

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR - PMBQBM

Mônica Maria de Almeida

Avaliação da atividade antifúngica de plantas nativas do Brasil frente às linhagens de
Cryptococcus* e *Candida

Governador Valadares

2024

Mônica Maria de Almeida

**Avaliação da atividade antifúngica de plantas nativas do Brasil frente às linhagens de
Cryptococcus e *Candida***

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares como requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Gabriella Freitas Ferreira

Governador Valadares

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida , Mônica Maria de .

Avaliação da atividade antifúngica de plantas nativas do Brasil frente às linhagens de *Cryptococcus* e *Candida* / Mônica Maria de Almeida . -- 2024.

155 f.

Orientador: Gabriella Freitas Ferreira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

1. *Candida*. 2. *Cryptococcus*. 3. *Anacardium occidentale*. 4. *Myracrodruon urundeuva*. 5. Tratamento. I. Ferreira, Gabriella Freitas , orient. II. Título.

Mônica Maria de Almeida

**Avaliação da atividade antifúngica de plantas nativas do Brasil frente às linhagens de
Cryptococcus e Candida**

Tese apresentada ao
Programa
Multicêntrico de
Pós-Graduação em
Bioquímica e
Biologia Molecular da
Universidade Federal
de Juiz de Fora como
requisito parcial à
obtenção do título
de Doutor em
Bioquímica e
Biologia Molecular.
Área de
concentração:
Bioquímica e
Biologia Molecular.

Aprovada em 11 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira - Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro
Universidade CEUMA

Prof. Dr. Rodrigo Assunção de Holanda

UPE

Profa. Dra. Marliete Carvalho da Costa

Universidade CEUMA

Profa. Dra. Luísa Helena Perin de Melo

UNIVALE

Juiz de Fora, 17/10/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira, Professor(a)**, em 12/12/2024, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Assunção de Holanda, Usuário Externo**, em 12/12/2024, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARLIETE CARVALHO DA COSTA, Usuário Externo**, em 12/12/2024, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea de Souza Monteiro, Usuário Externo**, em 12/12/2024, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luísa Helena Perin de Melo, Usuário Externo**, em 12/12/2024, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2048275** e o código CRC **ADFFC300**.

Dedico este trabalho, primeiramente, à Deus, ao meu marido, meu filho e minha mãezinha que me fazem querer ser sempre uma pessoa melhor e estão sempre juntos de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que com sua infinita bondade, me permitiu trilhar todos os caminhos para que pudesse chegar até aqui, com saúde e paz.

Ao meu amor, parceiro de vida, que sempre me apoiou a alçar voos maiores e conquistar meus sonhos. Agradeço a compreensão pela minha ausência, a confiança em mim depositada, que me fez ir longe, num momento em que acreditava que já tinha realizado tudo o que devia.

Ao meu filho, presente de Deus na minha vida, meu orgulho, para quem eu procuro ser um exemplo, e me tornar cada vez uma pessoa melhor. Agradeço a Deus por você existir em minha vida. Desculpa a mamãe por todas as vezes que você não pode ter toda a minha atenção.

À minha mãe, que sempre me ensinou a enfrentar todos os desafios, independentemente do tamanho, esforço que tivesse que ser feito, e que, incondicionalmente, acredita em mim e está sempre ao meu lado.

À minha orientadora, minha amiga do coração, que aceitou também, a empreitada de ser minha orientadora. Obrigada por me ensinar tanto, pela paciência, pela compreensão com as particularidades, e por estar sempre com um sorriso, mesmo nas horas mais complicadas, e não foram poucas... Obrigada pelas conversas, que me ajudaram nos momentos mais difíceis, difíceis mesmo.

À professora Karen, que me acolheu, uma bióloga, e tanto me ensinou no mundo da Farmacognosia, das plantas nativas, dos extratos e frações, além do pouco tempo de sobrevivência do café depois de pronto, nunca esqueci. Muito obrigada pela paciência e pela inestimável ajuda neste trabalho.

Às minhas amigas-irmãs, Layla, Livia e Lorena, parceiras de trabalho, dos risos e choros, dos percalços e das alegrias vividas juntas. Obrigada por estarem presentes, ajudando com tudo, conversando, ouvindo e apoiando. Muito obrigada por me ajudarem tanto, tanto nesses anos, seria impossível sem a contribuição de vocês.

À Mari, uma grande parceria, com quem dividi a orientadora, o laboratório, os experimentos, e, agora também, uma parceira no trabalho que ganhei de presente ao longo desta caminhada. Obrigada pela companhia, pelos nossos desesperos e alegrias juntas, pelas idas e vindas, pelo ombro amigo e claro, pela guarda compartilhada de nossos *Tenebrios*...

Ao Claudine, uma das pessoas mais generosas que já conheci nesta vida, que já está junto ao Senhor, a quem devo, todo o suporte na busca da nossa aroeira. E, ao Sr. Gilson, que

nos abriu as portas do seu sítio, fornecendo material precioso. Que vocês tenham sempre um bom lugar.

À Débora, pessoa tão especial, que sempre está ao nosso lado, agradeço por sua amizade, parceria, pela escuta, pelas orações, por seu trabalho inestimável e pelo incentivo.

À Sandra, que com seu trabalho impecável, me ajudou a cuidar de minha casa durante este período, e anteriores. Obrigada pela sua amizade, pelo amor que você tem pelo meu filho, e por você ser tão especial pra nós.

À Marlucy, pelos anos de amizade, e pela imensa ajuda com nosso material e conversas, viabilizando este e muitos outros trabalhos. Agradeço por todos os ensinamentos dentro do laboratório.

À UNIVALE, pela oportunidade me concedida, há tantos anos, de fazer aquilo que mais gosto, lecionar. Além, claro, do apoio, através de projeto de pesquisa e bolsa de iniciação científica aos meus alunos.

Aos meus alunos de Iniciação Científica da UNIVALE, Elisa, Isadora, Milena, Rodolfo e Thainá, que toparam participar do nosso projeto, e tanto contribuíram na preparação para nossos experimentos. Após esses anos de convivência, tenho certeza que vocês serão excelentes profissionais, além de éticos e comprometidos.

Enfim, mesmo sem a citação direta, peço desculpas, mas agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente, de todo processo, que me permitiu chegar até aqui.

“Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada, sempre haverá mais um caminho a
percorrer.”

Santo Agostinho

RESUMO

As plantas medicinais são fundamentais na descoberta de fármacos, oferecendo compostos bioativos com propriedades terapêuticas e reforçando a importância da preservação da biodiversidade. O estudo de plantas como fontes de moléculas antimicrobianas é uma estratégia inovadora para a saúde. *Anacardium occidentale* e *Myracrodruon urundeuva*, ambas da família Anacardiaceae, têm uso etnofarmacológico e ação antibacteriana conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de plantas nativas frente a linhagens do gênero *Cryptococcus* e *Candida*. A fase inicial deste estudo consistiu numa triagem com plantas nativas por meio do teste de concentração inibitória mínima (CIM). Após esta primeira triagem, *A. occidentale* e *M. urundeuva* se mostraram as mais promissoras para a continuação do trabalho. E, num segundo momento, a fração acetato de etila obtida dos extratos etanólicos das cascas de *A. occidentale* (FAAo) e *M. urundeuva* (FAMu) foi a escolhida para os testes seguintes. Assim, as duas frações foram testadas quanto à sua ação anti-*Candida* e anti-criptococócica *in vitro*, através da determinação da concentração inibitória e fungicida mínima (CIM/CFM). A seguir, foram avaliadas a cinética de morte e capacidade de inibir a formação de biofilme da FAAo. Foram feitos ensaios para tentar compreender o mecanismo de ação da FAMu contra linhagens de *Cryptococcus sp.*, como avaliação do conteúdo de ergosterol, peroxidação lipídica, causada pela FAMu foi avaliada através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ação do sistema antioxidante e alterações no diâmetro celular. Além disso, um ensaio de infecção, *in vivo*, foi realizado utilizando larvas de *Tenebrio molitor*. A FAAo demonstrou CIM menores que 10 µg/mL para todas as linhagens de *Candida* testadas e foi capaz de reduzir a formação de biofilmes das linhagens *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 10231 em baixas concentrações. Compostos fenólicos da FAMu demonstraram atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida* e *Cryptococcus*, com efeito dose-dependente em todas as linhagens testadas. A FAMu alterou o conteúdo de ergosterol, induziu peroxidação lipídica, modificou a cápsula do *Cryptococcus* e influenciou o potencial zeta, aumentando a vulnerabilidade fúngica. Em testes *in vivo* com *T. molitor*, a FAMu demonstrou baixa toxicidade e, em combinação com fluconazol, aumentou a sobrevivência das larvas infectadas por *C. neoformans*, indicando sua eficácia na contenção da infecção. Diante desses resultados obtidos, podemos concluir que a FAAo apresenta atividade contra linhagens de *Candida* e *Cryptococcus in vitro*, sugerindo a capacidade de inibir a formação de biofilme por *C. albicans*, principal patógeno oportunista em infecções invasivas. Nossos resultados também indicam que a FAMu demonstra uma promissora ação antifúngica *in vitro* e *in vivo*.

contra linhagens de *Cryptococcus sp.*, destacando-se como potencial fonte para a descoberta de compostos líderes no planejamento de novas moléculas antifúngicas. Essas frações podem expandir o arsenal antifúngico, oferecendo alternativas eficazes para o controle de patógenos resistentes e aprimorando as opções terapêuticas disponíveis, tanto como tratamentos independentes quanto em combinação com antifúngicos convencionais.

Palavras-chave: *Candida*; *Cryptococcus*; *Anacardium occidentale*; *Myracrodruon urundeuva*; Tratamento.

ABSTRACT

Medicinal plants play a crucial role in drug discovery, providing bioactive compounds with therapeutic properties while emphasizing the importance of biodiversity preservation. Studying plants as sources of antimicrobial molecules represents an innovative strategy for health promotion. *Anacardium occidentale* and *Myracrodruon urundeuva*, both belonging to the Anacardiaceae family, are known for their ethnopharmacological uses and established antibacterial activity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of native plants *in vitro* and *in vivo* against *Cryptococcus* and *Candida* species. The initial phase of the study involved a screening of native plants through the minimum inhibitory concentration (MIC) test. After this initial screening, *A. occidentale* and *M. urundeuva* emerged as the most promising *Candidates* for further investigation. In the next phase, the ethyl acetate fraction obtained from the ethanolic extracts of *A. occidentale* (FAAo) and *M. urundeuva* (FAMu) was selected for subsequent testing. Both fractions were then assessed for their anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* activities *in vitro*, through the determination of MIC and minimum fungicidal concentration (MFC). Following this, the death kinetics and the ability to inhibit biofilm formation of FAAo were evaluated. Assays were also conducted to understand the mechanism of action of FAMu against *Cryptococcus* strains, including the evaluation of ergosterol content, lipid peroxidation (measured by thiobarbituric acid reactive substances, TBARS), antioxidant system activity, and changes in cell diameter. In addition, *in vivo* infection assays were performed using *Tenebrio molitor* larvae. FAAo demonstrated MICs lower than 10 µg/mL for all tested *Candida* strains and was able to reduce biofilm formation in *C. krusei* ATCC 6258 and *C. albicans* ATCC 10231 at low concentrations. Phenolic compounds from FAMu exhibited antifungal activity *in vitro* against *Candida* and *Cryptococcus*, with a dose-dependent effect against all tested strains. FAMu altered ergosterol content, induced lipid peroxidation, modified the *Cryptococcus* capsule, and influenced the cell surface charge, increasing fungal vulnerability. *In vivo* assays with *T. molitor* showed that FAMu had low toxicity and, in combination with fluconazole, enhanced the survival of larvae infected with *C. neoformans*, indicating its efficacy in controlling the infection. Based on these results, we conclude that FAAo exhibits activity against *Candida* and *Cryptococcus* strains *in vitro*, suggesting its potential to inhibit biofilm formation by *C. albicans*, a major opportunistic pathogen in invasive infections. Our findings also indicate that FAMu demonstrates promising antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against *Cryptococcus* strains, highlighting its potential

as a source for the discovery of lead compounds in the development of new antifungal molecules. These fractions may expand the antifungal arsenal, offering effective alternatives for controlling resistant pathogens and improving available therapeutic options, either as standalone treatments or in combination with conventional antifungals.

Keywords: *Candida*; *Cryptococcus*; *Anacardium occidentale*; *Myracrodruon urundeuva*; Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células de <i>C. albicans</i> em transição celular analisadas por microscopia óptica. Em (A) clamidósporos (ponta de seta) e hifas (setas) e (B) pseudohifas (asterisco), clamidósporos (ponta de seta) e hifas (setas). Barra de escala (5µm).	28
Figura 2 - Visão geral dos mecanismos de patogenicidade de <i>C. albicans</i>	31
Figura 3 - Prevalência de <i>Candida sp.</i> em diferentes países.	35
Figura 4 - Célula titã de <i>Cryptococcus</i> em um modelo de infecção murino	47
Figura 5 - Melanização de <i>C. neoformans</i>	48
Figura 6 - Distribuição geográfica dos complexos <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	51
Figura 7 - Constituintes bioativos da natureza e seu potencial farmacológico.	60
Figura 8 - Árvore (A), casca (B) e fruto (C) de <i>Anacardium occidentale</i>	62
Figura 9 - Estrutura química dos constituintes do extrato etanólico das cascas de <i>A. occidentale</i>	64
Figura 10 - Árvore (A) e caule (B) de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	65
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações de <i>A. occidentale</i> em macrófagos murinos RAW 264.7 (A) e J774A.1 (B).	91
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações de <i>M. urundeuva</i> macrófagos murinos RAW 264.7 (A) e J774A.1 (B).	92
Figura 13 - Cromatograma de pico base no modo de ionização negativa (BPC, em vermelho) e absorbância a 254 nm (laranja), mostrando o perfil de FAAo.	95
Figura 14 - Rede Molecular de LC-MS realizada no site do GNPS, destacando as características de catequinas e ácido anacárdico.	96
Figura 15 - Estrutura química dos constituintes detectados na FAAo	97
Figura 16 - Estrutura química dos constituintes detectados na FAMu.	99
Figura 17 - Curva de morte da FAAo contra <i>Candida sp.</i> (A-E) e contra <i>Cryptococcus sp.</i>	103
Figura 18 - Curva de morte da FAMu contra <i>Cryptococcus sp.</i> nas concentrações ½ CIM, CIM e 2X CIM.	105
Figura 19 - Efeito da fração acetato de etila de <i>A. occidentale</i> (FAAo) e fluconazol (FLZ) na inibição da formação de biofilmes de <i>Candida sp.</i> e <i>Cryptococcus sp.</i> , em várias concentrações, por 24 horas, à 35°C.	106
Figura 20 - Níveis do conteúdo de ergosterol das linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> após 24 horas de tratamento com FAMu e fluconazol.	107

Figura 21 - Peroxidação lipídica como consequência do tratamento das células de <i>C. gatti</i> e <i>C. neoformans</i> com FAMu com a concentração inibitória mínima.	108
Figura 22 - Avaliação do tamanho da cápsula de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> após tratamento com concentração subinibitória da FAMu.....	110
Figura 23 - Efeito da concentração subinibitória da FAMu sobre a carga da membrana celular de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	111
Figura 24 - Avaliação da toxicidade da FAMu em larvas de <i>T. molitor</i> não infectadas.....	112
Figura 25 - Curvas de sobrevivência de larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com 10 ³ leveduras de <i>Cryptococcus</i> /larva e tratadas com FAMu e/ou FLZ na concentração inibitória mínima. (A) Larvas infectadas com <i>C. gattii</i> ATCC R265. (B) Larvas infectadas com <i>C. neoformans</i> ATCC H9.....	113

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Delineamento experimental para <i>A. occidentale</i>	72
Fluxograma 2 - Delineamento experimental para <i>M. urundeuva</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Candida sp</i> que foram utilizados no presente estudo.....	73
Tabela 2 - Isolados de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> que foram utilizados no presente estudo....	73
Tabela 3 - Rendimento do extrato etanólico das plantas nativas.....	87
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) do extrato etanólico de <i>A. occidentale</i> (caju), <i>M. flexuosa</i> (buriti), <i>M. urundeuva</i> (aroeira), e <i>C. spruceanum</i> (pau-mulato).	88
Tabela 5 - Rendimento das frações obtido a partir de 30g de extrato etanólico de <i>A. occidentale</i> e <i>M. urundeuva</i>	89
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) do extrato etanólico e frações das cascas de <i>A. occidentale</i> e <i>M. urundeuva</i> frente a <i>Candida sp</i> e <i>Cryptococcus sp</i>	90
Tabela 7 - Índice de seletividade (IS) do extrato e frações de <i>A. occidentale</i> em função das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258, <i>C. gattii</i> ATCC R275 e <i>C. neoformans</i> ATCC H99.	93
Tabela 8 - Índice de seletividade (IS) do extrato e frações de <i>M. urundeuva</i> em função das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258, <i>C. gattii</i> ATCC R275 e <i>C. neoformans</i> ATCC H99	93
Tabela 9 - Compostos presentes em FAAo detectados por HPLC-ESI-MS no modo de ionização negativa.....	95
Tabela 10 - Compostos presentes em FAMu detectados por HPLC-ESI-MS no modo de ionização negativa.	98
Tabela 11 - Efeitos antifúngicos da FAAo.	100
Tabela 12 - Efeitos antifúngicos da FAMu.	101
Tabela 13 - Avaliação da interação da FAAo e FAMu com fluconazol (FLZ) frente às espécies de <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>	102
Tabela 14 - EPA após 1 hora de exposição à FAMu na concentração CIM para <i>Cryptococcus</i>	107
Tabela 15 - Avaliação da interação da FAMu com DETC e 3-AT frente às espécies de <i>Cryptococcus</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ao	<i>Anacardium occidentale</i>
AG	Ácido gálico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALS	<i>Aglutinine-like sequence</i>
AmB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabourad Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Hidroxitoluenobutilado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração inibitória fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM	Meningoencefalite criptocócica
CVV	<i>Candidíase vulvovaginal</i>
DAD	Arranjo de fotodiodos
DHE	Dihidroergosterol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
EPA	Efeito pós-antifúngico
ESI	Ionização por eletrospray
FA	Fração acetato de etila
FAq	Fração aquosa
FAAo	Fração acetato de etila de <i>Anacardium occidentale</i>
FAMu	Fração acetato de etila de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
FB	Fração n-butanol
FD	Fração diclorometano
FH	Fração hexano
FLZ	Fluconazol
GalGXM	Glucuronoxilogalactomanana

GXM	Glucuronoxilomanana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IC	Índice de Citotoxicidade
IS	Índice de Seletividade
ITC	Calorimetria isotérmica de titulação
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
Mu	<i>Myracrodruon urundeuva</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PER	Peroxidase
PIC	Pressão intracraniana
PZ	Potencial Zeta
RENISUS	Relação de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Tomografia computadorizada
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ	Micro
h	Horas
n	Nano
%	Porcentagem
$\pm$	Mais ou menos
$>$	Maior
$\geq$	Maior ou igual
$<$	Menor
$\leq$	Menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 CANDIDÍASE.....	24
2.1.1 Gênero <i>Candida</i>	24
2.1.2 Fatores de virulência	31
2.1.3 Epidemiologia	34
2.1.4 Manifestações clínicas	36
2.1.5 Tratamento.....	39
2.2 CRIPTOCOCOSE	42
2.2.1 <i>Cryptococcus gatti</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	43
2.2.2 Fatores de virulência	45
2.2.3 Epidemiologia	49
2.2.4 Manifestações clínicas	53
2.2.5 Tratamento.....	55
2.3 PLANTAS MEDICINAIS.....	58
2.3.1 Família <i>Anacardiaceae</i>	61
2.3.1.1 <i>Anacardium occidentale</i>	61
2.3.1.2 <i>Myracrodruon urundeuva</i>	65
3 JUSTIFICATIVA	68
4 OBJETIVOS	70
4.1 OBJETIVO GERAL.....	70
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
5 METODOLOGIA.....	71
5.1 TRIAGEM DE PLANTAS NATIVAS	71
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71
5.3 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL	75
5.4 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO	75
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA.....	76
5.6 ANÁLISE DE REDES MOLECULARES REALIZADA NO GNPS.....	77
5.7 TESTES DE DILUIÇÃO EM CALDO PARA A DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS ÀS FRAÇÕES.....	77
5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	78
5.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS FRENTE AOS MACRÓFAGOS MURINOS.....	79
5.10 INTERAÇÃO DA FAAo e FAMU COM FLUCONAZOL <i>IN VITRO</i>	80

5.11 CURVA DE MORTE.....	80
5.12 ATIVIDADE DA FAAo CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>CANDIDA E CRYPTOCOCCUS</i>	81
5.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICRIPTOCOCÓCICA DA FAMu.....	82
5.13.1 Efeito pós-antibiótico	82
5.13.2 Quantificação do Ergosterol	82
5.13.3 Peroxidação lipídica	83
5.13.4 Interação <i>in vitro</i> de FAMu com 3-AT e DETC	84
5.13.5 Análise do tamanho e carga da cápsula de leveduras desafiadas pela FAMu.....	84
5.13.6 Ensaios de toxicidade e sobrevivência com <i>Tenebrio molitor</i>	85
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
6. RESULTADOS	87
6.1 RENDIMENTO SIGNIFICATIVO E POTENCIAL BIOATIVO DE <i>A. occidentale</i> E <i>M. urundeuva</i>	87
6.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS CASCAS DE <i>A. occidentale</i> E <i>M. urundeuva</i>	89
6.3 AS FRAÇÕES POLARES DE <i>A. occidentale</i> E <i>M. urundeuva</i> POSSUEM SIGNIFICATIVA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	89
6.4 A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>A. occidentale</i> E <i>M. urundeuva</i> TEM UM PERFIL INTERESSANTE DE SELETIVIDADE FRENTE A LEVEDURAS.....	90
6.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FAAo E DA FAMu.....	93
6.6 OS TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS FRAÇÕES DEMONSTRARAM CIM MENORES QUE 10 µg/mL PARA QUASE TODAS AS LINHAGENS DE <i>CANDIDA</i> E <i>CRYPTOCOCCUS</i> TESTADAS.....	99
6.7 A INTERAÇÃO ENTRE FAAo E FAMu COM FLUCONAZOL SE MOSTROU INDIFERENTE <i>IN VITRO</i>	102
6.8 CURVA DE MORTE.....	102
6.9 A FAAO REDUZ A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DAS LINHAGENS <i>C. KRUSEI</i> ATCC 6258 E <i>C. ALBICANS</i> ATCC 10231 EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES.....	105
6.10 EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO (EPA) DA FAMu FRENTE A <i>CRYPTOCOCCUS</i>	106
6.11 FAMU COMPROMETE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR	107
6.12 FAMU INDUZ A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS CÉLULAS CRIPTOCOCÓCICAS	108
6.13 INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE FAMu COM 3-AT E DETC	108
6.14 AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E POTENCIAL ZETA DE <i>Cryptococcus sp.</i> APÓS TRATAMENTO COM FAMu	109
6.15 ENSAIOS DE TOXICIDADE E SOBREVIVÊNCIA COM <i>T. MOLITOR</i>	111
7 DISCUSSÃO	114
8 CONCLUSÃO.....	123

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
---	------------

1 INTRODUÇÃO

A incidência global de micoses invasivas por patógenos fúngicos oportunistas tem crescido, resultando em elevada morbidade e mortalidade, com milhares de mortes anuais. Indivíduos imunossuprimidos, pacientes oncológicos, pós-cirúrgicos, transplantados, idosos e crianças prematuras estão em alto risco (Wambaugh *et al.*, 2020). Dentre os fungos responsáveis por estas infecções, dois gêneros de destacam: *Candida* e *Cryptococcus* (Sharma; Chakribarti, 2023).

Candida é o principal grupo de patógenos fúngicos oportunistas, com mais de 100 espécies descritas, com as mais comuns causando micoses em humanos, incluindo *C. albicans*, frequentemente isolada de material clínico. Outras espécies frequentes são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, esta última conhecida por sua resistência intrínseca e adquirida a azóis e outros antifúngicos (Hassan; Chew; Than, 2021). Por outro lado, a criptococose, causada por *Cryptococcus sp.*, emergiu como uma infecção fúngica potencialmente fatal de destaque na micologia clínica. A doença, transmitida pela inalação de esporos ambientais, pode afetar o sistema nervoso central e/ou os pulmões. É importante ressaltar que a criptococose pode ser fatal para indivíduos imunossuprimidos se não tratada adequadamente (Zaragoza, 2019).

O tratamento bem-sucedido de infecções fúngicas graves demanda uma terapia antifúngica eficaz que deve considerar a manifestação clínica e o estado imunológico do paciente. Sabe-se que hoje, apesar da disponibilidade de cinco classes de antifúngicos, o aumento da resistência extrínseca, aliado às interações medicamentosas, e efeitos adversos/tóxicos graves, limitam seu uso prolongado e representa um desafio significativo na gestão do paciente (Hasim; Coleman, 2019). Nesse contexto, a utilização de plantas como fonte de novas substâncias antimicrobianas consiste em uma estratégia bem estabelecida e bastante promissora. Produtos naturais têm demonstrado historicamente eficácia e potencial para a descoberta de novos fármacos, sendo uma das principais fontes de moléculas para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes (Newman; Cragg, 2020; Zida *et al.*, 2017).

Uma triagem da atividade antimicrobiana de extratos de plantas nativas foi realizada no laboratório de Microbiologia da UFJF/GV e identificou-se promissora atividade antimicrobiana para o extrato etanólico das cascas de *Anacardium occidentale* e *Myracrodruon urundeuva*. Estas duas plantas são nativas, tipicamente presentes em diversos biomas, como cerrado, mata atlântica e caatinga, adaptada a regiões quentes do país e pertencentes à família *Anacardiaceae*.

A seguir, os extratos foram particionados nas frações polares, e a fração acetato de etila se mostrou uma fonte promissora com atividade antifúngica. Até o momento pouco se conhece sobre a constituição química desta fração, obtida das cascas, e as atividades biológicas da mesma frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção será apresentado o embasamento teórico do trabalho.

2.1 CANDIDÍASE

A candidíase é uma infecção provocada por fungos pertencentes à espécie *Candida*, com *C. albicans* sendo a variedade mais frequentemente envolvida. Este é um fungo patogênico oportunista que normalmente habita a pele e as mucosas do corpo humano, como a boca, o intestino e a vagina. Essa infecção pode desencadear uma ampla gama de problemas, afetando tanto as barreiras mucocutâneas quanto o sistema em geral (Lu *et al.*, 2023).

Uma relação comensal é estabelecida quando o equilíbrio é mantido entre o sistema imunológico do hospedeiro e os fatores de virulência da *C. albicans*. No entanto, vários elementos desempenham um papel crucial no desenvolvimento de infecções, tanto patogênicas quanto oportunistas. Estes fatores englobam características sistêmicas, locais, hereditárias, ambientais e os próprios traços de virulência da *Candida sp.* Nos casos de pacientes com HIV/AIDS e indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos devido a quimioterapia, terapia com agentes imunossupressores, ou desequilíbrios induzidos por antibióticos, a candidíase torna-se um sério desafio para a saúde (Miguel *et al.*, 2022).

2.1.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* abriga diversas espécies que são consideradas patógenos fúngicos oportunistas e que possuem relevância na saúde pública mundial. Incluídos neste gênero estão fungos que podem fazer parte da microbiota normal da mucosa reprodutiva e gastrointestinal, vivendo em simbiose, em cerca de 50-70% dos indivíduos saudáveis. Em casos de desequilíbrio imunológico, essas leveduras podem causar doença em diversos órgãos do corpo, sendo a causa mais comum de vulvovaginite (Hani *et al.*, 2015; Harley *et al.*, 2022). Aproximadamente, 90% das infecções são provocadas pelas seguintes espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. auris* (Kulberg; Arendrup, 2015; Kumar *et al.*, 2022).

C. albicans, uma espécie cosmopolita, é a mais encontrada em todo o mundo, exceto em alguns países da Ásia, onde *C. tropicalis* ocupa esta posição. É o principal agente causador

da candidíase e de infecções fúngicas nosocomiais, especialmente em hospitais de grande porte (Sharma; Chakrabati, 2023). Nos Estados Unidos foi mostrado que a sepse causada por *C. albicans* tem uma mortalidade 40% maior do que a provocada por bactérias ou outros fungos (Talapko *et al.*, 2021).

Encontrada comumente na pele e nas mucosas do trato gastrointestinal e geniturinário, *C. albicans* vive como um comensal. No entanto, pode ser fonte endógena de infecção, caso haja um desequilíbrio no sistema imunológico (Kullberg; Arendrup, 2015). Costuma-se ainda ser encontrada associada a dispositivos médicos, tais como cânulas, marcapassos, catéteres, dentre outros e a patogênese segue-se em três momentos. Num primeiro, onde se verifica a adesão à superfícies bióticas e abióticas, seguido de diferenciação e colonização e depois, penetração e invasão de novos tecidos (Alim; Sircaik; Panwar, 2018). E existem diversos fatores de virulência envolvidos neste processo (Czechowicz; Nowicka; Gosciniak, 2022). Estes fatores, podem, parcialmente, explicar porque a candidíase invasiva aparece com mais frequência em unidade de terapia intensiva (UTI) e em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Kulberg; Arendrup, 2015; Mikulska *et al.*, 2022; Sharma; Chakrabati, 2023). Deve-se destacar que a morbidade associada às infecções por *C. albicans* depende, principalmente, das respostas imunes associadas do hospedeiro e dos tecidos e/ou órgão afetados (Dadar *et al.*, 2018).

Apesar de *C. albicans* ser o mais prevalente, o número de infecções por outras espécies deste gênero tem aumentado significativamente nos últimos anos (Wajdan *et al.*, 2023). A *C. glabrata* é o segundo agente etiológico mais comum da candidíase invasiva nos Estados Unidos e na Europa (Pfaller; Diekema, 2007; Hassan; Chew; Than, 2021). Essa espécie é encontrada frequentemente no ambiente, além de terem sido observada em galinhas, perus e carvalhos antigos (Liu *et al.*, 2018; Sokol; Gawel; Bobrek, 2018).

C. glabrata não possui a mesma capacidade de formação de hifas e mudança fenotípica de *C. albicans* (Schwarzmueller *et al.*, 2014). Estas diferenças podem ser atribuídas à evolução filogenética, há 300 milhões de anos, *C. albicans* divergiu de *Saccharomyces cerevisiae* (Van Ende; Wijnants; Dijck, 2019). Aproximadamente, 150 milhões de anos depois, *S. cerevisiae* sofreu uma alteração genômica, na qual duplicou todo seu material genético, e, após este fenômeno, *C. glabrata* emergiu desta “nova” *S. cerevisiae*. Desta forma, pode-se dizer que, filogeneticamente, *C. glabrata* é mais próxima de *S. cerevisiae* do que de *C. albicans* (Herrero, 2005; Sugino; Innam, 2005). Como forma de compensação, além de alta tolerância ao estresse, e adaptação ao hospedeiro (Brock, 2009; Hassan; Chew; Than, 2021), *C. glabrata* procura

vencer o sistema imunológico do hospedeiro pela sua persistência, permanecendo por mais tempo, por isso, não surpreende que cause doença de forma lenta, e que seu isolamento é associado com a maior idade do paciente. (Kawai; Yamagishi; Mikamo, 2015). O uso indiscriminado do fluconazol ao longo dos anos pode estar associado ao surgimento de linhagens de *C. glabrata* com resistência a este fármaco (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015).

A natureza emergente de *C. tropicalis* é evidenciada pelo alto número de casos relatados desta espécie, de 4,6 % a 7,5 %, entre os anos de 1997 a 2003. No Brasil e América Latina ela ocupa o segundo lugar, atrás apenas de *C. albicans*, causando candidemia (Pfaller; Diekema, 2007; Hassan; Chew; Than, 2021). As infecções por esta espécie costumam acometer pacientes após antibioterapia prolongada ou aqueles com neutropenia. Em caso de infecções invasivas, costumam apresentar uma mortalidade ainda maior que *C. albicans* (Eggimann; Garbino; Pittet, 2003), o que pode ser atribuído, em parte, a resistência adquirida à terapia antifúngica tradicional, com os azóis (Zuza-Alves; Silva-Rocha; Chaves, 2017), pois quando sofrem mutações apresentam também resistência à anfotericina B (Liu *et al.*, 2015; 2018). Além disso, essa maior propensão à disseminação e alta mortalidade pode ser explicada pelo dimorfismo, potente formação de biofilme e secreção de enzimas (Silva *et al.*, 2012).

C. parapsilosis, principal causadora de candidemia em pacientes hospitalizados na África do Sul (Sharma; Chakrabati, 2023) costuma infectar dois grupos em especial, pacientes graves em unidades de terapia intensiva (UTI), onde forma biofilme nos catéteres e neonato de baixo peso ao nascimento, onde se utiliza da sonda de alimentação parenteral para entrar no organismo (Harrington *et al.*, 2017). Um estudo realizado na Espanha, que comparou os fatores de risco e as taxas de mortalidade entre *C. parapsilosis* e *C. albicans* revelou que a idade neonatal, a administração de nutrição parenteral total e o histórico de terapia antifúngica, especialmente com fluconazol, estão frequentemente associados à infecção por *C. parapsilosis*. Neste grupo, as taxas de mortalidade foram significativamente menores para *C. parapsilosis* (7%) em comparação com *C. albicans* (56%) (Almirante *et al.*, 2006)

Pfaller e Diekema (2007) mostraram, num estudo multicêntrico, que avaliou as espécies causadoras de candidemia em todo o mundo, no período entre os anos de 1996 a 2003, que *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* eram responsáveis por 95% destas infecções.

E, por último, também compondo o grupo de patógenos causadores de candidíase, a *C. krusei* apesar de não ser tão frequente nos isolados clínicos, merece uma atenção especial em função de sua resistência intrínseca ao fármaco fluconazol (Gómez-Gaviria; Mora-Montes,

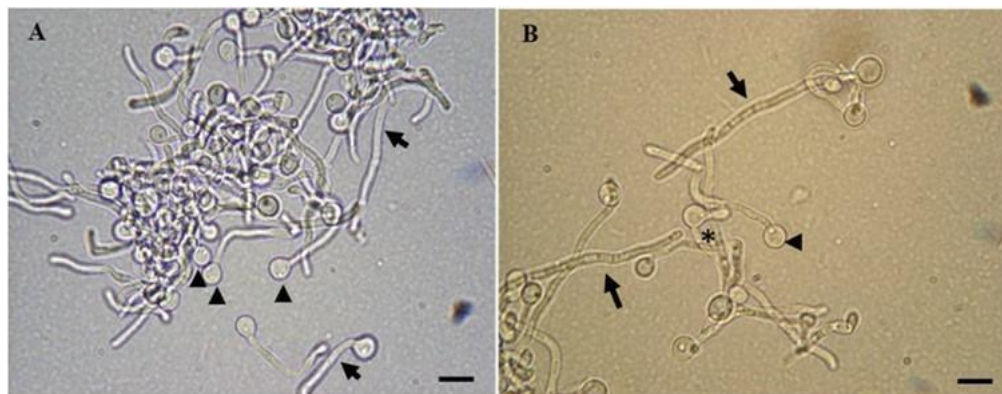
2020). Comumente, *C. krusei* é considerado um comensal transitório no hospedeiro humano saudável, e tem sido raramente isolado de mucosas superficiais em grupos de pacientes e indivíduos saudáveis; por outro lado, é um importante patógeno em pacientes com câncer, causando infecções sistêmicas e superficiais (Gómez-Gaviria; Ramiro-Sotero; Mora-Montes, 2022).

Documentado, pela primeira vez em 2009, em um hospital no Japão, um isolado do ouvido externo revelou-se ser *C. auris*, um fungo multirresistente (Pharkjaksu *et al.*, 2021). Hoje presente em 39 países, observa-se um aumento na incidência e prevalência desta infecção, principalmente, em pacientes imunossuprimidos, ou naqueles que estão hospitalizados há muito tempo (Spivak; Hanson, 2018). A transmissibilidade de *C. auris* em ambientes hospitalares, especialmente nas unidades de cuidados intensivos, já foi confirmada, embora o exato modo de transmissão ainda não tenha sido definido, a disseminação do paciente ou de seu ambiente para as mãos dos profissionais de saúde parece provável. O fungo costuma colonizar mais a pele do que a mucosa dos pacientes afetados, e já foi encontrado em diversas superfícies de contato, como colchões, pias e equipamentos médicos (Schelenz *et al.*, 2016; Pharkjaksu *et al.*, 2021). No entanto, pode atingir a corrente sanguínea, provocando uma candidemia, com taxas de mortalidade entre 30 a 70% (Fasciana *et al.*, 2020). A identificação e diagnóstico adequados de *C. auris* frequentemente apresenta desafios, já que é comum ocorrer confusão com outras espécies (por exemplo, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae* e *C. famata*) quando se utilizam os testes e métodos disponíveis atualmente. Como consequência desta identificação incorreta da morfologia desta espécie, medidas de prevenção da infecção podem ser retardadas, o que, por sua vez, aumenta o risco de transmissão (Fasciana *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2012).

Estes microrganismos podem crescer na forma de levedura ou filamentosa, sendo que esta pode-se apresentar como pseudohifas (construção nas junções, mais ramificações) ou hifas (parede celular, septos, menos ramificadas), onde a divisão celular se inicia no broto germinativo. As hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células humanas do que os blastoconídios (Kadosh; Mundodi, 2020; Sudbery; Gow; Berman, 2004). Porém, nem todas as espécies de *Candida* apresentam todas estas formas (Dadar *et al.*, 2018).

C. albicans apresenta em todas as formas acima citadas: leveduras hifas, pseudohifas e clamidósporos, como mostrado na figura 1. Destas pseudohifas surgirão micélios, os quais podem formar biofilmes uni ou multiespécies (Cottier; Hall, 2021; Li *et al.*, 2022).

Figura 1 - Células de *C. albicans* em transição celular analisadas por microscopia óptica. Em (A) clamidósporos (ponta de seta) e hifas (setas) e (B) pseudohifas (asterisco), clamidósporos (ponta de seta) e hifas (setas). Barra de escala (5µm).



Fonte: Macias-Paz *et al.* (2023).

A capacidade de *C. albicans* causar doença tem sido associada à sua transição de fase de hifa para levedura e formação de biofilme (Lo *et al.*, 1997; Zida *et al.*, 2017). A transição de leveduras para hifas altera o estado comensal para patogênico, e permite a invasão tecidual, adesão e desenvolvimento dos biofilmes (Dadar *et al.*, 2018). Esta espécie se diferencia, morfologicamente, das demais componentes do gênero, pela presença dos clamidósporos. Estes são células grandes, redondas e com paredes espessas, que se formam, normalmente, nas extremidades das hifas, como uma resposta a condições de estresse, como falta de nutrientes e, são mais raras de serem observadas nos tecidos infectados (Kadosh; Mundodi, 2020).

Além da adaptação metabólica descritas acima, acredita-se que mecanismos pós-transcricionais, tais como: estabilidade do RNAm recém transcrito, sistema de transporte de RNAm dependente de *SHE*, e até mesmo no processo de tradução, um *splicing* alternativo, estejam envolvidos no controle da transição entre estas formas, que reflete diretamente os processos de virulência do fungo (Kadosh *et al.*, 2016).

C. tropicalis pode ser encontrada em todas as três morfologias, levedura, hifas e pseudo-hifas. *C. parapsilosis* pode ser encontrada como levedura e pseudo-hifa, mas cresce predominantemente na forma de levedura, e, *C. glabrata* cresce, quase sempre, como levedura (Hassan; Chew; Than, 2021; Sharma; Chakrabati, 2023). A literatura relata que a capacidade de transição para a forma hifal em *C. albicans* está associada com aumento da patogenicidade e instalação da infecção (Zida *et al.*, 2017). Porém, Banerjee e colaboradores (2019) mostraram que o mesmo não pôde ser observado em seus experimentos com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

onde a transição esteve associada com baixa patogenicidade, e expressão reduzida de genes envolvidos com este processo.

A patogenicidade de *C. glabrata* parece não estar diretamente ligada à morfologia. Uma vez que este fungo não tem capacidade de alterar sua morfologia para hifal, a maneira que esta espécie possui para chegar até a corrente sanguínea é através da quebra das barreiras naturais do organismo do hospedeiro (Galocha *et al.*, 2019). Ou, pode-se dizer que uma maior susceptibilidade à infecção pode ser observada quando agem, concomitante, outras doenças como SIDA e tuberculose, antibioticoterapia prolongada, fármacos imunossupressores (Hassan; Chew; Than, 2021).

C. krusei produz células leveduriformes cilíndricas, que se assemelham a grãos de arroz. Apresentam termodimorfismo, ou seja, produzem hifas em temperaturas de 37°C, e blastoconídios e pseudohifas, em temperaturas menores, apresentando colônias lisas, brilhantes e com aspecto cremoso quando cultivadas em ágar *Sabourad* dextrose (ASD) (Gómez-Gaviria; Mora-Montes, 2020). Diferente de outras espécies de *Candida* de importância médica, *C. krusei* apresenta reprodução sexuada, e foi mostrado que a composição da parede celular é semelhante à de *C. albicans*, com quitina, betaglucanas e mananas (Navarro-Arias *et al.*, 2019).

A parede celular fúngica tem um papel de grande importância na interação entre o patógeno e hospedeiro, uma vez que esta é a principal estrutura em contato, além de ser essencial para a forma, para a integridade do microrganismo, protege do estresse, assegura equilíbrio osmótico e confere resistência (Chaffin, 2008). Devido à especificidade, a parede celular tem sido usada com sucesso como alvo de fármacos antifúngicos, como as equinocandinas (Lu *et al.*, 2023).

A parede celular de *C. albicans* que tem, aproximadamente, de 60 a 100 nanômetros (nm) de espessura (Gow *et al.*, 2012; Lenardon *et al.*, 2020), e a adesão da célula fúngica é tarefa primordial da parede celular externa. Dentre os componentes da parede celular, a quitina tem um papel fundamental na manutenção e integridade desta estrutura. Com o uso da microscopia eletrônica de transmissão observou-se a presença de microfibrilas de quitinas, em *C. albicans*, como pequenos bastonetes presentes nas paredes celulares de leveduras e hifas (Gow; Lenardon, 2023). Estudo recente tem sugerido que as fibrilas de quitinas estão apoiadas nas beta-1,3-glucanas, proporcionando uma estrutura flexível que pode contrair ou expandir de acordo com as necessidades da célula (Lenardon *et al.*, 2020).

Ela possui duas camadas na parede celular representada, uma mais externa, onde há a predominância de mananas ligadas covalentemente a proteínas, formando as glicoproteínas, e

a camada mais interna, com a presença de quitina e beta-1,3-glucana, que confere forma e resistência à parede, e temos as moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) fazendo a ligação destas estruturas (Timmermans *et al.*, 2018). As mananas são importantes porque além de funcionar como um elemento estrutural e de adesão (adesinas) também funcionam fazendo um reconhecimento das condições ambientais de onde o fungo se encontra (Macias-Paz *et al.*, 2023). As moléculas de GPI tem um papel fundamental na infecção fúngica, no processo inicial de aderência, assim, fármacos que tem como alvo a inibição da biossíntese de GPI estarão comprometendo este processo (Wilson *et al.*, 2014).

Logo abaixo da parede celular interna encontra-se a membrana plasmática do fungo, e tem função de regular a entrada e liberação de substâncias. De composição muito semelhante à presente nas células humanas, ela é uma bicamada fosfolipídica associadas a proteínas e a esteróis, neste caso do fungo, o ergosterol, um 5,7-dieno oxisterol, é o esterol mais predominante encontrado nas membranas celulares dos fungos (Griffin, 1994; Zhao; Lin; Brookes, 2005). Essa diferença na composição, permite que o ergosterol, com propriedades estruturais diferenciadas e síntese específica, seja, comumente, utilizado como alvo de terapia antifúngica.

O ergosterol é sintetizado no retículo endoplasmático, num processo sequencial, envolvendo 25 enzimas (Dhingra; Cramer, 2017). Atualmente, os antifúngicos utilizados tem como alvo apenas as enzimas codificadas pelos genes ERG1, ERG11 e ERG2, deixando um saldo de 22 alvos para serem estudados na biossíntese da molécula (Rodrigues, 2018). Um estudo recente, identificou o ergosterol como um lipídio imunoativo, capaz de induzir apoptose (morte celular inflamatória e necrótica) das células hospedeiras (Koselny *et al.*, 2018). Na composição da membrana celular fúngica ainda estão os glicerofosfolipídios e esfingolipídios, moléculas envolvidas em vias de sinalização celulares, sendo alvos promissores na busca por novos antifúngicos (Lu et al, 2023).

Várias outras organelas que compõem a célula fúngica guardam uma proximidade evolutiva com a humana, no entanto, mesmo que pequenas, estas diferenças podem ser uma opção como alvos terapêuticos. Como exemplo podemos citar duas proteínas, Nuo 1 e Nuo 2, presentes nas mitocôndrias dos fungos, e que possuem um papel importante na integridade da membrana desta organela (Yamashita *et al.*, 2019).

2.1.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência podem ser identificados como as características fenotípicas, presentes em um microrganismo, que o permitem evadir do sistema imunológico do hospedeiro e estabelecer uma infecção (Poulain, 2015).

Com espécies de *Candida* não é diferente, estes fatores possuem uma interação direta com a célula do hospedeiro, causando danos à mesma (Singh; Parija, 2012). No entanto, alterações no estado imunológico do hospedeiro, ou do fungo, podem afetar o grau de virulência. A figura 2 ilustra alguns dos diversos fatores que facilitam a infecção por *Candida*, dentre eles: expressão de adesinas, alteração da morfologia, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilme, bomba de efluxo, tigmotropismo, (Silva *et al.*, 2012; Singh; Parija, 2012; Talapko *et al.*, 2021).

Figura 2 - Visão geral dos mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*.



Fonte: Adaptado de Mayer; Wilson; Hube (2013).

C. albicans possui um grupo de proteínas especializadas, denominadas adesinas, que são responsáveis pela ligação do fungo à célula do hospedeiro ou às superfícies abióticas (Garcia *et al.*, 2011). O grupo de adesinas mais estudadas são as ALS (*agglutinine-like sequence*), uma família com oito membros (Als1–7 e Als9) (Mayer; Wilson; Hube, 2013). As mais importantes são a Als 3, associada à hifa, tem um importante papel na adesão, e já foi identificada, tendo seu papel elucidado em infecções orais e vulvovaginal *in vivo* e *in vitro* (Murciano *et al.*, 2012; Phan *et al.*; 2007), e a Hwp1 (Deorukhkar; Roushani, 2017).

A morfologia das espécies que compõem o gênero *Candida* pode ser considerada um dos principais fatores de virulências apresentados por este patógeno, uma vez que os mesmos apresentam diferentes formas em etapas distintas da infecção (Mayer; Wilson; Hube, 2013). Uma vez aderido, o fungo inicia o processo de transição, apresentando o dimorfismo, este é uma etapa crucial e determinante na virulência deste patógeno. A forma hifal permite que o

fungo penetre ativamente nos tecidos (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). Esta forma hifal é invasiva, induzindo endocitose, e causando danos ao tecido do hospedeiro. Foi identificada uma toxina produzida pela hifa, crucial para o processo, a *Candidalisina*, responsável por esta destruição tecidual, através da formação de poros, (Hanaoka; Domae, 2021; Kasper *et al.*, 2018).

O processo de invasão é direcionado, através do tigmotropismo, crescendo sobre as células do hospedeiro, ou superfícies abióticas, como próteses ou catéteres. (Mayer; Wilson; Hube, 2013). Este importante fator de virulência é regulado pelo cálcio extracelular, através dos canais de cálcio e tem importante papel na formação do biofilme (Viana *et al.*, 2020).

A alternância fenotípica entre colônias brancas e opacas, ou *switching*, é outro fator que garante ao microrganismo uma plasticidade e permite que o mesmo possa se adaptar rapidamente ao meio em que se encontra. Nas células de *C. albicans*, esta alternância, que pode ser transmitida às futuras gerações, se reflete em diferenças no crescimento das hifas e na interação com o sistema imunológico do hospedeiro (Brimacombe; Sierocinski; Dahabieh, 2020; Mallick *et al.*, 2016).

Biofilmes microbianos podem ser definidos como aglomerados de células, crescendo em superfícies bióticas ou abióticas, e que interagem física e metabolicamente, tornando o ambiente mais resistente à ação do sistema imunológico e/ou de fármacos (Kumar *et al.*, 2022; Lohse *et al.*, 2018).

A formação do biofilme de *C. albicans* se desenvolve em etapas, a primeira fase consiste na aderência de células individuais à superfície, seja ela biótica ou abiótica, estas formarão a camada mais basal do biofilme. Logo após, inicia a fase de proliferação, filamentação, com hifas alongadas, em continuidade ao processo, acontece a maturação do biofilme, com acúmulo da matriz extracelular de composição polissacarídica. Segue-se com a dispersão de células deste biofilme que irão aderir a novas superfícies, levando à formação de novos biofilmes (Cavalheiro; Teixeira, 2018).

A matriz extracelular dos biofilmes é, predominantemente, constituída por proteínas, representando cerca de 55% de sua composição, com a presença de carboidratos, lipídios e DNA extracelular, e tem um importante papel na manutenção na ligação do biofilme ao substrato (Talapko; Škrlec, 2020).

Em um estudo conduzido por Nett e Andes (2020), foi demonstrado que essa matriz desempenha um papel fundamental na promoção da tolerância e resistência aos agentes antifúngicos. Além disso, ela atua como uma barreira física, impedindo a penetração eficaz dos

fármacos, ao mesmo tempo em que oferece suporte à estrutura geral do biofilme. Um fator que contribui para a resistência oferecida pelos biofilmes aos fármacos antifúngicos é a presença da beta 1-3-glucano que evita o contato do medicamento com a célula alvo. Células sésseis liberam maior quantidade desta molécula do que as planctônicas (Karygianni *et al*, 2020).

As glucanas e mananas presentes na matriz do biofilme de *C. albicans*, por exemplo, conseguem estabelecer uma complexa interação que resulta na retenção dos antifúngicos. Esse fenômeno resulta em um considerável aumento na tolerância dos biofilmes aos medicamentos, quando comparado às células planctônicas (Dominguez *et al.*, 2018; Mitchell *et al.*, 2015). A contribuição dos glucanose mananas de matriz para a tolerância a medicamentos nos biofilmes é um mecanismo amplamente reconhecido, e sua relevância não se limita apenas à *C. albicans*, essa característica é observada nos biofilmes de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. auris* (Dominguez *et al.*, 2018; 2019).

Dois tipos celulares podem ser encontrados em biofilmes de *C. albicans*, hifas e leveduras, além de uma marcante presença de matriz extracelular, tornando-o denso, com muita massa fúngica e mais espesso. De forma contrária *C. glabrata* apresenta biofilmes mais finos, com alta densidade celular, com predominância de leveduras (Galocha *et al.*, 2019). Embora a quantidade de matriz seja diferente entre as duas espécies, quando se analisa a composição, percebe-se que tem as mesmas proteínas e carboidratos (Al-Fattani; Douglas, 2006). O arranjo do biofilme de *C. albicans* apresenta uma estrutura tridimensional, com suas morfologias diferentes, e espaços vazios por entre as células, onde são formados microcanais, fornecimento de nutrientes, ar e água às células (Ramage *et al.*, 2001; Talapko; Škrlec, 2020).

Um dos principais desafios em ambientes hospitalares é a formação de biofilmes em materiais utilizados em pacientes internados, pois sabe-se que os biofilmes são responsáveis pela resistência ao tratamento antifúngico, e, muitas vezes, a retirada do dispositivo é a forma mais eficaz a fungemia e, consequentemente, um aumentado risco de vida (Lohse *et al*, 2020).

Outro fator de virulência é a secreção de enzimas hidrolíticas, como fosfolipase e hemolisina, que proporciona a invasão das superfícies da membrana mucosa e dos vasos sanguíneos, desempenham um papel na evasão da resposta imunológica do hospedeiro. (Wibawa, 2016)

Além dos fatores de virulência, o fungo ainda expressa moléculas e adaptações que o ajudam no processo de patogenicidade, se ajustando rapidamente ao novo ambiente. Assim, apresentam um alto grau de flexibilidade, pois possuem diversos mecanismos que os ajudam a adaptar o metabolismo para adquirir os nutrientes necessários, como novas fontes de carbono e

de metais como ferro, zinco, cobre e manganês (Chew; Chee; Than, 2019; Dadar *et al*, 2018; Galocha *et al.*, 2019).

2.1.3 Epidemiologia

A lista de agentes etiológicos da candidíase é extensa e novas espécies foram adicionadas nos últimos anos. Ainda assim, a maioria dos casos é causada por apenas cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Guinea, 2014). Das espécies isoladas, tanto de indivíduos saudáveis, quanto doentes, mais de 80%, são de *C. albicans* (Pfaller *et al.*, 2022). Nos últimos 20 anos, a frequência de casos de candidíase provocada por espécies de *Candida* não *albicans* tem aumentando significativamente. Acredita-se que este aumento pode ser atribuído ao diagnóstico mais preciso na identificação de espécies, tais como cromágar, e o uso de métodos moleculares (Sharma; Chakrabarti, 2023). Por outro lado, a resistência destas outras espécies aos antifúngicos tradicionais pode também explicar este aumento (Silva *et al.*, 2012).

Pfaller e colaboradores (2005) realizaram um levantamento dos resultados do Programa de Vigilância Antifúngica *ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study*, no período de 1997 a 2003, com a identificação das espécies e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de 134.715 isolados clínicos de *Candida*, coletados em 41 países, em todos os continentes. Essas amostras foram coletadas em casos de infecções sistêmicas, do sangue, urina e infecções genitais, em 127 centros médicos distribuídos por 39 países, mostrando que a lista de espécies isoladas cresceu nos anos incluídos no estudo. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que, devido ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos em todo o mundo, espécies anteriormente consideradas “não patogênicas” estejam de fato emergindo como patógenos oportunistas (Nucci; Marr, 2005).

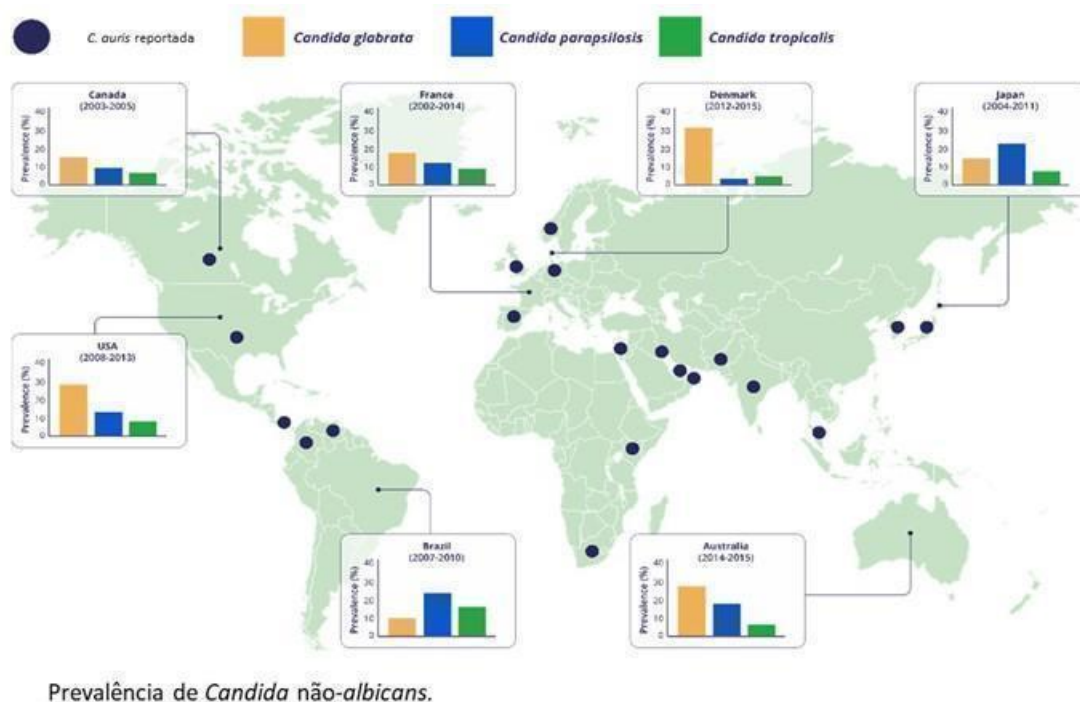
Embora *C. albicans* continue sendo a mais prevalente espécie causadora de fungemia, a frequência de ocorrência varia em todo o mundo, de 37% na América Latina a 70% na Noruega (Pfaller; Diekema, 2007). A segunda mais frequente foi *C. glabrata*, com 9,5% a 12% dos casos, seguida por *C. tropicalis* com frequência de 4,6% a 7,5% e *C. krusei*, responsável por menos de 3% dos casos (Pfaller; Diekema, 2007).

Os dados referentes à América Latina indicam que, ao longo do período estudado, a espécie *C. albicans* representou 51,8% dos isolados, seguida por *C. tropicalis*, que correspondeu a 13,2%, *C. parapsilosis* com 10,3%, *C. glabrata* com 7,2% e *C. krusei* com 1,4%

de ocorrência. Embora *C. albicans* tenha sido a espécie mais frequentemente isolada durante os dez anos de estudo, apenas 2,1% dos isolados apresentaram resistência ao fluconazol e 1,7% à voriconazol (Pfaller *et al.*, 2011).

Análise mais recente dos dados do Programa de Vigilância Antifúngica SENTRY, dentre os anos de 1997 a 2016, com 20.788 isolados de *Candida*, mostrou que *C. glabrata* foi a espécie não-*C. albicans* mais comum detectada em todas as regiões geográficas, exceto na América Latina, onde *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram mais comuns, 7,1% contra 24,3% e 17,0% respectivamente. *C. albicans* foi mais comum na Europa, com prevalência de 52,5% e nos Estados Unidos e Canadá, 42,7%. Das espécies *Candida* não *albicans*, *C. glabrata* foi mais comum na América do Norte, com 24,3% e menos na América Latina, 7,1% (Pfaller *et al.*, 2019). A Figura 3 mostra a prevalência destas espécies em alguns países do mundo.

Figura 3 - Prevalência de *Candida* sp. em diferentes países.



Fonte: Adaptado de Pappas *et al.* (2018).

É bem conhecido que *C. albicans* é a causa mais comum de candidemia em todo o mundo, as infecções causadas por *C. krusei* representam uma ameaça emergente para a saúde pública. Mesmo sendo a menos comum das cinco espécies, como se pode observar nos dados coletados de 1997 a 2007 mostrando que a frequência de infecções associadas a esta espécie

variou de 1,7% a 3,2% (Guinea, 2014). Mas, de acordo com um estudo conduzido em Montreal, Canadá, que analisou 190 casos de candidemia, *C. krusei* foi identificado como o agente etiológico da micose em 7% dos pacientes. No entanto, esse número aumentou para 13% no período de 2003 a 2006. A explicação mais provável para essa variação no período relatado foi o uso sistemático de fluconazol, de maneira profilática, em grupos de risco para o desenvolvimento de candidemia (Labbé *et al.*, 2009). A literatura mostra que esta espécie é mais prevalente nos grupos de idosos, e nas pessoas que apresentam doenças hematológicas (Castanheira *et al.*, 2016).

Isto posto, deve-se dar uma atenção especial a estas espécies de *Candida* não-*albicans*, pois, embora sejam menos comuns do que *C. albicans*, elas demonstram certa resistência aos antifúngicos comumente utilizados. *C. glabrata* tem sido um dos principais desafios, devido à resistência intrínseca ao fluconazol, afeta predominantemente adultos e está associada a taxas de mortalidade mais elevadas do que as demais espécies (Rodrigues *et al.*, 2018). *C. auris*, um patógeno emergente, também tem sido uma preocupação devido à sua notável resistência a agentes antifúngicos: 93%, ao fluconazol; 35% de resistência à anfotericina B e 7 %às equinocandinas (Pappas *et al.*, 2018).

2.1.4 Manifestações clínicas

A candidíase pode se manifestar em diferentes locais: pele, trato gastrointestinal, sistema geniturinário e também provocar infecções invasivas, sistêmicas. A candidíase mucocutânea se manifesta de diversas formas. As infecções na pele geralmente são superficiais, o acometimento da derme e da camada subcutânea é mais raro. As infecções mais frequentes ocorrem em áreas intertriginosas, como as inguinais, e são comuns em indivíduos com sobrepeso. *Candida spp.* também podem ser responsáveis por causar paroníquia ou onicomicose (Czechowicz; Nowicka; Gościński, 2022).

A candidíase é a infecção fúngica mais comum na cavidade oral e é causada por diversas espécies de *Candida*, sendo *C. albicans* responsável por 80% dos casos (Macias-Paz *et al.*, 2023; Wajdan *et al.*, 2023). Dados da literatura mostram que *C. albicans* faz parte da microbiota oral normal dos seres humanos (Lewis; Williams, 2017; Peters *et al.*, 2017).

A candidíase oral tem uma grande variedade de manifestações clínicas, podendo ser denominada candidíase primária, afetando somente cavidade oral e perioral (Baumgardner, 2019), ou secundária, quando ocorre como parte de uma infecção sistêmica, ou seja, a mucosa

já está alterada e susceptível a lesões e infecções associada à *Candida* (Du *et al.*, 2020). A forma primária inclui quatro manifestações clínicas: candidíase pseudomembranosa, a mais prevalente, candidíase eritematosa aguda, candidíase eritematosa crônica, e candidíase hiperplásica crônica ou nodular (Lewis; Williams, 2017).

A forma pseudomembranosa caracteriza-se pelo aparecimento de manchas ou placas brancas na mucosa oral, estas podem ser facilmente removidas por raspagem suave, uma vez que apenas a camada superior do epitélio mucoso é afetada (Baumgardner, 2019). Esta forma é comumente encontrada em neonatos, pessoas com xerostomia e indivíduos com HIV e, estas lesões podem ser localizadas ou generalizadas (Hellstein; Marek, 2019). E, muitas vezes, essa condição é acompanhada por distúrbios no paladar e um gosto ruim na boca (Millsop; Fazel, 2020). As características clínicas da candidíase oral e esofágica incluem manchas brancas na boca além de úlceras orais e dificuldade ao engolir (Maheshwari; Kaur; Chadha, 2016), e é a infecção fúngica oportunista mais comum em indivíduos infectados pelo HIV (Spalanzani *et al.*, 2018).

A candidíase eritematosa aguda costuma aparecer em pacientes que fazem uso de certos medicamentos, como antibióticos e corticoides, como efeito colateral destes (Sanghvi *et al.*, 2020). E a forma crônica, em indivíduos que usam próteses dentárias, onde o estabelecimento da doença é facilitado pela pouca higiene oral (O'Donnell *et al.*, 2015). A candidose hiperplásica se caracteriza pela penetração profunda das hifas na mucosa oral, causando lesões que podem ser homogêneas ou heterogêneas, estas últimas, são consideradas como potencialmente pré-cancerígenas (Hellstein; Marek, 2019).

A candidíase vulvovaginal (CVV) afeta milhões de mulheres anualmente, ficando atrás apenas das infecções bacterianas (Mayer; Wilson; Hube, 2013; Zeng *et al.*, 2018). Acredita-se que, pelo menos, 75% das mulheres enfrentarão um episódio ao longo da vida (Sobel, 2007), e 5 a 8% delas, terão crises recorrentes, o que afeta diretamente a qualidade de vida da mulher (Mayer; Wilson; Hube, 2013). Diversos fatores podem ser responsáveis pelo aparecimento desta doença: *diabetes mellitus* descontrolado, uso de antibióticos, contraceptivos orais, gravidez, terapia de reposição hormonal, imunossupressão, corticosteroides e predisposição genética (Gonçalves *et al.*, 2016). Os sintomas incluem prurido intenso na vulva e vagina, queimação, corrimento branco, caseoso e sem odor (Sobel, 2007; Czechowicz; Nowicka; Gościński, 2022).

A candidíase vulvovaginal ocorre principalmente em mulheres jovens em idade fértil, raramente em mulheres antes da puberdade ou na pré-menopausa (Zeng *et al.*, 2018; Lema,

2017). A atividade sexual e as alterações fisiológicas nos tecidos, induzidas pelos hormônios reprodutivos durante a fase reprodutiva, parecem desempenhar um papel significativo nesse contexto, aumentando a predisposição à infecção por *Candida spp* (Zeng *et al.*, 2018). Contrariamente, alguns autores tem sugerido que a origem da CVV pode não ser atribuída a uma infecção oportunista ou a uma deficiência imunológica, mas, em vez disso, estar associada a uma resposta de hipersensibilidade a um organismo comensal com características genéticas definidas (Fan *et al.*, 2008; Fidel Junior, 2007), ou mesmo, uma imunopatologia, onde a resposta imune dos neutrófilos e citocinas do paciente agrava os sintomas sem controlar o crescimento da levedura (Richardson *et al.*, 2018). O diagnóstico da candidíase vulvovaginal é feito através do exame clínico quando há vulvovaginite sintomática, e laboratorial através do isolamento das *Candida spp.* a partir do material clínico coletado (Achkar; Fries, 2010; Zyrek *et al.*, 2021).

A candidíase invasiva se refere a infecções na corrente sanguínea que geralmente ocorrem após a transposição da barreira intestinal, causadas por espécies de *Candida* (ou seja, candidemia). Além de infecções profundas, como abscessos intra-abdominais, peritonite ou osteomielite, com ou sem a infecção sanguínea (Pappas *et al.*, 2018). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em ambientes hospitalares e está intimamente ligada às novas tecnologias utilizadas na medicina como cateteres venosos centrais, diálises, longos períodos de internações, tratamentos em unidades de terapia intensiva, a interrupção das barreiras mucosas, durante traumas ou cirurgias, ou mesmo o uso de antibióticos de amplo espectro. Como exemplo, após uma cirurgia, a *Candida* pode se espalhar para a cavidade abdominal e entrar na corrente sanguínea, causando a doença (D'Enfert *et al.*, 2021; Magill *et al.*, 2014; Mayer; Wilson; Hube, 2013). Com sintomas similares às infecções bacterianas, o diagnóstico da candidemia se torna desafiador (Grubb *et al.*, 2008).

Na infecção invasiva, o fungo penetra no revestimento endotelial dos vasos sanguíneos no local da infecção e, após a disseminação hematogênica, atravessa novamente o endotélio e pode alcançar, virtualmente, qualquer órgão, incluindo cérebro, rins, fígado e pulmões, frequentemente resultando em óbito (D'Enfert *et al.*, 2021; Pappas *et al.*, 2018; Talapko *et al.*, 2021). Na maioria das infecções invasivas, a fonte de infecção é endógena, ou seja, o próprio paciente e estas acontecem quando o fungo escapa do trato gastrointestinal (Zhai *et al.* 2020).

A candidemia é a quarta infecção sanguínea nosocomial mais comum na América do Norte (Pfaller; Diekema, 2007). A taxa de mortalidade, variável entre as diversas regiões do

mundo, está entre 10% e 47%, apesar da disponibilidade de terapias antifúngicas; este número é considerado alto, uma situação extremamente preocupante (Brown *et al.* 2014; Pappas, 2018).

2.1.5 Tratamento

A candidíase tem sido, há tempos, um problema de saúde pública. Atualmente existem apenas três classes de fármacos que são comumente utilizados para o tratamento de infecções por *Candida*: os azóis, equinocandinas e polienos (Costa-De-Oliveira; Rodrigues, 2020). Cada uma dessas classes possui limitações, como efeitos adversos graves, alcance antimicrobiano restrito e potencial para desenvolver resistência, o que vem limitando seu uso clínico (Lu *et al.*, 2023).

Lançados como fármacos de uso tópico, a primeira geração da família dos azóis surgiu em 1969, com a introdução do clotrimazol e miconazol, e em 1974, o econazol. A partir de então, a classe dos fármacos azólicos se tornou uma opção terapêutica indispensável no tratamento de doenças fúngicas (Shafiei *et al.*, 2020). De acordo com sua estrutura química, os azóis podem ser divididos em fármacos imidazólicos e triazólicos, possuindo o mesmo mecanismo de ação e espectro antifúngico. Os triazóis sistêmicos são metabolizados lentamente e têm menos impacto na produção de esteroides naturais no corpo humano em comparação com os imidazóis, motivo pelo qual os novos fármacos em desenvolvimento são predominantemente triazólicos (Tan *et al.*, 2021). Compostos azólicos têm sido os mais amplamente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos, e sua eficácia com amplo espectro de ação, administração oral e baixo potencial de toxicidade têm justificado sua extensa aplicação clínica (Brunton, 2011; Regidor *et al.*, 2023).

A ação dos azóis se baseia na inibição do crescimento e replicação dos fungos, através da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase (*Erg11p*). Ela é a responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, um passo limitante na biossíntese do ergosterol, abundante componente da membrana celular fúngica (Douglas; Konopka, 2014; Rodrigues, 2018). Quando os azóis se ligam à enzima, o nitrogênio presente nas moléculas dos azóis reage com o átomo de ferro da porção heme da enzima. O resultado é a inibição da ativação do oxigênio, essencial para a reação de desmetilação do lanosterol, um passo fundamental na transformação deste em ergosterol pela ação da enzima. Como resultado desse bloqueio na biossíntese de ergosterol, ocorre o acúmulo de um esterol tóxico para a membrana celular, conhecido como 14- α -metil-3,6-diol. Esse esterol tóxico causa estresse na célula fúngica e impede a

continuidade do ciclo celular do micro-organismo (Hani *et al.*, 2015; Shapiro, Robbins, Cowen, 2011).

Sabe-se que os azóis prejudicam a função das ATPases, proteínas presentes nas membranas celulares e que desempenham um papel fundamental no transporte de íons de hidrogênio (H^+) através da membrana. Essa atividade é importante para manter a homeostase de cátions. Os azóis interferem nesse processo, como resultado, ocorre uma perturbação na homeostase de cátions dentro da célula fúngica. Isso pode levar a desequilíbrios iônicos que afetam negativamente o funcionamento normal da célula (Lupetti *et al.*, 2002). Essa descoberta fornece uma compreensão do mecanismo envolvido, das consequências celulares da depleção de ergosterol, componente crítico das membranas celulares dos fungos, e sua depleção afeta a integridade e a função destas. Portanto, ao interferir na homeostase de cátions e prejudicar a função das ATPases de membrana vacuolar H^+ , os azóis contribuem para os efeitos adversos nas células fúngicas causados pela falta de ergosterol. (Zhang *et al.*, 2010).

Os azóis tem ação fungistática contra leveduras e é fungicida contra fungos filamentosos (Cowen; Steinbach, 2008). A classe tem mostrado eficácia contra as espécies mais prevalentes de *Candida*, *C. neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e dermatófitos (Regidor *et al.*, 2023). Fluconazol, itraconazol e voriconazol são muito utilizados no tratamento de infecções por *C. albicans* devido à sua alta biodisponibilidade (Feng *et al.*, 2021). Alguns azóis (como o clotrimazol) podem aumentar diretamente a permeabilidade da membrana fúngica, porém, são concentrações muito elevadas, alcançadas somente com uso tópico (Regidor *et al.*, 2023).

No entanto tem-se observado que estes tratamentos tem se tornado insatisfatórios devido ao aumento da resistência, falta de fármacos para uso sistêmico e, principalmente, pelos efeitos colaterais das doses mais elevadas destes antifúngicos (Jothi *et al.*, 2021; Zyrek *et al.*, 2021). As últimas décadas têm sido marcadas por um aumento no uso profilático de azóis em pacientes de alto risco, numa tentativa de se evitar infecções oportunistas. Essa utilização em excesso, aliada a natureza fungistática destes fármacos levou a um aumento de resistência aos azóis nos isolados clínicos (Cowen; Steinbach, 2008).

A resistência aos antifúngicos pode ser clínica ou micológica. A resistência clínica é caracterizada pela incapacidade de erradicar completamente o fungo em um paciente que recebeu um antifúngico com atividade comprovada *in vitro* contra o mesmo. Já a resistência micológica permite que o fungo continue a crescer e se reproduzir, mesmo na presença do antifúngico que demonstrou eficácia em testes laboratoriais (Pristov; Ghannoum, 2019).

Os mecanismos que levam à resistência aos azóis em espécies de *Candida* são bem estabelecidos, e estão principalmente relacionados ao aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas, modificações na estrutura dos sítios-alvo e à formação de biofilmes (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017).

Embora o fluconazol seja o antifúngico mais comumente utilizado, a resistência antifúngica atualmente observada tem limitado seu uso (Tan *et al.*, 2021). Quanto às espécies, *C. albicans* é a espécie mais encontrada provocando infecções graves, no entanto, *C. auris*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* têm desenvolvido uma considerável resistência antifúngica (Costa-De-Oliveira; Rodrigues, 2020).

Os polienos, fármacos fungicidas como anfotericina B e nistatina, de natureza anfipática, se ligam firmemente ao ergosterol, criando complexos de drogas-lipídeos que se intercalam na membrana da célula fúngica formando canais transmembranares (Shukla *et al.*, 2016). Isso funciona como uma espécie de porta de saída para o conteúdo celular, incluindo íons potássio (K^+) e sódio (Na^+) provocando o rompimento da célula (Shapiro, Robbins, & Cowen, 2011). No entanto, devido à semelhança entre o ergosterol e o colesterol, bem como à baixa solubilidade dos polienos, esses compostos tendem a causar efeitos adversos significativos em pacientes, limitando ainda mais seu uso (Chandrasekar, 2011).

A anfotericina B é eficaz contra doenças fúngicas sistêmicas e apresenta atividade contra várias espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *C. neoformans*. Mesmo após vários anos de uso, um sério problema ainda é a toxicidade, principalmente renal. Isso se deve às semelhanças entre a estrutura do ergosterol e do colesterol (Agwu, 2021; Fanos; Cataldi, 2000; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). A utilização de anfotericina B lipossomal reduz, consideravelmente, a toxicidade do fármaco para o hospedeiro, tornando-o mais seguro, e novas formulações têm sido desenvolvidas (Segarra; Movshin; Zarif, 2002). A resistência aos polienos ocorre devido a alterações nas moléculas de ergosterol ou no conteúdo da membrana plasmática, bem como à substituição de ergosterol, colesterol ou estigmasterol por 3-hidroxi ou 3-oxoesteróis, que têm menor afinidade pelos polienos (Shukla *et al.*, 2016).

As equinocandinas são uma classe de antifúngicos amplamente utilizados para tratar candidemia e candidíase invasiva. O mecanismo de ação desses medicamentos envolve a inibição da enzima 1,3-beta-D-glucana sintase, essencial para a formação da parede celular fúngica. Essa inibição leva a uma quebra da homeostasia do fungo, resultando em lise (Baltaci; Kalkanci, 2021; Jothi *et al.*, 2021).

Atualmente, existem três fármacos dessa classe: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Mutações no gene *FKS*, que codifica a glucano sintase, deixam o fungo menos responsivo ao fármaco, aumentando a resistência (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017; Lara-Aguilar *et al.*, 2021). A ação das equinocandinas é oposta à dos azóis, são fungistáticas contra fungos filamentosos e, fungicidas contra leveduras como, *Candida* e *Aspergillus* (Denning, 2003). O fato de as equinocandinas se direcionarem para um componente específico dos fungos, faz com que o uso destas seja seguro. No entanto, seu uso por um curto período ainda não permitiu estudos de longo prazo sobre resistência (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).

2.2 CRIPTOCOCOSE

A criptococose, uma doença fúngica potencialmente fatal e globalmente disseminada, tem ganhado destaque na micologia clínica nos últimos 50 anos. Já foi conhecida como, torulose, blastomicose europeia ou doença de Busse-Buschke, é uma importante micose sistêmica (Casadevall *et al.*, 1998). Esse destaque se dá pelo aumento do número de casos associados a populações de hospedeiros imunocomprometidos, como os portadores de HIV. Entretanto, a infecção também pode acometer indivíduos imunocompetentes (Zavala; Baddley, 2020).

Causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus*, a infecção em humanos ocorre através da inalação do fungo presente em excretas de pombos e em árvores, sendo capaz de levar à morte hospedeiros susceptíveis, mesmo com tratamento (Gushiken; Saharia; Baddley, 2021). Em 1894, o cientista Francesco Sanfelice, do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari, na Itália, foi o primeiro a isolar o *Cryptococcus* a partir de suco de pêssago, demonstrando a capacidade do mesmo de causar lesões quando inoculado em animais de laboratório. No entanto, ele só foi reconhecido como patógeno humano a partir da década de 60. Após diversas classificações, o gênero hoje pertence ao filo *Basidiomycota*, classe *Tremellomycetes* e ordem *Tremellales* (Mitchell; Perfect, 1995; Perfect; Bicanic, 2015).

Usualmente, são dois os agentes etiológicos da criptococose: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que compartilham semelhanças, mas diferem entre si nas manifestações clínicas, epidemiologia e distribuição geográfica (Maziarz; Perfect, 2016). Eles são responsáveis por uma ampla variedade de infecções, que podem se apresentar como doenças

pulmonares e do sistema nervoso central (SNC), sendo a meningoencefalite criptocócica (CM) a manifestação mais frequente e grave (Perfect *et al.*, 2010).

A criptococose começa com a inalação de leveduras desidratadas presentes no ar, ou, possivelmente, via sexuada, pode produzir basidiósporos nos pulmões (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Estudos sorológicos indicam que a infecção criptocócica em humanos é prevalente, porém, a doença é rara (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Goldman *et al.* 2001). Em indivíduos imunocompetentes, uma resposta imune efetiva elimina a maioria dos esporos inalados, porém, naqueles indivíduos portadores de HIV ou que fazem uso de drogas imunossupressoras, estas células proliferam e se disseminam via hematogênica, atravessando a barreira hematoencefálica (Zaragoza, 2019).

2.2.1 *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*

Inicialmente, acreditava-se que o agente causador da criptococose era uma espécie anamórfica homogênea representada apenas por *C. neoformans*. As divergências genéticas culminaram na proposta de separação em duas espécies distintas, *C. neoformans* e *C. gattii* (Boekhout *et al.*, 2001), uma ideia que já havia sido proposta anteriormente por Kwon-Chung (1976).

Assim, historicamente, *C. neoformans* e *C. gattii* foram classificados desta forma devido às diferenças estruturais apresentadas na cápsula de polissacarídeo (Kwon-Chung *et al.*, 2017). No entanto, em 1970, estudos baseados em diversos parâmetros, como distribuição geográfica, nichos ecológicos, epidemiologia, manifestações clínicas e características moleculares, levaram ao reconhecimento da variante *C. neoformans* var. *gattii* (Cogliati, 2013; Gushiken *et al.*, 2016).

A heterogeneidade antigênica do *Cryptococcus* foi confirmada em 1950 por Evans, que identificou três sorotipos: A, B e C, um quarto sorotipo, D, foi descoberto em 1968 (Kwon-Chung *et al.* 2014). Em 1999, com base em diferenças clínicas, moleculares e biológicas, foi sugerido incluir uma variedade denominada *grubii* para amostras do sorotipo A (Franzot; Salkin; Casadevall, 1999).

Através de análises filogenéticas baseadas em abordagens de concordância genealógica e estudos de genotipagem, Hagen e colaboradores (2015) propuseram uma nova nomenclatura para os subtipos moleculares. De acordo com esta classificação proposta, os agentes causadores da criptococose estão divididos em dois complexos: *C. neoformans* e *C. gattii*, e esses complexos exibem uma notável diversidade genética. Baseando-se em estudos moleculares,

foram classificados em sete espécies distintas: *C. neoformans* (*C. neoformans* variedade *grubii*, que engloba três tipos moleculares - VNI, VNII, VNB - e linhagens do sorotipo A), *C. deneoformans* (*C. neoformans* variedade *neoformans*, VNIV, sorotipo D), *C. gattii* (VGI), *C. deuterogattii* (VGII), *C. bacillisporus* (VGIII), *C. tetragattii* (VGIV) e *C. decagattii* (VGIV/VGIIIc), abrangendo os sorotipos B e C. Além disso, foram identificados isolados que representam quatro formas híbridas entre essas espécies, incluindo *C. neoformans* × *C. deneoformans* (VNIII), *C. deneoformans* × *C. gattii* (híbrido VGI), *C. neoformans* × *C. gattii* (híbrido VGI) e *C. neoformans* × *C. deuterogattii* (híbrido VGII) (Cuomo; Rhodes; Desjardins, 2018, Maziarz; Perfect, 2016, Hagen *et al.* 2015, Kwon-Chung *et al.* 2017).

Esta proposta de reclassificação das espécies de *C. gattii* em cinco categorias e *C. neoformans* em duas categorias, além dos híbridos, tem gerado debates significativos dentro da comunidade de micologistas clínicos e taxonomistas. Em um esforço para resolver essa discussão em curso, evitando uma instabilidade no uso da nomenclatura, Kwon-Chung e seus colegas publicaram um trabalho importante em 2017. Nesse estudo, eles examinaram cuidadosamente as vantagens e desvantagens dessa proposta de reclassificação e sugeriram o uso dos termos "*Cryptococcus neoformans* complexo de espécies" e "*C. gattii* complexo de espécies" como uma etapa intermediária antes de atribuir mais categorias taxonômicas. Isso reflete o reconhecimento de que existe uma grande diversidade genética dentro dessas espécies, embora ainda não haja dados suficientemente conclusivos para reconhecer novas espécies (Kwon-Chung *et al.*, 2017).

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são, tipicamente, encapsuladas embora algumas possam não apresentar a estrutura. Elas têm uma forma globosa ou ovalada, com um tamanho variando de 3 a 8 µm de diâmetro (Liu *et al.*, 2015). Em condições normais, na forma de levedura unicelular, *C. neoformans* se reproduz, assexuadamente, por meio de brotamento. Sob condições que estimulam a reprodução sexual, como desidratação ou falta de nitrogênio, o fungo passa por uma transição morfológica, de levedura para hifas. A formação de hifas possibilita a aquisição de nutrientes do ambiente circundante e a produção de esporos infecciosos capazes de resistir ao estresse (Zhao; Lin, 2021). A habilidade de utilizar uma variedade de substratos fenólicos, como a dopamina, para produzir de melanina, contribui para a sua sobrevivência no hospedeiro e é uma característica distintiva em relação a outras leveduras patogênicas.

As colônias de *Cryptococcus* costumam ser de cor branca a creme, com uma textura mucoide e margens lisas e intactas. Isso ocorre após três dias de crescimento a uma temperatura de 25 a 37°C em meios como o ágar *Saboraud* dextrose (ASD) 2% (Kon *et al.*, 2008).

Uma estrutura fundamental, a parede celular dos fungos é composta de glicoproteínas, lipídeos e pigmentos, o que confere grande adaptabilidade e desempenha um papel vital na preservação da integridade e viabilidade das células (Gow *et al.*, 2012). Além de desempenhar diversas funções biológicas cruciais, como o controle da permeabilidade celular e a proteção contra situações de estresse osmótico e mecânico (Garcia-Rubio *et al.*, 2020).

A parede celular fúngica desempenha um papel fundamental no reconhecimento e adesão por meio de adesinas e vários receptores. Após sua ativação, esses receptores desencadeiam uma complexa cascata de sinais no interior da célula (Zaragoza, 2019). A síntese e a manutenção da parede celular envolvem uma ampla rede de biossíntese e vias de sinalização (Casadevall; Perfect, 1998). A parede celular do *Cryptococcus* é uma estrutura dinâmica, sujeita a contínuos processos de remodelação para ajustar a distribuição e conexão de seus componentes, essenciais para o crescimento e a divisão celular (Wang; Li; Doering, 2018). Dado que a parede celular fúngica é, predominantemente, composta por moléculas ausentes no organismo humano, a indústria farmacêutica tem frequentemente direcionado sua atenção para essa estrutura no desenvolvimento de novos fármacos (Cortes *et al.*, 2019).

2.2.2 Fatores de virulência

Para que um microrganismo se torne patogênico, é necessário que ele desenvolva mecanismos que proporcionem vantagens durante a infecção, permitindo que o patógeno supere ou contorne os sistemas de defesa do hospedeiro. Isto é possível devido à presença dos fatores de virulência, termo complexo, difícil de ser caracterizado, mas que, basicamente, se refere a mecanismos moleculares e celulares que permitem que um patógeno se estabeleça, se reproduza e colonize o hospedeiro (Pirofski; Casadevall, 2015; Zaragoza, 2019).

As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* apresentam como principais fatores de virulência: a presença da cápsula, produção de melanina, capacidade de sobreviver em macrófagos, termotolerância e secreção de enzimas, como proteases, lipases e ureases (Almeida; Wolf; Casadevall, 2015; Fu *et al.*, 2018; Garcia-Rubio *et al.*, 2020).

A cápsula polissacarídica, principal fator de virulência desse fungo, é ancorada pela parede celular, e é a estrutura que tem sido caracterizada com maiores detalhes (Zaragoza,

2019). É composta de glucanos, quitina, quitosana e glicoproteína; contendo dois tipos principais de polissacarídeos: a glucuronoxilomanana (GXM) (~90%) e a glucuronoxilagalactomanana (GalGXM) (~7%) (Cherniak; Jones; Reiss, 1988; Gilbert; Lodge; Specht, 2011; Heiss *et al.*, 2009). A organização da cápsula é complexa e, interessantemente, pode variar em resposta às condições ambientais. Ela é composta por fibras ramificadas que se ancoram à parede celular e se interconectam por meio de ligações não covalentes (Frases *et al.*, 2009).

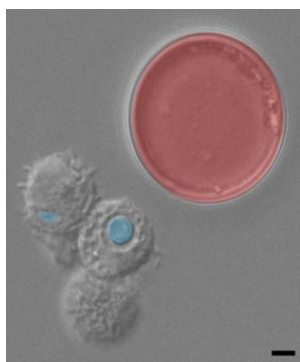
O entendimento sobre a síntese das cápsulas é de grande relevância para compreender a biologia deste patógeno, muitas das proteínas aí envolvidas são glicosidases, que desempenham um papel na conversão dos diversos açúcares que se unem para formar as fibras de polissacarídeos (Agustinho *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2016; Wang; Li; Doering, 2018). E, recentemente, mecanismos de síntese da cápsula têm sido elucidados, mostrando que a mesma é produzida no retículo endoplasmático e exportada para o citosol em vesículas pequenas, que também carregam outros fatores de virulência (Nimrichter *et al.*, 2016).

A cápsula não é essencial para a sobrevivência do fungo; de fato, existem espécies que carecem dessa estrutura. No entanto, a falta da cápsula leva a uma redução na virulência. Esse fenômeno pode ser explicado pelo papel crucial da cápsula no processo de infecção, onde ela atua inibindo a fagocitose e mascarando os epítomos presentes na membrana celular, resultando na diminuição e/ou atraso da resposta imune (Chang; Kwon-Chung, 1994; Zaragoza, 2019).

Com o objetivo de evadir o sistema imunológico do hospedeiro, a levedura tem a capacidade de modificar tanto a estrutura quanto o tamanho da cápsula (Zaragoza; Nielsen, 2013). Durante a infecção inicial nos pulmões, as leveduras têm a capacidade de gerar células conhecidas como "células titã", que se destacam por seu tamanho, mais de 100 µm de diâmetro, em contraste com as células típicas que apresentam cerca de 5-7 µm quando cultivadas *in vitro*. Estas células não sofrem fagocitose e continuam a dar origem a células-filhas com tamanho normal, indicando que desempenham um papel estratégico na disseminação da levedura e na sua sobrevivência, particularmente em ambientes de estresse dentro do hospedeiro (Hommel *et al.*, 2018).

Um exemplo desta célula é mostrado na Figura 4, onde temos a imagem de células originadas de um lavado broncoalveolar de camundongo infectado mostra leveduras de tamanho típico, em azul, as quais são prontamente fagocitadas pelas células mononucleares do hospedeiro (em cinza). Em vermelho, célula titã de *C. neoformans*, a qual não sofre o processo de fagocitose pelas células hospedeiras (Zaragoza; Nielsen, 2013).

Figura 4 - Célula titã de *Cryptococcus* em um modelo de infecção murino



Fonte: Zaragoza; Nielsen (2013).

Nota: Barra = 5 μ m.

Além da cápsula, a melanina é outro fator de virulência que interfere com o sistema imunológico do hospedeiro. De forma intrigante, esses dois elementos desempenham um papel duplo, atuando não apenas como fatores de virulência, mas também como protetores contra ataques do sistema imunológico (Zaragoza, 2019).

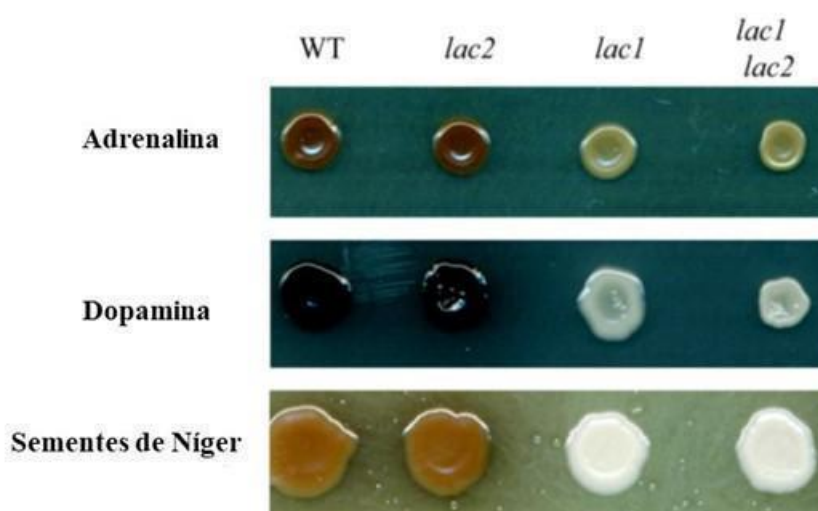
A melanina, sintetizada por diversas espécies de fungos, é um pigmento escuro, de alto peso molecular, que possui carga negativa, é hidrofóbica e insolúvel em soluções aquosas. Ele é depositado na parede celular fúngica, é reconhecido por desempenhar papel protetor contra o estresse ambiental, contribuindo para sua sobrevivência no hospedeiro (Nosanchuk; Casadevall, 2006; Nosanchuk; Stark; Casadevall, 2015). Diferentemente de outros fungos negros, presentes no solo, *C. neoformans* não produz eumelanina de forma constitutiva, ou seja, não a produz continuamente. Em vez disso, ele sintetiza eumelanina somente na presença de substratos específicos, como a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e outros compostos di ou polifenólicos, mostrando que esta produção é ativada quando ele encontra esses substratos em seu ambiente (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Como ilustrado na Figura 5, a melanização de *C. neoformans* depende de uma enzima, a difenol oxidase, codificada por dois genes, *Lac1* e *Lac2*, sendo LAC1 a principal proteína envolvida na produção deste pigmento, mutantes *lac1* e *lac2* falham em produzir quantidade significativa de melanina (Pukkila-Worley *et al.*, 2005).

A produção de melanina aumenta a resistência do *Cryptococcus* a danos ambientais, como temperaturas extremas, radiação ionizante (pois absorve a radiação eletromagnética) e toxinas, além de poder se ligar e diminuir a ação dos antifúngicos, como anfotericina B

(Cordero *et al.*, 2018; Martinez; Casadevall, 2006; Nosanchuk; Casadevall, 2006; Wang; Casadevall, 1994) também pode alterar a produção de citocina do hospedeiro, e atuar protegendo contra macrófagos (Mednick; Nosanchuk; Casadevall, 2005). O papel da melanina, como fator de virulência, foi elucidado através de pesquisas sobre partículas de melanina, sendo observado que, os camundongos que receberam o pigmento purificado do *Cryptococcus* desenvolveram granulomas no baço, pulmão e fígado indicando respostas pró-inflamatórias que modificam a resposta imunológica do hospedeiro (Rosas *et al.*, 2002).

Figura 5 - Melanização de *C. neoformans*



Fonte: Adaptado de Pukkila-Worley *et al.* (2005).

Outro fator fundamental na patogênese de *C. neoformans* e *C. gattii* é a capacidade de se adaptar à temperatura corporal do hospedeiro, uma das características que difere o fungo ambiental dos fungos patogênicos. Estes têm a capacidade de se reproduzir a 37°C, e esta adaptação é fundamental para que se tornem patógenos em hospedeiros imunossuprimidos (Bergman; Casadevall, 2010). O processo de adaptação ao crescimento em temperaturas mais elevadas envolve uma série de respostas, como a ativação de sistemas antioxidantes, a acumulação de trealose e o engajamento de diferentes vias de sinalização (Zaragoza, 2019).

C. neoformans produz algumas enzimas de degradação, consideradas fatores de virulência, como a urease e fosfolipase e estas desempenham um papel crucial na doença criptocócica (Chayakulkeeree *et al.*, 2011; Singh *et al.* 2013). A atividade da urease criptocócica é necessária para a disseminação do fungo no pulmão, além de ser responsável pela capacidade do fungo atravessar a barreira hematoencefálica, aumentando o número de

leveduras dentro dos microcapilares (Olszewski *et al.* 2004; Osterholzer *et al.* 2009, Fu *et al.*, 2018). Um estudo mostrou que a urease é importante para o crescimento do *Cryptococcus* e apresentando uma atividade maior, a 37°C mesmo sob restrição de nutrientes. Células deficientes em urease apresentaram alto níveis de ureia intracelular, além de maior atividade da arginase, que poderia estar fornecendo ureia endógena (Toplis *et al.*, 2020).

Outro fator que contribui para a virulência de *Cryptococcus spp.* é a sua capacidade de formar biofilmes, matrizes poliméricas que atuam como uma espécie de escudo protetor para as células fúngicas. Do ponto de vista clínico, uma das funções mais significativas da matriz extracelular do biofilme é criar uma barreira física que separa as células do biofilme do seu entorno (Martinez; Casadeval, 2007; Carmo *et al.*, 2022). Essas comunidades podem aderir a superfícies bióticas ou abióticas, protegendo a levedura dos fármacos antifúngicos e do sistema imunológico do hospedeiro (Ramage; Williams, 2013) e pode afetar dispositivos médicos (Benaducci *et al.*, 2016). Estudo com modelo invertebrado, *Galeria mellonella*, mostrou que as células do biofilme de *Cryptococcus spp.* são mais virulentas que as células planctônicas e expressam genes de virulência, como *LAC1*, *URE1* e *CAP59*, relacionados à lacase, urease e cápsula polisacarídica, respectivamente (Benaducci *et al.*, 2016).

O conhecimento dos elementos que desempenham um papel crucial na virulência do *Cryptococcus spp.* é de grande relevância, não apenas para a compreensão da criptococose, mas também para a pesquisa e desenvolvimento de terapias inovadoras e eficazes para o tratamento da doença.

2.2.3 Epidemiologia

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, cosmopolita e endêmica no nordeste do Brasil, Paraguai, México, Austrália, Índia, Sudeste Asiático, Europa, Califórnia (Estados Unidos) e vários países africanos. No início, acreditava-se que a infecção acontecia somente em indivíduos imunossuprimidos, mas um episódio que ficou conhecido como “surto de Vancouver” ocorrido nos Estados Unidos e Canadá evidenciou a capacidade de certas linhagens do fungo de atuarem como patógenos primários (Fraser *et al.*, 2005; May *et al.*, 2016). E, mesmo sendo uma doença disseminada, sua epidemiologia ainda não é amplamente compreendida (Rhodes *et al.*, 2017).

O complexo *C. neoformans* complexo é o principal patógeno em todo o mundo, e a maioria das infecções é causada por *C. neoformans* var. *grubii*, que corresponde aos subtipos

moleculares, VNI, VNII, VNBI, VNBII e VNIII (Figura 6). A doença causada por *C. neoformans* var. *neoformans*, correspondente subtipo VNIV, é mais prevalente na Europa, representando aproximadamente um terço dos casos (Howard-Jones *et al.*, 2022).

Enquanto isso, o complexo *C. gattii* é responsável por uma significativa parcela das infecções por criptococose em determinados países, como Austrália, Papua Nova Guiné, EUA e Canadá. Estas espécies são comumente encontradas em árvores como eucaliptos e outras três espécies nativas da região Noroeste do Pacífico, que são consideradas reservatórios naturais (Saidykhan; Onyishi; May, 2022). No passado, acreditava-se que o *C. gattii* estava limitado a áreas subtropicais e tropicais, porém, sua distribuição atual é mais abrangente, e as limitações geográficas relatadas eram, em parte, devido à falta de diferenciação de espécies (Bielska; May, 2015).

O número de infecções causados por espécies diversas daquelas constantes dos complexos *C. gattii* e *C. neoformans* tem aumentado, nas últimas quatro décadas, com destaque para *C. laurentii* e *C. albidus*, que respondem juntas por 80% dos casos registrados de criptococose. E mais, outras espécies como *C. curvatus*, *C. humicolus* e *C. uniguttulatus* também têm sido associadas a infecções oportunistas em seres humanos, e a imunossupressão se mostra como o fator de risco mais preponderante para a aquisição desses patógenos (Ragupathi; Reyna, 2015).

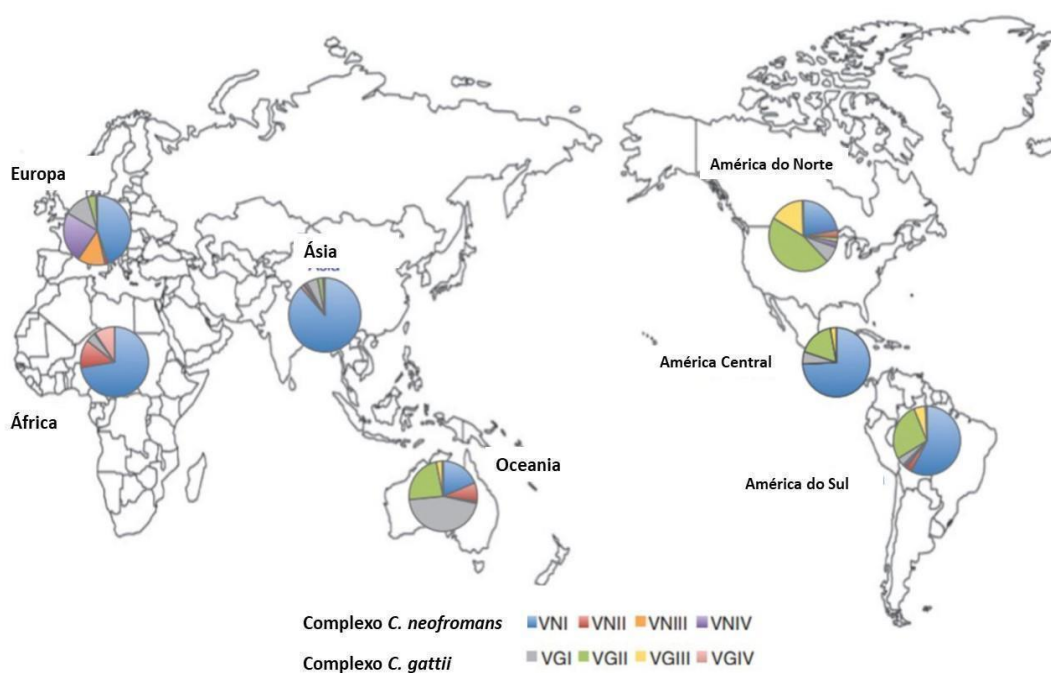
A criptococose não possui predisposição por sexo ou raça, contudo, estudos revelam uma incidência maior em homens, entre 30 e 60 anos, sendo muito raro o acometimento em crianças. Entretanto, há pesquisas que relatam alta frequência da doença nesta faixa etária nas regiões Norte e Nordeste do país, acreditando ser um fator ligado à desnutrição ou ao imunocomprometimento das crianças, mas, de forma controversa, também foi relatada em países desenvolvidos, como Austrália (Firacative *et al.*, 2018; Grimshaw *et al.*, 2019; Severo *et al.*, 2009).

Em todo o mundo, são relatados entre 200.000 e 300.000 novos casos de criptococose relacionada ao HIV anualmente, resultando em cerca de 180.000 óbitos, e o principal responsável são espécies do complexo *C. neoformans* (Rajasingham *et al.*, 2017). Estima-se que 181.100 mortes relacionadas ao HIV tenham sido causadas pela meningite criptocócica, representando 15% das mortes totais associadas à AIDS. Os sobreviventes da meningite criptocócica enfrentam um risco significativo de morbidade a longo prazo, incluindo deficiências cognitivas e auditivas (Pasquier *et al.*, 2018).

Embora a incidência de meningite criptocócica associada ao HIV tenha diminuído em países com acesso crescente à terapia antirretroviral (TAR), em 2014, houve uma estimativa global de 223.100 casos de meningite criptocócica em pacientes com HIV. A maior parte desses casos (73%) ocorreu na África Subsaariana, totalizando 162.500 casos. A América Latina registrou o terceiro maior número de casos anuais, totalizando 5.300. Brasil e Colômbia apresentaram as incidências mais altas, com 1.001 a 2.500 casos, seguidos pela Argentina e México, com 501 a 1.000 casos (Maziarz; Perfect, 2016; Rajasingham *et al.*, 2017).

Importante ressaltar que a frequência de casos de criptococose em indivíduos não infectados pelo HIV e não transplantados tem aumentado, possivelmente devido ao uso de terapias imunomoduladoras (Deming *et al.*, 2019).

Figura 6 - Distribuição geográfica dos complexos *C. gattii* e *C. neoformans*.



Fonte: Adaptado de Howard-Jones *et al.* (2022).

O complexo *C. neoformans* é o mais prevalente globalmente, com a maioria das infecções atribuídas à variante *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A). Essa infecção é frequentemente relacionada à exposição ocasional ao excremento de aves, como pombos e galinhas, embora também tenha sido associada a matéria orgânica em decomposição, produtos lácteos e solo (Emmons, 1995; Howard-Jones *et al.*, 2022).

Há uma certa escassez de dados relacionados à prevalência da criptococose na América Latina. No entanto, alguns estudos mostram a situação, isoladamente, em alguns países, como por exemplo, no México a criptococose foi o patógeno mais comum (10% prevalência), causando meningoencefalite (Angulo; Escorza; González, 2005); e *C. neoformans* foi o segundo fungo mais prevalente (21%) encontrado causando fungemia em pacientes imunossuprimidos (Gaona-Flores *et al.*, 2016). Na Venezuela, um levantamento sobre micoses endêmicas mostrou a criptococose em 3º lugar, sendo superada apenas pela histoplasmose (1º) e pela paracoccidioidomicose (2º), entretanto, quando se avaliou o percentual em pacientes HIV⁺, ela subiu para o segundo lugar (Reviákina *et al.*, 2007). E, uma pesquisa nacional realizada na Argentina identificou a criptococose como a segunda doença fúngica invasiva mais comum, com uma prevalência de 20%, sendo superada apenas pela fungemia causada por *Candida spp.* (Davel; Canteros, 2007).

Na Colômbia, num estudo com pacientes com HIV/AIDS, a criptococose foi a doença oportunista mais prevalente com prevalência de 76% (Castro-Jiménez *et al.* 2011). Em todo o país, entre as infecções oportunistas que afetam o SNC nestes pacientes, a criptococose se posiciona como a segunda mais frequente, atrás da toxoplasmose (Lizarazo *et al.*, 2006; Lozano; Manrique, 2007; Mantilla; Cárdenas, 2009, Firacative *et al.*, 2018).

No Brasil, a criptococose emergiu como uma das infecções fúngicas com alta letalidade para indivíduos com HIV (Nunes *et al.*, 2018). Embora inúmeros estudos tenham investigado a meningite criptocócica em todo o mundo, poucas pesquisas foram realizadas levando-se em conta todo o território brasileiro, comumente, observamos estudos a partir de centros de referência, por estados. Um estudo, avaliando os casos ocorridos em uma década, mostrou uma média anual de 0,45 casos de criptococose meníngea por 100.000 habitantes na população em geral no estado do Rio de Janeiro (Leimann; Koifman, 2008).

Estudos realizados sobre prevalência de genótipos, entre 2004 e 2020, em 12 estados brasileiros, que analisou as amostras clínicas de 1.204 pacientes, imunocomprometidos ou não, mostrou que 80,07% das amostras correspondiam a *C. neoformans* VNI, 5,73% a *C. neoformans* VNII, 0,17% a *C. neoformans* VNIV e 0,33% a *C. neoformans* VNB. No caso de *C. gattii*, a prevalência foi de 0,42% para VGI, 12,79% para VGII e 0,50% para VGIII (Carmo *et al.*, 2022).

C. gattii geralmente afeta indivíduos imunocompetentes e é endêmico nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, afetando crianças, adolescentes e adultos jovens (Alves *et al.*, 2016; Chen; Meyer; Sorrell, 2014). A criptococose primária está principalmente relacionada ao genótipo

VGII nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Esse genótipo também está associado a uma parte significativa dos casos de criptococose infantil em estados como Amazonas, Pará, Piauí e Maranhão (Santos *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011). A alta incidência de meningite criptocócica em crianças que não são portadoras do HIV nas regiões Norte e Nordeste do Brasil sugere que essa infecção ocorre nos estágios iniciais da vida nessas áreas (Souto *et al.*, 2016).

As regiões Sul e Sudeste mostram infecções esporádicas por *C. gattii* (Pinto Junior *et al.*, 2010). Um estudo de coorte retrospectiva, num hospital de alta complexidade no sul do Brasil, entre os anos de 2009 a 2016, avaliando setenta e nove casos de meningite criptocócica, mostrou que o exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) de 96% dos pacientes foi positiva para *C. neoformans*. E, a condição mais comumente encontrada foi o HIV/AIDS, seguida por transplantes de órgãos, as manifestações clínicas mais comuns foram, febre, náusea, vômito, dor de cabeça e alteração do estado mental (Azambuja *et al.*, 2018).

2.2.4 Manifestações clínicas

As manifestações mais frequentes da infecção por *Cryptococcus spp* ocorrem no sistema nervoso central e no trato respiratório inferior, mas pode se espalhar para outros órgãos. Considerando os desfechos desfavoráveis que podem estar associados a um diagnóstico tardio, é essencial estar atento e avaliar casos atípicos de criptococose, independentemente do estado imunológico do paciente (Gushiken; Saharia; Baddley, 2021).

Tempos atrás, acreditava-se que as manifestações da criptococose eram semelhantes nas infecções causadas pelos dois complexos, *C. neoformans* e *C. gattii*, porém, o surto de Vancouver desafiou essa premissa (Zavala; Baddley, 2020). As pessoas imunocompetentes, infectadas pelo *C. gattii*, é mais provável que desenvolvam massas inflamatórias proeminentes (criptococomas), frequentemente resultando em sequelas neurológicas que necessitam de intervenção cirúrgica ou tratamento antifúngico prolongado (Chayakulkeeree; Perfect, 2006; Speed; Dunt, 1995). A doença se manifesta de forma diversa nos indivíduos imunossuprimidos, quando *C. neoformans* se associa ao HIV (Perfect; Casadevall, 2002). Esta associação resulta em maior envolvimento do sistema nervoso central e extrapulmonar, maior taxa de resultados positivos nos testes de Nanquim, culturas sanguíneas positivas e menor número de células inflamatórias no líquido cefalorraquidiano. Esses resultados clínicos sugerem que pacientes infectados pelo HIV apresentam uma alta carga fúngica e reações inflamatórias deficientes no local da infecção, e uma apresentação semelhante pode potencialmente ocorrer em um

hospedeiro imunocomprometido devido a outras causas (Chayakulkeeree; Perfect, 2006; Perfect *et al.*, 2010).

A manifestação clínica mais comum da criptococose envolve uma infecção do SNC, geralmente na forma de meningite criptocócica (CM). Os pacientes com este tipo de infecção podem apresentar diversos de sintomas inespecíficos, incluindo dores de cabeça, náuseas, vômitos, mal-estar, alterações no estado mental e febre. O aumento da pressão intracraniana (PIC), a invasão dos nervos cranianos pelo fungo e a formação de lesões cerebrais (criptococomas) podem resultar em disfunção neurológica e sintomas associados (Maziarz; Perfect, 2016; Gassiep *et al.*, 2018). Convulsões, frequentemente reflexo do aumento da PIC ou dos criptococomas, tendem a surgir em fases posteriores da doença, e é uma característica marcante da MC, podendo resultar em complicações graves, como hidrocefalia, perda de visão, surdez ou mesmo óbito (Baddley; Forrest, 2019). Avaliar a presença de hidrocefalia relacionada ao aumento da PIC ou a presença de possíveis criptococomas através da tomografia computadorizada (TC) é importante no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes (Zavala; Baddley, 2020).

A infecção pulmonar, observada em até 50% dos pacientes com criptococose, é mais comum em pacientes infectados com *C. gattii*, sendo que este tende a provocar doença pulmonar mais grave em comparação com *C. neoformans*. As manifestações incluem desde a colonização das vias aéreas, que pode ser assintomática, até o desenvolvimento de nódulos pulmonares e pneumonia, incluindo a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Os sintomas são inespecíficos e podem incluir febre, tosse, dispneia, sudorese noturna, mal-estar, dor no peito e, ocasionalmente, hemoptise, e são mais frequentes nos pacientes imunocomprometidos (Setianingrum; Rautemaa-Richardson; Denning, 2019; Wang *et al.*, 2017; Zavala; Baddley, 2020). Em pacientes imunocompetentes, a doença geralmente permanece localizada nos pulmões e frequentemente se resolve sem a necessidade de terapia antifúngica (Chang *et al.*, 2006; Lomes *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Apesar de ser incomum, a criptococose grave com disseminação e desenvolvimento da MC a partir de uma infecção assintomática tem sido descrita na literatura. Numa análise retrospectiva com pacientes diagnosticados com criptococose pulmonar, aqueles que também tinham a doença extrapulmonar tinham maior probabilidade de possuir condições subjacentes, como cirrose, e de relatar sintomas como dor de cabeça, perda de peso, febre, alterações no estado mental ou uso de altas doses de corticoides em comparação com os pacientes que apresentavam apenas doença pulmonar localizada (Baddley *et al.*, 2008).

A infecção criptocócica pode afetar uma variedade de tecidos, incluindo a pele e os tecidos moles, próstata, fígado, rim, ossos e articulações (Lanternier *et al.*, 2007; Siddiqui; Zamani; Parada, 2005). A manifestação cutânea, o terceiro local mais comum de infecção, pode ser categorizada como primária (inoculação direta de *Cryptococcus* por meio de lesão traumática) ou secundária (decorrente de disseminação hematogênica). Indivíduos com infecção primária são mais velhos, residem em áreas rurais, praticam atividades ao ar livre, têm contato com fezes de pássaros e costumam não apresentar comorbidades. Nestes casos, esta lesão se apresenta como uma única lesão cutânea, semelhante a um panarício (Shelburne III *et al.*, 2005). Apesar de haver casos de infecção cutânea primária, a maioria das infecções cutâneas ocorrem em pacientes imunossuprimidos, como uma manifestação secundária de doença disseminada. Estas manifestações cutâneas abrangem uma variedade de lesões, como placas, úlceras, celulite, abscessos, pústulas, pápulas umbilicadas, bolhas e nódulos (Du *et al.*, 2015; Noguchi *et al.*, 2019). A maioria destas lesões é localizada nas extremidades inferiores e muitas vezes está associada a doenças do sistema nervoso central (Sun *et al.*, 2010).

A criptococose do SNC pode ocasionar manifestações oculares relacionadas à PIC elevada ou à atrofia primária do nervo óptico causada pela invasão direta do fungo (Goldberg *et al.*, 2005). A criptococose prostática é rara e ocorre durante uma infecção disseminada; ela geralmente não causa sintomas, mas, em alguns casos, pode levar a problemas como disúria ou uropatia obstrutiva (Wada *et al.*, 2008).

É crucial reconhecer a capacidade de disseminação da infecção criptocócica para que se possa, corretamente, e em menor tempo, diagnosticar as apresentações atípicas. A criptococose pode afetar várias partes do corpo por meio da disseminação hematogênica. E, são poucos os casos conhecidos de envolvimento urogenital, lesões oculares (particularmente comuns em pacientes com MC) e lesões ósseas, embora estas últimas ocorram em menos de 10% das formas disseminadas da doença (Mitchell; Perfect, 1995; Medaris *et al.*, 2016).

2.2.5 Tratamento

A escolha do tratamento da criptococose deve levar em conta o estado imunológico do paciente e as manifestações clínicas apresentadas, tais como a localização da infecção e a gravidade da doença (Baddley; Forrest, 2019). Nos pacientes com acometimento do SNC, o tratamento objetiva eliminar ou controlar a infecção, baixar a PIC e prevenir sequelas

neurológicas a longo prazo. Para os pacientes com doença pulmonar, o objetivo é a erradicação da doença e prevenir a disseminação para o SNC (Saag *et al.*, 2000; Shoham *et al.*, 2005).

Atualmente, há um limitado número de fármacos disponíveis para o tratamento desta doença, com diferentes mecanismos de ação e alcances terapêuticos. Os mais frequentemente empregados incluem a anfotericina B (AmB), os antifúngicos azólicos e a 5-flucitosina. Em certos grupos de pacientes, a preparação lipídica de AmB é preferível devido à redução de sua nefrotoxicidade. Para prevenir os efeitos adversos da 5-flucitosina, incluindo supressão da medula óssea e nefrotoxicidade, é essencial o monitoramento e manutenção dos níveis dentro do padrão de segurança. (Baddour; Perfect; Ostrosky-Zeichner, 2005; Pappas *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2018; Williamson *et al.*, 2017).

A maioria dos antifúngicos disponíveis no mercado e utilizados na prática clínica está relacionada à enzima 14- α -demetilase (Erg11), para atuar na inibição da biossíntese do ergosterol, que é o principal esteroide presente nas membranas celulares dos fungos (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011). No entanto, o êxito de um ensaio clínico de fase III que avaliou a eficácia da combinação de anfotericina B e 5-flucitosina levou a OMS a revisar e atualizar suas diretrizes para o tratamento da criptococose em pacientes portadores do vírus HIV (Molloy *et al.*, 2018; WHO, 2018).

O tratamento da MC é estruturado em três fases distintas: (1) indução, (2) consolidação e (3) manutenção dos regimes terapêuticos antifúngicos. Conforme as diretrizes de 2018 da OMS para o tratamento da criptococose em pacientes HIV⁺, a fase de indução consiste em uma semana de tratamento com AmB (1,0 mg/kg por dia) e 5-flucitosina (100 mg/kg por dia, divididos em quatro doses diárias), seguida por uma semana de fluconazol (1200 mg/dia para adultos e 12 mg/kg por dia para crianças e adolescentes, até uma dose máxima de 800 mg/dia). A fase de consolidação abrange um período de 8 semanas com fluconazol (800 mg/dia para adultos e 6–12 mg/kg por dia para crianças e adolescentes, até uma dose máxima de 800 mg/dia) após a conclusão da fase de indução. Por fim, a fase de manutenção envolve o uso contínuo de fluconazol (200 mg/dia para adultos e 6 mg/kg por dia para adolescentes e crianças) até que ocorra a reconstituição imunológica (WHO, 2018).

No ano de 2022, as recomendações do Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes da OMS sofreram uma revisão, resultando em um novo protocolo de tratamento que enfatiza o uso de doses elevadas de anfotericina B lipossomal, combinadas com 5-flucitosina e fluconazol por 14 dias, como a opção de terapia de indução preferencial para o tratamento da criptococose (WHO, 2022). É essencial destacar que essa atualização do protocolo amplia o desafio relacionado ao

acesso a tratamentos, um problema já agravado pela disponibilidade limitada e pelo alto custo da 5-flucitosina, que frequentemente não está acessível em países com recursos financeiros limitados (Zhao *et al.*, 2023).

A AmB, um exemplo de polieno, foi o primeiro agente antifúngico desenvolvido para combater infecções fúngicas sistêmicas e exibe atividade fungicida, através da formação de poros na membrana fúngica (Ellis, 2002; Ferreira *et al.*, 2013; Gray, 2012; Oura; Sternberg; Wright, 1955). A resistência a AmB por parte do *C. neoformans* é raramente documentada, embora a detecção eficaz de tal resistência possa ser uma tarefa desafiadora, e a verdadeira extensão da resistência ao fármaco ainda não é completamente compreendida (Ellis, 2002; Moore *et al.*, 2000; Rex *et al.*, 2001). Alguns isolados de *Cryptococcus* demonstraram sensibilidade reduzida à AmB (Arechavala *et al.*, 2009; Khyriem; Sujatha; Parija, 2006; Lozano-Chiu *et al.*, 1998), mas os mecanismos subjacentes a essas alterações permanecem em grande parte desconhecidos. Foi identificado que mutações no esteroide $\Delta 8-7$ isomerase, envolvida na biossíntese do ergosterol, podem levar à resistência da AmB em *C. neoformans* (Khyriem; Sujatha; Parija, 2006; Lozano-Chiu *et al.*, 1998). Curiosamente, também foram observados isolados resistentes à AmB sem evidência de modificações na biossíntese de ergosterol, o que sugere a existência de mecanismos alternativos de resistência a esse antifúngico no *C. neoformans* (Sangalli-Leite *et al.*, 2011).

A 5-flucitosina, originalmente desenvolvida em 1957, surgiu como uma substância química potente com aplicações tanto antibacteriana como antitumoral. Sendo um pró-fármaco, a flucitosina é transportada para o interior das células por meio da citosina permease Fcy2. Sua funcionalidade depende da conversão em 5-fluorouracila, um processo que envolve a ação da citosina desaminase Fcy1 e os metabólitos resultantes levando à inibição da síntese de DNA e RNA (Vermes; Guchelaar; Dankert, 2000). A resistência à flucitosina é um obstáculo que limita seu uso como monoterapia em infecções fúngicas, tornando a combinação com anfotericina B a abordagem preferencial de tratamento inicial para infecções criptocócicas (Schwarz *et al.*, 2007; WHO, 2022). Apesar de termos uma compreensão aprofundada da resistência à flucitosina em *Candida spp.* (McManus *et al.*, 2009; Papon *et al.*, 2007), há uma lacuna significativa na investigação da resistência em *C. neoformans*. Relatos demonstraram que mutações sem sentido no gene MSH2, que codifica a proteína de reparo de DNA, podem conferir resistência à flucitosina em isolados clínicos de *C. neoformans* (Rhodes *et al.*, 2017). Billmyre e colaboradores (2020) realizaram um estudo mostrando como defeitos no reparo de incompatibilidades de DNA podem acelerar o desenvolvimento de resistência à flucitosina em

C. deuterogattii, uma espécie relacionada ao *C. neoformans*. Os resultados desse trabalho também evidenciaram o papel da mutagênese por transposon na aquisição de resistência à flucitosina durante a transição do ambiente para o hospedeiro em *C. neoformans* (GUSA *et al.*, 2020).

O fluconazol, frequentemente empregado como o principal agente antifúngico no tratamento de infecções criptocócica, possui ação na biossíntese do ergosterol, um componente essencial das membranas celulares fúngicas, por meio da interação com a enzima esterol 14-desmetilase, também conhecida como citocromo P450 (Erg11 ou Cyp51). Esse processo culmina na perturbação da integridade da membrana celular do fungo (Pasko; Piscitelli; Van Slooten, 1990). A heterorresistência ao fluconazol e outros azóis, um fenômeno clinicamente comum, tem um papel significativo na recaída da criptococose durante a terapia de manutenção com fluconazol (Rhodes *et al.*, 2017, Stone *et al.*, 2019). *C. neoformans* exibe resistência inata ao fluconazol (Sionov *et al.*, 2009), principalmente, devido a duplicações transitórias de cromossomo 1, que abriga os genes ERG11 e AFR1, sendo este o evento inicial observado em níveis de fluconazol acima do valor do CIM (Sionov *et al.*, 2010, Sionov; Chang; Kwon-Chung, 2013). Entretanto, essas duplicações cromossômicas ou aneuploidias podem ser facilmente perdidas na ausência do agente antifúngico (Sionov *et al.*, 2010). Mutações no gene ERG11 também foram associadas à resistência ao fluconazol em *C. neoformans* (Gago *et al.*, 2016).

Por fim, deve-se ressaltar que triazóis de nova geração, desenvolvidos a partir do fluconazol e itraconazol, como voriconazol, posaconazol e isavuconazol têm demonstrado atividades mais eficazes contra patógenos fúngicos emergentes e resistentes (Peyton; Gallagher; Hashemzadeh, 2015). Esses triazóis de nova geração foram avaliados no tratamento de aspergilose e candidíase invasiva, sinalizando implicações clínicas promissoras para o tratamento da MC (Jović *et al.*, 2019).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

Os produtos naturais desempenharam um papel crucial na história da pesquisa e desenvolvimento de fármacos e constituíram a base da maioria dos remédios primitivos. Essas substâncias de origem natural têm se revelado uma fonte inestimável de novos tratamentos para diversas doenças graves, muitas das quais ainda carecem de terapias eficazes (Watkins *et al.*, 2015). A natureza tem consistentemente fornecido um reservatório de *Candidatos* a fármacos e permitindo a busca contínua por compostos líderes (Chopra; Dhingra, 2021).

No passado, a etnofarmacologia desempenhou um papel fundamental na origem de fármacos e medicamentos à base de plantas, com o conhecimento sendo acumulado ao longo dos tempos (Swerdlow, 2000). A consequência desta busca pelo homem é que, hoje em dia, produtos naturais derivados de plantas nativas são amplamente utilizados por boa parte da população em diversas opções terapêuticas, abrangendo uma ampla gama de patologias, que vão desde infecções até doenças crônicas (Verpoorte, 2000). Ainda hoje, os produtos naturais se mantêm como uma fonte valiosa de potenciais fármacos e são muito utilizados na indústria farmacêutica (Newman; Cragg; Snader, 2003).

As plantas medicinais são caracterizadas pela presença de compostos ativos, que podem ser constituídos por uma única substância ou por um complexo fitoterápico (Miana *et al.*, 2015). O uso destas plantas tem sido os mais diversos, começando com preparações caseiras e evoluindo para uso industrial, com isolamento de moléculas com algum tipo de ação farmacológica (Lorenzi, 2008). Desta forma, a natureza exibe um extraordinário potencial de compostos bioativos, alguns deles representados na Figura 7.

No mundo, existem cerca de 250.000 espécies de plantas, embora apenas cerca de 10% tenham sua composição química e potencial biológico conhecidos. O Brasil, por sua vez, abriga uma flora excepcionalmente rica, com uma estimativa de cerca de 50 mil espécies de plantas, das quais 43% são encontradas exclusivamente neste país. Esse número representa aproximadamente 20% da biodiversidade global de espécies vegetais (Souza *et al.*, 2021b).

A utilização de plantas medicinais para tratar uma variedade de doenças possui uma rica história entre a população brasileira. Essa prática é resultado da influência das culturas indígenas, africanas e europeias, que, ao longo do tempo, moldaram os fundamentos da medicina popular no Brasil, e o conhecimento é passado de geração em geração (Brandão *et al.*, 2009).

No caso de doenças fúngicas, os compostos naturais, extraídos de plantas nativas do Brasil, se tornam uma opção que pode além de diminuir os efeitos adversos do tratamento, ser uma alternativa de menor custo para a saúde pública e, ainda, contornar o crescente problema da resistência aos medicamentos hoje disponíveis (Zida *et al.*, 2017).

2.3.1 Família *Anacardiaceae*

A família *Anacardiaceae* possui, aproximadamente, 77 gêneros e cerca de 700 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Tianlu; Barfod, 2008). Um deles, o gênero *Anacardium*, inclui plantas que podem viver de 30 a 40 anos, crescendo em uma variedade de tipos de solo, incluindo solos pedregosos, arenosos, argilosos e pesados, desde que esses solos sejam bem drenados (Adewale *et al.*, 2013). No entanto, ela não consegue se desenvolver em solos que sejam muito pobres em nutrientes e cresce melhor em locais com estação de seca bem definida, de 3 a 4 meses (Akinwale; Olubamiwa; Ajav, 2001; Desai, 2008). Outro gênero presente nesta família é o *Myracrodruon* (sinonímia de *Astronium*), que também tem sido bastante utilizado na medicina popular, para tratar alergias, inflamação, diarreia e úlceras, e com pesquisas que demonstrando resultados positivos em diversas atividades farmacológicas (Silva *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2015).

É importante notar que essas plantas tendem a ter um crescimento limitado em áreas onde o solo é particularmente pesado, predominantemente argiloso ou excessivamente encharcado com salinidade (Tamuno; Onyedikachi, 2015). Com flores hermafroditas, a polinização pode ser feita por insetos ou pelo vento (Adejumo; Otuonye, 2002).

2.3.1.1 *Anacardium occidentale*

O gênero *Anacardium* é representado por cerca de 20 espécies, encontradas em regiões tropicais (The Plant List, 2013) e com diferentes usos etnomedicinais. Dentre os diversos efeitos bioativos das plantas deste gênero destacam-se suas atividades antioxidantes, antimicrobianas e anticancerígenas, esta última tem recebido muita atenção, e, os metabólitos responsáveis por estas ações estão em diversas partes da planta: folhas, frutos, cascas e brotos (Salehi *et al.*, 2020). *Anacardium humile* tem sido utilizado como purgante, antiemético, diurético (Siracusa *et al.*, 2020), *Anacardium giganteum* para tratar diarreia, inflamação e até mesmo hemorragia (Castro *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2021; Coutinho; Travassos; Amaral, 2002) e *Anacardium*

microcarpum, o cajuí, tem mostrado atividade antioxidante, citotóxica e antibacteriana (Barbosa Filho *et al.*, 2015).

Anacardium occidentale, conhecida como cajueiro (Figura 8), é registrada como espécie medicinal no RENISUS e, devido à sua elevada versatilidade vem sendo muito utilizada em alguns lugares do mundo e também no Brasil, o que a tornou a espécie mais cultivada e utilizada deste gênero (Baptista *et al.*, 2018).

Figura 8 - Árvore (A), casca (B) e fruto (C) de *Anacardium occidentale*.



Fonte: Serrano; Vidal Neto; Melo (2012).

Preparações fitoterápicas tradicionais com cascas de *A. occidentale* (Sika *et al.*, 2013) têm sido utilizadas popularmente para tratar hemorroidas e diarreia grave (Stasi; Hiruma-Lima, 2002) além de doenças reumáticas (Rufino *et al.*, 2010). A infusão com cascas de *A. occidentale* é indicada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira para tratamento de diarreia leve não infecciosa (Brasil, 2023).

Nas cascas do cajueiro já foram encontrados diversos metabólitos secundários, dentre eles flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos e ácidos fenólicos (Barbosa Filho *et al.*, 2015; Encarnação *et al.*, 2016; Ojezele; Agunbiade, 2013).

Entre as infecções tratadas com cascas de *A. occidentale*, encontra-se a candidíase oral (inflamação da garganta, gengivas doloridas, afta) e vulvovaginal (inflamação dos órgãos

femininos). Além disso, as cascas são utilizadas na medicina tradicional para tratar outras condições infecciosas e inflamatórias, geralmente encontradas na criptococose, como encefalite e pneumonia (Arendrup; Patterson, 2017; Bitu *et al.*, 2015; Albuquerque *et al.*, 2007; Diatta *et al.*, 2019; Salehi *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2014).

Estudos feitos com plantas nativas selecionadas a partir de indicações populares, mostrou que os extratos hidroetanólicos bruto de *A. occidentale* apresentou atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, com CIM de 0,312 µg/µL (Silva *et al.*, 2020). Um estudo feito, por meio da contagem de colônias, mostrou que as soluções de enxágue feitas a partir do extrato etanólico da casca de *A. occidentale* (1 a 5%) afetaram a aderência de *C. albicans* à resina acrílica. O número de colônias variou de 1757,50 a 670,00 UFC/mL, apresentando resultados melhores do que o grupo controle (1912,50 UFC/mL) (Harsini, 2016).

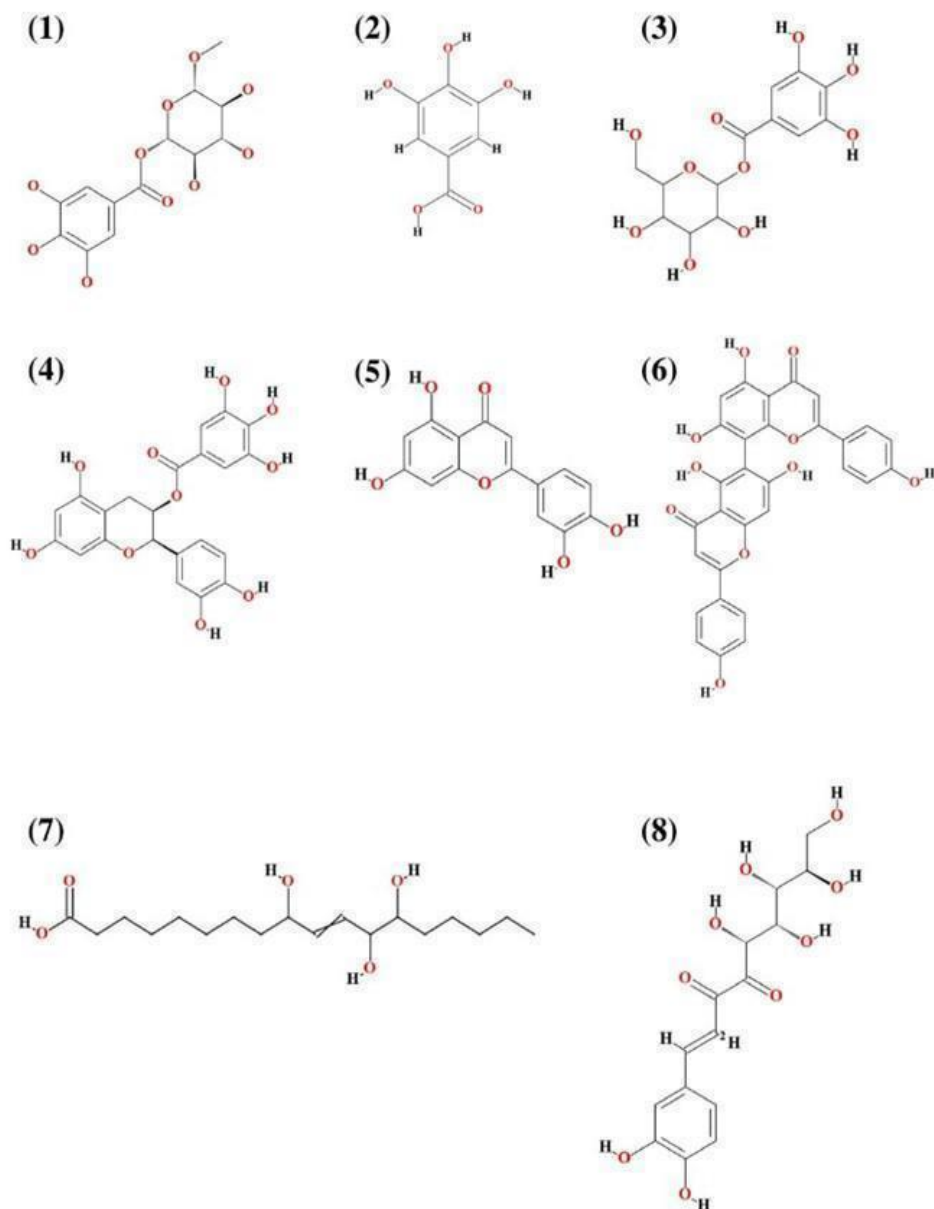
Uma preparação, a partir do extrato aquoso da casca do cajueiro tem sido utilizada no Brasil para tratar a diabetes tipo 2 (Encarnação *et al.*, 2012). Uma análise fitoquímica deste extrato, utilizando cromatografia em camada fina (CCD), além de um ensaio colorimétrico mostrou o teor total de compostos fenólicos, a presença de ácido gálico e elágico (Encarnação *et al.*, 2022).

Costa e colaboradores (2020) identificaram, através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada a um espectômetro de massa (MS), a presença de 11 compostos nos extratos etanólico brutos obtidos das folhas e 6 compostos do extrato das cascas de *A. occidentale*. Neste estudo destaca-se a presença de flavonoides e taninos, tanto hidrolisáveis quanto condensados. Este mesmo grupo, outra análise, utilizando HPLC-MS feita a partir de extratos etanólico bruto das cascas elucidou a estrutura química de alguns compostos presentes: (1) galoil-β-glicose ou glucogalina, (2) ácido gálico, (3) hexosídeo de ácido gálico, (4) epigallocatequina galato, (5) luteolina, (6) agatisflavona, (7) ácido 9,12,13-triidroxi-octadec-10-enoico e (8) cafeoil-D-glicose (Figura 9) (Costa *et al.*, 2021).

As moléculas presentes no extrato etanólico da casca, taninos e flavonoides, podem ser as responsáveis pelas ações antioxidantes (glucogalina, epigallocatequina galato), anti-inflamatório e antitumoral (luteolina); além do uso como fitohormônios (agatisflavona) (Bitu *et al.*, 2015; Paola *et al.*, 2018; Taiwo *et al.*, 2017). Já a ação antifúngica pode ser devida à presença de ácido gálico (Câmara *et al.*, 2019). Essa ação antimicrobiana promissora tem sido observada em estudos que mostram que extratos brutos obtidos de cascas de caule, folhas, flores e frutos demonstraram atividade antibacteriana, abrangendo tanto bactérias Gram-positivas

quanto Gram-negativas, incluindo linhagens resistentes, e atividade antifúngica contra fungos do gênero *Candida* (Andrade Júnior *et al.*, 2018).

Figura 9 - Estrutura química dos constituintes do extrato etanólico das cascas de *A. occidentale*.



Fonte: Costa *et al.* (2021).

Como mostrado acima, observa-se na literatura estudos analisando composição química e ação antimicrobiana de extratos etanólico brutos obtidos das cascas de *A. occidentale*. No entanto, percebe-se uma escassez, quando se deseja analisar a ação individual das frações

polares obtidas destes extratos. A diversidade de metodologias aplicadas na obtenção dos extratos, locais onde a coleta das plantas foi realizada, e microrganismos analisados, também deixa uma lacuna a ser preenchida.

2.3.1.2 *Myracrodruon urundeuva*

Uma outra espécie integrante da família *Anacardiaceae*, *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão, sinônimo de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. é encontrada na Caatinga, no Cerrado e na Mata Atlântica, caracteriza-se por um caule, uma copa larga e um tronco com diâmetro aproximado de 35 cm, e pode chegar a 15m de altura (CNIP, 2014). Conhecida popularmente como aroeira, aroeira do sertão ou aroeira preta é uma árvore caducifólia, dioica, com casca cinzenta a pardacenta e madeira muito dura, que tem levado a uma exploração desmedida, colocando a espécie em risco (Lorenzi; Matos, 2002).

Figura 10 - Árvore (A) e caule (B) de *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

M. urundeuva possui folhas imparipinadas, que podem medir até 5 cm de comprimento, e quando esmagadas, emitem um forte odor de terenbitina, devido à presença de óleos voláteis

(Costa *et al.*, 2014). As flores são sésseis e unissexuadas, e os sexos ocorrem em indivíduos separados (CNIP, 2014). A madeira é vermelha, muito resistente (inclusive à decomposição), sendo considerada imputrescível. Devido à permeabilidade extremamente baixa, costuma ser muito utilizada na indústria civil (Kiill; Martins; Silva, 2010). As propriedades físicas, químicas e biológicas da aroeira permitem uma maior resistência à compressão, flexão, erosão, fogo, ataque de insetos e microrganismos (Vieira; Camilo; Coradin, 2016). Aliado à sua resistência, os taninos presentes na casca desta árvore conferem à mesma um elevado valor econômico. Taninos de *M. urundeuva* costumam ser utilizados para curtimento de pele e, na medicina popular, para tratamento de feridas, gastrite e outras doenças internas devido às suas propriedades cicatrizantes, balsâmicas, reguladoras do ciclo menstrual e anti-inflamatórias (Souza *et al.*, 2022).

M. urundeuva foi uma das espécies citada em mais de 50% das comunidades avaliadas num estudo etnofarmacológico, indicando um conhecimento amplo e/ou uso dessas espécies no nordeste do Brasil (Macedo *et al.*, 2018). A medicina popular tem utilizado esta planta para tratamento de diversas lesões (Cartaxo; Souza; Albuquerque, 2010) e a ciência vem comprovando as ações antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas e antioxidantes (Jandu *et al.*, 2013; Viana; Bandeira; Matos, 2003). A infusão das entrecascas de *M. urundeuva* é indicada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira como auxiliar no tratamento sintomático de aftas e inflamações da orofaringe e como antiácido (Brasil, 2023).

Lectinas presentes no extrato obtido das cascas de *M. urundeuva* apresentaram ação contra ovos do *Aedes aegypti* (Alves *et al.*, 2020). Contudo, a ação antimicrobiana desta espécie é a característica mais marcante até o momento (Ferreira *et al.*, 2021). A hemaglutinina, uma lectina extraída da madeira do cerne de *M. urundeuva* que parece ser a responsável pela resistência da árvore, apresentou atividade antimicrobiana contra fitopatógenos do gênero *Fusarium* (Sá *et al.*, 2009). As lectinas extraídas da casca, cerne e folhas de *M. urundeuva* exibiram baixa citotoxicidade, bem como não causaram genotoxicidade em linfócitos. Em concentrações não tóxicas, as lectinas das folhas mostraram uma citotoxicidade moderada nas linhagens de células cancerígenas, e atividade antifúngica contra isolados de *C. neoformans* e *C. gatti* (Videres *et al.*, 2023).

O extrato da casca do caule de *M. urundeuva* foi investigado no controle do crescimento e na prevenção da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria oportunista que se fixa em superfícies e cria biofilmes protetores. Os resultados apontam que os taninos

encontrados na aroeira, como o ácido gálico, podem ser os responsáveis pelos danos causados na membrana da bactéria, impedindo a formação do biofilme (Trentin *et al.*, 2013).

Foi descrito para o extrato metanólico das folhas de *M. urundeuva* a presença de taninos e heterosídeos de flavonoides. O extrato apresentou citotoxicidade dose dependente em fibroblastos gengivais humanos, inibindo a viabilidade em concentrações elevadas (100 e 1000 µg/mL) (Machado *et al.*, 2016). Esse mesmo extrato apresentou atividade frente a *C. albicans* e *C. glabrata*, inibindo a formação de biofilmes em CIM de 62,5 e 250 µg/mL, respectivamente (Bonifácio *et al.*, 2019).

Uma análise fitoquímica dos extratos etanólico bruto obtidos das cascas, galhos e folhas de *M. urundeuva* revelou a presença de flavonoides, fenóis, taninos, derivados de quercetina e ácidos anacárdicos, sendo que a casca mostrou predominantemente, chalconas e catequinas (Castro *et al.*, 2020).

De forma semelhante ao observado para *A. occidentale*, nota-se uma escassez de na literatura de estudos analisando composição química e ação antifúngica de extratos etanólicos brutos obtidos das cascas de *A. occidentale* contra linhagens de *Cryptococcus*. A lacuna é ainda maior em estudos que desejam analisar a ação individual das frações polares obtidas destes extratos.

3 JUSTIFICATIVA

A frequência de micoses invasivas causadas por patógenos fúngicos oportunistas aumentou significativamente nas últimas décadas, associada a maiores níveis de morbidade e mortalidade. Estudos recentes estimam que, em todo o mundo, infecções fúngicas matam mais de 1,5 milhões de pessoas por ano, taxa semelhante à mortalidade por tuberculose, e cerca de três vezes mais do que a malária (Wambaugh *et al.*, 2020). Tal situação torna as doenças fúngicas um grave problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, estima-se que os custos com as micoses cheguem a 12 bilhões de dólares, e, que, somente a candidíase, seja responsável por quase 30% deste valor (Benedict; Whitham; Jackson, 2022).

Desde o primeiro relato de caso em 1895 até alcançar a marca de um milhão de casos anuais no mundo, a criptococose conquistou um lugar de destaque na área da micologia clínica. Causada principalmente pelas espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, pode ser uma doença infecciosa fúngica letal. Por outro lado, espécies do gênero *Candida* são, sem dúvida, o grupo de patógenos fúngicos oportunistas mais importante. Sabe-se que existem mais de 100 espécies descritas, sendo as mais frequentes encontradas causando micoses em humanos: *C. albicans*, espécie isolada com mais frequência de material clínico, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, esta apresenta resistência intrínseca e adquirida aos azólicos e a outros antifúngicos usados. Existem ainda, as espécies *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. haemulonii* e *C. auris* (Hassan; Chew; Than, 2021).

A produção de novos fármacos antimicóticos precisa superar alguns desafios, pois patógenos eucarióticos, como os fungos compartilham uma relação evolutiva próxima com seus hospedeiros humanos, tornando difícil a descoberta de agentes seletivos e isentos de toxicidade (Shapiro; Robins; Cowen, 2011).

No caso de doenças fúngicas, os compostos naturais, extraídos de plantas nativas do Brasil, se tornam uma opção que pode além de diminuir os efeitos adversos do tratamento, ser uma alternativa de menor custo para a saúde pública e, ainda, contornar o crescente problema da resistência aos medicamentos hoje disponíveis (Zida *et al.*, 2017). A *Myracrodruon urundeuva*, também conhecida como aroeira do sertão, ou simplesmente aroeira, é uma destas plantas que são amplamente utilizadas como medicinais, sendo uma com um maior número de indicações terapêutica por comunidades (Macedo *et al.*, 2018). E, junta com ela, também pertencente à família *Anacardiaceae*, que abriga o gênero *Anacardium*, com espécies com diferentes usos etnomedicinais, como, por exemplo, *Anacardium humile* utilizado como

purgante, antiemético, diurético (Siracusa *et al.*, 2020), disso, estudos atestam as propriedades de *Anacardium giganteum* para tratar diarreia, inflamação e até mesmo hemorragia e *A. occidentale* é registrada como espécie medicinal, devido à sua elevada versatilidade.(Castro *et al.*, 2011; Coutinho; Travassos; Amaral, 2002; Costa *et al.*, 2021).

Assim, após uma triagem para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas nativas, foi possível observar resultados promissores ao explorar o potencial do extrato etanólico das cascas de *A. occidentale* e *M. urundeuva*, plantas nativas que são adaptadas às condições climáticas quentes da nossa região. Ao identificar propriedades antifúngicas na fração acetato de etila dos extratos etanólico destas plantas, visamos ainda elucidar sua composição química, possíveis mecanismos de ação e propriedades termodinâmicas. É importante ressaltar que, até o momento, há lacunas significativas no entendimento da composição química destas frações e suas atividades biológicas em relação às espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. Este achado promissor poderá contribuir para a compreensão destes processos citados, e, quem sabe, oferecer perspectivas inovadoras para o desenvolvimento de protótipos com ação antifúngica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das plantas nativas frente a linhagens do gênero *Cryptococcus* e *Candida*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escolher duas plantas nativas que apresentassem melhor atividade contra *Candida sp* e *Cryptococcus sp*.
- Obter e fracionar o extrato etanólico de cascas de *A. occidentale* e *M. urundeuva*.
- Caracterizar quimicamente a fração mais ativa de *A. occidentale* e *M. urundeuva*.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato e frações de *A. occidentale* e *M. urundeuva* frente aos macrófagos murinos RAW 264.7 e J744A.1.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e frações de *A. occidentale* e *M. urundeuva* frente à *Candida spp.* e *Cryptococcus sp*.
- Verificar a ação antifúngica da fração mais ativa das cascas de *A. occidentale* frente a espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* avaliando *in vitro* o efeito fungicida ou fungistático, cinética de morte, interação com fluconazol e inibição da formação de biofilme.
- Estudar a ação anticriptocócica da fração mais ativa das cascas de *M. urundeuva* através de ensaios que avaliem, *in vitro*, o efeito fungicida ou fungistático, a cinética de morte, a interação com fluconazol e anfotericina B e o efeito pós-antibiótico.
- Avaliar se a fração mais ativa das cascas de *M. urundeuva* provoca induz mudanças na produção de ergosterol, no estresse oxidativo celular, na morfometria e na carga de superfície das leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Avaliar a toxicidade e a sobrevida da fração mais ativa de *M. urundeuva* em *Tenebrio molitor*.

5 METODOLOGIA

5.1 TRIAGEM DE PLANTAS NATIVAS

O presente trabalho iniciou com a triagem de plantas nativas, utilizando o teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima. O objetivo foi identificar plantas com considerável atividade antifúngica, *in vitro*, sobre *Candida* e *Cryptococcus* (CIM < 100 ug/mL). As plantas incluídas nesta triagem foram: *Anacardium occidentale* (caju), *Mauritia flexuosa* (buriti), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) e *Calycophyllum spruceanum* (pau-mulato). Estas plantas foram escolhidas após um levantamento bibliográfico de plantas nativas com indicações etnobotânicas.

Todas as plantas foram coletadas no mesmo dia, 17 de agosto de 2021, entre 9:00h e 10:00h, no município de Governador Valadares (18°51'04"S, 41°56'58"O), Minas Gerais, e as partes escolhidas de cada uma delas para produção de extrato foram: *A. occidentale* (cascas), *M. flexuosa* (cascas), *M. urundeuva* (folhas, galhos e cascas) e *C. spruceanum* (cascas). Após a coleta, o material vegetal foi seco em estufa de ar circulante, sob temperatura inferior a 40 °C e triturado em moinho de facas. Os materiais foram então submetidos à maceração com etanol 96° GL. Após 7 dias o extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C, sendo o processo extrativo repetido por mais três vezes.

Para a determinação da atividade antifúngica, os experimentos seguiram o protocolo descrito no documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* com modificações (CLSI, 2008), com modificações. As linhagens utilizadas para estes experimentos foram: *Cryptococcus neoformans* ATCC H99, *Cryptococcus neoformans* WM 148; *Cryptococcus gattii* R265, *Cryptococcus gattii* WM 161, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com base nos valores de CIM e no rendimento dos extratos, as cascas de *A. occidentale* e as cascas de *M. urundeuva* foram selecionadas como objetos de estudo. Na primeira parte deste trabalho, foram utilizadas as cascas de *A. occidentale*, o delineamento experimental desta

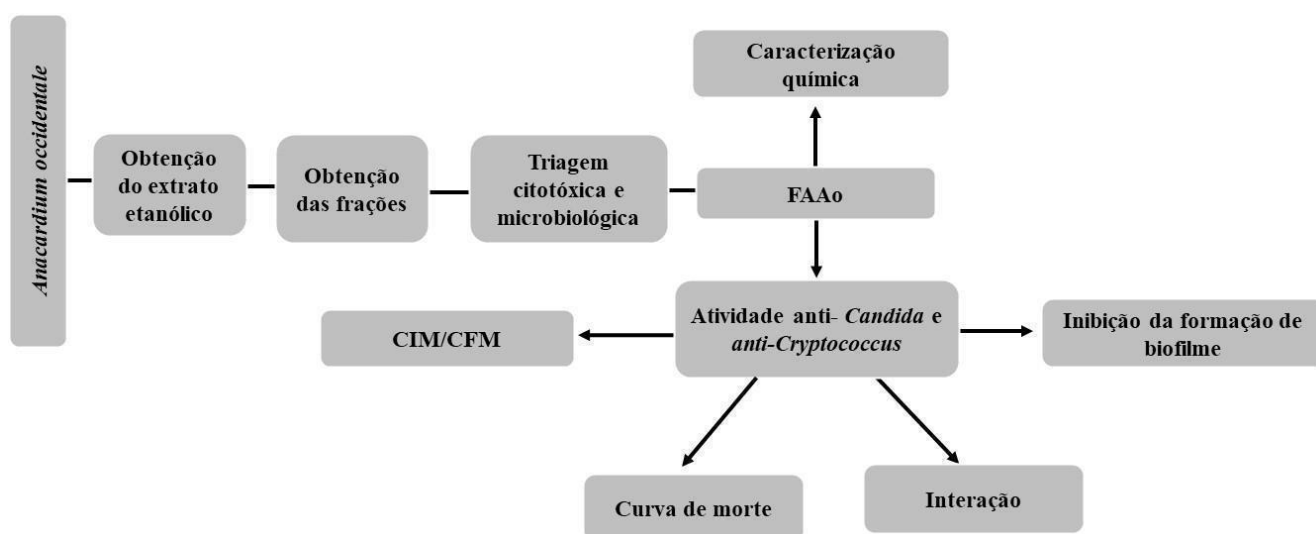
etapa está representado, esquematicamente, no Fluxograma 1. Inicialmente, avaliamos as atividades antifúngica e citotóxica tanto do extrato etanólico quanto de suas frações.

O extrato bruto das cascas de *A. occidentale* foi particionado nas seguintes frações: hexano (FHAo), diclorometano (FDAo), acetato de etila (FAAo), n-butanol (FBAo) e aquosa (FAqAo). Para os testes de sensibilidade antifúngica e de citotoxicidade com o extrato e estas frações foram utilizadas as linhagens *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99.

A partir dos resultados dos testes citados acima, foi calculado o índice de seletividade (IS), e a fração de acetato de etila de *A. occidentale* (FAAo) foi selecionada para dar continuidade ao estudo. Desta forma, a FAAo foi caracterizada quimicamente e foram realizados testes de suscetibilidade antifúngica para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra as linhagens descritas nas Tabelas 1 e 2.

Para avaliar a interação da FAAo com fármacos antifúngicos, sua cinética de ação e a inibição da formação de biofilmes, foram selecionadas, aleatoriamente, as linhagens *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99. Todos os isolados foram armazenados em caldo dextrose Sabouraud (SDB) a -20°C . Antes de cada teste, as linhagens foram cultivadas em ágar dextrose Sabouraud (SDA) por 48 horas a 35°C .

Fluxograma 1 - Delineamento experimental para *A. occidentale*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

* FAAo - Fração acetato de etila de *A. occidentale*; FLZ: fluconazol; CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima.

Tabela 1 - Isolados de *Candida sp* que foram utilizados no presente estudo.

<i>Candida sp</i>	
Linhagem	Origem
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Homem com broncomicose
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	Lesão de pele interdigital erosiva
<i>C. krusei</i> ATCC 20298	IAM - 4801
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Escarro de paciente com broncomicose
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	Fezes
<i>C. glabrata</i> ATCC90030	Sangue
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Paciente com broncomicose
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Infecção intestinal

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 2 - Isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* que foram utilizados no presente estudo.

<i>Cryptococcus gattii</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
ATCC 32608 (ATCC® 32608™)	VG III/ C	Clínica; Califórnia, EUA
ATCC WM179 (ATCC® WM179™)	VG I/ B	Clínica; Austrália
ATCC WM161 (ATCC® WM161™)	VG III/ B	Ambiental; San Diego, EUA
ATCC R265 (ATCC® R265™)	VG IIa/ B	Clínica; Canadá
ATCC WM178 (ATCC® WM178™)	VG II/ B	Clínica; Austrália
ATCC 24065 (ATCC® 24065™)	VG III /B	Clínica; Califórnia, EUA
L28/02	ND	Clínica; Brasil
L27/01	VG II	Clínica; Brasil
ICB181 (A)	ND	Ambiental; Brasil
1913 ER	ND	Clínica
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
ATCC 28957 (ATCC® 28957™)	ND/Sorotipo D	Clínica; Lesão óssea humana
ATCC 24067 (ATCC® 224067™)	ND/Sorotipo D	Clínica; Maryland, EUA
ATCC 62066 (ATCC® 62066™)	ND/Sorotipo A	Clínica; França
ATCC H99 (ATCC® 208821™)	VN I/ A	Clínica; Nova Iorque; EUA
ATCC WM 148 (ATCC® MYA4564™)	VN I/ A	Clínica; Austrália
ATCC WM 626 (ATCC® MYA4565™)	VN II/ A	Clínica; Austrália
27JF	ND	Clínica
C31	ND	Ambiental
WP	ND	Clínica
96806	ND	Clínica

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De forma semelhante ao procedimento realizado com as cascas de *A. occidentale*, na segunda parte deste trabalho foram utilizadas as cascas de *M. urundeuva* para investigar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações obtidas dessa planta, conforme mostrado no Fluxograma 2. O extrato bruto foi particionado para obtenção das frações hexano (FHM_u), diclorometano (FDM_u), acetato de etila (FAM_u), n-butanol (FBM_u) e aquosa (FAq_u), que foram submetidas à avaliação de citotoxicidade e ação antifúngica contra as seguintes linhagens: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99.

A fração de acetato de etila (FAM_u) apresentou os melhores resultados nos testes de concentração inibitória mínima e citotoxicidade, obtendo assim, o melhor IS. A seguir, a FAM_u foi submetida à caracterização química, além de testes de sensibilidade antifúngica, como Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra um maior número de linhagens (Tabela 2).

Com o objetivo de avaliar a interação da FAM_u com fármacos antifúngicos, sua cinética de ação frente às leveduras, e outros ensaios, as linhagens *C. gattii* ATCC (R265 e WM179) e *C. neoformans* ATCC (H99 e WM626) foram selecionadas. Todos os isolados foram armazenados em caldo dextrose Sabouraud (SDB) a -20°C. Antes de cada teste, as linhagens foram cultivadas em ágar dextrose Sabouraud (SDA) por 72 horas a 35°C.

Fluxograma 2 - Delineamento experimental para *M. urundeuva*

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Cascas de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foram identificadas pelo botânico Vinícius Dittrich e depositadas no herbário Leopoldo Krieger, sob os números CESJ 57696 E e CESJ 43810, respectivamente. O presente trabalho foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob os números de registro ACC16E7 (*A. occidentale*) e A14E18C (*M. urundeuva*).

5.4 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante, sob temperatura inferior a 40° C e triturado em moinho de facas. Cerca de 524 g de cascas de *A. occidentale* e 822 g de cascas de *M. urundeuva* foram então submetidas à maceração com etanol 96° GL. Após 7 dias o extrato

foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C, sendo o processo extrativo repetido por mais três vezes.

O extrato etanólico de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foi dissolvido em água e submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Para tanto foram empregados n-hexano, tendo como produto, a fração hexano das cascas do *A. occidentale* (FHAo), diclorometano (FDAo), acetato de etila (FAAo), n-butanol (FBAo) e fração aquosa (FAqAo). Da mesma forma, obteve-se a fração hexano das cascas do *M. urundeuva* (FHMu), diclorometano (FDMu), acetato de etila (FAMu), n-butanol (FBMu) e fração aquosa (FAqMu). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C para obtenção das frações correspondentes.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA.

A caracterização dos compostos majoritários da fração mais ativa foi realizada em parceria com o Departamento de Química Orgânica, UMYMFOR-CONICET, FCEN, da Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. O extrato de FAAo foi dissolvido em metanol a 4 mg/mL, filtrado através de cartuchos C18 (*Hypersep* C18 25mg, *Thermo Scientific*) em um frasco de 1 mL e injetado no HPLC pelo módulo de amostragem automática. As análises de HPLC-MS foram realizadas em um RRLC Agilent 1200 usando uma coluna Luna C18 (3 µm, 2,0 × 100 mm; Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos). A fase móvel consistiu em água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B). Método 1: A 50:50 (0 a 3 min); A 0:100 (10-34 min); A 1:1 (35 a 40 min). Método 2: A 90:10 (0 a 2 min); A 0:100 (25-45); A 90:10 (45 a 50 min). A taxa de fluxo foi de 0,3 mL/min, e a temperatura da coluna foi ajustada para 30°C. A detecção foi realizada com um detector de arranjo de diodos (DAD) de 190 a 950 nm acoplado a um espectrômetro de massas.

As análises espectrométricas de massa foram realizadas em um espectrômetro de massas Bruker micrOTOF-Q II (*Bruker Daltonics*, Billerica, MA, Estados Unidos), equipado com uma fonte de electrospray usando o modo negativo. O instrumento foi operado com uma voltagem de capilar de 4,5 kV com um deslocamento da placa terminal de 500 V, uma temperatura de secagem de 200°C, usando N₂ como gás de secagem a 11,0 L/min e uma pressão do nebulizador de 3,3 bars. A calibração de massa multiponto foi realizada usando uma solução de formiato de sódio de m/z 50 a 1.200. A aquisição de dados, processamento e conversão para o formato

mzML para análise GNPS foram realizados usando o software Bruker Compass Data Analysis versão 4.4 fornecido com o instrumento.

5.6 ANÁLISE DE REDES MOLECULARES REALIZADA NO GNPS

Uma rede molecular foi criada por meio do fluxo de trabalho clássico de redes moleculares (Wang *et al.*, 2016), acessível em <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation>, no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram submetidos a uma filtragem, que resultou na remoção de todos os íons fragmentados de MS/MS dentro de uma faixa de ± 17 Da do m/z precursor. Os espectros de MS/MS foram submetidos à filtragem por janelas, na qual apenas os seis íons fragmentados mais proeminentes em uma janela de 50 Da foram mantidos em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da. A tolerância para íons fragmentados de MS/MS foi definida em 0,5 Da. Uma rede foi criada. As arestas foram filtradas para que tivessem um valor de cosseno maior que 0,7 e mais de seis picos coincidentes. As arestas foram mantidas na rede se os nós aparecessem entre os 10 nós mais semelhantes entre si. O limite superior para o tamanho de uma família molecular foi estabelecido em 100. Até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite, as arestas com menor pontuação foram removidas. As bibliotecas espectrais do GNPS foram então comparadas com os espectros da rede. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma forma que os dados de entrada. Todas as correspondências entre os espectros da rede e da biblioteca exigiram uma pontuação maior que 0,7 e, pelo menos, seis picos coincidentes (Khan *et al.*, 2020; Menezes *et al.*, 2021; Nicault *et al.*, 2021).

5.7 TESTES DE DILUIÇÃO EM CALDO PARA A DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS ÀS FRAÇÕES

A determinação da atividade antifúngica do extrato etanólico (EEAo, EEMu) e das frações das cascas de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foi realizada através do método da microdiluição em caldo, conforme proposto pelo documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* com modificações (CLSI, 2008), com modificações. As linhagens utilizadas para estes experimentos estão descritas nas tabelas 3 e 4.

Os extratos e frações (FHAo, FAAo, FDAo, FBAo, FHMu, FAMu, FDMu e FBMu) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter a concentração inicial de

10000 µg/mL. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas utilizando os meios de cultura RPMI-1640 e obteve-se concentrações finais nos poços de 100µg/mL a 0,195µg/mL (CLSI, 2008). Foi considerada a CIM que inibiu 100% do crescimento fúngico.

Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em ágar *Sabouraud* Dextrose (ASD), durante 48 ou 72 horas, a 35 °C e então, ressuspendidas em tubos contendo solução salina (0,9%) estéril na concentração de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL (padronizadas pela transmitância 75-77%). Em seguida, o inóculo foi diluído em caldo RPMI - 1640 de modo a alcançar a concentração final no poço de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL.

Para fins de comparação com fármacos de reconhecida ação antifúngica, foram realizados os testes de suscetibilidade antimicrobiana com 08 linhagens de *Candida* e 20 linhagens de *Cryptococcus* (Tabelas 1 e 2) frente ao fluconazol (FLZ) com concentrações variando entre 256 µg/mL a 0,5 µg/mL e anfotericina B (AMB) com concentrações variando entre 16 µg/mL a 0,313 µg/mL, conforme descrito pelo protocolo M27-A3. Para o FLZ foi considerada a CIM a concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico em comparação com o controle de crescimento. Já para a AMB foi considerada a CIM a concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico (CLSI 2008; Ferreira *et al.*, 2013).

Os resultados de CIM obtidos dos experimentos com leveduras foram confirmados utilizando o corante MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*- Sigma, St, Louis, MO, USA). Brevemente, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço e posteriormente a microplaca foi incubada a 35 °C por 3 horas (Nga *et al.*, 2020). Transcorrido este período a reação foi finalizada com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) e realizado a leitura em espectrofotômetro de microplaca *Multiskan TM FC Microplate Photometer* para medição da densidade óptica no comprimento de onda de 570nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração que promoveu 100% de inibição da atividade metabólica em comparação com o controle de crescimento, exceto para o fluconazol, em que a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu 50% do crescimento. Todos os experimentos foram realizados três vezes e em duplicata.

5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).

Tanto a FAAo quanto à FAMu foi testada contra todas as linhagens das tabelas 1 e 2 foram avaliadas quanto à ação fungicida ou fungistática. Após a identificação da CIM, alíquotas de 100 µL dest frações foram removidas dos poços em que houve 100% de inibição visual do

crescimento antimicrobiano, e foram subcultivadas em ágar Sabourad dextrose (ASD), incubadas a 35 °C por 48 ou 72 horas. A menor concentração em que não houve crescimento de colônias foi considerada a CFM. A fração foi considerada como fungicida quando a CFM foi igual à CIM, e como fungistática, quando a CFM foi maior que a CIM (CLSI, 2008). Esse experimento foi realizado três vezes e em duplicata, com todos os isolados de *Candida sp* e *Cryptococcus sp.* listados nas tabelas 1 e 2.

5.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS FRENTE AOS MACRÓFAGOS MURINOS

A viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*- Sigma, St, Louis, MO, USA). Macrófagos murinos RAW 264.7 e J774.A1 foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1 % de aminoácidos essenciais e 0,5% de solução penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10.000 mg/mL, respectivamente). Após atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL. As células foram tratadas com o extrato e as frações nas concentrações finais de 200 µg/mL a 3,12 µg/mL, e incubadas em estufa com 5% de CO₂ por 48 h. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, 100 µL de RPMI-1640 foram adicionados em todos os poços, seguidos da adição de 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas a 35 °C em estufa com 5 % de CO₂ por 4 horas. A reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de 100 µL de DMSO. A leitura foi feita em leitor de microplaca Multiskan™ FC *Microplate Photometer* com comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram inseridos e analisados no programa *Prisma 6.0*. Como controle foram utilizadas células RAW264.7 e J774.A1 não tratadas.

Os dados são apresentados em porcentagem de viabilidade comparados ao controle, e expresso através do índice de citotoxicidade (IC). Os valores de IC₇₀ (IC₇₀ = concentração do extrato/fração onde 70% dos macrófagos estavam viáveis) obtidos neste experimento foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) do extrato e de cada fração. O IS foi determinado pela razão do valor do IC₇₀ em macrófagos murinos dividido pelo valor do CIM (IS = IC₇₀/CIM). Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade (Menezes; Campos; 2021).

5.10 INTERAÇÃO DA FAAO E FAMU COM FLUCONAZOL *IN VITRO*

O método de microdiluição em tabuleiro de xadrez foi utilizado para testar interação de fluconazol e a FAAo frente às linhagens *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* 750 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Khodavandi *et al.*, 2010). E, também foi testada a interação de fluconazol e FAMu frente as linhagens *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM148, *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626. As concentrações das frações variaram entre 25 µg/mL e 0,39 µg/mL; e a do fluconazol variaram de 64 µg/mL a 0,0625 µg/mL.

Um volume de 100 µL da suspensão do inóculo (1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL) foi transferido para placas estéreis de 96 poços de fundo plano contendo 50 µL de cada um dos antifúngicos e 50 µL de fração ou RPMI-1640 (controle de crescimento). As placas foram incubadas a 35°C por 48 ou 72 horas. A leitura foi realizada visualmente. A interação das amostras com o agente antifúngico foi expressa como a soma do índice da concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente. A CIF de cada agente foi calculada como a CIM desse agente em combinação, dividido pela CIM do agente sozinho. O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) será calculado pela soma dos CIFs:

$$ICIF = \frac{CIM (FLZ \text{ ou } ANF B + FAMu/FAAo)}{CIM FLZ \text{ ou } ANF B} + \frac{CIM (FAMu/FAAo + FLZ \text{ ou } ANF B)}{CIM FAMu}$$

O ICIF pode ser interpretado como sinérgico quando for $\leq 0,5$; sem interação quando $0,5 < ICIF \leq 4,0$ e como antagonista quando $> 4,0$ (Ferreira *et al.*, 2013; Folly *et al.*, 2020).

5.11 CURVA DE MORTE

Para avaliar a cinética da ação da FAAo, foi realizado o experimento de curva de morte utilizando as linhagens *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99. E, na avaliação da cinética da ação da FAMu, as linhagens utilizadas foram *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM148, *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626.

Neste experimento foram utilizadas as concentrações de FAAo ou FAMu referentes à metade (1/2 CIM), à CIM e ao dobro (2xCIM) desse valor para cada linhagem. Para todos os

experimentos foram realizados controle negativo (meio de cultura) e um controle positivo com meio RPMI 1640 mais o inóculo fúngico (Ferreira *et al.*, 2013). Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL de inóculo fúngico preparado conforme o item 5.7. As placas foram incubadas a 35°C por 48 ou 72 horas e durante esse período foram realizadas leituras em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas (*Candida sp*) ou 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas (*Cryptococcus sp*).

Nos intervalos pré-determinados, foram removidas alíquotas de 30 µL de cada poço e plaqueadas em placas de Petri contendo ASD e incubadas a 35°C por 48 ou 72 horas. Após a incubação, as colônias foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Esse experimento foi realizado em duplicata, e os resultados são mostrados em quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ao longo dos tempos avaliados. Para esse experimento foram utilizadas as concentrações de fluconazol capazes de inibir visualmente 100% o crescimento fúngico.

5.12 ATIVIDADE DA FAAO CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS*

A capacidade de inibição da formação de biofilme de *Candida sp.* pela FAAo foi avaliada através do uso de placas de 96 poços (Pierce *et al.*, 2008) com as seguintes linhagens: *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* 750 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. A fração foi diluída em RPMI, seriadamente, em concentrações finais que variavam de 1024 µg/mL até 1,0 µg/mL. Cada poço recebeu 100 uL de FAAo em diferentes concentrações, seguido de 100 uL de uma suspensão de 1×10^6 /mL de inóculo fúngico em meio RPMI. O controle positivo consistiu em inóculo e meio RPMI e o controle negativo apenas meio RPMI. As placas foram incubadas por 24h, a 35°C. Após 24 horas, o sobrenadante foi descartado, e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X para remoção das células planctônicas e não aderentes. Após a lavagem, 100 µL de RPMI-1640 foram adicionados em todos os poços, e por fim adicionados 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas a 35 °C em estufa por 3 horas. A reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de 100 µL de DMSO. A leitura foi feita em leitor de microplaca *Multiskan™ FC Microplate Photometer* com comprimento de onda de 570 nm. Para fins de comparação, o experimento foi realizado com um fármaco com reconhecida ação antifúngica, o fluconazol,

nas mesmas concentrações. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes, e os resultados são mostrados como porcentagem do crescimento do biofilme em comparação com o controle não tratado.

5.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICRIPTOCOCÓICA DA FAMU

5.13.1 Efeito pós-antibiótico

Um método previamente descrito foi utilizado para esse propósito, com algumas alterações (Ellepola *et al.*, 2014). As linhagens *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM148, *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626 foram cultivadas a 35°C por 72 horas em meio SDA, e o inóculo foi preparado conforme descrito no item 5.7. Em seguida, foram utilizados 100 µL de inóculo com 100 µL de FAMu, em concentrações de CIM. As placas foram incubadas a 35°C por um período de 1 hora. Após essa exposição limitada, as drogas foram removidas por um ciclo de diluição com PBS estéril e centrifugação por 30 minutos a 3000 g. Em seguida, o sobrenadante foi completamente decantado e os pellets foram ressuspensos em 100 µL de RPMI. Após a remoção da droga, a supressão do crescimento e a subsequente recuperação do crescimento fúngico, conhecida como EPA, foram avaliadas. Para esse experimento, utilizou-se um método previamente descrito, com algumas pequenas adaptações. A equação $EPA = T - C$ foi empregada, onde "T" é o tempo (em horas) necessário para que a densidade óptica da suspensão celular tratada com o fármaco aumente em 0,05 a 520 nm, e "C" é o tempo que a suspensão celular controle (sem fração) leva para aumentar este mesmo valor. Os resultados foram expressos em horas.

5.13.2 Quantificação do Ergosterol

As linhagens *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM148, *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626 foram cultivadas a 35°C por 72 horas em meio SDA, a partir da qual 20,0 mg da massa celular fúngica foram transferidos para tubos de polipropileno. Em seguida, essas amostras foram submetidas ao tratamento com CIM da FAMu ou do CIM do fluconazol por um período de 24 horas, a 35°C. Além destes, um controle de crescimento apenas com RPMI foi mantido. Após o término da incubação, os tubos foram submetidos à centrifugação a 1643 g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado. As

células foram posteriormente lavadas com água destilada estéril, e o peso úmido do pellet resultante foi então determinado. Para a extração dos lipídios, 3 mL de uma solução etanólica de hidróxido de potássio a 25% foram adicionados a cada massa celular e agitados por 1 minuto. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 85°C por 1 hora e posteriormente resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, uma mistura de 1 mL de água estéril e 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich) foi adicionada, seguida de agitação em vórtice por 3 minutos. O sobrenadante foi separado, e a leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro a 282 e 230 nm. O teor de ergosterol foi calculado como uma porcentagem do peso úmido da célula pelas seguintes equações: % de ergosterol + % 24(28)DHE = $[(A_{282}/290) \times F] / \text{peso do pellet}$, % 24(28)DHE = $[(A_{230}/518) \times F] / \text{peso do pellet}$, e % ergosterol = [% ergosterol + % 24(28)DHE] - % 24(28)DHE, onde F é o fator de diluição em etanol e 290 e 518 são os valores E (em porcentagens por centímetro) determinados para ergosterol cristalino e 24(28)DHE, respectivamente. Estes ensaios foram realizados duas vezes, em triplicatas, e o teor de ergosterol apresentado como porcentagem em função do peso úmido em ng/mL. (Arthington-Skaggs; Warnock; Morrison, 2000; Santos *et al.*, 2012).

5.13.3 Peroxidação lipídica

As células foram tratadas conforme descrito no item anterior “Quantificação do ergosterol”, porém, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 5%, foi utilizado como controle positivo. A quantificação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica foi realizada por meio da medição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O pellet resultante foi congelado e homogeneizado em 1000 µL de ácido fosfórico a 1,1%, previamente resfriado. Deste homogeneizado, foram retirados 400 µL, que foram misturados com 400 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (Sigma-Aldrich), preparado em solução de NaOH 50 mM contendo hidroxitolueno butilado (BHT) a 0,1 mM, e mais 200 µL de ácido fosfórico a 7% (todas as soluções foram mantidas em condições refrigeradas durante o manuseio). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 98°C por 60 minutos, seguido da adição de 1500 µL de butanol. A mistura foi vigorosamente agitada usando um vórtex e então centrifugada por 5 minutos a 2.000 g. A camada orgânica resultante foi transferida, e a absorbância a 532 nm foi medida utilizando um Espectrofotômetro Multiskan da *Thermo Fisher Scientific*. Para os controles em branco, a solução de ácido tiobarbitúrico foi substituída por HCl 3 mM. Os valores de TBARS foram

calculados utilizando o coeficiente de extinção de $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e expressos em nmols/g. Os resultados representam a média de três experimentos (Ferreira *et al.*, 2013).

5.13.4 Interação *in vitro* de FAMu com 3-AT e DETC

FAMu foi testada em combinação com o inibidor específico da catalase, 3-AT e o inibidor da SOD, DETC. Um método de microdiluição em tabuleiro xadrez foi utilizado para avaliar a suscetibilidade de *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM179; *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626 a essas drogas, proporcionando uma matriz de todas as possíveis combinações de drogas dentro das faixas de concentração necessárias (Ferreira 2013). As concentrações de FAMu variaram de 0,19 a 200 mg/L, e as de peróxido de hidrogênio, de 1,5 a 0,01 mg/mL. Para os inibidores, as concentrações foram de 1,25 a 80 mM para 3-AT e de 0,5 a 32 mM para DETC, com base nas CIM encontradas nos testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 5.7. Um volume de 100 μL da suspensão do inóculo foi adicionado a placas estéreis de 96 poços de fundo plano contendo 50 μL de fração e 50 μL de cada inibidor ou RPMI-1640 (controle de crescimento). As placas foram incubadas a 35°C por 72 horas, seguido de leitura visual.

5.13.5 Análise do tamanho e carga da cápsula de leveduras desafiadas pela FAMu

As linhagens *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM148, *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626 foram cultivadas a 35°C por 72 horas, em meio ASD, em concentrações de 0,5 CIM e visualizadas em um microscópio óptico (AXIOPLAN, Carl Zeiss), após suspensão em tinta Nanquim. O tamanho total da célula foi definido como o diâmetro da célula completa, incluindo a cápsula. Para obter o tamanho da cápsula foi subtraído o tamanho total da célula pelo diâmetro do corpo da célula. A cápsula e o diâmetro de pelo menos 100 células foram medidos usando o software Image J 1.40 g (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; *National Institutes of Health*, NIH, Bethesda, MD) (Araújo *et al.*, 2012). As medidas finais foram apresentadas como proporção do tamanho da cápsula em relação ao diâmetro celular e a relação superfície/volume foi calculada usando a fórmula $3/r$, onde r é o raio (Ferreira *et al.*, 2015).

Para avaliar o potencial Zeta (PZ) de FAMu sobre a superfície celular das leveduras foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. As células de *C. gattii* ATCC R265, *C. gattii* ATCC WM179; *C. neoformans* ATCC H99 e *C. neoformans* ATCC WM626 foram

cultivadas em Agar Sabouraud por 72h a 35 °C. Os experimentos de potencial Zeta (pZ) foram feitos pela titulação de quatro injeções manuais de 50 µL de FAMu nas concentrações finais de 3,12, 6,25 e 12,5 µg/mL em uma suspensão salina contendo a levedura (1×10^3 UFC/mL) à temperatura ambiente. O PZ foi determinado pela técnica de micro-eletroforese laser Doppler, em ângulo de dispersão de 173°, usando um capilar dobrado de célula celular (DPS 1060). Os valores de PZ foram calculados como a média de dez medidas independentes, cada uma obtida pela média de 40 contagens (Nosanchuk *et al.*, 1999).

5.13.6 Ensaios de toxicidade e sobrevida com *Tenebrio molitor*

Antes de realizar o ensaio de sobrevida, foi conduzido um teste de toxicidade da FAMu utilizando o modelo de *Tenebrio molitor*. Grupos de 10 larvas foram tratadas com a fração na CIM, 5xCIM, 10xCIM e 20xCIM, administradas por injeção no segundo ou terceiro escudo ventral visível acima das pernas. A morte das larvas foi monitorada por inspeção visual com base na falta de movimento após toque. A avaliação da toxicidade foi realizada ao longo de um período de 7 dias (Sangalli-Leite *et al.*, 2011).

Os ensaios de sobrevida foram executados conforme Souza e colaboradores (2015), com adaptações. Foram selecionadas larvas com peso entre 100 e 200 mg, com cor clara e uniforme, sem manchas escuras ou marcas esbranquiçadas. As larvas selecionadas foram inoculadas com células de *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99, utilizando uma seringa para insulina. E foi realizada injetando o inóculo na cavidade corporal, no segundo ou terceiro escudo ventral visível acima das pernas. As larvas foram distribuídas em placas, em grupos de 15 animais, e cada uma recebeu uma aplicação de 10 µL da suspensão contendo o patógeno. As concentrações finais são apresentadas nas figuras quando necessário. Utilizamos um grupo controle, que foi inoculado com PBS estéril. Para verificar a eficácia do tratamento, a FAMu foi administrada uma vez, na CIM, 24 horas pós-infecção. As larvas foram então incubadas a 35 °C em placas de Petri contendo dieta de criação e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 horas durante 10 dias (Villis *et al.*, 2021). Para determinar a morte das larvas, verificamos visualmente a melanização e a resposta a estímulos físicos, tocando-as gentilmente. Os experimentos foram realizados em duplicata com grupos de 15 animais, totalizando 30 larvas por grupo, que foram usadas para construir a curva de sobrevivência. Os resultados foram analisados com o GraphPad Prism 5, organizados em uma curva de

sobrevivência usando o método Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada utilizando o teste log-rank. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O tipo de análise estatística foi determinado após a avaliação da normalidade dos dados. Para as amostras com distribuição normal foi utilizado o Teste *T* e ANOVA e *Mann Whitney* e *Kruskall-Wallis* para os com distribuição não normal. Para curva de sobrevivência foi utilizado o Teste Kaplan-Meier. Para todas as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p > 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 RENDIMENTO SIGNIFICATIVO E POTENCIAL BIOATIVO DE *A. OCCIDENTALE* E *M. URUNDEUVA*

Os resultados da Tabela 3 mostram variações significativas nos rendimentos dos extratos etanólicos obtidos a partir de diferentes partes vegetativas de plantas nativas. *M. urundeuva* destacou-se com os maiores rendimentos percentuais, especialmente a partir dos galhos (3,36%) e cascas (3,05%), apesar de as folhas terem fornecido a maior quantidade absoluta de extrato (2,74 g). *C. spruceanum* apresentou um rendimento percentual de 2,90% a partir de suas cascas. Em comparação, *A. occidentale* e *M. flexuosa*, embora tenham mostrado rendimentos menores (1,30% e 2,47%, respectivamente), continuam relevantes devido ao seu potencial bioativo e importância etnofarmacológica. Esses resultados sugerem que as cascas e galhos de *M. urundeuva* e as cascas de *C. spruceanum* são, particularmente, promissoras para estudos futuros.

Tabela 3 - Rendimento do extrato etanólico das plantas nativas.

Planta nativa	Massa (g)	Rendimento (g / %)
<i>A. occidentale</i> (cascas)	78,5	1,02 / 1,30
<i>M. flexuosa</i> (cascas)	61,3	1,51 / 2,47
<i>M. urundeuva</i> (folhas)	103,8	2,74 / 2,64
<i>M. urundeuva</i> (galhos)	8,9	0,30 / 3,36
<i>M. urundeuva</i> (cascas)	49,4	1,52 / 3,05
<i>C. spruceanum</i> (cascas)	43,8	1,27 / 2,90

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Os resultados do teste de suscetibilidade antifúngica para diferentes extratos vegetais mostram uma variação significativa na atividade dos extratos etanólicos contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (Tabela 4). O extrato de cascas de *A. occidentale* apresentou interessante atividade antifúngica, com CIM de 3,12 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, e de 12,5 µg/mL para *C. gattii* e *C. neoformans*. O extrato de folhas de *M. urundeuva* também mostrou atividade relevante, particularmente contra *C. parapsilosis* e *C. krusei* com CIM de 6,25 µg/mL. Por outro lado, os extratos de cascas de *M. flexuosa* não demonstraram atividade significativa, com CIM superiores a 100 µg/mL para todas as linhagens testadas. Os galhos de

M. urundeuva e as cascas de *C. spruceanum* exibiram atividade moderada, com CIM variando entre 25 e 100 µg/mL dependendo da cepa, sendo mais eficazes contra *C. gattii* e *C. krusei*. E, os CIM das cascas *M. urundeuva* variaram entre 3,12 e 100 µg/mL para *Candida*, e de 6,25 e 12,5 µg/mL *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. Esses resultados indicam que os extratos de *A. occidentale* (cascas) e *M. urundeuva* (folhas) são os mais promissores para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

A escolha de *A. occidentale* (cascas) e *M. urundeuva* (cascas) para a continuação deste trabalho é justificada pelos resultados obtidos nos testes de sensibilidade antifúngica, e também, pelo rendimento considerável dos extratos etanólicos obtidos, que, embora não sejam os mais elevados, apresentam porcentagens significativas. Em particular, a *M. urundeuva* destaca-se por ter diferentes partes vegetativas (folhas, galhos, cascas) analisadas, e as cascas exibiram um rendimento de 3,05%, o que sugere um potencial bioativo considerável que merece exploração. Além disso, apresentou promissores valores de CIM diante das linhagens de *Cryptococcus* testadas, e mais, a pouca informação disponível na literatura sobre este efeito, nos encorajou a trabalhar mais com esta planta. Já *A. occidentale* (cascas), apesar de seu rendimento menor (1,30%), é amplamente utilizada em estudos etnofarmacológicos, o que agrega valor à escolha desta planta para futuras investigações devido ao seu conhecido potencial medicinal.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) do extrato etanólico de *A. occidentale* (caju), *M. flexuosa* (buriti), *M. urundeuva* (aroeira), e *C. spruceanum* (pau-mulato).

<i>Candida sp/ Cryptococcus sp</i>	<i>A. occidentale</i> Cascas	<i>M. flexuosa</i> Cascas	<i>M. urundeuva</i> Folhas	<i>M. urundeuva</i> Galhos	<i>M. urundeuva</i> Cascas	<i>C. spruceanum</i> Cascas
<i>C. albicans</i> 10231	3,12	> 100	100	> 100	3,12	> 100
<i>C. parapsilosis</i> 22019	3,12	> 100	6,25	50	3,12	50
<i>C. krusei</i> 6258	25	> 100	6,25	50	25	25
<i>C. tropicalis</i> 750	50	> 100	> 100	> 100	100	> 100
<i>C. gattii</i> R265	12,5	> 100	6,25	25	12,5	50
<i>C. gattii</i> WM 161	12,5	> 100	6,25	25	12,5	50
<i>C. neoformans</i> H99	12,5	> 100	> 100	50	6,25	25
<i>C. neoformans</i> WM 148	12,5	> 100	> 100	50	6,25	25

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

6.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS CASCAS DE *A. OCCIDENTALE* E *M. URUNDEUVA*.

A partir de 524,0 g de cascas de *A. occidentale* e 822,0 g de cascas de *M. urundeuva*, foram obtidos, respectivamente, 84,30 g e 114,03 g de extrato etanólico, após duas extrações, com rendimentos de 16,08% e 13,87%. O extrato etanólico, após ressuspensão em solução hidroalcoólica, foi particionado com solventes de polaridade crescente, dando origem às frações fração hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Rendimento das frações obtido a partir de 30g de extrato etanólico de *A. occidentale* e *M. urundeuva*.

Fração	<i>A. occidentale</i>		<i>M. urundeuva</i>	
	Massa (g)	Rendimento (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,03	0,10	0,33	1,10
Diclorometano	0,02	0,06	0,22	0,73
Acetato de etila	5,64	18,80	3,55	11,83
Butanólica	11,0	36,66	9,06	30,20
Aquosa	0,69	2,30	0,57	1,90

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

6.3 AS FRAÇÕES POLARES DE *A. OCCIDENTALE* E *M. URUNDEUVA* POSSUEM SIGNIFICATIVA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O extrato etanólico e as frações de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foram testados quanto à atividade antifúngica frente a diversas leveduras. O extrato etanólico de *A. occidentale* apresentou CIM de 3,12 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e 25 µg/mL para *C. krusei*, enquanto a fração FAAo se destacou com CIM de 6,25 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e 3,12 µg/mL para *C. krusei*, sendo que as frações n-butanol e aquosa também demonstraram ação antifúngica semelhante. Para *M. urundeuva*, o extrato etanólico apresentou CIM de 12,5 µg/mL para *C. gattii* R265 e 6,25 µg/mL para *C. neoformans* H99, com a fração FAMu mostrando os melhores resultados (CIM de 3,12 µg/mL para ambas as leveduras, exceto *C. krusei*, que apresentou CIM de 50 µg/mL), e as frações n-butanol e aquosa com atividade antifúngica similar (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico e frações das cascas de *A. occidentale* e *M. urundeuva* frente a *Candida sp* e *Cryptococcus sp*.

<i>Candida sp/ Cryptococcus sp</i>	<i>A. occidentale</i>						<i>M. urundeuva</i>					
	Extrato	FAq	FB	FA	FD	FH	Extrato	FAq	FB	FA	FD	FH
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3,12	3,12	1,56	6,25	100	>100	1,56	1,56	1,56	3,12	50	50
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	3,12	1,56	3,12	6,25	50	100	3,12	1,56	3,12	3,12	50	100
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	25	50	50	3,12	>100	100	25	50	50	25	>100	>100
<i>C. gattii</i> ATCC R265	12,5	12,5	12,5	3,12	>100	25	12,5	25	6,25	3,12	25	25
<i>C. neoformans</i> ATCC H99	12,5	6,25	6,25	3,12	100	25	6,25	12,5	6,25	3,12	25	25

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Nota: FAq: fração aquosa; FB: fração butanólica; FA: fração acetato; FD: fração diclorometano; FH: fração hexano.

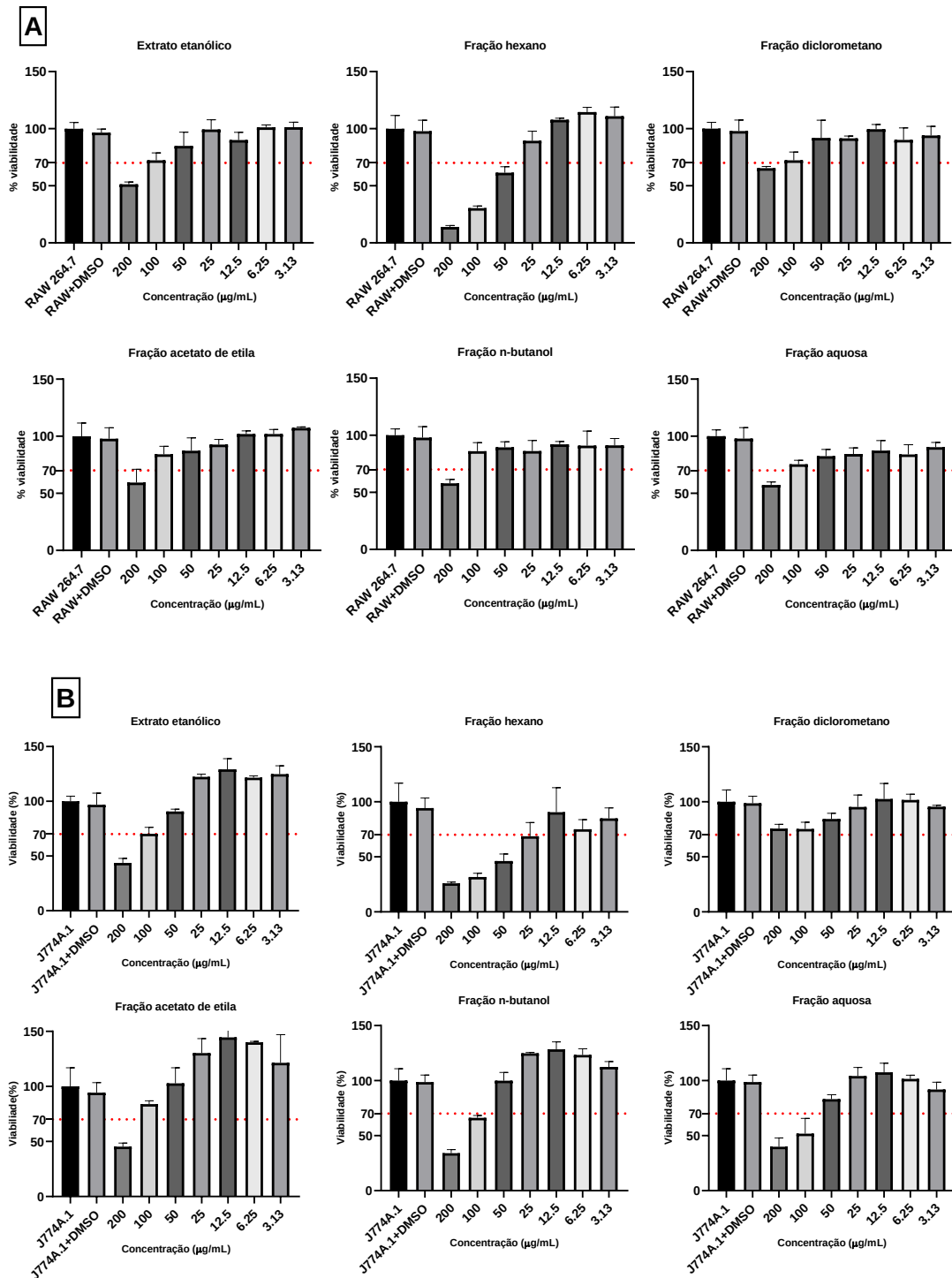
6.4 A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *A. OCCIDENTALE* E *M. URUNDEUVA* TEM UM PERFIL INTERESSANTE DE SELETIVIDADE FRENTE A LEVEDURAS

A citotoxicidade dos extratos e frações de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foi avaliada frente a macrófagos murinos RAW264.7 e J774.A1. Nas figuras 11 e 12, observa-se que FAAo, FBAo, FAMu e FBMu foram citotóxicas para macrófagos RAW264.7 somente na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as frações diclorometano, hexano e as demais de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foram tóxicas em concentrações menores. Para macrófagos J774.A1, a FDAo e o extrato de *M. urundeuva* mostraram ausência de citotoxicidade nas concentrações avaliadas, enquanto a FAAo foi citotóxica a 200 $\mu\text{g/mL}$ e a FDMu a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. As demais frações de *A. occidentale* e *M. urundeuva* foram citotóxicas em concentrações inferiores.

De acordo com Menezes e Campos (2021) índices de seletividade (IS) acima de 10 indicam relativa segurança do extrato ou fração em relação à atividade antimicrobiana. Como mostrado na Tabela 7, o IS das frações de *A. occidentale* variou entre 0,5 e 128, destacando-se a FAAo com IS de 64 para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e de 16 para *C. krusei* em todos os modelos celulares. Já o IS das frações de *M. urundeuva* variou entre 0,25 e 64, com a FAMu apresentando IS de 16 e 32 nos macrófagos RAW264.7 e nos macrófagos J774.A1 para todas as linhagens, exceto para *C. krusei* ATCC 6258, onde obteve um IS menor que 10 (Tabela 8). Esses valores indicam uma boa seletividade para patógenos fúngicos, posicionando a FAAo e a FAMu como promissoras para estudos *in vivo*, o que justificou sua escolha para a continuidade

da pesquisa, com a FAAo sendo testada contra linhagens de *Candida* e *Cryptococcus*, e a FAMu, especificamente contra *Cryptococcus*.

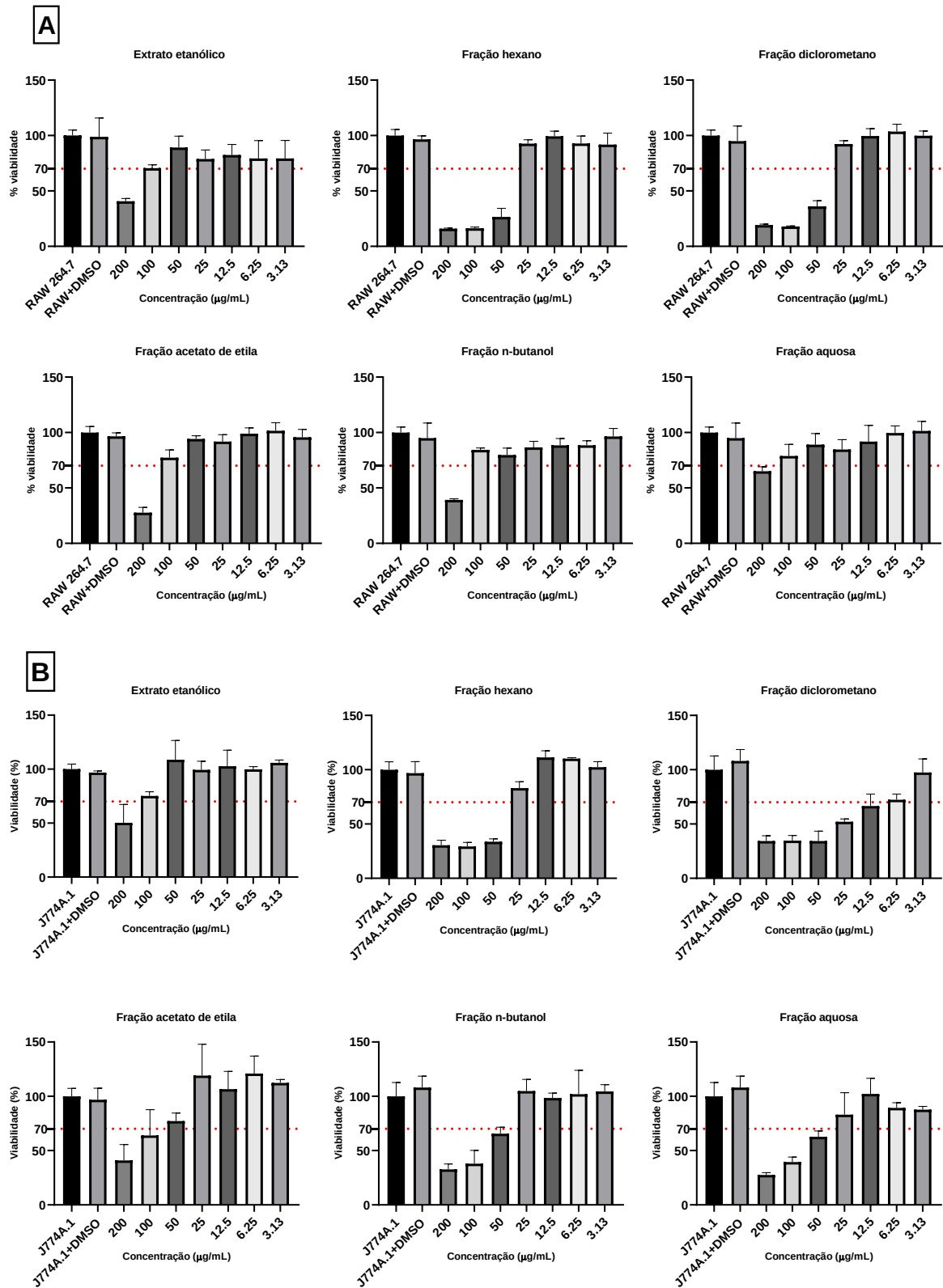
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações de *A. occidentale* em macrófagos murinos RAW 264.7 (A) e J774A.1 (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Nota: Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão.

Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações de *M. urundeuva* macrófagos murinos RAW 264.7 (A) e J774A.1 (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 7 - Índice de seletividade (IS) do extrato e frações de *A. occidentale* em função das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, *C. gattii* ATCC R275 e *C. neoformans* ATCC H99.

Extrato/ frações - A. <i>occidentale</i>	IS (IC ₇₀ /CIM)									
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. gattii</i> ATCC R265		<i>C. neoformans</i> ATCC H99	
	Macrófagos murinos									
	J774A. 1	RAW264 .7	J774A. 1	RAW264. 7	J774A. 1	RAW264. 7	J774A. 1	RAW264. 7	J774A. 1	RAW264. 7
Extrato	32	32	32	32	4	4	8	8	8	8
FAqAo	16	32	32	64	1	2	4	8	8	16
FBAo	32	64	16	32	1	2	4	8	8	16
FAAo	16	16	16	16	32	32	32	32	32	32
FDAo	2	2	4	4	1	1	1	1	2	2
FHAo	0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,5	1	0,5	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: IS: Índice de seletividade; IC: Índice de citotoxicidade

Tabela 8 - Índice de seletividade (IS) do extrato e frações de *M. urundeuva* em função das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, *C. gattii* ATCC R275 e *C. neoformans* ATCC H99

Extrato/ frações - <i>M. urundeuva</i>	IS (IC ₇₀ /CIM)									
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. gattii</i> ATCC R265		<i>C. neoformans</i> ATCC H99	
	Macrófagos murinos									
	J774A.1	RAW264.7	J774A.1	RAW264.7	J774A.1	RAW264.7	J774A.1	RAW264.7	J774A.1	RAW264.7
Extrato	64	64	32	32	4	4	8	8	16	16
AqMu	16	64	16	64	1	2	1	4	2	8
FBMu	32	64	16	32	1	2	8	16	8	16
FAMu	16	32	16	32	2	4	16	32	16	32
FDMu	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
FHMu	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

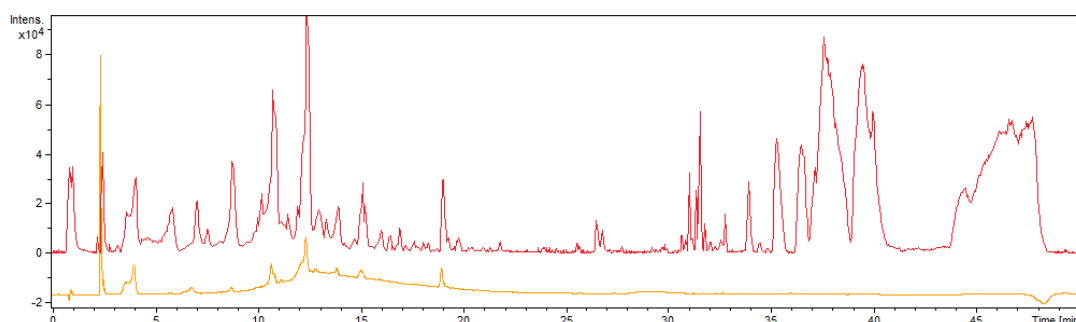
Nota: IS: Índice de seletividade; IC: Índice de citotoxicidade

6.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FAAO E DA FAMU

A análise de pico a pico do cromatograma HPLC-MS no modo negativo (Figura 13 e Tabela 9) mostrou a presença de vários compostos fenólicos em FAAo. A reanálise desses dados de LC-MS no site do GNPS, usando o protocolo clássico de rede molecular, permitiu a construção de uma rede molecular na qual as características dos compostos, presentes na FAAo,

relacionados à estrutura são agrupadas de acordo com seus espectros MS2 (Figura 14). Além disso, várias correspondências com o banco de dados GNPS levaram à proposta e identificação, por meio de inspeção manual cuidadosa, das catequinas (2-6) e do ácido elágico (7). A posição do grupo galloil nos compostos 2-6 foi deduzida a partir dos espectros MS2, bem como pela análise NMR da subfração polar de FAAo. A anotação dos pares diastereoisoméricos epigallocatequina galato (3)/galocatequina galato (4) e epicatequina galato (5)/catequina galato (6) foi atribuída considerando o comportamento cromatográfico desses compostos em colunas de fase reversa (C18) (Zeeb *et al.* 2000; Pelillo *et al.* 2004), uma vez que seus espectros MS2 resultaram quase idênticos. Além disso, o ácido gálico (1) (tR: 4,1 min, m/z 169) e vários ácidos anacárdicos (8-16) (tR 33 a 46 min) mostrando cadeias laterais C13 a C17 com até três duplas ligações (Figura 13, Figura 14 e Tabela 9) também foram identificados pela análise de seus espectros MS e MS2, como esperado para o gênero *Anacardium*. Os sinais LC-MS mais intensos dos ácidos anacárdicos correspondem aos compostos 13 (C15:1), 14 (C17:2), 15 (15:0) e 16 (17:1), enquanto o pico mais intenso das catequinas corresponde ao epigallocatequina galato (3). Os cardanóis (17), que também foram relatados para *Anacardium*, não puderam ser detectados nos cromatogramas HPLC-MS, nem no modo negativo nem no positivo, devido à baixa eficiência de ionização observada para fenóis. No entanto, os espectros de ¹H NMR do subextrato de FAAo em clorofórmio-d mostraram sinais característicos do grupo m-alquil-feno, que foram consistentes com os valores δ H relatados para os cardanóis (Yokoyama *et al.* 2023). A análise 2D-NMR HSQC-DEPT e COSY permitiu anotar vários sinais de ¹H e ¹³C consistentes com a presença desses metabólitos. O comprimento da cadeia lateral e o grau de insaturação não puderam ser determinados; esses compostos geralmente ocorrem como misturas micro-heterogêneas com cadeias laterais variáveis (Yokoyama *et al.* 2023). Além disso, foi notada sobreposição de sinais com outros compostos relacionados à estrutura presentes nesse subextrato, como ácidos anacárdicos e triacilgliceróis. A comparação semiquantitativa da área dos sinais característicos dos ácidos anacárdicos e cardanóis sugere abundâncias similares para esses produtos naturais.

Figura 13 - Cromatograma de pico base no modo de ionização negativa (BPC, em vermelho) e absorbância a 254 nm (laranja), mostrando o perfil de FAAo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

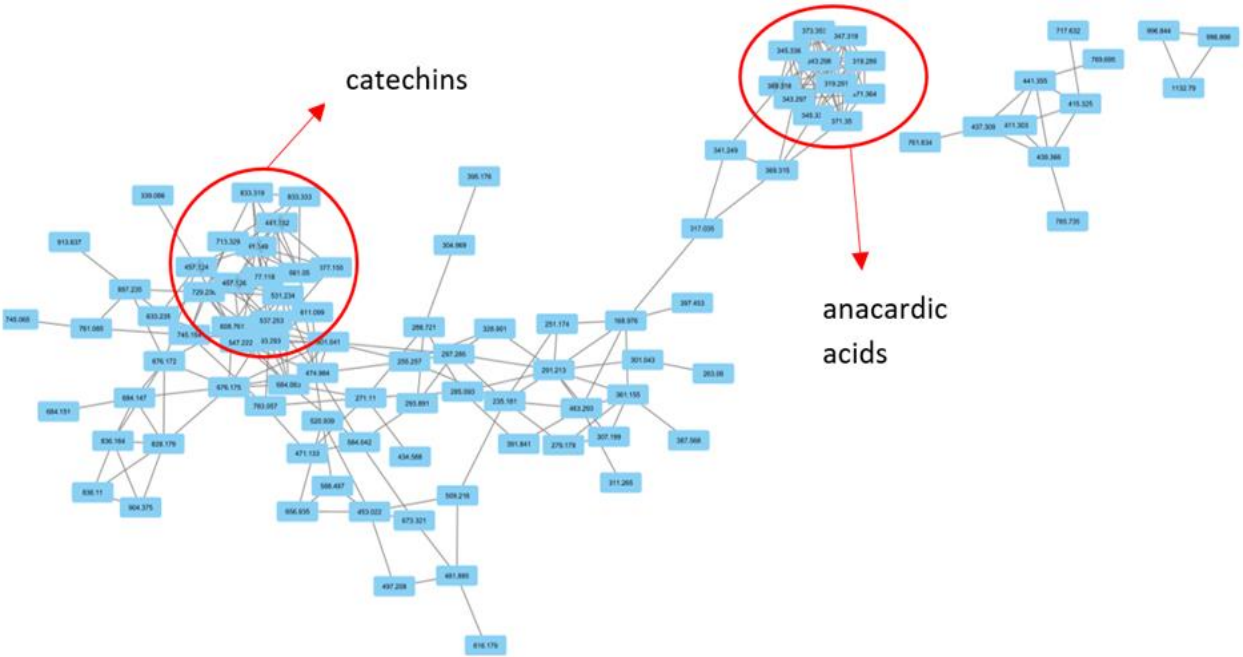
Tabela 9 - Compostos presentes em FAAo detectados por HPLC-ESI-MS no modo de ionização negativa.

Índice	tr Método 1 (min)	tr Método 2 (min)	Composto proposto	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	Calculado [M-H] ⁻ (m/z)	Erro (ppm)	Íon precursor (m/z)	Íons produzidos (intensidade relativa)	Referências
1	4.1	2.5	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0150	169.0132	-4.3	169	125(100)	Encarnação <i>et al.</i> , 2024
2	10.3		Epicatequina*	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711	289.0718	2.2	289	245(56), 137(11), 125(100)	Pelillo <i>et al</i> , 2004, Encarnação <i>et al.</i> , 2024
3	12.4	2.6	Epigallocatequina gallato*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457.0777	457.0765	-0.2	457	305(14), 169(100), 125(19)	Pelillo <i>et al</i> , 2004, Encarnação <i>et al.</i> , 2024
4	13.9	2.8	Gallocatequina gallato*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457.0774	457.0765	0.6	457	305(18), 169(100), 125(25)	Pelillo <i>et al</i> , 2004, Encarnação <i>et al.</i> , 2024
5	15.1	2.9	Epicatequina gallato*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0833	441.0816	-1.3	441	289(70), 169(100), 125(24)	Zeeb <i>et al</i> , 2000, Galvão <i>et al.</i> , 2018
6	16.0	3.0	Catequina gallato*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0840	441.0816	-2.8	441	289(65), 169(100), 125(21)	Zeeb <i>et al</i> , 2000, Galvão <i>et al.</i> , 2018
7	19.1	4.4	Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9990	300.9979	-0.5	301	284(60), 257(70), 229(100)	Encarnação <i>et al.</i> , 2024
8	33.9	16.5	Ácido anacárdico C15:3	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	341.2125	341.2111	-0.9	341	297(100), 119(9)	Hamad; Mubofu, 2015
9	34.4	17.3	Ácido anacárdico C13:1	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2142	317.2111	-6.2	317	273(100), 119(5)	Ventura <i>et al.</i> , 2023

10	35.3	17.8	Ácido anacárdico C 15:2	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	343.2275	343.2268	1.1	343	299(100), 119(2)	Hamad; Mubofu, 2015
11	36.5	18.9	Ácido anacárdico C17:3	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	369.2439	369.2424	-1.2	369	325(100), 119(3)	Ventura <i>et al.</i> , 2023
12	37.1	19.3	Ácido anacárdico C13:0	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319.2279	319.2268	-0.1	319	275(100), 119(1)	Ventura <i>et al.</i> , 2023
13	37.8	19.6	Ácido anacárdico C15:1	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	345.2449	345.2424	-4.1	345	301(100), 119(1)	Hamad; Mubofu, 2015
14	39.5	21.4	Ácido anacárdico C17:2	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	371.2590	371.2581	0.4	371	327(100), 119(1)	Ventura <i>et al.</i> , 2023
15	44.2	25.5	Ácido anacárdico C15:0	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	347.2588	347.2581	1.0	347	303(100), 119(0.2)	Hamad; Mubofu, 2015
16	46.0	26.3	Ácido anacárdico C17:1	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	373.2759	373.2737	-3.0	373	329(100), 119(0.2)	Ventura <i>et al.</i> , 2023

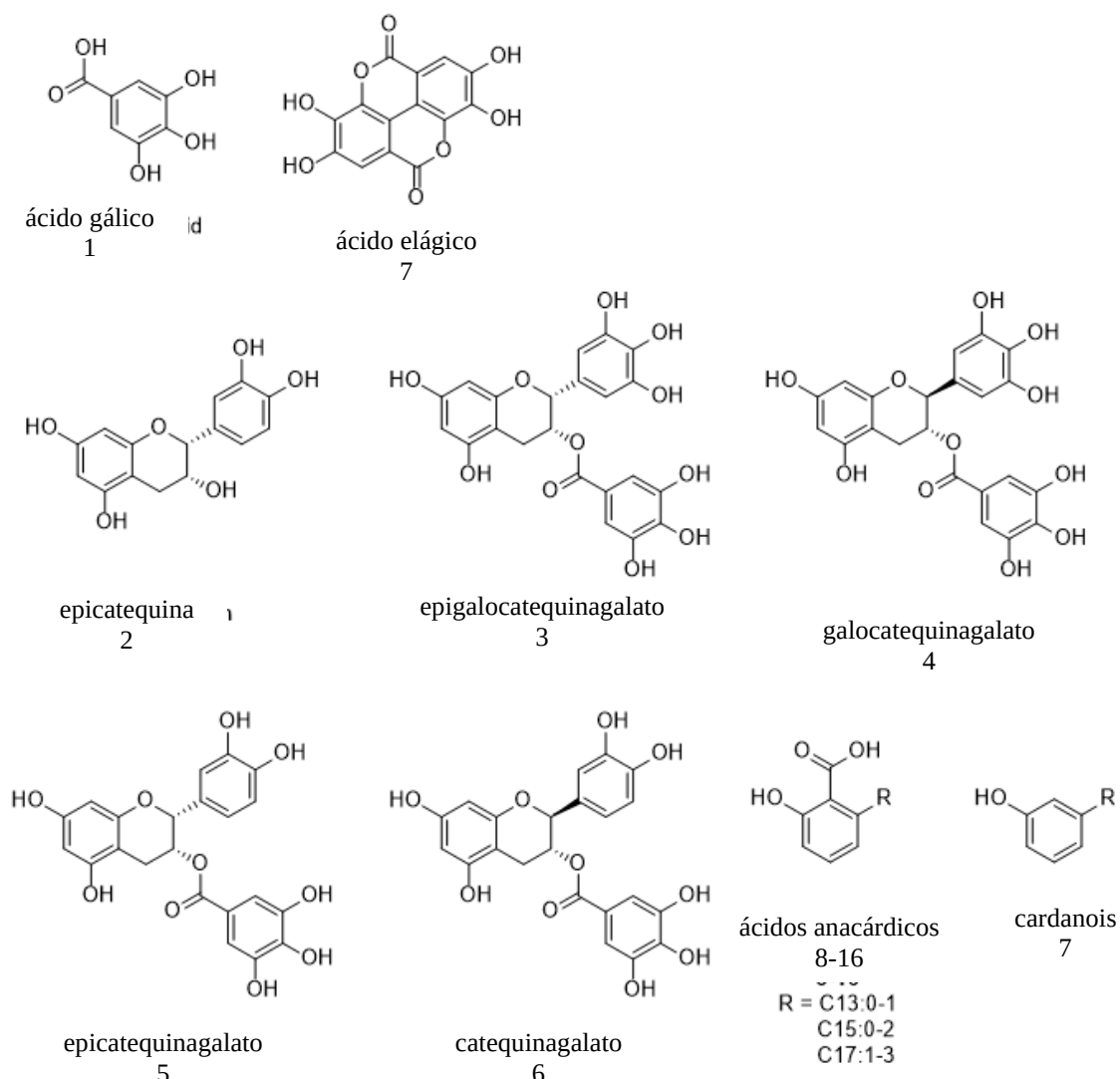
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 14 - Rede Molecular de LC-MS realizada no site do GNPS, destacando as características de catequinas e ácido anacárdico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 15 - Estrutura química dos constituintes detectados na FAAo



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

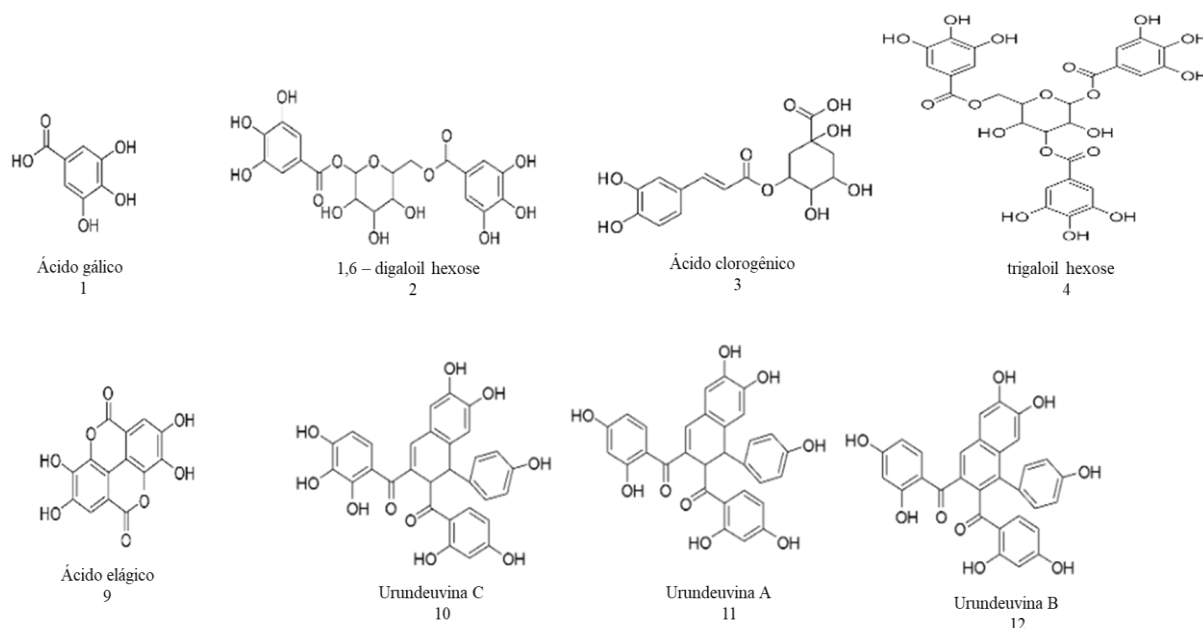
E, de acordo com análise do HPLC-ESI-MS no modo de ionização negativa, foram identificados 12 constituintes químicos na fração acetato de etila do extrato etanólico das cascas de *M. urundeuva*, que podem ser vistos na tabela 10 e na figura 16. Foram encontrados compostos do metabolismo secundário, compostos fenólicos da classe dos taninos hidrolisáveis, como ácido 1,6 - di-galoil-hexose (Rt: 10,9 min) e tri-galoil-hexose (13,1 min), (Fig. 16). Outros metabólitos secundários, que estão relacionados à proteção da planta, foram identificados o ácido gálico (Rt: 3,7 min), ácido clorogênico (Rt: 11,5 min), ácido elágico (Rt: 18,9 min) e as urundeuvinas C, A e B (Rt: 20,3 min, 20,9 min e 21,3 min, respectivamente) que são flavonoides glicosilados (Figura 16 e Tabela 10).

Tabela 10 - Compostos presentes em FAMu detectados por HPLC-ESI-MS no modo de ionização negativa.

Índice	t _R Método 1 (min)	Composto proposto	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	Calculado [M-H] ⁻ (m/z)	Erro (ppm)	Precursor (-)	Produtos (-)	Ref.
1	3,7	ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0000	169,0142	-8,6	169	125	Sarria <i>et al.</i> , 2018
2	10,9	1,6-di-galoil-hexose	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483,0722	483,0780	12,2	483	313, 271, 227, 211, 169	Castro <i>et al.</i> , 2020
3	11,5	3-ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0757	353,0878	34,3	353	191	Castro <i>et al.</i> , 2020
4	13,1	tri-galoil-hexose	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635,0000	635,0890	12,2	635	465, 410, 313	Galvão <i>et al.</i> , 2018
5	13,8	ácido gálico derivado I	C ₃₁ H ₁₆ O ₅	467,0924	467,0925	0,1	467	357, 217	Galvão <i>et al.</i> , 2018
6	14,2	ácido gálico derivado I - isômero	C ₃₁ H ₁₆ O ₅	467,0942	467,0925	-3,6	467	357, 217	Galvão <i>et al.</i> , 2018
7	14,6	ácido gálico derivado I - isômero	C ₃₁ H ₁₆ O ₅	467,0944	467,0925	-4,0	467	357, 217	Galvão <i>et al.</i> , 2018
8	17,4	ácido gálico derivado I - análogo	C ₃₁ H ₁₆ O ₄	451,0995	451,0976	-4,4	451	341, 217	Galvão <i>et al.</i> , 2018
9	18,9	ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9978	301,9990	3,8	301	284, 257, 229	Encarnação <i>et al.</i> , 2024
10	20,3	urundeuquina C	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	541,1172	541,1140	-5,8	541	523, 505, 431, 415, 40	Viana <i>et al.</i> , 2003
11	20,9	urundeuquina A	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	525,1181	525,1191	2,0	525	5, 389, 371, 151, 135	Castro <i>et al.</i> , 2020
12	21,3	urundeuquina B	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	523,1026	523,1035	1,7	523	389, 371, 385	Viana <i>et al.</i> , 2003
13	21,5	urundeuquina A diastêromero	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	525,1175	525,1191	3,1	525	387, 413, 410, 251	Castro <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 16 - Estrutura química dos constituintes detectados na FAMu.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6.6 OS TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS FRAÇÕES DEMONSTRARAM CIM MENORES QUE 10 µG/ML PARA QUASE TODAS AS LINHAGENS DE *CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS* TESTADAS.

A Tabela 11 mostra os resultados do experimento de CIM da FAAo, fluconazol e anfotericina B diante de *Candida spp* e *Cryptococcus sp*. Neste ensaio, a FAAo apresentou valores de CIM que variaram entre 1,56 (para as duas linhagens *C. glabrata*) e 6,25 µg/mL (para *C. albicans* 10231, *C. albicans* 188084, *C. tropicalis* 750 e *C. parapsilosis* 22019). Além disso, os valores de CIM variaram de 1,56 a 12,5 µg/mL contra as linhagens de *C. neoformans* e de 1,56 a 3,12 µg/mL contra as linhagens de *C. gattii*. Os valores individuais de CIM para anfotericina B variaram entre 0,5 e 4,0 µg/mL e para o fluconazol variaram entre 1 e 16 µg/mL.

A Tabela 12 mostra os resultados do experimento de CIM da FAMu, fluconazol e anfotericina B diante de *Candida sp* e *Cryptococcus sp*. Neste ensaio, a FAMu apresentou valores de CIM que variaram entre 1,56 a 3,13 µg/mL para todas as linhagens de *Candida sp*, *C. gattii* e quase todas de *C. neoformans*, a única exceção, foi *C. neoformans* WM 626 que apresentou um CIM de 12,5 µg/mL. Os valores individuais de CIM para anfotericina B variaram entre 0,01 e 1,0 µg/mL e para o fluconazol variaram entre 1 e 16 µg/mL.

Tabela 11 - Efeitos antifúngicos da FAAo.

	Linhagens	FAAo			AmB	FLZ
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CFM/ CIM	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>Candida sp</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6,25	50,00	8	1,00	8,00
	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	6,25	50,00	8	0,50	4,00
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	3,12	25,00	8	2,00	2,00
	<i>C. krusei</i> ATCC 20298	3,12	25,00	8	2,00	2,00
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1,56	12,50	8	1,00	16,00
	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1,56	12,50	8	1,00	16,00
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	6,25	50,00	8	1,00	4,00
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	6,25	12,50	2	1,00	4,00
	Média aritmética	4,30	29,69	-	1,19	7,00
	Média geométrica	3,71	25,00	-	1,09	5,19
<i>Cryptococcus sp.</i>	<i>C. gattii</i> ATCC R265	3,12	6,25	2	0,06	8,00
	<i>C. gattii</i> ATCC 32608	1,56	3,12	2	0,50	2,00
	<i>C. gattii</i> ATCC 24065	1,56	6,25	4	0,12	2,00
	<i>C. gattii</i> ATCC WM161	1,56	3,12	2	0,03	2,00
	<i>C. gattii</i> ATCC WM178	1,56	3,12	2	0,01	8,00
	<i>C. gattii</i> ATCC WM179	1,56	3,12	2	0,01	1,00
	<i>C. gattii</i> L27/01	1,56	6,25	4	0,12	8,00
	<i>C. gattii</i> 1913 ER	1,56	6,25	4	0,50	16,00
	<i>C. gattii</i> ICB181	1,56	6,25	4	0,03	4,00
	<i>C. gattii</i> L28	1,56	25,00	16	0,12	4,00
	<i>C. neoformans</i> ATCC H99	3,12	3,12	1	0,12	1,00
	<i>C. neoformans</i> WM 626	12,5	25,00	2	0,06	2,00
	<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	1,56	6,25	4	0,03	2,00
	<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	3,12	12,50	4	0,25	2,00
	<i>C. neoformans</i> ATCC62066	1,56	3,12	2	0,25	2,00
	<i>C. neoformans</i> ATCC WM 148	1,56	6,25	4	0,25	8,00
	WP	1,56	6,25	4	0,50	2,00
	C31	1,56	12,50	8	1,00	4,00
	96806	1,56	12,50	8	0,50	8,00
	27JF	1,56	12,50	8	0,50	2,00
	Média aritmética	2,34	8,44	-	0,25	4,40
	Média geométrica	1,92	6,70	-	0,13	3,25

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 12 - Efeitos antifúngicos da FAMu.

Linhagens		FAMu			AmB	FLZ
		CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CFM/ CIM	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
Candida sp.	C. albicans ATCC 10231	3,12	12,50	4	1,00	8,00
	C. albicans ATCC 18804	1,56	12,50	8	0,50	4,00
	C. krusei ATCC 6258	3,12	25,00	8	2,00	2,00
	C. krusei ATCC 20298	3,12	25,00	8	2,00	2,00
	C. glabrata ATCC 2001	1,56	6,25	4	1,00	16,00
	C. glabrata ATCC 90030	1,56	12,50	8	1,00	16,00
	C. tropicalis ATCC 750	3,12	25,00	8	1,00	4,00
	C. parapsilosis ATCC 22019	3,12	25,00	8	1,00	4,00
	Média aritmética	2,53	26,56	-	1,19	7,00
Média geométrica		2,40	22,92	-	1,09	5,19
Cryptococcus sp.	C. gattii ATCC R265	3,12	3,12	1	0,06	8,00
	C. gattii ATCC 32608	1,56	1,56	1	0,50	2,00
	C. gattii ATCC 24065	1,56	12,5	8	0,12	2,00
	C. gattii ATCC WM161	1,56	1,56	1	0,03	2,00
	C. gattii ATCC WM178	1,56	1,56	1	0,01	8,00
	C. gattii ATCC WM179	1,56	1,56	1	0,01	1,00
	C. gattii L27/01	1,56	1,56	1	0,12	8,00
	C. gattii 1913 ER	1,56	1,56	1	0,50	16,00
	C. gattii ICB181	1,56	6,25	4	0,03	4,00
	C. gattii L28	1,56	6,25	4	0,12	4,00
	C. neoformans ATCC H99	3,12	3,12	1	0,12	1,00
	C. neoformans WM 626	12,5	12,5	1	0,06	2,00
	C. neoformans ATCC 24067	1,56	1,56	1	0,03	2,00
	C. neoformans ATCC 28957	3,12	6,25	2	0,25	2,00
	C. neoformans ATCC62066	1,56	3,12	2	0,25	2,00
	C. neoformans ATCC WM 148	1,56	3,12	2	0,25	8,00
	WP	1,56	12,5	8	0,50	2,00
	C31	1,56	6,25	4	1,00	4,00
	96806	1,56	1,56	1	0,50	8,00
	27JF	1,56	6,25	4	0,50	2,00
	Média aritmética		2,34	4,69	-	0,25
Média geométrica		1,92	3,46	-	0,13	3,25

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6.7 A INTERAÇÃO ENTRE FAAO E FAMU COM FLUCONAZOL SE MOSTROU INDIFERENTE *IN VITRO*.

Os valores do índice de concentração inibitória fracional (ICIF) para a FAAo e fluconazol (Tabela 13) foram considerados indiferentes para quase todas as espécies de *Candida* testadas, exceto para *C. tropicalis*, onde a fração apresentou sinergismo com o fluconazol, com um ICIF de 0,13. Da mesma forma, os valores do ICIF para a FAMu e fluconazol foram considerados indiferentes para todas as linhagens de *Cryptococcus* testadas.

Tabela 13 - Avaliação da interação da FAAo e FAMu com fluconazol (FLZ) frente às espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

ICIF			
	LINHAGEM	FAAo x FLZ	INTERAÇÃO
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,51	Indiferente
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1	Indiferente
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1	Indiferente
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	Indiferente
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,13	Sinergismo
	<i>C. gatti</i> ATCC R265	1	Indiferente
	<i>C. neoformans</i> ATCC H99	0,5	Sinergismo
	LINHAGEM	FAMu x FLZ	INTERAÇÃO
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. gatti</i> ATCC R265	1	Indiferente
	<i>C. gatti</i> ATCC WM 179	1	Indiferente
	<i>C. neoformans</i> ATCC H99	1	Indiferente
	<i>C. neoformans</i> ATCCWM 626	1	Indiferente

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

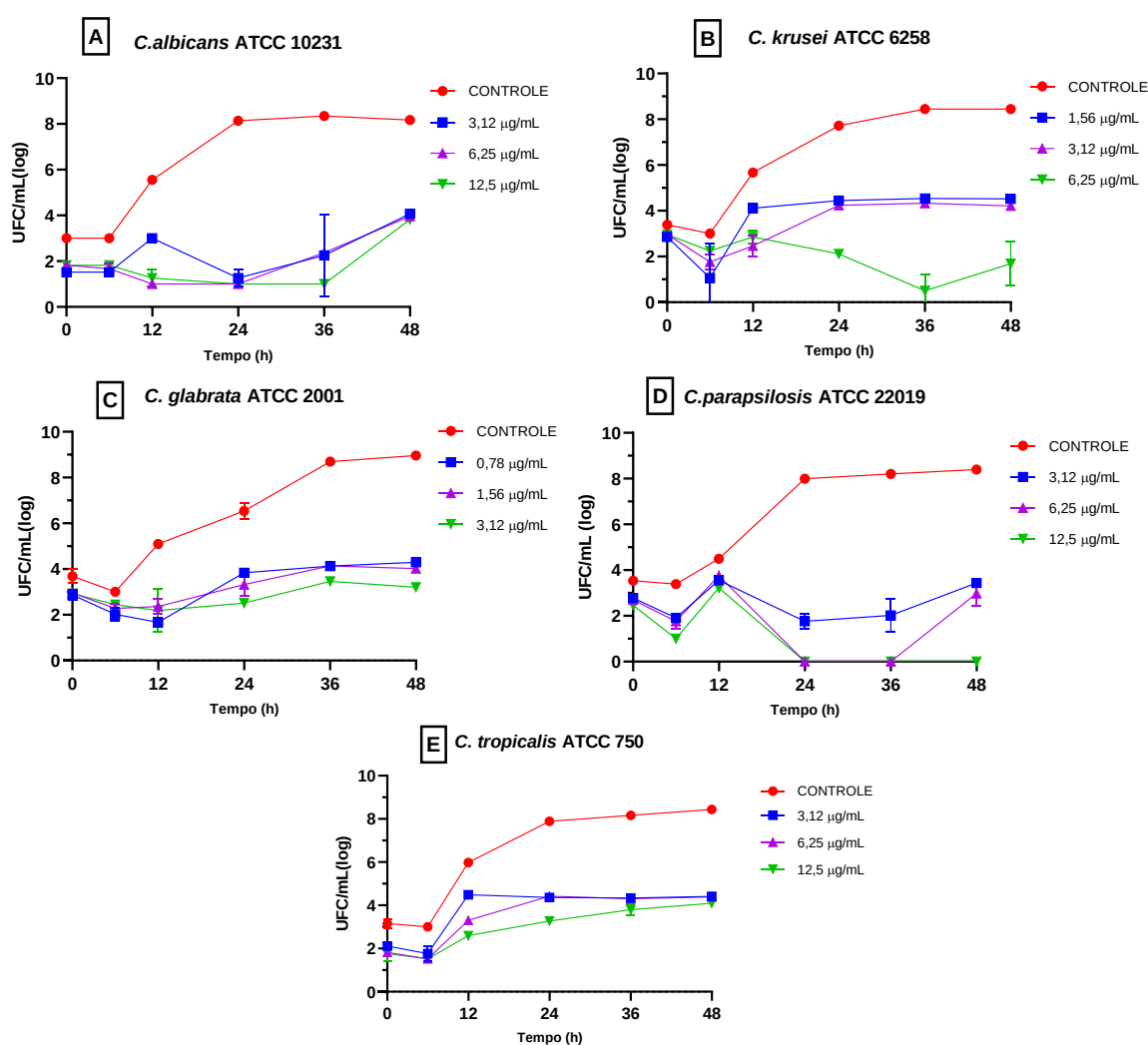
6.8 CURVA DE MORTE

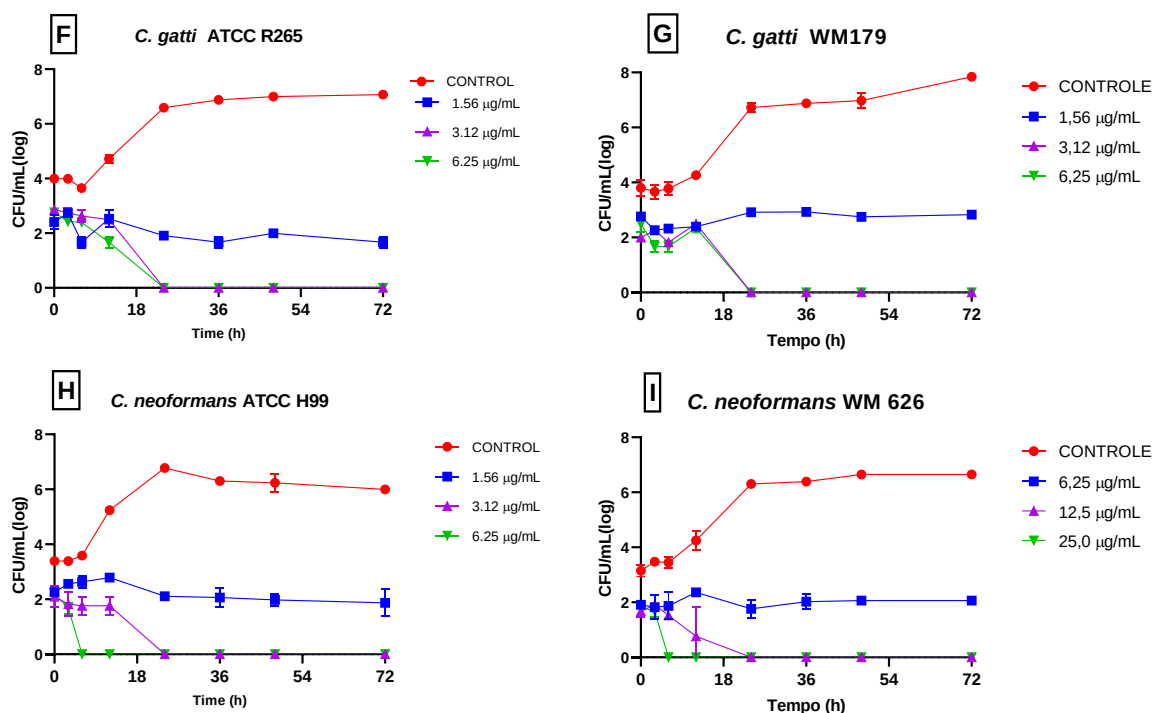
O ensaio da curva de morte oferece uma perspectiva mais dinâmica da interação entre um agente antimicrobiano e um patógeno. Os efeitos da FAAo na capacidade das leveduras de produzir colônias são mostrados na Figura 17. As concentrações usadas para a curva de morte foram CIM, 0,5CIM ou duas vezes a CIM (2xCIM) ao longo de 48 horas para *Candida spp.* e 72 horas para *Cryptococcus sp.* A FAAo reduziu as contagens de UFC ao longo do tempo de maneira dependente da dose em comparação com o inóculo inicial contra *C. krusei* ATCC 6258 (Figura 17B), *C. glabrata* ATCC 2001 (Figura 17C) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figura

17E). É interessante notar que a fração a 12,5 µg/mL não gerou crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019, sugerindo uma atividade fungicida (Figura 17E). Entre outras espécies, a FAAo proporcionou aproximadamente 48% a 53% de morte em comparação com o controle sem droga na concentração de CIM após 48 horas (Figura 17A-D). No entanto, o número de UFC por mL permaneceu o mesmo ou aumentou ligeiramente em comparação com o inóculo inicial.

Nenhum crescimento foi observado em *Cryptococcus sp.* após 24 horas de tratamento nas concentrações inibitórias testadas, o que persistiu por até 72 horas (Figura 17 F-I). Isso indica um efeito fungicida. Curiosamente, a FAAo em 2CIM reduziu 100% das contagens de UFC dentro de 6 horas de exposição para *C. neoformans* ATCC H99 (Figura 18H).

Figura 17 - Curva de morte da FAAo contra *Candida sp.* (A-E) e contra *Cryptococcus sp.* (F-I) nas concentrações ½ CIM, CIM e 2X CIM.



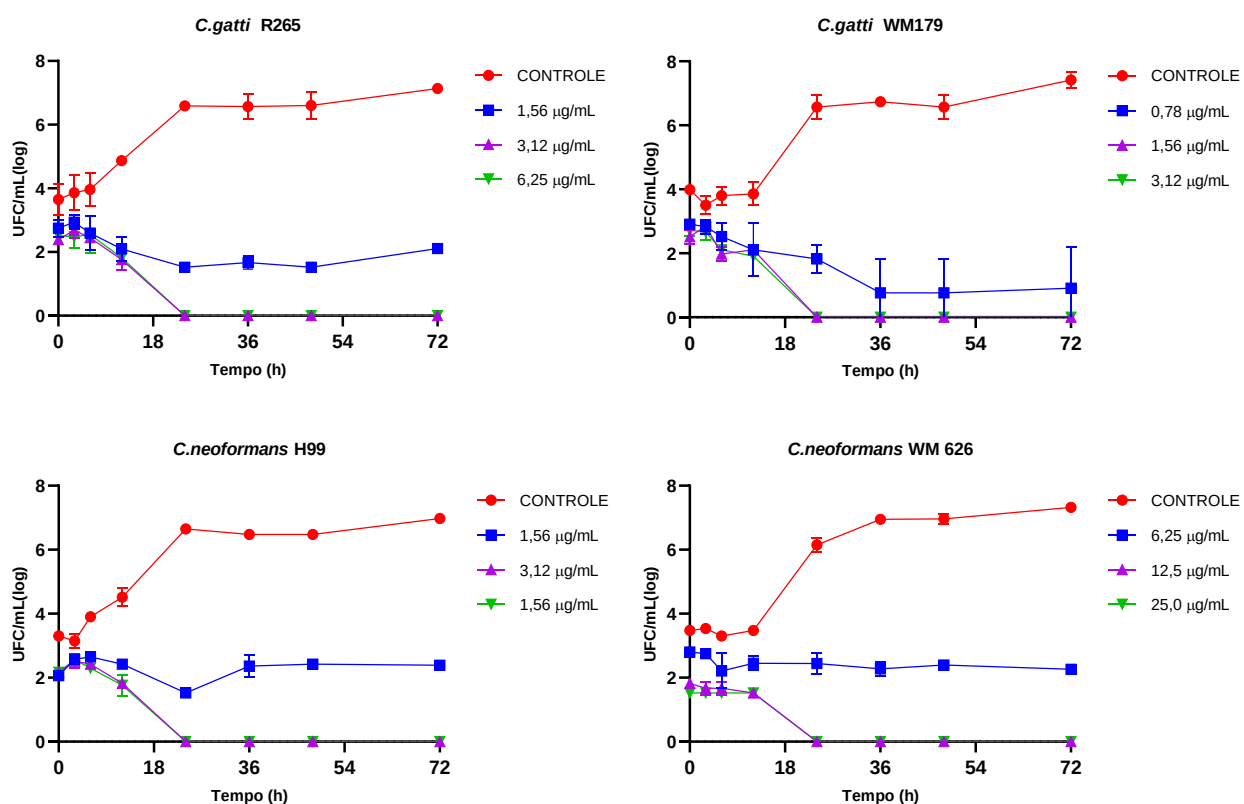


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Os dados são apresentados em média $\pm$ desvio padrão de UFC/mL ($\log_{10}$).

O efeito tempo-dependente da FAMu na viabilidade das células de *C. gattii* e *C. neoformans* foi avaliado através do ensaio de curva de morte. Analisando os gráficos da figura 18 foi possível observar que a FAMu apresentou o início do declínio da viabilidade celular a partir das 12 horas na concentração CIM e, essa redução da viabilidade celular foi progressiva, inibindo 100% das células fúngicas, a partir das 24 horas. Esses resultados expressivos nos valores de CIM (1,56 $\mu\text{g/mL}$ para *C. gattii* ATCC WM 179, 3,12 $\mu\text{g/mL}$ *C. gattii* R265 e *C. neoformans* ATCC H99, e, 12,5 *C. neoformans* ATCC WM626, reforçam o comportamento fungicida da fração para todas as linhagens de *Cryptococcus* testadas, num comportamento tempo-dependente da FAMu.

Figura 18 - Curva de morte da FAMu contra *Cryptococcus sp.* nas concentrações ½ CIM, CIM e 2X CIM.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

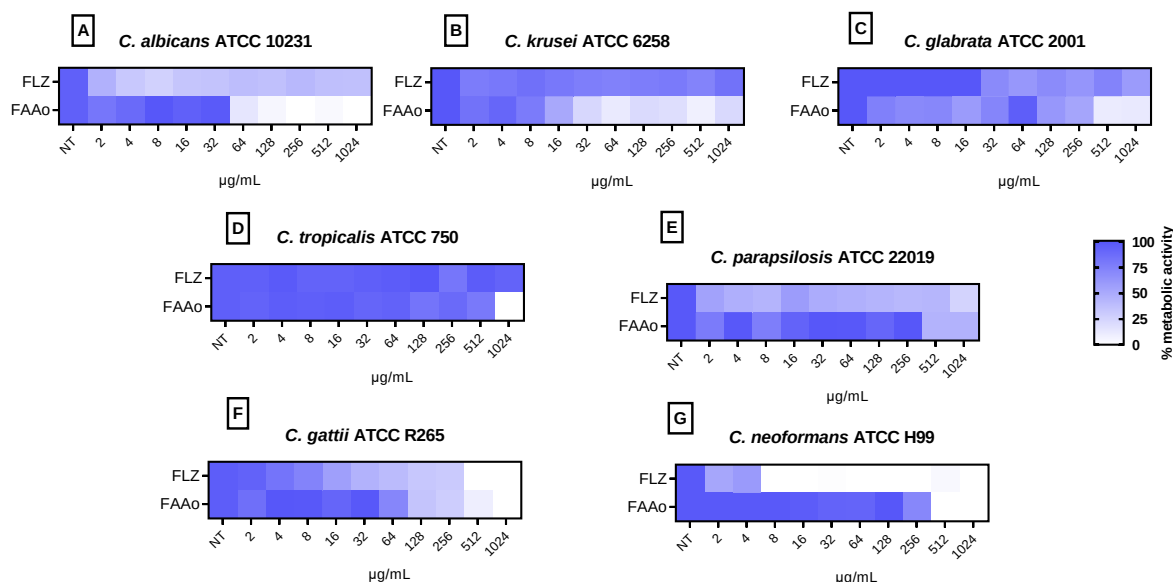
Nota: Os dados são apresentados em média $\pm$ desvio padrão de UFC/mL ($\log_{10}$).

6.9 A FAAO REDUZ A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DAS LINHAGENS *C. KRUSEI* ATCC 6258 E *C. ALBICANS* ATCC 10231 EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES

O efeito do FAAo na formação de biofilme foi analisado pelo ensaio MTT (Figura 19). A fração reduziu o desenvolvimento do biofilme em aproximadamente 60% a 64 µg/mL para *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 19A) e a 32 µg/mL para *C. krusei* ATCC 6258 (Figura 18B). Para *C. glabrata* ATCC 2001 (Figura 19C), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figura 19E) e *C. neoformans* ATCC H99 (Figura 19G), a atividade metabólica das células sesséis foi reduzida em mais de 50% a 512 µg/mL. A adesão às placas foi impedida a 1028 µg/mL para *C. tropicalis* ATCC 750 (Figura 19D). A concentração mínima inibitória que reduziu 50% da formação de biofilme foi de 128 µg/mL para *C. gattii* ATCC R265 (Figura 19F). Além disso, o efeito inibitório do FAAo sobre esses biofilmes pareceu ser dependente da dose.

Como esperado, o fluconazol foi ineficaz contra *C. glabrata* ATCC 2001. Este medicamento não prejudicou efetivamente a formação de biofilme de *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. krusei* ATCC 6258 nas concentrações testadas. As menores concentrações de fluconazol que inibiram 50% da atividade metabólica da formação de biofilme foram: 4 µg/mL para *C. albicans* ATCC 10231, 512 µg/mL para *C. parapsilosis* ATCC 22019, 8 µg/mL para *C. neoformans* ATCC H99 e 128 µg/mL para *C. gattii* ATCC R265.

Figura 19 - Efeito da fração acetato de etila de *A. occidentale* (FAAo) e fluconazol (FLZ) na inibição da formação de biofilmes de *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.*, em várias concentrações, por 24 horas, à 35°C.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6.10 EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO (EPA) DA FAMU FRENTE A *CRYPTOCOCCUS*

O efeito pós antibiótico encontrado para a FAMu variou de 5 a 8 horas (média de EPA, 6,5 horas) para uma concentração de FAMu igual à CIM.

Tabela 14 - EPA após 1 hora de exposição à FAMu na concentração CIM para *Cryptococcus*.

<i>Cryptococcus sp.</i>	EPA (h)
<i>C. gattii</i> ATCC R265	7
<i>C. gattii</i> ATCC WM179	8
<i>C. neoformans</i> ATCC H99	6
<i>C. neoformans</i> ATCC WM626	5

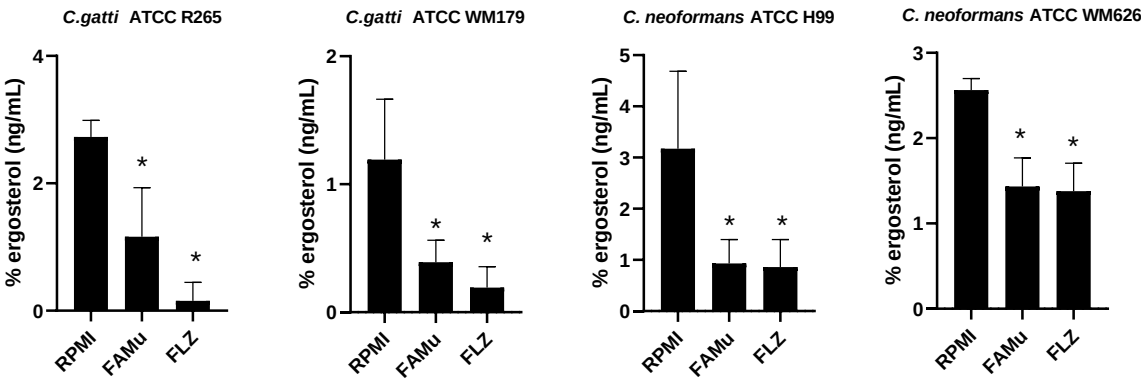
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6.11 FAMU COMPROMETE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR

Em seguida, avaliamos a capacidade da FAMu de alterar a composição da membrana celular criptocócica, cuja estrutura lipídica é predominantemente composta por esteróis e representa o alvo mais comum de drogas anticriptocóccicas.

Observa-se que após 24 h de tratamento com FAMu conseguiu reduzir, significativamente, os níveis de ergosterol em comparação ao controle ($p < 0,05$) da mesma forma que o controle fluconazol.

Figura 20 - Níveis do conteúdo de ergosterol das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* após 24 horas de tratamento com FAMu e fluconazol.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Os resultados são expressos como uma porcentagem do peso úmido da célula (ng/mL) $\pm$ o desvio padrão da média, de dois experimentos independentes em ensaios triplicados. Diferenças estatísticas entre os antifúngicos e o controle são representadas por * ($P < 0,05$).

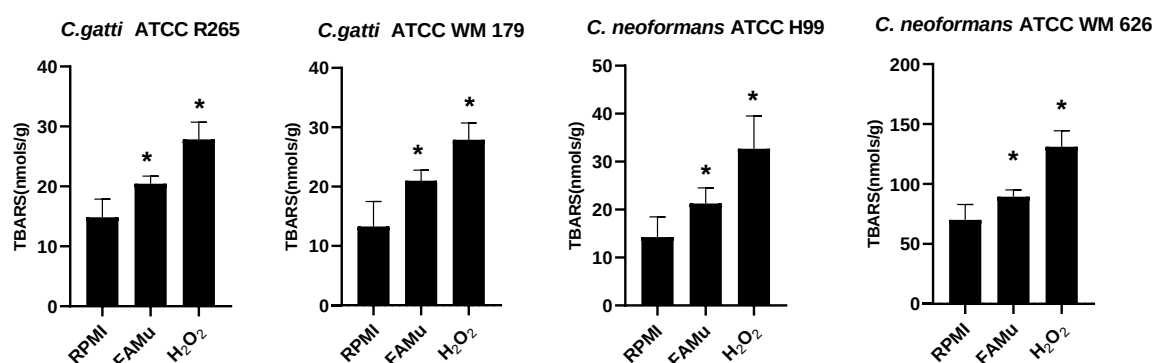
RPMI: meio sem fração; FAMu: fração acetato de etila de *M. urundeuva*. FLZ: fluconazol.

6.12 FAMU INDUZ A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS CÉLULAS CRIPTOCOCÓCICAS

Após os resultados do ergosterol, a fim de se evidenciar o mecanismo de ação da FAMu, avaliou-se a peroxidação lipídica das membranas celulares. Para isso, foi utilizado o teste que avalia as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um biomarcador comumente utilizado para mensurar a peroxidação lipídica (Ferreira *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram níveis elevados de TBARS após 24 horas de tratamento com FAMu para *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99 em comparação com o controle de crescimento ($P < 0,05$), indicando dano nos lipídios (Figura 5).

Figura 21 - Peroxidação lipídica como consequência do tratamento das células de *C. gattii* e *C. neoformans* com FAMu com a concentração inibitória mínima.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Os resultados são expressos como uma média $\pm$ desvio padrão da quantificação de peroxidação lipídica, em nmols/g de dois experimentos independentes realizados em triplicata. RPMI: meio sem fração; FAMu: fração acetato de etila de *M. urundeuva*. H₂O₂: peróxido de hidrogênio como controle positivo. Diferenças em relação ao controle negativo, * $p < 0,05$.

6.13 INTERAÇÃO *IN VITRO* DE FAMU COM 3-AT E DETC

Para determinar a influência das enzimas antioxidantes, catalase e superóxido dismutase (SOD) na tolerância das linhagens de *Cryptococcus* à FAMu, testamos 3-AT (inibidor específico da catalase) e DETC (inibidor da SOD) em combinação FAMu. Foi observado um efeito sinérgico do 3-AT com FAMu para *C. gattii* ATCC R265 (ICIF=0,26) e para *C. neoformans* ATCC H99 e ATCC WM626 (ICIF=0,5 e ICIF=0,07, respectivamente) (Tabela

15). Também foi observado um efeito sinérgico do DETC com FAMu para *C. gattii* ATCC R265 (ICIF=0,5), *C. gattii* ATCC WM179 (ICIF=0,5) e a interação com as linhagens de *C. neoformans* foi indiferente (Tabela 15).

Tabela 15 - Avaliação da interação da FAMu com DETC e 3-AT frente às espécies de *Cryptococcus*.

ICIF					
	LINHAGEM	FAMu x DETC	INTERAÇÃO	FAMu x 3-AT	INTERAÇÃO
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. gatti</i> R265	0,50	Sinergismo	0,26	Sinergismo
	<i>C. gatti</i> WM 179	0,50	Sinergismo	1	Indiferente
	<i>C. neoformans</i> H99	0,53	Indiferente	0,5	Sinergismo
	<i>C. neoformans</i> WM 626	0,56	Indiferente	0,07	Sinergismo

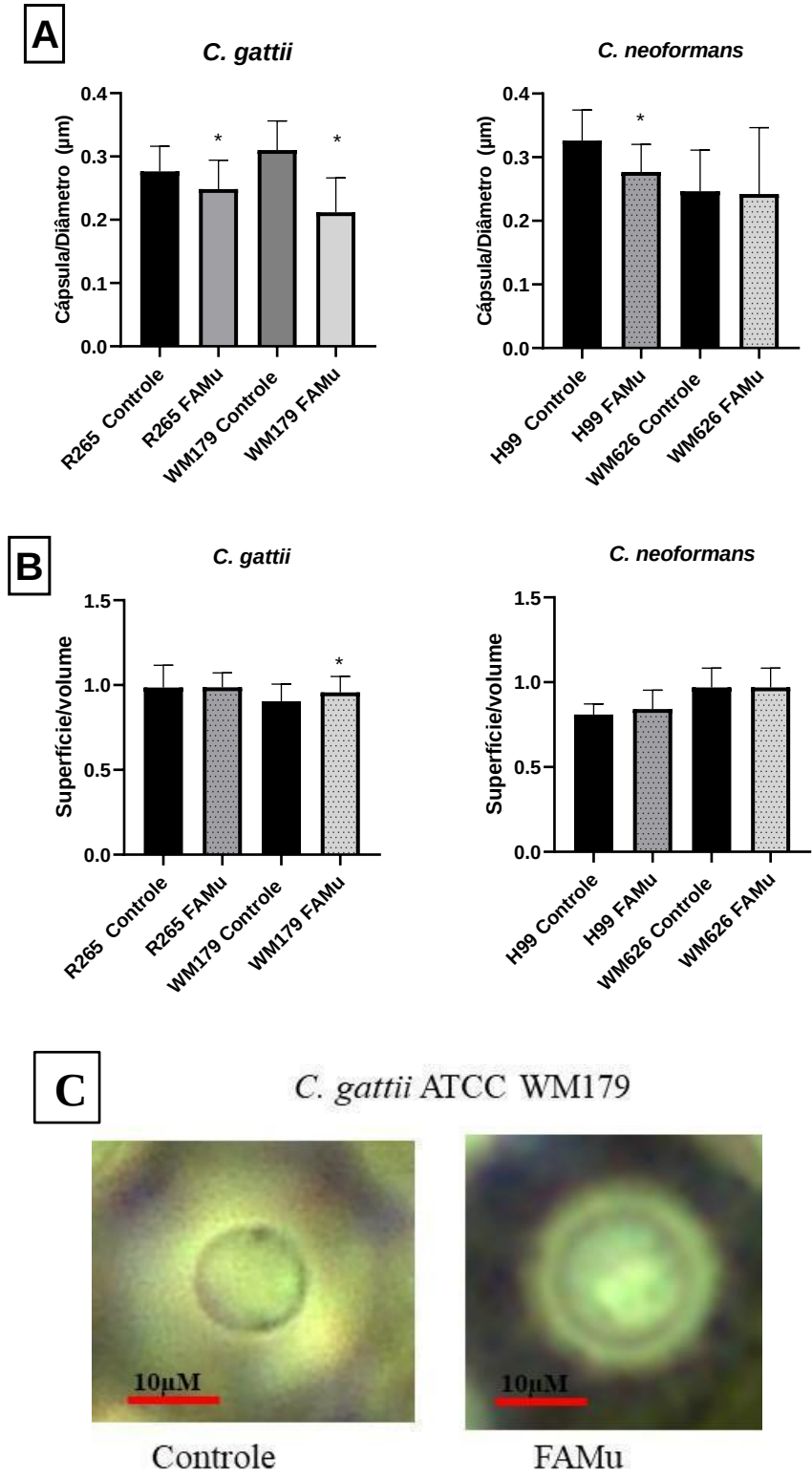
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: DETC= dietilditiocarbamato; 3-AT= 3-amino-1,2,4-triazol

6.14 AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E POTENCIAL ZETA DE *CRYPTOCOCCUS SP.* APÓS TRATAMENTO COM FAMU

Para avaliar o comportamento das células de *Cryptococcus* frente ao estresse provocado por FAMu, as leveduras foram expostas a uma concentração equivalente à metade da CIM, ou seja, uma concentração sub inibitória. A análise morfométrica mostrou que a FAMu reduziu significativamente as razões cápsula/diâmetro celular, para três linhagens, *C. gattii* ATCC R265 - não tratado: $0,28 \pm 0,039$, tratado: $0,24 \pm 0,046$; *C. gattii* ATCC WM 179 - não tratado: $0,31 \pm 0,046$, tratado: $0,21 \pm 0,054$; *C. neoformans* ATCC H99 - não tratado: $0,32 \pm 0,048$, tratado: $0,27 \pm 0,043$ ($p < 0,01$), no entanto, para *C. neoformans* ATCC WM 626: não tratado: $0,24 \pm 0,064$, tratado: $0,24 \pm 0,10$ não houve diferença significativa (Figura 22A). Exemplos de imagens que sustentam esses dados estão na Figura 22C.

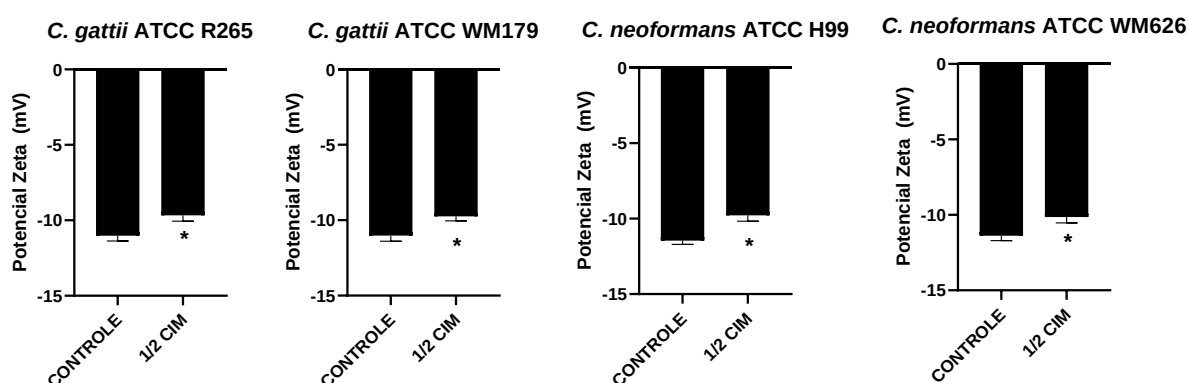
Figura 22 - Avaliação do tamanho da cápsula de *C. gattii* e *C. neoformans* após tratamento com concentração subinibitória da FAMu.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para avaliar o efeito da FAMu na carga superficial das células de *C. gattii* e *C. neoformans*, mediu-se o potencial Zeta. Os resultados, apresentados na figura 23, mostraram que, após a interação entre o fungo e a FAMu, com as leveduras cultivadas em condições de ½ CIM, houve uma redução da carga superficial em todas as linhagens de *C. gattii* (R265 e WM179) e *C. neoformans* (H99 e WM626).

Figura 23 - Efeito da concentração subinibitória da FAMu sobre a carga da membrana celular de *C. gattii* e *C. neoformans*.



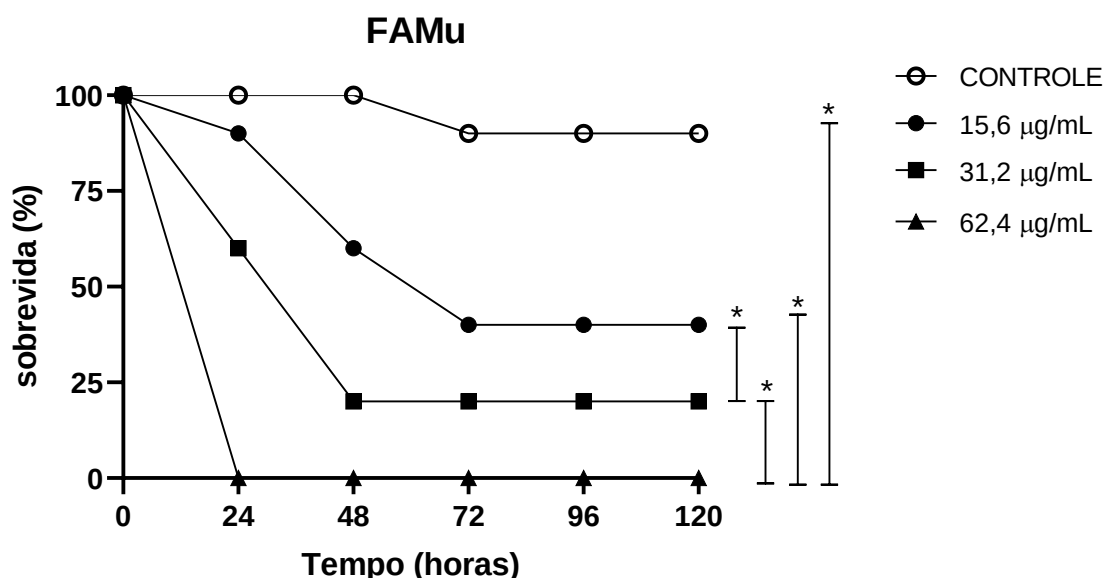
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Cada barra representa a média + erro padrão da média. O potencial Zeta expresso em mV*: indicam significância estatística ($P > 0,05$).

6.15 ENSAIOS DE TOXICIDADE E SOBREVIDA COM *T. MOLITOR*

A toxicidade e sobrevida *in vivo* foi realizada com larvas de um besouro, *Tenebrio molitor*, um modelo invertebrado com protocolo descrito para *Candida* e *Cryptococcus* (Souza *et al.*, 2015; Villis *et al.*, