubo Eppendorf contendo 300 µL de água destilada, e em seguida a suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Na sequência, 900 µL de álcool absoluto foi adicionado em cada Eppendorf e homogeneizado. As amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 13000g e o sobrenadante foi removido.

Após a formação do *pellet*, 50 µL de ácido fórmico a 70% e um volume equivalente de acetonitrila foi adicionado, misturados em vórtex e posteriormente centrifugados por 2 min a 13000g.

Do sobrenadante de cada isolado, 1 µL foi adicionado em duplicata no interior do *spot* da placa em aço do MALDI, e mantidos a temperatura de 27°C. Posteriormente, foi recoberto com 1 µL da matriz orgânica contendo uma solução saturada de α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético.

As placas foram secas em temperatura de 27°C e introduzidas no espectrômetro de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) para em seguida ser obtido os espectros protéicos.

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através do laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada acima do limiar para a produção de íons. Para

calibração foi usado um kit protéico (*protein calibration standart I*, Bruker Daltonics, Bilerica, MA, USA) conhecidos valores de massa das proteínas foi usado para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos foi exportada no software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e as identificações finais foram baseadas na presença ou ausência de cada pico no espectro (McTaggart et al., 2011).

1.3.2 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi constituído de folhas de *Eugenia uniflora* L.(89989), cascas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) (86735) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (86681), e frutos de *Libidibia ferrea* Mart. (88145). As espécies foram coletadas em Pernambuco (PE) e identificadas por membros do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Todo material vegetal estar mantidos no Laboratório de Farmacognosia da Univerisdade Federal de Pernambuco.

1.3.2.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

O material vegetal seco e moído foi levado a um liquidificador industrial por 20 minutos, com intervalos de 5 minutos a cada ciclo extrativo. Para cada 50 g de material vegetal, seca e moída, foram adicionados 500 mL de água ou a mistura acetona:água (1:1 ou 7:3; v/v) como líquidos extratores, na proporção inicial de planta/solvente de 10% (p/v). Após filtração de cada extrato e posterior a evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40 °C), os extratos foram congelados em freezer a 80°C e liofilizados, obtendo-se assim os extratos brutos (EB) (ISHIDA et al., 2006; FERREIRA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014).

1.3.2.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO AQUOSA (FAQ)

O extrato bruto total foi disperso em água destilada e particionado 10 a 12 vezes com acetato de etila (ISHIDA et al., 2006). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico,

congeladas e liofilizadas, sendo obtidas as frações acetato de etila (FAE). A fase aquosa restante foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FAQ).

1.3.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos/frações foram caracterizados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o teor de polifenóis totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível, foi calculado com base na metodologia proposta pelos códigos oficiais (FB5, 2010).

1.3.3 ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS *IN VITRO* DOS EXTRATOS

A determinação da CIM seguiu o protocolo do documento M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes foi RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) tamponado com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) e ajustado em pH $7 \pm 0,1$. Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada, respectivamente. Em seguida foram avaliados em concentrações variando de 4 a $2.048 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente aos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Os antifúngicos comercialmente disponíveis avaliados foram a anfotericina B (*Bristol-Myers Squibb*) diluída em DMSO e fluconazol (Pfizer) preparados em água destilada em concentrações variando de 0,015 a $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,125 a $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B e fluconazol respectivamente.

As leveduras foram

mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar suplementado de extrato de levedura e incubadas a 35°C por 48 horas. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (8,5 g/L) e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm.

Em seguida foram realizadas diluições em série, do inóculo, primeiro de 1:100 ($2,5 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$) em salina e depois em meio líquido RPMI 1640 de 1:20 ($1,0 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$).

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de microtitulação planas com 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). Os inóculos foram adicionados aos poços com os antifúngicos, e as placas incubadas a 35°C por 72 horas. As CIM's foram determinadas em relação aos poços controles em 100% e 50% para anfotericina B e fluconazol.

1.3.3.1 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO PELO MÉTODO DE *CHECKERBOARD*

Seguindo o protocolo do documento M27-A3 (CLSI, 2008), porém, modificando a fase da preparação das placas, para dessa forma, combinar o extrato bruto mais os antifúngicos convencionais, adaptado de Lewis et al. (2002) e Odds et al. (2003).

A droga foi colocada na primeira fileira na posição 10 e em sentido vertical e feitas diluição sucessivas na horizontal da direita para esquerda, decaindo assim, as concentrações até a posição 01. Na horizontal a segunda droga foi colocada na primeira fileira de posição A e em seguida foram feitas diluições seriadas em sentido vertical até a posição H para o decaimento da concentração. As posições 11 e 12 foram usadas como controle positivo e negativo.

Os antifúngicos comercialmente disponíveis avaliados foram a anfotericina B colocado na placa com a concentração variando de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Fluconazol em concentrações variando de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração de *Schinus terebinthifolius* foi preparada em uma concentração entre $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A interpretação do sinergismo da combinação do extrato com os fármacos foi baseada no cálculo do somatório dos índices de Concentração inibidora fracional (ICIF) (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003).

Os parâmetros para avaliação da interação medicamentosa seguiu o modelo de Lewis et al. (2002). O sinergismo foi determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Medicamentos são considerados Aditivos quando o ICIF foi $> 0,5$ e < 1 . Indiferentes foram definidos quando o ICIF for ≥ 1 e < 4 , e o antagonismo foi determinado quando o ICIF for ≥ 4 .

1.3.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VIVO*

A atividade antifúngica *in vivo* do extrato mais efetivo, de acordo com os testes *in vitro*, foi analisada através do modelo de infecção experimental de criptococose em ratos *Wistar* convencionais com oito a 12 semanas de idade, pesando 250 g, obtidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do CCS/UFPE.

Modelo murino neutropênico foi realizado para se atingir a criptococose disseminada de acordo com Andes et al., 2008. A neutropenia nos animais (contagem de células polimorfos nucleares $< 100/\text{mm}^3$) foi induzida pela injeção de ciclofosfamida (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, IN) subcutaneamente quatro dias antes da infecção fúngica (150 mg/Kg de peso corpóreo), um dia antes da infecção (75 mg/Kg) e dois dias após a infecção

(75 mg/Kg). A contagem total de leucócitos no sangue dos animais foi realizada com a finalidade de confirmar a imunossupressão.

O inóculo fúngico URM 5814 *Cryptococcus neoformans* foi suspenso em 5 mL de solução salina esterilizada a 0,9% com 10^7 células/mL ajustada em espectrofotômetro. Criptococose disseminada foi atingida pela injeção de 0,1 mL do inóculo via veia caudal 48 horas antes do início da terapia com o extrato.

O extrato bruto de *Schinus terebinthifolius* Act:Aq (1:1) foi diluído em *phosphate buffered saline* (PBS) e administrado por via oral em uma concentração de 500 mg.Kg^{-1} , por sete dias consecutivos após o desafio e da partir da infecção por um dos isolados de espécie de *Cryptococcus*. Os grupos foram divididos em: (G1) = imunossuprimido; G2 = imunossuprimido infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato.

A eficácia da substância foi avaliada através do prolongamento da taxa de sobrevivência dos animais e pela ausência de células de leveduras nas amostras de sangue analisadas. Para estudo de sobrevivência, os animais foram observados diariamente por 28 dias a partir do início da infecção. Amostras de 2 mL de sangue caudal foram coletados e analisadas em um, três, sete e quinze dias após desafio em todos os animais sobreviventes. Após o término os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO_2 .

Os exames micológicos foram realizados com a preparação de lâminas clarificadas com hidróxido de potássio, e cultura em ágar Sabouraud. Após o retrocultivo foi realizado a confirmação taxonômica por espectrometria de massa MALDI-TOF MS.

Um total de oito ratos *Wistar* com média de peso de 200-250 g mantidos em jejum de 12 horas antes dos ensaios. Os animais receberam 5 g.Kg^{-1} do extrato bruto de *Schinus terebinthifolius* Act:Aq (1:1) por via oral, e foram acompanhados por 30 dias (PIRES et al., 2004).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPLEXO *Cryptococcus*

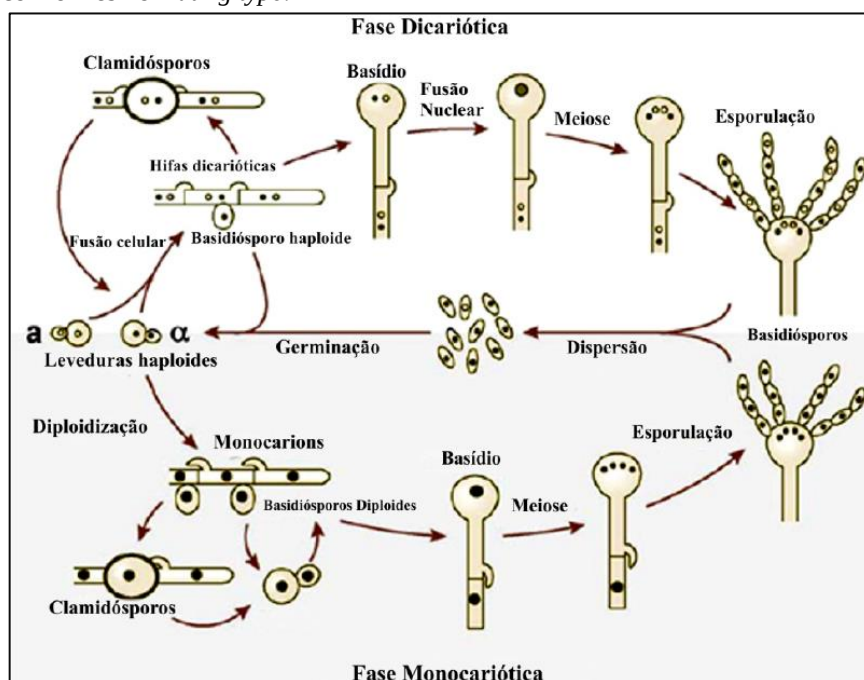
Na micologia médica *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são leveduras de grande importância, por serem agentes etiológicos da criptococose, micose oportunista que acometem humanos e animais (CONSENSO 2008; GOMES et al., 2010; REOLON et al., 2004).

Espécies de *Cryptococcus* apresentam distribuição mundial e podem ser isolados em excretas de aves e árvores. Quando presentes em excretas de pombos dessecadas formam partículas infectantes compostas por basidiósporos ou leveduras desidratadas passíveis de serem inaladas permanecendo viáveis por cerca de dois anos (CASALI et al., 2001; CONSENSO, 2008).

A classificação taxonômica segue de acordo com as características fenotípicas e genéticas de seus teleomorfos. Reino: Fungi. Filo Basidiomycota. Classe: Hymenomycetes. Ordem: Tremellales. Família: Tremellaceae. Gênero: *Filobasidiella* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

O ciclo de vida de *Cryptococcus spp.* é composto por dois estágios, sexual e assexual como apresentado na figura 1 (SEVERO et al., 2009).

Figura 1 – Ciclo de vida de leveduras do Complexo *Cryptococcus*. A parte superior da imagem mostra o ciclo com fusões de leveduras *mating type a* e α oposto. Na parte inferior a imagem mostra a frutificação que ocorre entre fungos com o mesmo *mating type*.



Fonte: Lin; Heitman, 2006.

Atualmente *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram divididos em duas espécies, de acordo com a sua fase teleomorfa, *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* respectivamente (KWON-CHUNG et al., 2011).

A espécie de *Cryptococcus neoformans* é constituída por duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) enquanto que as espécies de *Cryptococcus gattii* apresentam sorotipo B e C (KWON-CHUNG et al., 2011; SEVERO et al., 2009).

De acordo com Kwon-Chung et al. 2011 e Severo et al. 2009, o complexo pode ser dividido em cinco sorotipos distintos e nove genótipos.

A principal característica dessas espécies é a presença de uma capsula de mucopolissacarídeo em volta de suas células, considerada o principal fator de virulência, particularidade que o diferencia de outros fungos patogênicos. Estudos bioquímicos demonstram que a capsula é estruturada principalmente por um polímero o glucuronoxylomannan (GXM), o qual representa cerca de 90% na composição da mesma (CONSENSO 2008; LACAZ et al., 2002; ROCHA et al., 2015).

Segundo Casali et al. (2001) outros fatores associados à virulência é a presença da fenoloxidase, enzima sintetizadora da melanina e outros pigmentos a partir de precursores fenólicos e da enzima uréase.

A principal via de infecção das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as vias respiratórias, através da inalação de propágulos infecciosos, os quais podem sobreviver em latência no pulmão e posteriormente reativar para causar a doença no hospedeiro (COELHO et al., 2014; CONSENSO 2008; FARIA et al., 2010).

Cryptococcus neoformans estar frequentemente relacionado a indivíduos com o sistema imunológico comprometido, enquanto que as infecções por *Cryptococcus gattii* são observadas com maior prevalência em indivíduos imunocompetentes (PEDROSO et al., 2007).

Identificado em 1894 por Sanfelice, o *Cryptococcus gattii* é um dos principais fungos patogênicos para humanos por causar infecções respiratórias e disseminadas, estando principalmente relacionado a indivíduos imunocompetentes. Sua distribuição ocorre nos trópicos e subtropicais, sendo isolado em diversos nichos ecológicos, principalmente em árvores como da espécie *Eucalyptus camaldulensis* (GOMES et al., 2010; PEDROSO et al., 2007; SLOAN E PARRIS 2014).

Diferente de *Cryptococcus gattii* espécie associada a árvores, as espécies de *Cryptococcus neoformans* estão associadas à excretas de aves e solos contaminados por cepas infectantes (CASALI et al., 2001; CONSENSO 2008; REOLON et al., 2004).

De acordo com Casali et al. (2001) a capacidade de se associar a excretas de aves das espécies de *Cryptococcus neoformans* ocorre a partir de uma adaptação bioquímica, na habilidade de assimilar creatinina, ácido úrico e purinas como fontes de nitrogênio, compostos encontrados em abundância nesse nicho ecológico. Embora capaz de assimilar creatinina, *Cryptococcus gattii* não está associado à excretas de aves.

Em 2004, *Cryptococcus gattii* foi o responsável por um aumento significativo na quantidade de casos de criptococose em imunocompetentes entre humanos e animais em uma área compreendida no Canadá e a noroeste dos Estados Unidos. A criptococose se apresentou primariamente como lesão pulmonar regressiva, sendo detectada na formação de nódulos pulmonares periféricos que se diferenciam em tumores malignos (KIDD et al., 2004; PERFECT et al., 2010; SANTOS et al., 2008).

Segundo Gomes et al. (2010) as espécies de *Cryptococcus neoformans* e de *Cryptococcus gattii* apresentam fatores de virulência tais como a capacidade de produzir melanina, presença de uma cápsula em volta de suas células e crescimento a 37°C.

2.2 CRIPTOCOCOSE

Criptococose é uma micose sistêmica também conhecida como torulose, blastomicose européia, ou doença de Busse-Buschke (CONSENSO, 2008; FARIA et al., 2010).

Em 1894 *Cryptococcus neoformans* foi isolado primeiramente por Sanfelice na Itália em suco de pêssago e em 1985 isolado por Busse na Alemanha em um paciente com uma lesão na tibia. Porém só teve proporções mundiais a partir do advento do HIV. Em 2000 a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) publicou “Orientações práticas para a gestão da doença criptococose” (PARK et al., 2009; PERFECT et al., 2010; SAAG et al., 2000).

A criptococose é uma micose profunda e oportunista de distribuição cosmopolita que acomete grande variedade de mamíferos incluindo humanos, tendo como principal porta de entrada as vias respiratórias, através da inalação de propágulos infecciosos (CONSENSO, 2008; FARIA et al., 2010; PARK et al., 2009).

Principalmente causada por duas espécies de fungos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* a criptococose apresente uma significativa prevalência em pacientes com deficiências imológicas nas células T, principalmente aqueles infectados com o vírus do HIV,

aumentando a probabilidade de infecção (MEYA et al., 2015; PERFECT et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

A doença pode se caracterizar a partir de uma infecção aguda ou após a reativação de um período de latência em granulomas. Devido ao tropismo pelo sistema nervoso central a principal manifestação clínica da doença é a meningite criptocócica (COELHO et al., 2013; GOMES et al., 2010).

A infecção pulmonar pode dar origem à disseminação por via hematogênica até o comprometimento do sistema nervoso central, e em formas mais raras, comprometer outros órgãos como ossos e pele (ROEBUCK et al., 2015).

De acordo com Neofytos et al. (2010) a criptococose ocorre em cerca de aproximadamente 2% a 8% em pacientes transplantados.

Segundo Meya et al. (2015) *Cryptococcus neoformans* consegue atravessar a barreira do sangue e chegar ao cérebro por três mecanismos: via células endoteliais (paracellular), via endotelial cerebral (transcitose), e dentro de monócitos ou macrófagos infectados (cavalo de Tróia).

O acometimento do sistema nervoso central é a manifestação clínica mais comum da criptococose e entre as sequelas se destacam o acidente vascular cerebral, hidrocefalia, cegueira e surdez. A infecção pulmonar é a segunda manifestação clínica mais comum, seguido da pele, olhos e doenças gênito-urinário (SPEED et al., 1995).

Segundo Bii et al. (2007) o risco para pacientes com HIV serem acometidos por meningite criptocócica e globalmente estimado em aproximadamente 6-8% para os adultos e para as crianças de 1%.

Araujo et al. (2012) descreveram um caso de criptococose intra-abdominal causado por *Cryptococcus gattii* em um paciente imunocompetente com diabetes tipo II. O paciente foi inicialmente tratado com anfotericina B com doses de 1mg/kg/dia durante 21 dias, seguindo por fluconazol (800 mg/dia). Em sequência ao tratamento o paciente acometido apresentou melhora progressiva dos seus sintomas.

Leechawengwongs et al. (2014) relataram um caso de criptococose cutânea primária causada por *Cryptococcus gattii* em uma mulher com 48 anos de idade sobrevivente do tsunami da Tailândia. A recuperação da paciente foi obtida a partir do tratamento com anfotericina B associado à itraconazol, e em seguida, doses de manutenção com fluconazol.

Recentemente Wang et al. (2015) descreveram um caso de criptococose cutânea primária causado por *Cryptococcus neoformans* em um paciente imunossuprimido decorrente da administração de um corticosteroide em doses elevadas para o tratamento de asma. Os

resultados apresentados pelos autores mostraram que a terapia com fluconazol foi bem sucedida.

Sivaranjini et al. (2015) relataram um caso de meningoencefalite criptocócica em um jovem, imunocompetente, no sul da Índia, região geográfica não endêmica para infecções por *Cryptococcus gattii*. O paciente foi inicialmente tratado com anfotericina B, mas desenvolveu reação anafilática, e a medicação de escolha para continuar a terapia foi fluconazol. Apesar da terapia intensiva, a doença progrediu rapidamente e o paciente foi a óbito.

Mukhopadhyay et al. (2015) apresentaram um relato de caso de criptococose cerebral causada por *Cryptococcus gattii* em um paciente do sexo masculino de 73 anos de idade morador da região nordeste da Índia, que apesar de considerado imunocompetente, o paciente demonstrava sintomas de cefaleia grave, vômitos, perda de apetite e desequilíbrio motor. O tratamento iniciado com anfotericina B e continuado com fluconazol foi satisfatório a recuperação do paciente.

Lin et al. (2014) relataram um caso de pneumonia necrotizante, que acarretou o desenvolvimento de uma meningite por *Cryptococcus gattii* em um paciente vietnamita do sexo masculino com 32 anos de idade. Após o tratamento inicial com anfotericina B associada à flucitosina, e posteriormente com fluconazol, o paciente se recuperou sem apresentar sequela neurológica.

2.2.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

O diagnóstico da criptococose se dá a partir da avaliação clínica, seguido da pesquisa laboratorial do agente em materiais biológicos tais como líquido cefalorraquidiano (LCR) escarro, ganglios e lesões cutâneo-mucosas (LACAZ et al., 2004).

Os métodos são relativamente simples proporcionando boas estratégias. Entre as técnicas incluem o exame direto a partir de fluidos corporais contrastados com tinta da China, também conhecida como nanquim, para visualização da cápsula, isolamento do fungo em meios específico, provas bioquímicas, exames histopatológicos dos tecidos infectados, e técnicas imunológicas para a pesquisa de antígeno específico (LACAZ et al., 2002; PERFECT et al., 2014; PEDROSO et al., 2007).

A preparação com tinta da China revela células de leveduras com diferentes tamanhos, em diâmetro médio de 4 a 6 μm , geralmente globosos ou ovais, apresentando brotação e duplo contorno que as tornam altamente refráteis (CASALI et al., 2001).

Espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* crescem em meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose, em uma temperatura de 30-38°C, apresentando colônias brilhantes, de cor branca a

creme, textura mucoide e margem lisa (KWON-CHUNG & FELL, 1984; SEVERO et al., 2009).

A capacidade de produzir melanina é uma característica bastante utilizada nos laboratórios para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O pigmento é revelado a partir do crescimento fúngico em meios de cultura específicos, enriquecidos por composto fenólicos ou difenólicos. O meio ágar níger composto por fenólicos é utilizado para a diferenciação das espécies de *Cryptococcus*, a partir da detecção da atividade da fenoloxidase produzindo melanina e tornando as colônias marrons escurecidas (KWON-CHUNG et al., 1984; PEDROSO et al., 2007; SEVERO et al., 2009).

As espécies de *Cryptococcus* podem ser diferenciadas devido à mudança de cor sobre o meio CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol). O princípio do teste se baseia na resistência que *Cryptococcus gattii* apresenta a L-canavanina, utilizando a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, sendo capaz de crescer no meio CGB. A partir do crescimento fúngico, ocorre à produção de amônia e elevação do pH, alterando a coloração do meio da cor verde para azul (BAUTERS et al., 2002).

Teste de látex revestida com anticorpos é utilizado para a detecção do antígeno polissacarídeo de *Cryptococcus* sp. encontrados em materiais biológicos como soro e LCR apresentando uma sensibilidade entre 90-100% e uma especificidade de 93-98% (SEVERO et al., 2009).

Tecnologias podem auxiliar na identificação de diferentes linhagens como o uso de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) combinada a primers aleatórios e permitindo a identificação do DNA de cada linhagem, levando a um maior conhecimento sobre a epidemiologia da infecção (CASALI et al., 2001; MEYER et al., 1999)

Diferenças bioquímicas podem ser observadas nas duas espécies, a exemplo da capacidade de assimilar D-prolina como fonte de carbono pelo *Cryptococcus gattii*, diferentemente do *Cryptococcus neoformans*, que é incapaz (KWON-CHUNG et al., 2015)

Caracterizar essas leveduras em níveis de gênero e espécies seguem inúmeras etapas como a microscopia das células, análise bioquímica, meios de culturas e sequenciamento de DNA, acarretando tempo e podendo levar a custos altos. Recentemente a identificação por Espectrometria de Massas pela técnica de *matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), permite a identificação de diversos fungos e bactérias em um curto espaço de tempo com menos custos, possibilitando o início da terapia em menos tempo (MCTAGGART et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

Segundo McTaggart et al. (2011) a metodologia MALDI-TOF MS baseada em espectros protéicos obtidos a partir das proteínas ribossomais e estruturais das células fúngicas, pode realizar a identificação das espécies de forma confiável e altamente discriminatória de uma cultura pura, em média de tempo de 5 a 20 minutos, com um custo mínimo dependendo da preparação da amostra.

2.2.2 TRATAMENTOS DA CRIPTOCOCOSE

O antifúngico de escolha depende principalmente do sítio de infecção e das características imunológicas do hospedeiro. O antifúngicos recomendados e amplamente utilizados são anfotericina B em uma dosagem de 0,5-1,0 mg/kg/dia ou combinado com 5-flucitosina (100 mg/kg/dia) e fluconazol (400mg/dia) (PERFECT et al., 2010; SEVERO et al., 2009).

Segundo Martinez (2006), o arsenal terapêutico para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas disponíveis pela indústria farmacêutica são escassos e algumas apresentam atividades limitadas, enquanto outros não apresentam mais atividade antifúngica.

Fluconazol e itraconazol são triazólicos que apresentam atividade microbiana a partir da inibição do citocromo P-450, sendo esse um componente da via de biossíntese do ergosterol. Fluconazol exerce atividade robusta contra leveduras, entretanto com o uso generalizado em longo prazo, espécies de *Candida* e *Cryptococcus* desenvolvem mecanismos de resistência (CHEN, SORRELL 2007; CHEONG, MCCORMACK 2013).

Agentes azólicos são drogas largamente usadas para a profilaxia e manutenção terapêutica da criptococose (SAAG et al. 2000).

De acordo com a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) para o tratamento da meningite criptocócica a droga de escolha é a anfotericina B administrada por via intravenosa em um período de 14 dias. A sua atividade e toxicidade esta diretamente proporcional a sua concentração, sendo aconselhado uma administração de 0,7-1,0 mg/Kg (ANDES, 2006).

Paciente que desenvolvem a criptococose neural após transplante de órgãos recebem imunossupressores nefrotóxicos para evitar a rejeição do enxerto, cerca de 30% dos receptores de órgão apresentam quadros de disfunção renal, tornando-se necessário que a administração de anfotericina B não apresente concentrações muito altas para não comprometer o sistema renal (PERFECT et al., 2010; SLOAN et al., 2014).

A combinação da anfotericina B com flucitosina é o tratamento de escolha para a meningite criptocócica, porém as espécies de *Cryptococcus* vêm frequentemente apresentando resistência (OLIVEIRA et al., 2014; SAAG et al., 2000).

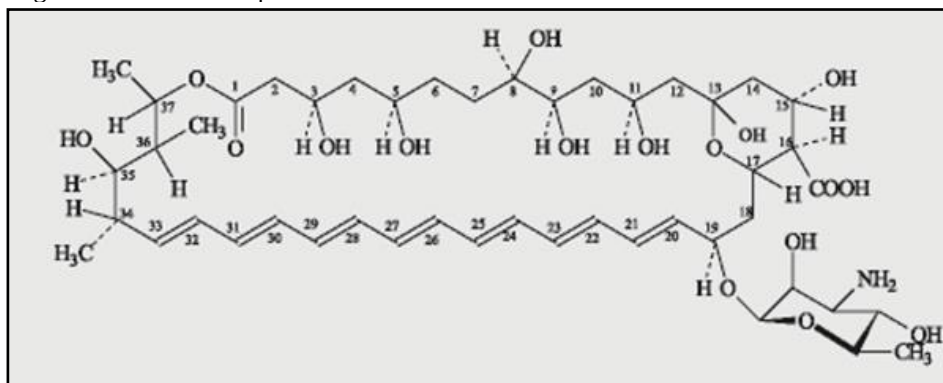
Uma nova alternativa terapêutica para criptococose foi proposto por Oliveira et al. (2010) demonstrando a atividade antifúngica da ciclopirox olamine frente a 16 isolados de *Cryptococcus neoformans*, um fungicida destinado ao tratamento de micoses tópicas, por meio do método de microdiluição seguindo o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

2.2.2.1 ANFOTERICINA B

Antibiótico poliênico produzido naturalmente a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosuse* e disponibilizado a partir da década de 50, a anfotericina B apresenta um largo espectro antifúngico e uma boa eficácia, embora possua uma alta toxicidade ainda é a principal escolha para o tratamento de micoses sistêmicas relacionadas a pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN, SOUZA 2006; MARTINEZ, 2006).

Estruturalmente a anfotericina B é composto por 37 carbonos, apresentando um anel macrocíclico. Possui uma cadeia de hidratos de carbono unidos por duplas ligações, e uma oposta com sete grupos hidroxilos livres, dando-lhe uma característica anfipática. A cadeia lateral é formada por um grupo de amino livre (Figura 4) (FILIPPIN, SOUZA 2006).

Figura 02 – Estrutura química da anfotericina B



Fonte: Filippin, Souza 2006.

A anfotericina B (AmB) é um agente que apresente um mecanismo de ação relacionado a sua afinidade com esteróis. Apesar de apresentar um largo espectro contra infecções fúngicas a utilização da anfotericina B é bastante limitada devido a sua alta toxicidade, principalmente ao sistema renal, por esse motivo, formulações lipídicas vêm sendo desenvolvidas como a *Ambisome*[®], uma formulação lipossomal da anfotericina B em qual o fármaco está fortemente associada com a estrutura em bicamada de pequenos lipossomas unilamelares (ADLER-MOORE, PROFFITT 2002; FALCI et al., 2015; GUERRA et al., 2007).

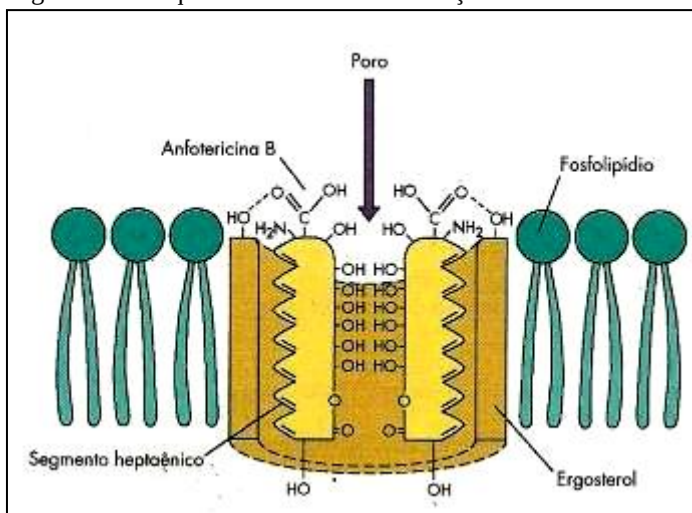
Segundo Falci et al. (2015) atualmente a indústria farmacêutica disponibiliza no mercado três formulações lipídicas: *Ambisome*[®] (anfotericina B lipossomal - L-AmB); *Abelcet*[®] compreende o complexo lipídico (ABLC); *Amphotec*[®] dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD).

Anfotericina B pode ser utilizada em combinação com fluorocitosina, resultando em sinergismo e potencializando assim a ação do fármaco além de diminuir o tempo de tratamento da criptocose. Entretanto, estudos ressaltam que fluorocitosina pode causar efeitos adversos como leucopenia em pacientes acometidos com HIV (MITCHELL; PERFECT 1995).

Embora as espécies de *Cryptococcus* se apresentem como leveduras capsuladas a anfotericina B possui a capacidade de afetar a morfologia da cápsula de mucopolissacarídeos, trazendo um mecanismo de ação mais eficiente para o tratamento (ZARAGOZA et al., 2006).

O mecanismo de ação *in vivo* de anfotericina B é baseado na ligação com o ergosterol, componente presente na membrana celular dos fungos, que leva à formação de canais transmembranares, e acarreta desequilíbrio iônico dos cátions presentes e conduz a célula à morte (Figura 5) (BAGINSKI et al., 2005; BRAJTBURG et al., 1990).

Figura 03 – Esquema do mecanismo de ação da anfotericina B



Fonte: Murray et al., 2004

A anfotericina B possui um amplo espectro frente a doenças fúngicas como candidíase, criptocose, aspergilose, histoplasmose, blastomicose, coccidiomicose, mucormicose, esporotricose, fusariose e feo-hifomicoses. Embora estudos tenham demonstrado que espécies de *Cryptococcus* possam apresentar resistência a este fármaco, o mesmo ainda é fundamental na terapia da criptocose disseminada, doença fúngica de grande impacto em

mortalidade no mundo, causando cerca de meio milhão de mortes por ano (FALCI et al., 2015; PERFECT, COX 1999)

2.2.2.2 FLUCONAZOL

Fármaco sintético formado a partir da substituição do anel imidazólico por um triazólico, bastante utilizado no tratamento de micoses profundas e mucocutâneas de forma isolada ou em combinação. O fluconazol apresenta seletividade para o citocromo P450 presente na célula fúngica e possui um amplo espectro de ação frente a espécies de *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* (COELHO et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

O uso do fluconazol esta reservado a criptococose recidivas ou pacientes que desenvolveram a doença com histórico de exposição recente a medicamentos antifúngicos, apesar de ser fungistático apresenta excelente perfil de segurança, farmacocinética e resposta clínica (PERFECT et al., 2010; SANAT et al., 2006)

O mecanismo de ação do fluconazol é baseado na inibição de parte do complexo P450 especificamente na C-14- α -desmetilase, componente necessário para a síntese do ergosterol presente na membrana das células fúngicas, sendo ativos em fungos leveduriformes. Devido ao sitio de ação no complexo P450, o fluconazol também pode apresentar efeito sobre este complexo em humanos, podendo levar a interações medicamentosas e diversos efeitos secundários adversos (CHARLIER et al., 2006).

Segundo Santos et al. (2005) a maior biodisponibilidade do fluconazol está relacionada a administração por via oral, podendo alcançar no plasma uma concentração maior ou igual a 80% em comparação a administração por via endovenosa.

De acordo com Yamazumi et al. (2003) isolados clínicos de *C. neoformans* demonstraram resistência ao fluconazol devido a seleção de clones resistentes induzida pela longa exposição ao mesmo (YAMAZUMI et al., 2003).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA DE *Cryptococcus* spp.

Resistência de micro-organismos aos antimicóticos ocorre na grande maioria dos casos esta relacionado a fenômenos genéticos diretamente ligados a alterações de genes, tornando as espécies fúngicas capazes de codificarem diferentes mecanismos bioquímicos, os quais impedem as ações dos medicamentos (TENOVER, 2006).

O uso extensivo e disseminado de fluconazol para a terapia de pacientes acometidos de criptococose se tornou uma preocupação de saúde pública em decorrência do desenvolvimento de resistência ao fármaco. Atualmente a falha no tratamento de pacientes com criptococose vem aumentando significativamente o índice de mortalidade (CHEN et al., 2015; LI, MODY 2010).

Os principais mecanismos que os fungos patogênicos desenvolvem resistência aos antifúngicos da classe dos azólicos estão relacionados à expressão do gene ERG11 (conhecido como CYP51) responsável por codificar o sitio alvo dos azoles a enzima lanosterol 14-*demethylase* diminuído a susceptibilidade do sitio de ação ao fármaco (GAST et al., 2013).

Administração de baixas doses de fluconazol, usadas normalmente em tratamentos de longo prazo, em pacientes com HIV acometidos com criptococose, é um dos principais fatores para as espécies patogênicas de *Cryptococcus* desenvolvam resistência (CHEONG, MCCORMACK 2013; PERFECT et al., 2010).

Assing et al. (2003) relataram um caso de meningite criptocócica em um paciente HIV negativo, acometidos com *Cryptococcus* sp. resistente a fluconazol sem histórico de exposição anterior ao fármaco. A resistência foi inicialmente observada a partir da recaída clínica após a interrupção do tratamento com anfotericina B e a iniciação da terapia por fluconazol. A avaliação da resistência *in vitro* foi verificada seguindo a metodologia de E-test e disco difusão e posteriormente foram confirmadas pelo método de microdiluição.

Segundo Lia et al. (2012) relatos foram feitos sobre a resistência de isolados de *Cryptococcus neoformans* resistentes a anfotericina B, fluconazol, flucitosina, Itraconazol, antes ou durante o tratamento. O aparecimento da resistência a estes fármacos antimicóticos sugere a necessidade de vigilância em maior escala para reduzir ou eliminar o surgimento de novos relatos.

2.4 PRODUTOS NATURAIS E NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

O interesse pela utilização de medicamentos fitoterápicos surgiu pela crença popular de que substâncias obtidas de plantas medicinais são isentas ou apresentam poucos efeitos colaterais, além da sua aparente eficácia quando a medicina tradicional não alcança os resultados esperados (SANTOS et al., 2010).

Produtos medicinais a partir de plantas eram mais comumente adotados em populações carentes de áreas rurais e urbanas, por apresentar uma disponibilidade maior com custos menores. A utilização de plantas medicinais é predominante em diversos países em

desenvolvimento como único recurso terapêutico disponível para problemas de saúde pública (JESUS, 2009; MACIEL et al., 2002).

Produtos naturais representam nos dias atuais uma extensa e rica fonte de potentes compostos bioativos com diferentes composições moleculares, os quais compõem mais de 30% dos produtos disponíveis pela indústria farmacêutica (GOULART et al., 2013; MISHIRA et al., 2008).

As propriedades terapêuticas observadas em plantas utilizadas na medicina popular comprovam que a biodiversidade vegetal possui numerosos compostos bioativos promissores na produção de novos fármacos (MORAIS-BRAGA et al., 2013). Além disso, a emergência na resistência de micro-organismos tem tornado a busca por novos agentes terapêuticos eficazes constantes, envolvendo pesquisas desde Briófitas até Angiospermas associadas as suas diversas atividades farmacológicas. Esse potencial têm-se apresentado como alternativa promissora no combate às infecções fúngicas (SANTOS et al., 2010).

A etnobotânica e a etnofarmacologia são poderosas ferramentas na busca por substâncias naturais bioativas, e embora ressaltem alguns fatores limitantes, como a dificuldade em coletar informações que sejam fidedignas, bem como o aspecto ético que envolve o acesso ao conhecimento tradicional, considera que as informações sobre as plantas medicinais podem ser obtidas de maneira mais verossímil através do uso dessas ferramentas (ALBUQUERQUE, HANAZAKI 2006).

A capacidade de apresentar atividade antimicrobiana das substâncias presentes em extratos e óleos essenciais extraídos de plantas é bastante reconhecida popularmente há séculos. A partir da comprovação da atividade antimicrobiana dos compostos bioativos é preciso estratégias e programas de triagem para que o composto possa da origem a novos fármacos (AHMAD, BEG 2001; GERGIS et al., 1990).

Apesar de existir uma grande biodiversidade de plantas no mundo, poucos estudos são direcionados a descoberta de compostos bioativos com propriedades farmacêuticas, as quais poderiam fornecer novos produtos químicos para a descoberta de novas drogas e diferentes alternativas terapêuticas (DZOYEM et al., 2013; NEWMAN, CRAGG 2010).

Compostos como óleos essenciais e elementos voláteis de plantas medicinais apresentam potenciais significativos para o tratamento de infecções microbianas principalmente infecções fúngicas (LIMA et al., 2006).

Produtos naturais representam grande parte dos componentes candidatos à formulação de novos fármacos com potencial para uma significativa variedade de doenças que acometem os humanos. Atualmente a maiorias desses produtos que estão em pesquisas para o

desenvolvimento de fármacos são proveniente de plantas ou fontes microbianas (DZOYEM et al., 2013).

2.4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Diversos estudos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* demonstram os inúmeros benefícios dos compostos fenólicos presentes em vegetais, frutas, legumes e verduras. Tais capacidades são atribuídas aos múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos tais como atividades antimicrobiana, hipoglicemiante, anti-inflamatória e prevenção de doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares (ABE et al., 2007; BANSAL et al., 2012; BEER et al., 2003; JANIQUES et al., 2013).

Originados do metabolismo secundário das plantas os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução, além de proteger os vegetais de estresses ambientais, infecções, radiação ultravioleta e ferimentos (ANGELO, JORGE 2007; NACZK, SHAHIDI 2004). Segundo Souza et al. (2010) os compostos fenólicos (ferúlico, cinâmico e vanílico) de vegetais possuem efeitos inibitórios no crescimento de fungos e produção de micotoxinas

Compostos fenólicos compõem o maior grupo de bioativos presentes em vegetais, cerca de cinco mil fenóis de estrutura variável com multifuncionalidades, subdivididos em classes a partir de suas estruturas químicas. Esses compostos apresentam um anel aromático presente em sua estrutura podendo ter um ou mais substituintes hidroxílicos (FALLER, FIALHO 2009; JANIQUES et al., 2013).

Os principais grupos fenóis são os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. A variedade de combinações possíveis que acontecem na natureza leva a uma diversidade estrutural muito grande dos fenóis os quais são chamados de polifenóis (ANGELO, JORGE 2007; FALLER, FIALHO 2009).

Segundo Calixto et al. (2001) compostos fenólicos são substâncias importantes nos mecanismos de defesa da planta contra fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores.

Divididos em dois grupos os compostos fenólicos podem ser classificados em flavonoides e não flavonoides, porém ambos apresentam baixo peso molecular, denominados de metabólitos secundários (VOLP et al., 2008).

Os fenóis que largamente são encontrados na natureza estão principalmente nos vegetais, entre esses fenóis, os mais estudados são os flavonoides, ácidos fenólicos e

cumarinas, sendo classificados de acordo com a quantidade de carbono presente em suas estruturas Tabela 01 (ANGELO, JORGE 2007; SOARES, 2002).

Tabela 1 - Classe de compostos fenólicos encontrados em plantas, de acordo com suas estruturas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6–C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6–C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antoquinonas	C6–C2–C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6–C3–C6
Lignanas, neolignanas	(C6–C3) ₂
Biflavonóides	(C6–C3–C6) ₂
Ligninas	(C6–C3) _n
Taninos condensados	(C6–C3–C6) _n

Fonte: Angelo, Jorge 2007.

Atividade antimicrobiana de vegetais ricos em fenóis foram recentemente publicadas por Oliveira et al. (2014) que relataram atividade antifúngica *in vitro* de *Euphorbia tirucalli* (L.) utilizando ensaio de microdiluição em caldo, frente a cepas de *Cryptococcus neoformans*, apresentando CIM entre 3,2 a 411 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Efeitos genotóxicos foram avaliados em células leucocitárias humanas e os compostos obtidos de *Euphorbia tirucalli* (L.) não apresentou atividade genotóxica.

Dulger et al. (2014) descreveram atividade antifúngica da *Hypericum havvae*, planta utilizada na medicina popular de todo o mundo e apresenta uma grande tendência para acumular compostos fenólicos, frente às espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii*, por método de microdiluição em caldo. Os valores das concentrações inibitórias variaram de 3,12 a 2.500 mg.mL^{-1} . Concentrações inibitórias mínimas iguais foram observadas frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus laurentii*, os quais apresentaram 1,56 mg.mL^{-1} .

Alves et al. (2014) realizaram um estudo para avaliar a capacidade antifúngica dos compostos fenólicos ácido gálico, catequina, luteolina e quercetina frente a biofilmes de espécies de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A CIM variou de 0,156 a 1,250 mg.mL^{-1} para todos compostos testados. Entre os compostos utilizados o ácido gálico foi o mais eficaz com CIM <0,156 mg.mL^{-1} .

Souza et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica de extratos fenólicos da cebola, farelo de arroz e micro alga *Chlorella pyrenoidosa* frente ao fungo *Rhizopus oryzae*, por método de microdiluição. O extrato aquoso da cebola e metanólico de *Chlorella pyrenoidosa* não apresentaram atividade inibitória ao crescimento fúngico. Porém os extratos acetato etílicos da cebola e metanólico de farelo de arroz apresentaram atividade antifúngica com CIM 2,6-86 e 46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

Silva Filho et al. (2008) mostraram em teste de microdiluição, seguindo a metodologia CLSI, atividade antifúngica do extrato de folhas de *Baccharis dracunculifolia* D. C. contra *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* apresentando valores de CIM 65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

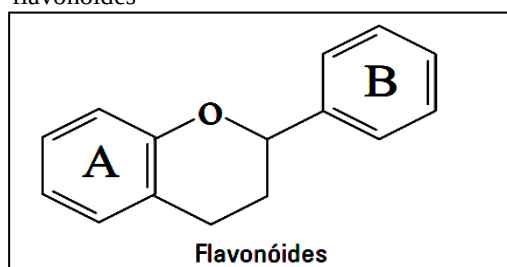
2.4.2 FLAVONÓIDES

Entre os polifenóis largamente distribuídos no reino vegetal os flavonóides estão entre os mais presentes, encontrados frequentemente em frutas e sementes, podendo também estar em forma de glicosídeos ou gliconas. O organismo humano não produz flavonóides, mas estas estruturas químicas são obtidas em alimentação a base de vegetais (ANGELO, JORGE 2007; BEECHER, 2003; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Nos vegetais os flavonóides além de serem encontrado em grande quantidade também apresentam importantes funções, entre elas, à proteção contra estresses ambientais como radiação ultravioleta, atividade antimicrobiana, ação antioxidante e inibição enzimática (MENDES et al., 2015; NIJVELDT et al., 2001).

Segundo Martínez-Flóres et al. (2002) os flavonóides estruturalmente apresentam baixo peso molecular, constituídos estruturalmente por 15 átomos de carbono C6–C3–C6 e em cada uma das duas partes da molécula com seis carbonos são estruturadas por anéis aromáticos, como mostra a Figura 6.

Figura 4 – Estrutura química básica dos flavonóides



Fonte: Martínez-Flóres et al., (2002).

Originados a partir do metabolismo secundário dos vegetais, da família dos flavanóides, existem em torno de 8000 componentes (BEECHER, 2003; VOLP et al., 2008)

De acordo Peterson et al., (1998) as inúmeras propriedades farmacológicas que são apresentadas pelos flavonóides conferem a eles a capacidade de atuarem em componentes biológicos, com pouca ou nenhuma toxicidade, contribuindo positivamente para a saúde humana.

Melo et al. (2012) descreveram atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de *Zizyphus joazeiro*, vegetal que apresenta diferentes tipos de flavonóides, frente á microrganismos, incluindo leveduras, bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e *Mycobacterium bovis*.

Coelho et al. (2012) demonstraram por meio do teste de microdiluição em caldo a capacidade antimicrobiana do extrato metanólico da *Chamomilla recutita* L., planta medicinal que apresenta compostos fenólicos da classe dos flavonóides, contra sete isolados de micro-organismos: *Cryptococcus neoformans* (CIM = 0,156 mg.mL⁻¹), *Candida albicans* (CIM = 2,5 mg.mL⁻¹), *Staphylococcus aureus* (CIM = 5 mg.mL⁻¹), *Escherichia coli* (CIM = 2,5 mg.mL⁻¹), *Salmonella entérica* (CIM = 5 mg.mL⁻¹), *Shigella sonnei* (CIM = 5 mg.mL⁻¹), *Klebsiella pneumoniae* (CIM = 5 mg.mL⁻¹), *Bacillus cereus* (CIM = 0,625 mg.mL⁻¹), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 1,25 mg.mL⁻¹).

Dzoyem et al. (2013) avaliaram atividade antimicrobiana de flavonóides presentes em espécies de *Dorstenia* por método de microdiluição. A CIM determinada para *Staphylococcus aureus* variou de 0,5-128 µg.mL⁻¹ e para *Candida albicans* ficou entre 64-128 µg.mL⁻¹. A concentração inibitória mais significativa foi frente ao isolado de *Cryptococcus neoformans* (0,5µg.mL⁻¹), similar a CIM da anfotericina B (0,5 µg.mL⁻¹) frente ao mesmo isolado.

2.4.3 TANINOS

Compostos fenólicos do metabolismo secundário vegetal, os taninos possuem peso molecular em cerca de 500 a 3000 Dalton. São responsáveis pela adstringência de grande parte dos frutos e produtos vegetais. A utilização de drogas baseadas em taninos estar diretamente relacionada à capacidade adstringente (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos exercem atividades biológicas em humanos como antidiarréico, antisséptico, antibacteriano e antifúngico, podendo também auxiliar na formação de camada protetora em tecidos epiteliais inflamados com feridas, queimaduras e inflamações. O equilíbrio da estrutura química e composição são essenciais para a caracterização biológica (MONTEIRO et al., 2005; OKUDA, ITO 2011).

Apensar de serem produtos naturais de plantas, os taninos tem a capacidade de precipitar proteínas solúveis em água podendo adquirir toxicidade frente a organismos biológicos (SILTE et al., 1999).

Taninos podem ser classificados em dois grupos: hidrolisáveis, que compreendem ésteres como o ácido gálicos e os taninos condensados sendo esses polímeros como o flavan 3,4-diol (KHANBABAEE, REE 2001; MONTEIRO et al., 2005;).

Ishida et al. (2009) demonstraram por microdiluição seguindo o documento CLSI M27-A3 a ação antifúngica de *Stryphnodendron adstringens*, vegetal de composição química rica em taninos e conhecido no Brasil popularmente como barbatimão, frente a cepas de *Cryptococcus neoformans* com CIM variando de 2 a $5\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também foi demonstrado que os taninos extraídos interferem diretamente no crescimento, tamanho da capsula, pigmentação e em todos os fatores de virulência de *Cryptococcus neoformans*, podendo ser considerado um candidato ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Goulart et al. (2013) descreveram ação antifúngica através do método de microdiluição em caldo de extratos de *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth., vegetal comum do Cerrado brasileiro, frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. O extrato hidrometanólico apresentou CIM de $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. neoformans*, contra *C. gattii* a CIM foi determinada em $600\mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações hexânicas para *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* apresentaram CIM de $150\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. krusei* e *C. parapsilosis* as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas em $600\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. A fração hidrometanólica foi ativa sobre *C. krusei* e *C. tropicalis* em uma CIM de $300\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Passos et al. (2002) a partir da técnica de diluição em ágar verificaram a atividade antifúngica de diferentes constituintes de *Caryocar brasiliensis*, planta que apresenta em sua composição química grande quantidade de tanino e flavonóides. Todos os constituintes apresentaram atividade inibitória frente à *Cryptococcus neoformans* com CIM variando de $15,6-1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$. A análise de suscetibilidade frente à espécie de *Cryptococcus gattii* demonstrou uma CIM variando de 500 a $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5 ESPÉCIES VEGETAIS

Segundo Argenta et al. (2011) plantas medicinais, em diversos lugares do Brasil e em grande parte da população mundial, representam o único recurso terapêutico. Fatores culturais e sócios econômicos estão diretamente relacionados ao baixo acesso da população aos medicamentos convencionais.

Conhecimentos populares sobre plantas medicinais contribuem de forma positiva para a divulgação da capacidade terapêutica de diversos vegetais. O uso de tais plantas de acordo com diversos estudos e conhecimentos populares é tão antigo quanto à espécie humana (MACIEL et al., 2009).

O Nordeste brasileiro é destaque nacional em relação à variedade de plantas medicinais, sendo considerado um dos centros mundiais de biodiversidade, onde tais vegetais são utilizadas popularmente por comunidades tradicionais e atuais para o tratamento de inúmeros processos patológicos (BAPTISTEL et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

Recentemente Barbosa Junior et al. (2015) avaliaram por meio da técnica de difusão em disco a atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais popularmente utilizadas no Nordeste e principalmente por comunidades do sertão sergipano: *Ziziphus joazeiro* Mart., *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Bumelia sartorum* Mart., *Hymenaea courbaril* L. Todos os extratos avaliados com concentrações de 4 a 100 mg.mL⁻¹ apresentaram ação antifúngica em todas as linhagens clínicas de *Cryptococcus neoformans*.

Ferreira et al. (2013) descreveram atividade antifúngica *in vitro* por método de microdiluição de dez espécies de plantas utilizadas tradicionalmente no Nordeste brasileiro: *Eugenia uniflora* Linn., *Caesalpinia ferrea* Mart., *Psidium guajava* Linn., *Persea americana* Mill., *Schinus terebinthifolius* Raddi., *Mimosa ophthalmocentra* Mart., *Parapiptadenia rigida* (Benth.), *Hymenaea stigonocarpa* Mart., *Mimosa tenuiflora* (Willd.). Poir., frente a isolados de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Os melhores resultados para inibição fúngica foram demonstrados a partir dos extratos de *E. Uniflora* (CIM=15,62 µg.mL⁻¹) e extratos de *C. ferrea* e *P. guajava* com CIM variando de 15,62 a 250 µg.mL⁻¹ contra as espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Johann et al. (2007) demonstraram por método de microdiluição a ação antifúngica de oito plantas tradicionalmente usadas na medicina popular brasileira: *Ingadulcis* (Vell.) Mart., *Schinus terebinthifolius* Raddi., *Althernanthera brasiliana* Kuntze., *Piper regnellii* CDC., *Herissantia crispa* L. Briz., *Rubus urticaefolius* P., *Rumex acetosa* L., *Baccharis dracunculifolia* DC., frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*. Os melhores resultados foram obtidos a partir das frações de *S. terebinthifolius* apresentando CIM de 30 µg.mL⁻¹ para as duas espécies.

2.5.1 *Anadenanthera colubrina* (Vell.)

Espécie de planta comum no Brasil, a *Anadenanthera colubrina* pertencente à família Fabaceae, apresenta grande importância econômica, social e ambiental, além de ser muito

utilizada na recuperação e restauração de áreas e florestas degradadas por apresenta boa regeneração natural. Além disso, é um vegetal rico em taninos com propriedades medicinais (LAMBRECHT et al., 2015; MEYER et al., 2015; MONDO et al., 2008).

Escassos estudos evidenciam a atividade antimicótica desse vegetal. Ferreira et al. (2013) demonstraram *in vitro* a atividade antifúngica de extratos de *Anadenanthera colubrina*, por método de microdiluição em caldo frente a espécies de *Candida albicans* (CIM=31,25-1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), *Candida dubliniensis* (CIM=250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), *Cândida glabrata* (CIM=62,50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e *Candida krusei* (CIM=62,50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) (FERREIRA et al., 2013).

2.5.2 *Eugenia uniflora* L.

Popularmente conhecida como pitangueira, a *Eugenia uniflora* L., é uma espécie de planta pertencente à família Myrtaceae, nativa da mata atlântica brasileira e bastante utilizada no Brasil principalmente na Região do Nordeste. De acordo com os conhecimentos populares, o chá apresenta atividade antimicrobiana, assim como outras diversas ações na medicina popular (BEZERRA et al., 2004; GALLINA, REHEM 2013; PAROUL et al., 2004).

Apesar de ter a sua investigação química pouco estudada, sabe-se que diversos compostos fenólicos com ações antioxidantes, hipoglicemiantes, antirreumática, antidiarréica, e com capacidade de regular a pressão articular, são encontrados na composição química da *Eugenia uniflora*, fazendo com que esta planta fosse incorporada a indústrias alimentícias, cosméticas e medicinais (ALMEIDA et al., 2012; PAROUL et al., 2004).

De acordo com Bagetti et al. (2011) a caracterização físico-química de *Eugenia uniflora* apresenta grande quantidade de compostos fenólicos, os quais estão diretamente ligados a sua capacidade antioxidante e os tipos de coloração que o fruto apresenta.

Bezerra et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana por método de disco difusão em ágar, de extratos hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* L., frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. A atividade antibacteriana foi verificada contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com diâmetro dos halos de inibição variando de 13,14 a 11,07mm, e 16,11 a 11,59mm, respectivamente.

Lago et al. (2011) descreveram atividade antifúngica pelo teste de microdiluição a partir de óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L., contra leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* apresentando CIM variando entre 0,11 a 3,75 mg.mL^{-1} .

Ação contra bactérias cariogênicas foi demonstrado por Oliveira et al. (2008) pelo método de difusão em meio sólido a partir de extratos hidroalcoólicos obtidos do fruto da *Eugenia uniflora*. Os resultados demonstraram halos de inibição para *Streptococcus mutans* de 11,0 a 16,0 mm, *Streptococcus sanguis* (7-17 mm), *Streptococcus salivarius* (12-17 mm), *Streptococcus mitis* (12mm) e *Streptococcus oralis* (10-22 mm).

Souza et al. (2002) investigaram por microdiluição a ação antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L., frente as espécies de dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *T. Mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*. A atividade inibitória dos extratos foi observada entre 500 a 1000 µg.mL⁻¹.

2.5.3 *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.)

Conhecida como popularmente com “jucá” ou “pau ferro”, A *Libidibia ferrea* é uma planta principalmente encontrada em biomas de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, mas que cresce em todo o Brasil, especialmente no Norte e Nordeste. Largamente utilizada na medicina popular por apresentar inúmeras propriedades terapêuticas como ação anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica (FREITAS et al., 2012; MAIA-SILVA et al., 2012; VENÂNCIO et al., 2015).

Recentemente, Kobayashi et al. (2015) realizaram estudos fitoquímicos da *Libidibia ferrea* demonstrando a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, compostos fenólicos e taninos.

Costa et al. (2015) também descreveram a presença de vários compostos presentes do extrato hidroalcoólicos da casca, caule e folhas os quais apresentaram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróis, compostos fenólicos e ácido gálico como seus principais constituintes, os quais são responsáveis por muitas das atividades farmacológicas.

De acordo com Venâncio et al. (2015) a *Libidibia ferrea* apresenta uma atividade antimicrobiana promissora frente os micro-organismos presentes na cavidade oral e contra a formação de biofilmes, além de não apresentar atividade citotóxica significativa em testes com linhagens de células.

Oliveira et al. (2013) através da técnica de difusão em ágar demonstraram atividade antimicrobiana de extratos de *Libidibia ferrea* frente *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*, patógenos da cavidade oral. Os resultados demonstraram valores de CIM para *L. casei* e *S. oralis* de 9,3 mg.mL⁻¹, para *S. mutans* a CIM

foi determinada em 18,6 mg.mL⁻¹. Contra *Candida albicans* a inibição foi observada em uma concentração de 18,7 mg.mL⁻¹.

Marreiro et al. (2014) realizaram análise microbiológica e verificaram que não existia presença de contaminantes tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos filamentosos, leveduras e coliformes em extratos de *Libidibia férrea*. Descreveram também a atividade antibacteriana pela técnica de microdiluição frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*, com valores de inibição variando de 100 a 3.125 µL.mL⁻¹.

2.5.4 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Planta medicinal nativa do Brasil, conhecida popularmente como aroeira-vermelha, a *Schinus terebinthifolius* Raddi pertencente da família Anacardiaceae e possui propriedades medicinais e alimentícias. Tradicionalmente é utilizada para tratamento de diversas infecções, entre elas as do sistema genital feminino, por apresentar características anti-inflamatórias e cicatrizantes (AZEVEDO et al., 2015; GREATTI et al., 2014).

Cada vez mais vem crescendo o interesse da indústria farmacêutica nos compostos presentes nessa espécie vegetal. Atualmente já existe no mercado um medicamento a base de taninos extraídos de *Schinus terebinthifolius*, chamado Kronel[®], indicado como cicatrizante e para uso ginecológico (GREATTI et al., 2014).

Segundo Oliveira Junior et al. (2013) a ação antifúngica dos extratos de *Schinus terebinthifolius* são bastantes discutidos para várias espécies, como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*.

Estudos dos componentes químicos presentes na aroeira revelaram diversos e numerosos compostos bioativos, tanto em óleos essenciais quanto em extratos, os quais apresentam inúmeras propriedades farmacêuticas. Entre os compostos encontrados e descritos na literatura, destacam-se os fenólicos, flavonóides, taninos, ácido gálico, terpenóides, ácidos graxos, fenóis triterpenos, xantones e esteróides livres (CARVALHO et al., 2013; LIMA 2009).

Freire et al. (2011) demonstraram por meio de método de disco difusão atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* frente à *Candida albicans* e *C. tropicalis* com halos de inibição ≤16 mm, e *C. krusei* apresentando halos de inibição ≤14 mm.

Analises *in vivo* em ratos Wistar da genotoxicidade de extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos indicam

que os mesmos não apresentam efeitos genotóxicos. Apenas um discreto aumento no número de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (TERRA JUNIOR et al., 2015).

De acordo com Ghanney, Rhouma (2015) extratos obtidos da folha de *Schinus terebinthifolius* apresentaram ação antibacteriana contra *Agrobacterium tumefaciens*, espécies patogênicas de plantas. Os resultados apresentaram halos de inibição ≥ 7 mm pelo método de disco difusão em ágar.

Sá et al. (2014) demonstraram por método de difusão em ágar que *Staphylococcus aureus* apresenta susceptibilidade ao extrato hidro alcóolico de *Schinus terebinthifolius* formando zonas de inibição com halos de 8mm de diâmetro em concentrações inibidoras mínimas de até 35,3 mg/mL.

Segundo Costa et al. (2013) extratos etanoicos *Schinus terebinthifolius* avaliados por método de difusão em ágar apresentam atividade antimicrobiana frente à *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* com a formação de halos de inibição de 8 e 12 mm respectivamente.

Atividade inibitória *in vitro* de extratos obtidos de *Schinus terebinthifolius* contra cinco diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, pelo método de microdiluição em caldo, foram apresentadas por Johann et al., (2010). Nesse estudo, as CIM do extrato frente ao fungo dimórfico foi de 7,5-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Freire et al. (2010) demonstraram *in vitro* por método de difusão em ágar que bactérias das espécies *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, formadoras do biofilme dentário, são susceptíveis à ação antibacteriana de *Schinus terebinthifolius*. Nesse estudo, as CIM foi de 3,125 mg/mL para *S. mutans* e 1,562 mg.mL^{-1} para *L. casei*.

Ação cicatrizante do extrato hidro alcoólico da aroeira foram avaliadas *in vivo* em cicatrizações de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. Demonstrou-se que o extrato apresenta efeito cicatrizante favorável nas cobaias (LUCENA et al., 2006).

2.6 SINERGISMO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

Alterar o efeito de um medicamento a partir da administração anterior, simultânea, ou posterior de outro é denominado de interação medicamentosa. A resposta farmacológica a partir da interação pode ser potencializada (sinergismo), diminuída (antagônica) ou não proporcionar nenhum efeito terapêutico desejado (indiferente) (LEWIS et al., 2002; SECOLI 2001).

Em 2002, Lewis e colaboradores destacavam o crescimento no interesse pelo uso da terapia baseada na combinação de antifúngicos, que esta relacionada diretamente ao aumento dos casos de resistências de fungos aos medicamentos atualmente comercializados.

Embora o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente nomeado *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) não padroniza um método *in vitro* para testes de combinações de antifúngicos, existem vários métodos descritos na literatura, entre esses, destacam-se os métodos de disco difusão, *checkerboard*, *time-kill* e método epsilométrico (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; PANKEY et al., 2009; WHITE et al., 1996).

Diversas questões abordam a complexidade da interação medicamentosa, entre elas, a grande quantidade de possibilidade de interferência entre os medicamentos, fatores relacionados aos diferentes indivíduos como a idade, genética, alimentação, dose medicamentosa a ser administrada, via de administração e resposta de tratamento (MACDONALD et al., 2000; SECOLI 2001).

2.6.1 MÉTODO DE *CHECKERBOARD*

Checkerboard é uma das metodologias mais aplicada para a avaliação *in vitro* da combinação de diferentes drogas antimicrobianas, fato diretamente ligado a relativa facilidade de realização (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; WHITE et al., 1996).

A interpretação do sinergismo a partir da combinação de diferentes fármacos é baseada no Índice de concentração inibitória fracionária, definido pela soma dos índices de Concentração Inibitória Fracionada para cada droga, que corresponde à relação entre o CIM de cada droga utilizada em combinação e o CIM da mesma droga testada isoladamente (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003).

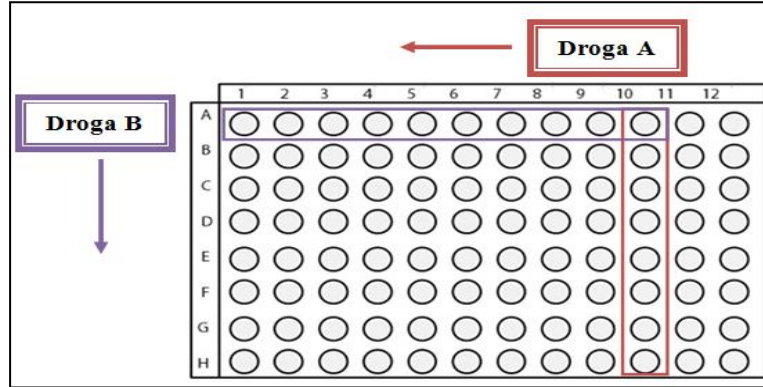
Lewis et al. (2002) determinaram quatro parâmetros para avaliação da interação medicamentosa. O sinergismo é determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Medicamentos são considerados aditivos quando o ICIF for $> 0,5$, mas < 1 . Indiferente é definida quando o ICIF for ≥ 1 mas < 4 , e o antagonismo é determinado quando o ICIF for ≥ 4 .

De acordo com Odds et al. (2003) apenas três combinações são estabelecidas. Sinergismo é determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Moléculas sem interação medicamentosa é definida quando o ICIF for $> 0,5$ e $< 4,0$. Antagonismo quando o ICIF $> 4,0$.

As drogas são distribuídas em sentidos diferentes a partir das concentrações determinadas anteriormente de acordo com as concentrações inibitórias mínimas de cada droga sozinha. Em sentido vertical e horizontal de uma placa de microtitulação contendo meio

liquido, como apresentado na Figura 7 (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; ORHAN et al., 2005; WHITE et al., 1996; YAN et al., 2014).

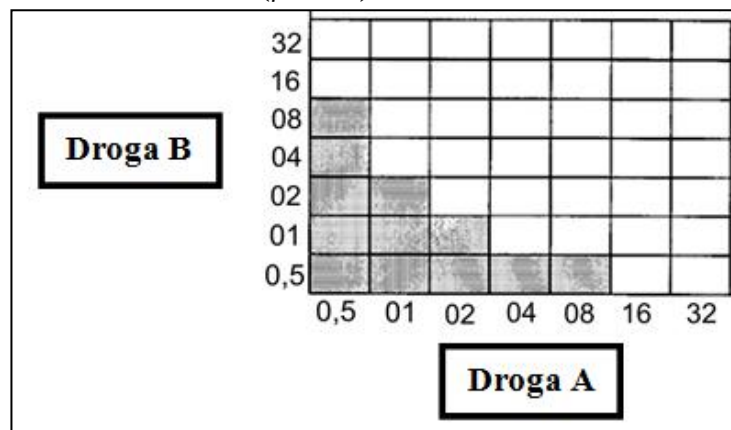
Figura 5 – Esquema da distribuição de duas drogas diferentes para avaliação do sinergismo. Droga A colocada na vertical e diluída em sentido horizontal da direita para esquerda. Droga B colocada na horizontal e diluída em sentido vertical de cima para baixo.



Fonte: Araujo, 2016

A partir das diluições em série, as menores concentrações das drogas são encontradas nos eixos de encontro das linhas ordenadas e abcissas da placa de microtitulação, conforme Figura 8 (ORHAN et al., 2005).

Figura 6 – Método de *Checkerboard* resultante da combinação de duas drogas. Concentrações compreendidas no encontro dos eixos de da ordenada e abcissas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$).



Fonte: Modificado de Orhan et al., 2005.

Segundo Lewis et al. (2002) o teste de *Checkerboard* apesar de ser apenas um indicador da inibição em apresentar uma medida relativa da potência da combinação entre diferentes fármacos, é um dos métodos mais utilizados, por ser de fácil realização e interpretação.

2.6.2 MÉTODO DE *TIME-KILL*

Método de avaliação *in vitro* de interação medicamentosa de agentes antimicrobianos, metodologia realizada por macrodiluição de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (PETERSEN et al., 2006; WHITE et al., 1996;).

Avalia a concentração do fármaco e a morte dos micro-organismos em diferentes intervalos de tempo do ensaio. O número médio de colônias (UFC/mL) obtidas com a droga combinada e sozinha é comparado com o controle sem a droga. Os resultados são expressos em log de UFC/mL (PANKY et al., 2009; WHITE et al., 1996).

Sinergismo é determinado quando ocorre a redução ≥ 100 vezes da quantidade de colônias em contato com os fármacos combinados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após incubação de 24 horas. Terapia combinada é categorizada como indiferente quando a mudança < 10 vezes na contagem das colônias em contato com os fármacos combinados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após incubação de 24 horas. Antagonismo ocorre quando o aumento ≥ 100 vezes da quantidade de colônia em contato com os fármacos combinados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após 24 horas (WAYNE et al., 1999; WHITE et al., 1996;).

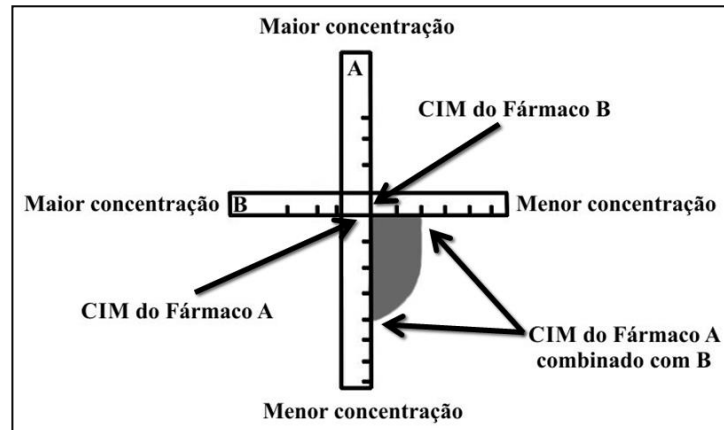
Apesar de apresentar bons resultados com utilidade para a iniciação terapêutica, o *time-kill* apresenta a desvantagem de ser um método laborioso (PANKEY et al., 2009; WHITE et al., 1996).

2.6.3 MÉTODO EPSILOMÉTRICO (E-TEST)

Em relação às metodologias de *checkerboard* e *time-kill*, o método que utiliza uma fita graduada nomeada E-test é o mais simples e requer uma quantidade menor de materiais, além de também permitir a avaliação do sinergismo entre duas moléculas diferentes *in vitro* (BONAPACE et al., 2000; WHITE et al., 1996).

As tiras de E-test são colocadas em ágar numa formação cruzada, com um ângulo de 90° na intersecção entre as escalas em suas respectivas CIMs para o organismo e incubadas durante 18 horas a 35°C, como apresentado na Figura 9 (BONAPACE et al., 2000; WHITE et al., 1996).

Figura 7 – Método E-test para a determinação da interação medicamentosa de dois fármacos diferentes.



Fonte: White et al., 1996.

Os parâmetros que caracterizam sinergismo ou antagonismo entre diferentes moléculas são determinados em cálculo através do somatório dos índices de concentração inibidora fracional (ICIF) (Bonapace et al., 2000; Lewis et al., 2002).

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

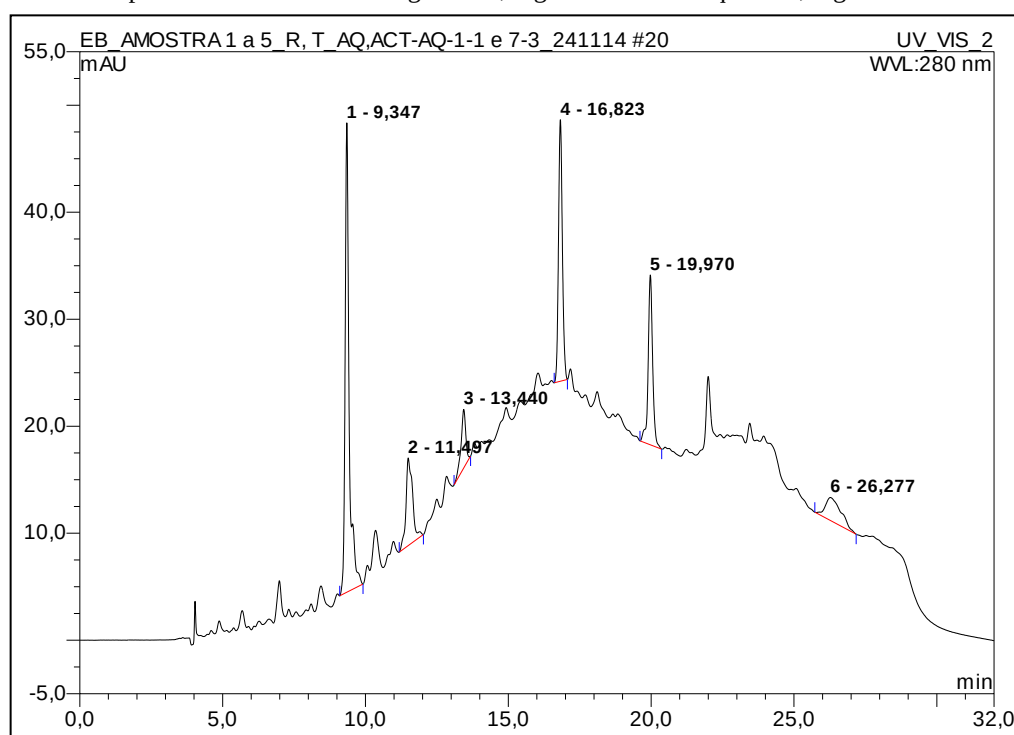
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

De acordo com o perfil cromatográfico do composto Acetona:Água (1:1) de *Schinus terebinthifolius* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), foi observado a presença de Ácido gálico e Catequina com teores de 0,22g% 0,48g% respectivamente (Figura 10 e 11).

Lima e colaboradores em 2006 através de análise química do extrato etanólico de *Schinus terebinthifolius* revelaram a presença de fenóis triterpenos, e antraquinonas. Para extratos preparados em hexano pode ser observada a presença de flavonas, xantones, flavonóides, esteróides livres, antraquinonas e triterpenes.

Em estudos fitoquímicos da fase acetato de etilo proveniente do extracto etanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Ceruks et al. (2007) isolaram e identificaram quatro compostos bioativos: galato, miricetina, quercetina e galato de metila.

Figura 08 – Perfil cromatográfico de *Schinus terebinthifolius* por CLAE-DAD. Teores calculados por CLAE: Pico 1: Ácido gálico: 0,22g%. Pico 4: Catequina: 0,48g%



Fonte: Araujo, 2015.

Polifenóis totais calculados por Ultra Violeta-Vis de *Schinus terebinthifolius* apresentou um teor de 35,79g%.

Santana et al. (2012) isolaram a partir da folha de *Schinus terebinthifolius* seis compostos: ácido gálico, galato de etila, galato de metila, catequina, quercitrina e afzelina. Assim como Santana e colaboradores em 2013, Santos et al. (2010) identificaram das folhas de *Schinus terebinthifolius* a presença de ácido gálico.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS)

Todos os isolados foram identificados por Espectrometria de Massas MALDI-TOF MS ao *taxo* de espécie. Dos isolados analisados, 28 cepas foram identificadas como *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, duas *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e cinco *Cryptococcus gattii* como apresentado na Tabela 2.

Em 2012 Firacative e colaboradores identificaram 20 isolados pertencentes ao complexo *Cryptococcus* por Espectrometria de Massas MALDI-TOF MS. O Estudo demonstrou que todos os isolados geram diferentes espectros de acordo com quatro tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII, VNIV) e *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV). As espécies foram separadas a partir de diferenças espectrais, para *C. neoformans* os sinais na região 2050 e 9200 Da, com picos espectrais entre 3340 e 6680 Da, enquanto *C. gattii* apresentou picos entre 3030 e 9950 Da.

Tabela 2 – Identificação dos isolados do complexo *Cryptococcus* por espectrometria de massas

Número de estocagem	Organismo identificado
URM 5809	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5810	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5811A	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5811B	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5813	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5814	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5815	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5816	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5818	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5819	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5820	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5821	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5822	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5823	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5824	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 5825	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6895	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6896	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6897	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>

URM 6898	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6899	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6900	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6901	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6902	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6903	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>neoformans</i>
URM 6904	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6905	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>neoformans</i>
URM 6906	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6907	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6908	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 6909	<i>Cryptococcus neoformans</i> _var_ <i>grubii</i>
URM 7355	<i>Cryptococcus gattii</i> [ana] (<i>Filobasidiella bacilliospora</i> [teleo])
URM 7356	<i>Cryptococcus gattii</i> [ana] (<i>Filobasidiella bacilliospora</i> [teleo])
URM 7357	<i>Cryptococcus gattii</i> [ana] (<i>Filobasidiella bacilliospora</i> [teleo])
URM 7358	<i>Cryptococcus gattii</i> [ana] (<i>Filobasidiella bacilliospora</i> [teleo])
URM 7359	<i>Cryptococcus gattii</i> [ana] (<i>Filobasidiella bacilliospora</i> [teleo])

Ana* = Anamorfo. Teleo** = Teleomorfo

McTaggart et al. (2011) Identificaram por Espectrometria de Massas MALDI-TOF MS um total de 160 isolados de levedura, incluindo 137 Cepas de *Cryptococcus*, 23 leveduras de outras espécies como *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* e 25 estirpes de referência. Assim como nesse trabalho, os resultados apresentados mostram que é possível distinguir *C. neoformans* var. *grubii* de *C. neoformans* var. *neoformans*, como também, diferenciar claramente as duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICAS IN VITRO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

Os isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 testados frente às duas frações (FAQ) e (FAE) de *Eugenia uniflora* não tiveram o crescimento inibido. A (FAQ) de *Libidibia ferrea* mostraram a CIM variando de 1.024 a 2.048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração aquosa de *Anadenanthera colubrina* variou entre 16-32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a fração Act/Aq 1:1 apresentou a CIM de 8 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração Aq/Act 7:3 de *Schinus terebinthifolius* teve a CIM compreendida entre 256-512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o extratos Aq/Act 1:1 apresentou 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIM, Fração orgânica e Fração aquosa de *Schinus terebinthifolius* apresentaram CIM de 4 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

O Ácido gálico padrão utilizado teve sua CIM variando de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os isolados de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Tabela 3).

Johann et al. (2007) demonstraram por método de microdiluição a ação antifúngica de *Schinus terebinthifolius* Raddi., frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*, apresentando CIM de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as duas espécies.

Lago et al. (2011) descreveram atividade antifúngica de *Eugenia uniflora* L., através do teste de microdiluição contra *Cryptococcus* sp., obtendo CIM entre 0,11 a 3,75 mg.mL^{-1} , discordando desse estudo onde a espécie *Eugenia uniflora* L., não apresentou atividade inibitória frente aos isolados do complexo *Cryptococcus neoformans/gattii*.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos brutos e frações de plantas medicinais, anfotericina B e fluconazol, frente aos isolados fúngicos *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Isolados Fungicos	<i>Eugenia uniflora</i> FAQ	<i>Eugenia uniflora</i> FAE	<i>Libidibia ferrea</i> EB-Aq	<i>Anadenanthera colubrina</i> EB-Aq	<i>Anadenanthera colubrina</i> EB-Aq (1:1)	<i>Schinus terebinthifolius</i> Act:Aq (7:3)	<i>Schinus terebinthifolius</i> Act:Aq (1:1)	<i>Schinus terebinthifolius</i> FAQ	<i>Schinus terebinthifolius</i> FAE	Ácido gálico	FLU	AmB
URM 5809 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	32	256	4	16	8	32	8	0.125
URM 5810 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	16	256	4	8	8	32	16	0.25
URM 5811A <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	8	8	32	32	1
URM 5811B <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	16	256	4	16	8	32	32	1
URM 5813 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	16	256	4	16	8	64	4	1
URM 5814 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	8	256	4	4	4	32	32	2
URM 5815 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	4	4	32	32	0.125
URM 5816 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	512	4	16	4	64	16	0.06
URM 5818 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	8	8	64	16	0.125
URM 5819 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	8	4	32	16	0.03
URM 5820 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	8	4	32	16	2
URM 5821 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	8	4	32	8	1
URM 5822 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	16	256	4	8	4	32	8	125
URM 5823 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	4	256	4	8	4	32	16	0.25
URM 5824 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	16	256	4	16	16	32	16	1
URM 5825 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	16	256	4	8	8	32	16	1
URM 6895 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	16	16	32	32	1
URM 6896 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	16	16	32	32	2
URM 6897 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	8	512	4	8	16	32	32	2
URM 6898 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	16	512	4	8	16	32	8	1
URM 6899 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	8	16	64	8	1
URM 6900 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	8	256	4	16	16	64	16	2
URM 6901 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	32	256	4	16	16	64	16	2
URM 6902 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	8	256	4	8	16	32	16	2
URM 6903 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	8	256	4	16	8	32	8	0.25
URM 6904 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	16	8	64	32	0.25
URM 6905 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	16	8	256	4	8	8	64	32	0.125
URM 6906 <i>C. neoformans</i>	N	N	1.024	32	16	256	4	8	16	32	32	1
URM 6907 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	8	256	4	4	16	32	16	1
URM 6908 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	16	4	256	4	8	16	32	16	2
URM 6909 <i>C. neoformans</i>	N	N	2.048	32	8	256	4	8	16	32	16	2
URM 7355 <i>C. gattii</i>	N	N	1.024	128	32	256	4	16	8	32	8	2
URM 7356 <i>C. gattii</i>	N	N	2.048	16	16	256	4	16	8	32	8	2
URM 7357 <i>C. gattii</i>	N	N	2.048	16	8	256	4	8	8	32	16	1
URM 7358 <i>C. gattii</i>	N	N	1.024	16	16	256	4	16	8	32	8	1
URM 7359 <i>C. gattii</i>	N	N	1.024	32	16	256	4	16	8	64	16	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	N	N	1.024	128	32	128	8	16	16	32	16	2

N^o = não apresentou atividade antifúngica; EB = Extrato Bruto; Aq = aquoso, Act:Aq = Acetona:água (1:1 ou 7:3, v/v); FAQ = Fração aquosa; FAE = Fração acetato de etila; FLU = Fluconazol; AmB = Anfotericina B.

3.3.1 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE *Schinus terebinthifolius* E ÁCIDO GÁLICO EM COMBINAÇÃO COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL

Foram testados 10 isolados de *Cryptococcus neoformans*, cinco de *C. gattii* e uma ATCC de *Candida parapsilosis* frente à *Schinus terebinthifolius* combinado com anfotericina B e com fluconazol. Quando testados frente à combinação de *Schinus terebinthifolius* e anfotericina B todos os isolados apresentaram ICIF > 4, caracterizando antagonismo. Entretanto a combinação de *Schinus terebinthifolius* com fluconazol frente a sete cepas de *C. neoformans* e a ATCC *Candida parapsilosis* se apresentou aditiva, com o ICIF > 0,5 e < 1, porém frente a três isolados de *C. neoformans* e todos os isolados *C. gattii* foram indiferentes ICIF ≥ 1 e < 4. Nenhum isolado apresentou sinergismo para as combinações analisadas. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

Assim como Johann et al. (2010) a avaliação *in vitro* do sinergismo de *Schinus terebinthifolius* combinado com anfotericina B através do método *Checkerboard* não apresentou efeito sinérgico, porém diferentemente desse trabalho, os testes foram realizados frente a isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Quando os isolados foram testados frente à combinação de ácido gálico e anfotericina B apresentaram ICIF > 4, caracterizando antagonismo. Entretanto, a combinação de ácido gálico com fluconazol foi determinada para todos os isolados como indiferentes (ICIF ≥ 1 < 4). Nenhum isolado apresentou sinergismo para as combinações analisadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 04.

Tabela 4 - Avaliação do sinergismo de *Schinus terebinthifolius* e ácido gálico combinado com anfotericina B e fluconazol. Frente a isolados fúngico de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Isolados Fúngicos	(ICIF) FLU + <i>Schinus</i> <i>terebint</i> <i>hifolius</i>	Parâmetro FLU + <i>Schinus</i> <i>terebinth</i> <i>ifolius</i>	(ICIF) AmB + <i>Schinus</i> <i>terebinth</i> <i>ifolius</i>	Paramentos AmB + <i>Schinus</i> <i>terebinthifol</i> <i>ius</i>	(ICIF) FLU + Ácido Gálico	Parametro FLU + Ácido Gálico	(ICIF) AmB + Ácido Gálico	Paramentos AmB + Ácido Gálico
URM 5809 <i>C. neoformans</i>	1	Indiferentes	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5810 <i>C. neoformans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	2	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5811 <i>C. neoformans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	1	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5813 <i>C. neoformans</i>	1	Indiferentes	>4	Antagônicas	2,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5814 <i>C. neoformans</i>	1.25	Indiferentes	>4	Antagônicas	1	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5815 <i>C. neoformans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	2	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5816 <i>C. neoformans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	1	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5818 <i>C. neoformans</i>	0.75	Aditivas	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5819 <i>C. neoformans</i>	0.75	Aditivas	>4	Antagônicas	2	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 5820 <i>C. neoformans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	2	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 7355 <i>Cryptococcus gattii</i>	1.5	Indiferentes	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 7356 <i>Cryptococcus gattii</i>	1.5	Indiferentes	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 7357 <i>Cryptococcus gattii</i>	1.125	Indiferentes	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 7358 <i>Cryptococcus gattii</i>	1	Indiferentes	>4	Antagônicas	2,5	Indiferentes	>4	Antagônicas
URM 7359 <i>Cryptococcus gattii</i>	1.125	Indiferentes	>4	Antagônicas	1	Indiferentes	>4	Antagônicas
ATCC 22019 <i>Candida parapsilosis</i>	0.75	Aditivas	>4	Antagônicas	1,5	Indiferentes	>4	Antagônicas

ICIF = índice de Concentração Inibitória Fracionada; FLU = Fluconazol; AmB = Anfotericina B.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICAS *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO DE *Schinus terebinthifolius*

Após a imunossupressão de ataque e as seguidas imunossupressões de manutenção todas as cobaias se apresentaram neutropênicos, de acordo com na contagem de leucócitos, variando de 0,11 a 0,52x10³/μL, e diminuição na contagem de plaquetas (134-205 10³/μL). Os parâmetros bioquímicos apresentaram valores normais para aspartato aminotransferase (AST) (68,1-86,8 U/L), alanina aminotransferase (ALT) (37,97-46,35 U/L) e uréia (43,11-45,52 mg/dL). Esses dados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos *Wistar* fêmeas antes da infecção. Valores expressos em média ±. Desvio padrão e (n) – número de animais

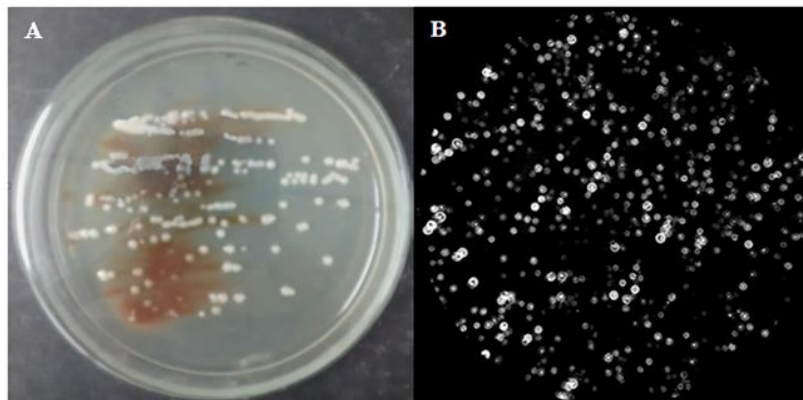
Parâmetros (Unid.)	*G1 - Média (n) D.P. (n)	**G2 - Média D.P. (n)	†G3 - Média D.P. (n)	‡G4 - Média D.P. (n)	§G5 - Média D.P. (n)	Valores de referência
Leucócitos (10 ³ /μL)	1,07 ± 0,75 (8)	0,61 ± 0,68 (8)	0,71 ± 0,66 (8)	0,66 ± 0,34 (8)	0,31 ± 0,09 (8)	4,96 ± 1,55
Hemácias (10 ⁶ /μL)	6,75 ± 0,74 (8)	7,59 ± 0,58 (8)	7,68 ± 0,56 (8)	8,05 ± 0,49 (8)	8,02 ± 0,32 (8)	5,21 – 8,83
Hemoglobina (g/d)	12,325 ± 1,25 (8)	13,4 ± 0,42 (8)	12,81 ± 1,10 (8)	12,55 ± 1,20 (8)	13,2 ± 0,26 (8)	14,33 ± 1,19
Hematócrito (%)	35,37 ± 3,79 (8)	37,55 ± 1,37 (8)	36,03 ± 3,24 (8)	35,1 ± 8,50 (8)	36,93 ± 1,76 (8)	40,52 ± 3,77
VCM (f)	52,42 ± 0,72 (8)	50,25 ± 1,90 (8)	50,81 ± 2,24 (8)	51,65 ± 15,57 (8)	51,81 ± 1,40 (8)	50,97 ± 2,00
CHM (pg)	18,275 ± 0,17 (8)	17,95 ± 0,86 (8)	18,03 ± 0,46 (8)	17,86 ± 0,45 (8)	18,2 ± 0,08 (8)	18,23 ± 1,75
CHCM (g/dL)	34,85 ± 0,37 (8)	35,675 ± 0,72 (8)	35,21 ± 0,61 (8)	35,03 ± 0,52 (8)	35,05 ± 0,85 (8)	35,76 ± 3,87
Plaquetas (10 ³ /μL)	157 ± 62,89 (8)	205 ± 90,5 (8)	171,5 ± 16,54 (8)	134 ± 81,27 (8)	192,833 ± 24,75 (8)	971 ± 140
Neutrófilos (10 ³ /μL)	0,08 ± 0,17 (8)	0,24 ± 0,24 (8)	0,15 ± 0,21 (8)	0,26 ± 0,21 (8)	0,08 ± 0,201 (8)	1,86 ± 0,99
Linfócitos (10 ³ /μL)	0,50 ± 0,11 (8)	0,49 ± 0,41 (8)	0,52 ± 0,19 (8)	0,47 ± 0,16 (8)	0,43 ± 0,14 (8)	6,76 ± 2,57
Monócitos (10 ³ /μL)	0,29 ± 0,520 (8)	0,035 ± 0,036 (8)	0,213 ± 0,420 (8)	0,371 ± 0,486 (8)	0,196 ± 0,403 (8)	0,067 ± 0,061
Eosinófilos (10 ³ /μL)	0,007 ± 0,009 (8)	0,015 ± 0,017 (8)	0,008 ± 0,007 (8)	0,011 ± 0,006 (8)	0,008 ± 0,008 (8)	0,010 ± 0,023
Basófilos (10 ³ /μL)	0,05 ± 0,04 (8)	0,02 ± 0,02 (8)	0,02 ± 0,024 (8)	0,02 ± 0,03 (8)	0,00 ± 0,00 (8)	0,01 ± 0,03
AST/TGO (U/L)	86,8 ± 17,69 (8)	68,1 ± 12,82 (8)	79,61 ± 17,95 (8)	82,46 ± 18,21 (8)	69,2 ± 23,96 (8)	107,87 ± 53,96
ALT/TGP (U/L)	46,35 ± 9,5 (8)	37,97 ± 4,38 (8)	42,96 ± 3,20 (8)	43,56 ± 3,83 (8)	40,65 ± 3,07 (8)	45,47 ± 9,23
Uréia (mg/dL)	43,75 ± 5,39 (8)	45,52 ± 4,68 (8)	44,36 ± 3,85 (8)	44,53 ± 3,25 (8)	43,11 ± 20,02 (8)	39,17 ± 6,43
Creatinina (mg/dL)	0,22 ± 0,05 (8)	0,22 ± 0,05 (8)	0,25 ± 0,05 (8)	0,26 ± 0,05 (8)	0,23 ± 0,05 (8)	0,57 ± 0,19

*G1 = apenas imunossuprimido; **G2 = imunossuprimido + infectado; †G3 = imunossuprimido + infectado + tratado com fluconazol; ‡G4 = imunossuprimido + infectado + tratado com anfotericina B e §G5 = imunossuprimido + infectado + tratado com extrato de *Schinus terebinthifolius*.

Culturas realizadas com sangue das cobaias após 48 horas da infecção foram obtidas para *Cryptococcus neoformans*, apresentando um crescimento a 37°C, evidenciando colônias com coloração branca/creme de aspecto brilhante e textura mucóide (figura 10A). Na

microscopia foram visualizadas células de leveduras capsuladas (figura 10B). A identificação do isolado foi confirmada por MALDI-TOF MS.

Figura 09 - A: Cultura de sangue feita 48 horas seguinte a infecção. Leveduras cultivada a 37°C em ágar Sabouraud por 7 dias, evidenciando a coloração creme de aspecto brilhante e textura mucóide. B: Células de levedura capsuladas, contrastadas com tinta da Nanquim (400x), característica típica de *Cryptococcus* sp.



Fonte: Araujo, 2015.

No sétimo dia de tratamento, as culturas dos grupos tratados com anfotericina B, fluconazol e com o extrato bruto de *Schinus terebinthifolius* Act:Aq (1:1) foram negativas, não havendo crescimento fúngico, evidenciando eficácia na terapia da criptococose.

Na avaliação hematológica após o tratamento as cobaias ainda apresentaram reduzida quantidade de Linfócitos devido à imunossupressão. Os parâmetros bioquímicos AST, ALT e uréia permaneceram dentro dos valores de referência para todos os grupos tratados como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos Wistar fêmeas após o tratamento da infecção. Valores expressos em média $\pm$ Desvio padrão e (n) – número de animais

Parâmetros (Unid.)	*G1 - Média (n) D.P. (n)	**G2 - Média D.P. (n)	†G3 - Média D.P. (n)	††G4 - Média D.P. (n)	‡G5 - Média D.P. (n)	Valores de referência
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,31 $\pm$ 0,60 (8)	1,43 (1)	0,58 $\pm$ 0,34 (7)	0,61 $\pm$ 0,29 (8)	0,62 $\pm$ 0,40 (7)	4,96 $\pm$ 1,55
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	6,14 $\pm$ 0,69 (8)	6,92 (1)	7,98 $\pm$ 0,23 (7)	7,91 $\pm$ 0,54 (8)	7,16 $\pm$ 0,92 (7)	5,21 – 8,83
Hemoglobina (g/d)	13,02 $\pm$ 0,76 (8)	13,9 (1)	13 $\pm$ 0,62 (7)	12,56 $\pm$ 1,33 (8)	12,94 $\pm$ 0,68 (7)	14,33 $\pm$ 1,19
Hematócrito (%)	35,52 $\pm$ 2,19 (8)	40,9 (1)	35,54 $\pm$ 2,21 (7)	35,43 $\pm$ 8,09 (8)	36,98 $\pm$ 2,34 (7)	40,52 $\pm$ 3,77
VCM (f)	54,07 $\pm$ 1,32 (8)	59,1 (1)	51,5 $\pm$ 1,64 (7)	52,08 $\pm$ 2,91 (8)	51,94 $\pm$ 2,05 (7)	50,97 $\pm$ 2,00
CHM (pg)	18,37 $\pm$ 0,17 (8)	20,1 (1)	18,44 $\pm$ 0,16 (7)	18,11 $\pm$ 0,32 (8)	18,48 $\pm$ 0,31 (7)	18,23 $\pm$ 1,75
CHCM (g/dL)	35,07 $\pm$ 0,27 (8)	34,0 (1)	35,36 $\pm$ 0,97 (7)	35,03 $\pm$ 0,52 (8)	35,32 $\pm$ 0,69 (7)	35,76 $\pm$ 3,87
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	285 $\pm$ 55,07 (8)	395 (1)	208,4 $\pm$ 51,27 (7)	261,66 $\pm$ 61,84 (8)	310,6 $\pm$ 81,84 (7)	971 $\pm$ 140
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,42 $\pm$ 0,17 (8)	0,77 (1)	0,21 $\pm$ 0,23 (7)	0,268 $\pm$ 0,16 (8)	0,286 $\pm$ 0,18 (7)	1,86 $\pm$ 0,99
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,27 $\pm$ 0,09 (8)	0,32 (1)	0,50 $\pm$ 0,07 (7)	0,478 $\pm$ 0,16 (8)	0,42 $\pm$ 0,08 (7)	6,76 $\pm$ 2,57

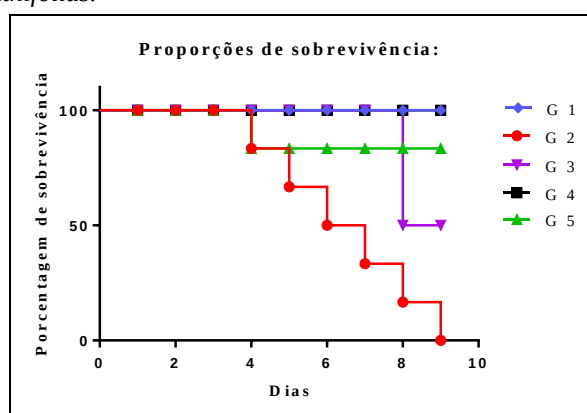
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,04 \pm 0,02$ (8)	0,29 (1)	$0,20 \pm 0,38$ (7)	$0,19 \pm 0,37$ (8)	$0,27 \pm 0,52$ (7)	$0,067 \pm 0,061$
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,01 \pm 0,00$ (8)	0,02 (1)	$0,01 \pm 0,00$ (7)	$0,03 \pm 0,02$ (8)	$0,05 \pm 0,04$ (7)	$0,010 \pm 0,023$
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,02 \pm 0,01$ (8)	0,01 (1)	$0,02 \pm 0,01$ (7)	$0,02 \pm 0,01$ (8)	$0,10 \pm 0,09$ (7)	$0,01 \pm 0,03$
AST/TGO (U/L)	$88,57 \pm 15,24$ (8)	95,5 (1)	$120,82 \pm 11,03$ (7)	$119,63 \pm 14,60$ (8)	$120,14 \pm 13,48$ (7)	$107,87 \pm 53,96$
ALT/TGP (U/L)	$45,77 \pm 7,51$ (8)	34,2 (1)	$46,54 \pm 5,12$ (7)	$42,31 \pm 2,34$ (8)	$39,42 \pm 2,95$ (7)	$45,47 \pm 9,23$
Uréia (mg/dL)	$43,92 \pm 2,70$ (8)	44,9 (1)	$45,02 \pm 2,42$ (7)	$44,53 \pm 3,25$ (8)	$43,8 \pm 21,30$ (7)	$49,17 \pm 6,43$
Creatinina (mg/dL)	$0,2 \pm 0,05$ (8)	0,2 (1)	$0,22 \pm 0,04$ (7)	$0,28 \pm 0,04$ (8)	$0,28 \pm 0,04$ (7)	$0,57 \pm 0,19$

*G1 = apenas imunossuprimido; **G2 = imunossuprimido + infectado; [†]G3 = imunossuprimido + infectado + tratado com fluconazol; [‡]G4 = imunossuprimido + infectado + tratado com anfotericina B e [§]G5 = imunossuprimido + infectado + tratado com extrato de *Schinus terebinthifolius*.

Para determinar a taxa de sobrevivência, as cobaias foram acompanhadas por 28 dias, contados a partir do primeiro dia da infecção. O tratamento foi iniciado 48 horas seguintes à infecção. Após a infecção foram observadas mortes em todas as cobaias do grupo G2 entre o 4º e o 9º dia. Um óbito no grupo G3 no 8º dia e outro óbito no grupo G5 no quarto dia.

Análise da sobrevivência após a infecção calculada pelo método de Kaplan-Meier demonstrou que o grupo de ratos tratados para criptococose com *Schinus terebinthifolius* (G5) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo G3 e G2, apresentando valor de Log-rank $p=0,0001$. Porém, não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado com o grupo tratado com anfotericina B, como demonstrado no gráfico da Figura 13.

Figura 10 – Sobrevivência acumulada a partir do primeiro dia da infecção entre os diferentes grupos de animais. Os grupos divididos em G1 = apenas imunossuprimido; G2 = imunossuprimido + infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato de *Schinus terebinthifolius*.



Fonte: Araujo, 2016.

3.4.1 TOXIDADE DE *Schinus terebinthifolius*

A fração de *Schinus terebinthifolius* que apresentou a melhor concentração *in vitro*, frente aos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* não apresentou toxicidade em teste *in vivo* por DL_{50} . Não foram observadas mortes nas cobaias (n=8) após a administração de 5 g.Kg^{-1} por via oral e acompanhados por 30 dias.

Concordando com Pires et al. (2004) que avaliou a toxicidade aguda por LD_{50} em uma administração por via oral e intraperitoneal em concentrações de 5 g.Kg^{-1} e 3.5 g.Kg^{-1} , respectivamente. Os resultados também mostram que extratos de *Schinus terebinthifolius* não apresenta toxicidade aguda.

4 CONCLUSÃO

Isolados clínicos do complexo *Cryptococcus* apresentam resistência *in vitro* a anfotericina B e dose-dependência ao fluconazol.

Extratos obtidos das plantas medicinais do Nordeste brasileiro *Libidibia ferrea* Mart., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentam atividade antifúngica *in vitro*, frente aos fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans/gattii*. Entretanto os extratos obtidos de *Eugenia uniflora* não apresentam atividade antimicótica.

O extrato obtido de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentou menores, e portanto, melhores CIM frente isolados de *Cryptococcus* quando comparado com as outras espécies de plantas.

Criptococose experimental evidenciou que o extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentou resposta terapêutica mais efetiva do que fluconazol com valores estatisticamente significantes.

Extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi não apresentou toxicidade aguda em modelo animal, corroborando sua postulação à formulação de novo fármaco.

O extrato de *Schinus terebinthifolius* não apresentou sinergismo quando combinados com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.

A combinação de extrato de *Schinus terebinthifolius* com fluconazol se demonstrou aditivo para sete isolados de *C. neoformans* e a *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Ácido gálico apresentou capacidade antifúngica para os isolados de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. parapsilosis* ATCC 22019, demonstrando relevância para futuras pesquisas na formulação prara novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABE, Lucile Tiemi; MOTA, Renata Vieira; LAJOLO, Franco Maria; GENOVESE, Maria Inés. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.27, n.2, p.394-400, abr.-Jun. 2007.
- ADLER-MOORE, Jill; PROFFITT, Rihard. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Jour. Ant. Chem.** v.48, n1, p.21-30, 2002.
- AHMAD, Iqbal; BEG, Arina. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. of Etnopharmacol.** Irlanda, v.74, p. 113-123, ago. 2000.
- ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino; HANAZAKI, Natália. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. **Braz. J. Pharmacogn.** João Pessoa, v.16, n.0, p.679-689, dec. 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J; Mims, C.W; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley. 1996.
- ALMEIDA, Durinézio José; FARIA, Marcos Ventura; SILVA, Paulo Roberto. Experimental biology in pitangueira: a review of five decades of scientific publications. **Ambiência.** Guarapuava, v.8, n.1, p.177-193, jan.-Abr. 2012.
- ALVES, Carlos Thiago; FERREIRA, Isabel; BARROS, Lillian; SILVA, Sôni; AZEREDO, Joana; HENRIQUES, Mariana. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiol.** V.9, n.2, p.139–146. 2014.
- ANDES, D; MARCHILLO, K; NETT, J; PITULA, A; SMITH, J. *In vivo* fluconazole pharmacodynamics and resistance development in a previously susceptible *Candida albicans* population examined by microbiologic and transcriptional profiling. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n.7, p.2384–2394, jul. 2006.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** V.66, n.1, p.1-9. 2007.
- ARAÚJO, Bruno S; BAY, Monica; REICHERT, Roberta; GOLDANI, Luciano. Z. Intra-abdominal Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii*: Case Report and Review. **Mycopathologia.** Porto Alegre, V.174, n.1, p.81–85, jul. 2012.
- ARGENTA, Scheila Crestanello; ARGENTA, Leila Crestanello; GIACOMELLI, Sandro Rogéri; CEZAROTTO, Verciane Schneider. Medicinal plants: popular culture versus Science. **Vivências.** V.7, n.12, p.51-60, mai. 2011.
- ASSING, K; BIRGENS, H; ARENDRUP, M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* resistant to fluconazole in an HIV-negative patient with chronic lymphocytic leukemia. **Clin Microbiol Infect.** V.9, p.441–444, 2003.

AZEVEDO, C. F; QUIRINO, Z.G.M; BRUNO, R.L.A. Pharmacobotanical study of the aerial parts of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). **Rev. Bras. Plantas Med.** Botucatu, v.17, n.1, jan.-Mar. 2015.

BAGINSKI, M; STERNAL, K; CZUB, J; BOROWSKI, E. Molecular Modeling of Membrane Activity of Amphotericin B, a Polyene Macrolide Antifungal Antibiotic. **Acta Biochim. Pol.** V.53, n.3, p.655-658, ago, 2005.

BAGETTI, Milena; FACCO, Elizete Maria Pesamosca; PICCOLO, Jaqueline; HIRSCH, Gabriela Elisa; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia; KOBORI, Cintia Nanci; VIZZOTTO, Márcia; EMANUELLI, Tatiana. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Cienc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.31, n.1, jan.-Mar. 2011.

BANSAL, PUNIT; PAUL, PIYA; MUDGAL, JAYESH; NAYAK, PAWAN G; PANNAKAL, STEVE THOMAS; PRIYADARSINI, K.I., UNNIKRISHNAN, M.K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology.** v.64, n.1, p.651-658, Set. 2012.

BAPTISTEL, A.C; COUTINHO, J.M.C.P; LINS NETO, E.M.F; MONTEIRO, J.M. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Rev. bras. plantas med.** Campinas, v.16, n.2, p.406-425, Fev. 2014.

BARBOSA JUNIOR, A. M; MÉLO, D. L. F. M; ALMEIDA, F. T. C; TRINDADE, R. DE C. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. **Rev. Bras. Pl. Med.** Campinas, v.17, n.1, p.120-132, 2015.

BAUTERS, T. G. M; SWINNE, D; BOEKHOUT, T; NOENS, L; NELIS, H. J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia**, v.153, n.3, p. 133-135, 2002.

BEECHER G. R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **Am. J. Clin. Nutr.** V.133, n.10, p.3248 – 3254, 2003.

BEER, D. JOUBERT E; GELDERBLOM W.C; MANLEY M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **J. Agric. Food Chem.** V. 51, n.4, p.902-909, fev. 2003.

BEZERRA, João Emmanoel Fernandes; LEDERMAN, Ildo Eliezer Lederman; SILVA JÚNIOR, Josué Francisco; ALVES, Marta Assunção. Performance of surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) under irrigation in the Moxotó Valley, Pernambuco State, Brazil. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, v.26, n.1, abr. 2004.

BEZERRA, Natália Aragão; FELISMINO, Delcio de Castro; CHAVES, Thiago Pereira; ALENCAR, Laianne Carla Batista; DANTAS, Ivan Coelho; SOBRINHA, Luciana Costa 2012. Evaluation of antimicrobial activity of *Eugenia uniflora* L. **BioFar.** V.08, n.2, p.40-48, out. 2012.

BII C. C; MAKIMURA, K; ABE, S; TAGUCHI, H; MUGASIA, O. M; REVATHI, G; WAMAE N. C; KAMIYA S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi. **Mycoses**. Kenya, v.50, n.1, p.25-30, jan. 2007.

BONAPACE, C.R; WHITE, R.L; FRIEDRICH, L.V; BOSSO, J.A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and *checkerboard* methods. **Diagn Microbiol Infect Dis**. V.38, n1, p.43-50, set. 2000.

BRAJTBURG, Janina; POWDERLY, William; KOBAYASHI, George S; MEDOFF, Gerald. 1990. Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Actiont. **Am. J. Clin. Mic**. V.34, n.2, p.183-188, fev. 1990

BUTTERFIELD, D.Allan; CASTEGNA, Alessandra; POCERNICH, Chava B; DRAKE, Jennifer; SCAPAGNINIB, Giovanni; CALABRESE. Vittorio. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **J. Nutr. Biochem**. v. 13, n.8, p. 444-461, ago. 2002.

CALIXTO, João B; SCHEIDT, Cristiano; OTUKI, Michel Fleith; SANTOS, Adair Roberto Soares. Biological Activity of plants extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion in Emerging Drugs**, v. 6, n.2, p. 621-79, nov. 2001.

CARVALHO, M. G; MELO, A. G. N., ARAGÃO, C. F. S; RAFFIN, F. N; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med**. Botucatu, v.15, n.1, p.158-169, jul. 2013.

CASALI, Agnes Kiesling; STAATS, Charley Christian; SCHRANK, Augusto; VAINSTEIN, Marilene Henning. *Cryptococcus neoformans*. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv**. Brasília, v.4, n.20, p.34-37, maio.-Jun. 2001.

CERUKS, Melina; ROMOFF, Paulete; FÁVERO, Oriana A; LAGO, João Henrique G. Polar phenolic constituents from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quím. Nova**. São Paulo, v.30, n.3, p.597– 599, may.-Jun. 2007.

CHARLIER, C; HART, E; LEFORT, A; RIBAUD, P; DROMER, F; DENNING, D. W; LORTHOLARY, O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? **J. Antimicrob. Chemother**. Oxford, v.57, n.3, p.384–410, jan. 2006.

CHEN, Yi-Chun; CHANG, Tzu-Yao; LIU, Jien-Wei; CHEN, Fang-Ju; CHIEN, Chun-Chih; LEE, Chen-Hsiang; LU, Cheng-Hsien. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. **BMC Infect Dis**. v.15, n.277, p.1-7, jul. 2015.

CHEONG, Jenny Wan Sai; McCormack Joe. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Med. Mycol**. v.51, n.3, p.261-269, abr. 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008b) Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts. Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA: CLSI.

Consenso em criptococose: 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, n.5, p.524-544, set.-Out. 2008.

COELHO, Aline Gonçalves; SCIO, Elita; LIMA, Isabel Vieira de Assis; NOGUEIRA, Mauro. Atividades antimicrobiana e antioxidante da *Chamomilla recutita* L. **Rev. HU.** Juiz de fora, v.38, n.1, p.86-90, jan.-Mar. 2012.

COELHO, C; BOCCA, A. L; CASADEVALL A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Pathol.** V.9, p.219-38, 2014.

COELHO, Helenilze; MATINATTI, Audrei Nunes Fernandes; ARAÚJO, Magali Benjamim; BERGOLD, Ana Maria; BUENO, Francie. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. **Braz. J. Pharmacog.** V.40, n. 2, p.256-246, abr.-Jun. 2004.

COSTA, Edja Maria Melo de Brito; BARBOSA, Ariel Siqueira; ARRUDA, Thulio Antunes; OLIVEIRA, Patrícia Teixeira; DAMETTO, Fábio Roberto; CARVALHO, Rejane Andrade; MELO, Maria das Dores. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.175-180, jun. 2010

COSTA, Edja Maria Melo de Brito; BARBOSA, Ariel Siqueira; FLORENTINO, Vinícius Gabriel BARROS; SILVA, Jhone Diego Franca; TROVÃO, Dilma Maria de Brito Melo; MEDEIROS, Ana Cláudia Dantas. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Ver. Odonto Cienc.** V.28, n.4, p.101-104, nov. 2013.

COSTA, Leidyana Moraes; GUILHON-SIMPLICIO, Fernanda; SOUZA, Tatiane Pereira. *Libidibia ferrea* (mart. ex tul) l. p. queiroz var. ferrea: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** V.7, n.4, p.48-53, 2015.

DULGER, Gorkem; DULGER, Basaran. Antifungal Activity of Hypericum havvae Against Some Medical Candida Yeast and *Cryptococcus* Species. **Trop. J. Pharm. Res.** V.13, n.3, p.405-408, jan. 2014.

DZOYEM, Jean. P; HAMAMOTO, Hiroshi; NGAMENI, Barthelemy; NGADJUI, Bonaventure Tchaleu; SEKIMIZU, Kazuhisa. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. **Drug. Disc. Therap.** V.7, n.2, p.66-72, abr. 2013.

FALCI, Diego R; DA ROSA, Franciele B; PASQUALOTTO, Alessandro. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. **Mycoses.** V.58, n.2, p.104-12, fev. 2015.

FALLER, Ana Luísa Kremer; FIALHO, Eliane. Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. **Rev Saúde Pública.** V.43, n.2, p.211-218, set. 2009.

FARIA, Renata Osório; NASCENTE, Patrícia da Silva; MEINERZ, Ana Raquel Mano; CLEFF, Marlete Brum; ANTUNES, Tatiana de Avila; SILVEIRA, Érica da Silva; NOBRE, Márcia de Oliveira; MEIRELES, Mário Carlos Araújo; MELLO, João Roberto Braga. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** V.43, n.2, p.198-200, mar.-Abr. 2010.

FB 5. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed., Brasília: ANVISA, 2010.

FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção; SANTIAGO, Rosilene Rodrigues; LANGASSNER, Silvana Maria Zucolotto; MELLO, João Carlos Palazzo; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; SOARES, Luiz Alberto Lira. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **J. Med. Plants Res.** V.7, n.40, p.3008-3013, out. 2013.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Cane. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** V.42, n.2, p.168-194, jun. 2006.

FIRACATIVE, Carolina; TRILLES, Luciana; MEYER, Wieland. MALDI-TOF MS Enables the Rapid Identification of the Major Molecular Types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex. **PLoS. One.** V.7, n.5, mai. 2012

FREITAS, A. C. C; XIMENES, N. C. A; AGUIAR, J. S; NASCIMENTO, S. C., LINS, T. U. L; MAGALHÃES, L. R; COELHO, L. C. B. B; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G; GONÇALVES-SILVA, T; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of (Caesalpinia) *Libidibia ferrea_var_parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.** Recife, v.2012, p.1-7, 2012.

FREIRES, Irlan de Almeida; ALVES, Livia Araújo; JOVITO, Vanessa de Carvalho; ALMEIDA, Leopoldina de Fátima Dantas; CASTRO, Ricardo Dias; PADILHA, Wilton Wilney Nascimento. *In vitro* antibacterial and antiadherent activities of tinctures from *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) and *Solidago microglossa* (Arnica) on dental biofilm forming bacteria. **Odontol. Clín. Cient.** Recife, v.9, n.2, p.139-143, abr.-Jun. 2010.

FREIRES, Irlan de Almeida; ALVES, Livia Araújo; JOVITO, Vanessa de Carvalho; CASTRO, Ricardo D. Antifungal activity of *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) on *Candida* strains. **Rev. Bras. Odontol.** V.20, n.52, p.41-45. 2011

GAST, Charles E; BASSO, Luiz R; BRUZUAL, Igor; WONG, Brian. Azole Resistance in *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest: Investigation of the Role of ERG11. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.57, n.11, p.5478-5485, nov. 2013.

GERGIS, V; SPILIOTIS V; POULOS C. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie.** V.45, n.1, p.70-71, jan, 1990.

GHANNEY, Nadia; RHOUMA, Ali. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) leaf extracts: Antibacterial activity against two *Agrobacterium tumefaciens* strains. **J. Crop. Prot.** V.4, n.1, p.85-96, mar. 2015.

GOMES, Fabíola Silveira; ESPÍRITO SANTO, Elaine Patrícia Tavares; SARMENTO, Dayse Nogueira; SILVA, Silvia Helena Marques. Chemotype determination and phenotypic characterization of isolated *Cryptococcus* from Belém, Pará State, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude.** V.1, n.4, p.43-49, 2010.

GOULART, Letícia Silveira; TELES, Helder Lopes; MENDES, Vanessa Alves; VIEIRA, Marizete Cavalcante de Souza; MOURA, Selma Vieira; RAMON, Júlia de Lima; SOUZA, Jacqueline Marques; VIEIRA, José Cavalcante Souza; CAMPOS, Érica Pereira. Antifungal prospecting in *Agonandra brasiliensis*. **Rev. Bras. Farm.** V.94, n.3, p.289–294, 2013.

GREATTI, Vanessa Raquel; NEVES, Fernando Tozze Alves; CORAL, Dorival José; WECKWERTH, Paulo Henrique. Antibacterial activity “*in vitro*” of mastic (*Schinus terebinthifolius*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) strains against Gram positive and Gram negative. **Salusvita**. V.33, n.3, p.345-354. 2014.

GUERRA, Caroline Rezende; ISHIDA, Kelly; NUCCI, Marcio; ROZENTAL, Sônia. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.107, n.5, p.582-590, ago. 2007.

ISHIDA, Kelly; MELLO, J.C.P; CORTEZ, D.A.G; FILHO, B.P.D; UEDA-NAKAMURA, T; NAKAMURA, Celso Vataru. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.** v.58, n.5, p.942-9, 2006.

ISHIDA, Kelly; Rozental, Sonia; PALAZZO, João Carlos de Mello; NAKAMURA, Celso Vataru. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** V.8, n.29, nov. 2009.

JANIKUES, Alessandra Grau de Paula Ramos; LEAL, Viviane de Oliveira; MOREIRA, Nara Xavier; SILVA, Alexandra Anastácio Monteiro; MAFRA, Denise. Phenolic compounds: possible applicability in chronic kidney disease. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.** São Paulo, SP, v.38, n.3, p.322-337, dez. 2013.

JESUS, Neyres Zínia Taveira; LIMA, Joaquim Corsino da Silva; DA SILVA, Regilane Matos; ESPINOSA, Mariano Martinez; MARTINS, Domingos Tabajara de Oliveira. Ethnobotanical survey of plants popularly used as anti-ulcer and anti-inflammatory in Pirizal, Nossa Senhora do Livramento, MT, Brazil. **Rev. bras. farmacogn.** João Pessoa, v.19, n.1, p.130-139, jan.-Mar. 2009.

JOHANN, Susana; PIZZOLATTI, Moacir G; DONNICI, Cláudio L; RESENDE, Maria Aparecida. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.** V.38, p.632-637, set 2007.

JOHANN, Susana; SÁ, Nívea P; LIMA, Luciana ARS; CISALPINO, Patricia S; COTA, Betania B; ALVES, Tânia M; SIQUEIRA, Ezequias P; ZANI, Carlos L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** V. 9, n.30, 2010.

KHANBABAEE, Karamali; REE, Teunis van. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product. Reports**. Londres, v.18, p.641-649, 2001.

KIDD, S.E; HAGEN, F; TSCHARKE, R.L; A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.101, n.49, p.17258–17263, dez. 2004.

KOBAYASHI, Yuri Teiichi da Silva; ALMEIDA, Vívian Tavares; BANDEIRA, Talita; ALCÂNTARA, Bianca Nascimento; SILVA, Andressa Santa Brígida; BARBOSA, Wagner

RAMOS, Luiz; SILVA, Paula Barbosa; MONTEIRO, Maria Vivina Barros; ALMEIDA, Milton Begeres. Phytochemical evaluation and wound healing potential of the fruit extract ethanolic of Jucá (*Libidibia ferrea*) in Wistar rats. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v.52, n.1, p.34-40, 2015.

KWON-CHUNG, Kyung J; POLACHECK I; BENNETT J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.** V.15, n.3, p.535-7, mar 1982.

KWON-CHUNG, Kyung J; SAIJO, Tomomi. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? **J. Fungi.** V.1, n.2, p.154-167, jul. 2015.

LACAZ, C. S; PORTO, E; MARTINS, J. E. C; HEINS-VACCARI, E. M; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed. São Paulo, Sarvier. 2002.

LAGO, João Henrique G; SOUZA, Elisângela Dutra; MARIANE, Bruna; PASCON, Renata; VALLIM, Marcelo. A; MARTINS, Roberto Carlos C; BAROLI, Adriana A; CARVALHO, Bianca. A; SOARES, Marisi G; SANTOS, Roberta T; SARTORELLI, Patricia. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of *Myrtaceae* — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules.**v.16. p.9827-9837, 2011.

LAMBRECHT, Fernanda Raquel; DALLABRIDA, Juliana Pizutti; CUCHI, Tarik; SALAMONI, Adriana Tourinho. Influência do substrato na germinação e no desenvolvimento inicial de *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan. **Enciclopédia Biosfera.** Goiânia, v.11, p.1217-1224, jun. 2015.

LEECHAWENGWONGS, Manoon; MILINDANKURA, Samaniya; SATHIRAPONGSASUTI, Kriengkrai; TANGKOSKUL, Teerawit; PUNYAGUPTA, Sompone. Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* VGII in a tsunami survivor from Thailand. **Med. Mycol.** V.6, p.31–33, ago. 2014.

LEWIS, Russell E; DIEKEMA, Daniel; MESSER, SA; PFALLER, Michael; KLEPSER, Michael E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **J Antimicrob. Chemother.** V.49, n.1, p.345-351, fev. 2002.

LIA, Meng; LIAOB, Yong; CHENA, Min; PANA, Weihua; WENG, Lixing. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. **Braz. J. Infect. Dis.** V.16, n.2, p.175-179, 2012.

LIMA, Igara de Oliveira; OLIVEIRA, Rinalda de Araújo Guerra; LIMA, Edeltrudes de Oliveira; FARIAS, Nilma Maria Porto; SOUZA, Evandro Leite. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. **Rev. Bras. Farmacogn.** João Pessoa, v.16, n.2, p.197-201, abr.-Jun. 2006.

LIMA, L. B; VASCONCELOS, C. F. B; MARANHÃO, H. M. L; LEITE, V. R.; FERREIRA, P. A; ANDRADE, B. A; ARAÚJO, E. L; XAVIER, H. S; LAFAYETTE, S. S. L; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **J. Ethnopharmacol.** V.126, n.3, p. 468-73, dez. 2009.

LIMA, Maria Raquel Ferreira; LUNA Josiane de Souza; SANTOS, Aldenir Feitosa; ANDRADE, Maria Cristina Caño; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart; GENET, Jean-Pierre; MARQUEZ, Béatrice; NEUVILLE, Luc; MOREAUB, Nicole. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** V.105, n.1-2, p.37–147, abr. 2006.

LIN, Chih-Chen; TSENG, Hsiang-Kuang; WANG, Wei-Sheng; CHEN, Yee-Chun; HUANG, Tseng-Yu; WU, Alice Ying-Jung; LIU, Chang-Pan. *Cryptococcus gattii* Meningitis Developed after Pneumonectomy in A Case of Necrotizing Pneumonia. **Journal of Internal Medicine of Taiwan.** V.25, n.1, p.1-6, 2014.

LI, Shu Shun; MODY, Christopher H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc.** V.7, n.3, p.186–196. 2010.

LUCENA, Periguari Luiz Holanda; FILHO, Jurandir Marcondes Ribas; MAZZA, Marcelo; CZECHKO, Nicolau Gregori; DIETZ, Ulrich Andreas; NETO, Mario Adolfo Correa; HENRIQUES, Gilberto Simeone; SANTOS, Orlando José; CESCHIN, Álvaro Pigatto; THIELE, Edilson Schwansee. Evaluation of the areira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, V.21, n.2, p.46-51, 2006.

MACIEL, Maria Aparecida M; PINTO, Angelo C; VEIGA JR, Valdir F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova.** V.25, n.3, p.429-438, 2002.

MARREIRO, Raquel Oliveira; BANDEIRA, Maria Fulgência Costa Lima; SOUZA, Tatiane Pereira; ALMEIDA, Mailza Costa; BENDAHAM, Katiana; VENÂNCIO, Gisely Naura; RODRIGUES, Isis Costa; COELHO, Cristiane Nagai; MILÉRIO, Patrícia Sâmea Lêdo Lima; OLIVEIRA, Glauber Palma; CONDE, Nikeila Chaco Oliveira. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin. Cosmet. Investig. Dent.** V.6, p.9–13, jan. 2014.

MacDONALD, A. J; CULLEN, B. E. Drug interactions in anesthesia. **Curr. Rev. PAN.** V.22, n.8, p.89-100, 2000.

MACIEL, Maria Aparecida M; PINTO, Angelo C; VEIGA Jr, Valdir F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, V. 25, n.3, p.429-438, 2002.

MA, H; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus species*. **Adv. Appl. Microbiol.** V.67, p.131-190, 2009.

MCTAGGART, Lisa. R; LEI, Eric; RICHARDSON, Susan. E; HOANG, Linda; FOTHERGILL, Annette; ZHANG, Sean. X. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J. Clin. Microbiol.** v.49, n.8, p.3050-3053, ago. 2011.

MARTINS, Maristela; KLUCZKOVSKI; Ariane Mendonça, SOUZA, Tatiane Pereira; PACHECO, Carolina; SAVI, Geovana Dagostim, SCUSSEL, Vildes Maria. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paulliniacupana Kunth*) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **Academic. Journals.** V.13, n.1, p.131-137, jan. 2014.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S; GONZÁLEZ-GALLEGO, J; CULEBRAS, J.M; TUÑÓN, M.J; Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp.** V.17, n6, p.271-878. 2002.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J. Bras. Pneumol.** São Paulo, v.32, n.5, set.-Out. 2006.

MELO, Maria do Socorro Fernandes; ROCHA, Claudia Quintino; SANTOS, Marcelo Henrique; CHAVASCO, Juliana Moscardini; CHAVASCO, Jorge Kleber. Research with antimicrobial activity of bioactive hydroethanolic extracts fruit, leaf and stem bark of *Zizyphus joazeiro* Mart. **RUVRD.** Três Corações, v. 10, n. 2, p. 43-51, ago.-Dez. 2012.

MEYA, David B; OKURUT, Samuel; ZZIWA, Godfrey; ROLFES, Melissa A; KELSEY, Melander; COSE, Steve; JOLOBA, Moses; NALUYIMA, Prossy; PALMER, Brent E; KAMBUGU, Andrew; MAYANJA-KIZZA, Harriet; BOHJANEN, Paul R; ELLER, Michael A; WAHL, Sharon M; BOULWARE, David R; MANABE, Yuka C; JANOFF, Edward N. Cellular immune activation in cerebrospinal fluid from ugandans with cryptococcal Meningitis and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. **JID.** V.211, n.10, p.1597-1606, mai. 2015.

MEYER, Sofie E; FABIANO, Elena; TIAN, Rui; VAN BERKUM, Peter; SESHADRI, Rekha; REDDY, Tbk; MARKOWITZ, Vitor; IVANOVA, Natalia., PATI, Amrita; WOYKE, T Tanja; HOWIESON, J John; KYRPIDES, Nikos; REEVE, Wayne. High-quality permanent draft genome sequence of the *Parapiptadenia rigida* nodulating *Burkholderia* sp. strain UYPR1.413. **Stand Genomic Sci.** V.10, n.31, p.1-8. 2015.

MEYER, W; MARSZEWSKA, K; AMIRMOSTOFIAN, M; IGREJA, R. P; HARDTKE, C; METHLING, K; VIVIANI, M. A; CHINDAMPORN, A; SUKROONGREUNG, S; JOHN, M. A; ELLIS, D. H; SORREL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, n.8, p.1790-1799. Jun. 1999.

MISHRA, K.P; GANJU L; SAIRAM M; BANERJEE P.K; SAWHNEY R.C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomed Pharmacother.** V.62, n.2, p.94-98, jul. 2008.

MITCHELL, Thomas G; PERFECT, John R. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.** v.8, p.515-548, out. 1995.

MONDO, Vitor Henrique Vaz; BRANCALION, Pedro Henrique Santini; CICERO, Silveio Moure; NOVENBRE, Ana Dionisia da Luz Coelho; NETO, Durval Dourado. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (BENTH.) BRENAN (FABACEAE). **Rev Bras Sementes.** v.30, n.2, p.177-183, 2008.

MONTEIRO, Julio Marcelino; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino; ARAÚJO, Elcida de Lima. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova.** V.28, n.5, p.892-896, 2005.

MORAIS-BRAGA, M. F. B; SOUZA, T. M; SANTOS, K. K. A; GUEDES, G. M. M; ANDRADE, J. C; TINTINO, S. R; COSTA, J. G. M; MENEZES, I. R. A; SARAIVA, A. Á. F; COUTINHO, H. D.M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 12, n. 1, p. 157-162, 2013.

MURRAY, Patrick R; BARON, Ellen Jo. **Manual of clinical microbiology**. 9th. ed. Washington: ASM, 2007.

MUKHOPADHYAY, Shayanki Lahiri; KUMAR, Mukesh; CHICKABASAVIAH, Yasha T; BAHUBALI, Veena Kumari H; RAJ, Prabhu A.R; BHARATH, Rose Dawn; SIDDAIAH, Nagarathna. Cerebellar cryptococcoma due to *Cryptococcus gattii* VGI; a rare and first report from India. **JMM. Case Reports**. Abr. 2015.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr A**. V.1054, n.1-2, p.95-111, out. 2004.

NEOFYTOS, D; FISHMAN, J.A; HORN, D; ANAISSIE, E; CHANG, C. H; OLYAEI, A; PFALLER, M; STEINBACH, W. J; WEBSTER, K. M; MARR, K. A. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transpl Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 220-229, jun. 2010.

NEWMAN, David J; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. 2012. **J. Nat. Prod**. V.75, n.3, p. 311–335, fev. 2012.

NIJVELDT, Robert J; NOOD, Els van; HOORN, Danny; BOELEN, Petra G; VAN NORREN, Klaske; LEEUWEN, Paul Van. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Cli Nutr**. V.74, p.418–425, 2001.

activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* L. against microorganisms of the oral cavity. **Rev. Fitos**. Rio de Janeiro, v.8, n.2, p.95-102, jul.-Dez 2013.

ODDS, F. C. 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemothe**. V.52, n.1, p.1, Jun 2003.

OLIVEIRA, Cibele Braga; SOARES, Diana Garbiela de Souza; PAULO, Marçal de Queiroz; PADILHA, Wilton Wilney Nascimento. Antibacterial Activity in vitro of *Eugenia uniflora* L. (pitanga) against Cariogenic Bacteria. **R. Bras. Ci. Saúde**. V.12, n.3, p.239-250, 2008.

OLIVEIRA, Glauber P; SOUZA, Tatiane P; CAETANO, Sheila K; FARIAS, Kaliny S; VENANCIO, Gisely N; BANDEIRA, Maria. F. C. L; CONDE, N. C. O. Antimicrobial activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* l. against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, n.2, p.73-160, jul.-Dez. 2013.

OLIVEIRA, JUNIOR, L.F.G; SANTOS, R.B; REIS, F.O; MATSUMOTO, S.T; BISPO, W.M.S; MACHADO, L.P; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med**. Botucatu, v.15, n.1, p.150-157, jul. 2013.

OLIVEIRA, L. F. S; FUENTEFRIA, A. M; KLEIN, F. S; MACHADO, M. M; Antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* strains and genotoxicity assessment in human leukocyte cells of *Euphorbia tirucalli* L. **Braz. J. Microbiol.** V.45, n.4, p.1349-1355, abr. 2014.

OLIVEIRA, P. C; MEDEIROS, C. S. Q; MACÊDO, D. P. C; ANDRADE, S. L; CORREIA, M. T. A. L; MESQUITA, S. D; LIMA-NETO, R. G; NEVES, R. P. Ciclopirox olamine: an antifungal alternative against cryptococcosis. **Lett. Appl. Microbiol.** V.51, p.485-489, jul. 2010.

OKUDA, Takuo; ITO, Hideyuki. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules.** V.16, p.2191-2217, 2011.

ORHAN, Gani; BAYRAM, Aysen; ZER, Yasemin; BALCI, Iclal. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **J. Clin. Microbiol.** V.43, n.1, p.140-143, jan. 2005.

PANKEY, George A; ASHCRAFT, Debroah S. *In vitro* synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** V.49, n.7, p.2959-2964, Jul. 2005.

PANKEY, George A; ASHCRAFT, Debroah S. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest® and time-kill assay. **Diagnostic. Microbiol and Infect. Dis.** v.63, n.2, p.228-232, fev. 2009.

PARK, Benjamin J; WANNEMUEHLER, Kathleen A; MARSTON, Barbara J; GOVENDER, Nelesh; PAPPAS, Peter G; CHILLER, Tom M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS.** v.23, n.4, p.525-530, fev. 2009.

PASSOS, Xisto Sena; SANTOS, Suzana da Costa; FERRI, Pedro Henrique; FERNANDES, Orionalda de Fátima Lisboa; PAULA, Thaliana de Freitas; GARCIA, Ana Cristina Ferreira; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues. Atividade antifúngica de *Cariocar brasiliensis* (caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. 2002. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.35, n.6, nov.-Dec. 2002.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos; COSTA, Karen Regina Carim; Ferreira, Joseane Cristina; Candido, Regina Celia. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Rev da Soc Bra Med Trop.** Uberaba, v.40, n.5, out. 2007.

PETERSON, J; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr. Res.** v.18, n.12, p.1995- 2018, 1998.

PEREA, S; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clin. Infect. Dis.** V.35, n.9, p.1073-1080, nov 2002

PERFECT, John. R; BICANIC, Tihana. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet. Biol.** V.78, p.49–54, mar. 2015.

PERFECT, John R; DISMUKES, William E; DROMER, Francoise; GOLDMAN, David L; GRAYBILL, John R; HAMILL, Richard J; HARRISON, Thomas S; LARSEN, Robert A; LORTHOLARY, Olivier; NGUYEN, Minh-Hong; PAPPAS, Peter; POWDERLY, William; SINGH, Nina; SOBEL, Jack D; SORRELL, Tania C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** V.50, p.291–322, jan. 2010.

PERFECT J. R; COX, GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resist Updat**, v.2, n.4, p.259-269, ago. 1999.

PETERSEN, Peter J; LABTHAVIKUL, Ponpen; JONES, C. Hal; BRADFORD, Patricia A. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **J. Antimicrob. Chemother.** V.57, n.3, p.573-576, mar. 2006.

PIRES, O. C; TAQUEMASA, A. V. C; AKISUE, G; OLIVEIRA, F; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.) **Acta Farm Bonaer**, v. 23, p. 176-82, 2004.

REOLON, Aline; PEREZ, Leandro Reus Rodrigues; MEZZARI, Adelina. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v.40, n.5, p.293-298, out. 2004.

ROCHA, Juliana D. B; NASCIMENTO, Michelle T. C; RICARDO, Debora Decote; CORTE-REAL, Suzana; MORROT, Alexandre; HEISE, Norton; NUNES, Marise P; PREVIATO, José Osvaldo; MENDONÇA-PREVIATO, Lucia; REIS, George A; SARAIVA, Elvira M; FREIRE-DE-LIMA, Célio G. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. **Scien. Rep.** v.5, n.8008, jan. 2015.

ROEBUCK, D; FISHER, D. A; CURRIE, B. J. Cryptococcosis in HIV negative patients: findings on chest radiography. **Thorax**. V.53, p.554–557, fev. 1998.

SAAG, M. S; GRAYBILL, R. J; LARSEN, R. A; PAPPAS, P. G; PERFECT, J. R; POWDERLY, W. G; SOBEL, J. D; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin. Infect. Dis.** V.30, n.4, p.710–718, abr. 2000.

SÁ, Erica Renata Nogueira; MEDEIROS, Cássio Ilan Soares; OLIVEIRA, Juliana Raquel de Moraes Santos; EVANGELISTA, Antonio José de Jesus; MAGALHÃES, Maria Iranilda Silva; FILHO, Geraldo Gonçalves de Almeida; PAZ, Andréa Maria Rolim; PESSÔA, Hilzeth de Luna Freire. “*In Vitro*” Antibacterial Activity of the Hidroalcoholic Extract of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Barks. **Adv. Microb.** V.4, p.761-765. 2014.

SANATI, H; MESSER, S.A; PFALLER, M; WITT, M; ESPINELL-INGROFF, A; Ghannoum, M. 2006. Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility

testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazole. **J. Clin. Microbiol.** v.34, n.5, p.1280-1282. 1996.

SANTANA, Jeferson S; SARTORELLI, Patricia; GUADAGNIN, Rafael C; MATSUO, Alisson L; FIGUEIREDO, Carlos R; SOARES, Marisi G; SILVA, Adalberto M; LAGO, João Henrique G. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. **Pharm. Biol.** V.50, n.10, p.1248-1253, 2012.

SANTOS, C; PATERSON, RUSSELL; Venancio, A; NELSON, Lima. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J. Appl. Microbiol.** v.108, n.2, p.375–385, fev. 2010.

SANTOS, Paula Macedo Lessa; JAPP, Alberto Sadda; LIMA, Livia Gralato; SCHRIPEMA, Jan; MENEZES, Fábio de Sousa; KUSTER, Ricardo Machado. Atividade antioxidante dos extratos de folhas de Jacarandá puberula Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Rev. Bras. de Farmacogn.** Curitiba, v.20, n.2, p.147-153, abr.-Mar. 2010.

SANTOS, Wallace Raimundo A; MEYER, Wieland; WANKE, Bodo; COSTA, Solange Evangelista; TRILLES, Luciana; NASCIMENTO, Jose Luiz M; MEDEIROS, Rita; MORALES, Bernardina Pernarrieta; BEZERRA, Claudia de Carvalho Falci; MACÊDO, Regina Célia Lima; FERREIRA, Silvana O; BARBOSA, Gláucia Gonçalves; PEREZ, Mauricio A; NISHIKAWA, Marília Martins; LAZÉRA, Márcia dos Santos. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V.103, n.8, p.813-818, 2008.

SANTOS, J. R; DOMINGOS, Inaldo; SOUZA, Izamara Araújo Moraes; BORGES, Renata Gomes; SOUZA, Luciana B. S; SANTANA, Willma J; COUTINHO, Henrique Douglas M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Med.** 15. Porto Alegre, v. 15, n. 3, p. 189-197, jul.-Set. 2005.

SCHELENZ, Silke. Management of candidiasis in the intensive care unit. **J. Antimicrob. Chemother.** V.61, n.1, p.31–34. 2008.

SECOLI, S. R. Drugs interactions: fundamental aspects for clinical practice nursing. **Rev. Esc. Enf.** v.35, n. 1, p. 28-34, mar. 2001.

SEVERO, Cecília Bittencourt; GAZZONI, Alexandra Flávia; SEVERO, Luiz Carlos. Criptococose pulmonar. **J. Bras Pneumol.** V. 35, n.11, p.1136-1144, 2009.

SHALE, T.L., STIRK W.A., VAN STADEN J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **J. Ethnopharmacol.** V.67, n.3, p.347-354, 1999.

SILVA FILHO, Ademar A; SOUSA, João P. B; SOARES, Sandra; FURTADO, Nieger A. J. C; SILVA, Marcio L. Andrade; CUNHA, Wilson R; GREGÓRIO, Luís E; NANAYAKKARAC, N. P. Dhammika; BASTOS, Jairo. K. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Z. Naturforsch.** V.63, n.1-2, p.40-46, jan.-Fev. 2008.

SILVA, Paulo Roberto; RABELO, Rosiley Aparecida de Souza; TERRA, Ana Paula Sarreta; TEIXEIRA, David Nascimento Silva. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.41, n.2, p.158-162, mar.-Abr. 2008.

SIVARANJINI, Alagiri; UMA, Sekar; JYOTI, Kindo Anupma; SHANKAR V. 2015. *Cryptococcus gattii* meningitis in a young adult in South India: A case report. **Int. J. Case Rep. Images.** V.6, n.11, p.702–706, 2015.

SLOAN, Derek J; PARRIS, Victoria. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clin. Epidemiology.** V.6, p.169–182, 2014.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr.** Campinas, v.15, n.1, p.71-81, jan.-Abr. 2002.

SOUSA, Rosemary da Silva; HANAZAKI, Natalia; LOPES, João Batista; BARROS, Roseli Farias Melo. Are gender and age important in understanding the distribution of local botanical knowledge in fishing communities of the parnaíba delta environmental protection area? **Ethnobotany Research & Applications.** v.10, p.551-559, 2012.

SOUZA, Lúcia Kioko Hasimoto; OLIVEIRA, Cecília Maria Alves; FERRI, Pedro Henrique; SUZANA, Costa Santos; JÚNIOR, Juldásio Galdino de Oliveira; MIRANDA, André Thiago Borges; LIÃO, Luciano Moraes; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Braz. J. of Microbiol.** V.33, p.247-249, 2002.

SOUZA, Michele Moraes; OLIVEIRA, Melissa dos Santos; ROCHA, Meritane; FURLONG, Eliana Badiale. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, V.30, n.3, p.680-685, jul.-Set. 2010.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control.** V.34, n.1, p. 64-73, jun. 2006.

TERRA JUNIOR, O. N; MALDONADO, G. C; ALFRADIQUE, G. R; ARNÓBIO A. Study of Acute Genotoxic Potential of an Aqueous Extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi: an in vivo Micronucleus Assay. **Adv. Stud Biol,** V.7, n.8, p.35 – 364, 2015.

VENÂNCIO, Gisely Naura; RODRIGUES, Isis Costa; SOUZA, Tatiane Pereira; MARREIRO, Raquel de Oliveira; BANDEIRA, Maria Fulgência Costa Lima; CONDE, Nikeila Chacon de Oliveira. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Ver. Odontol.** V.44, n.2, p.118-124, mar.-Abr. 2015.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro; RENHE, Isis Rodrigues Toledo; BARRA, Kiriaque; STRINGUETA, Paulo César. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** V.23, n.2, p.141-149, 2008.

WANG, Jennifer; BARTELT, Luther; YU, Deborah; JOSHI, Anjali; WEINBAUM, Bradley; PIERSON, Tiffany; PATRIZIO, Michael; WARREN, Cirle A; HUGHES, Molly A;

DONOWITZ, Gerald. Primary Cutaneous Cryptococcosis Treated with Debridement and Fluconazole Monotherapy in an Immunosuppressed Patient: A Case Report and Review of the Literature. **Cas. Rep. Inf. Dis.** V.1, p.1-08, jan. 2015.

WHITE, Roger L; BURGESS, David S; MANDURU, Madhavi; BOSSO, John A. Comparison of Three Different *In Vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.40, n.8, p.1914–1918, ago. 1996.

YAMAZUMI, T; PFALLER, M. A; MESSER, S. A; HOUSTON, A. K; BOYKEN, L; HOLLIS, R. J; FUTURA, I; JONES, R. N. Characterization of Heteroresistance to fluconazol among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** V.41, n.1, p.267-272, jan. 2003.

YAN, Liping; ZHANG, Linlin; YANG, Hua; XIAO, Heping. In Vitro Synergism Testing of Three Antimicrobial Agents against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Checkerboard Method. **J. Mol. Pharm. Org. Process. Res.** V.2, n.3, p.1-4. 2014.

ZARAGOZA, Oscar; RODRIGUES, Marcio L; JESUS, Magdia; FRASES, Susana; DADACHOVA, Ekaterina; CASADEVALL, Arturo. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv. Appl. Microbiol**, v.68, p.133–216, 2009.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

Recife, 24 de novembro de 2014.

Ofício nº 76/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto**
Departamento de micologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.023319/2014-39

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Potencial antifúngico in vitro e in vivo de metabólitos bioativos de plantas medicinais do nordeste.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do CCS/ UFPE; Animais: ratos Hetegênico; Linhagem: Wistar; Idade: 60 dias; Peso: 250g; Sexo:fêmea; N° total de animais: 99.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SUAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver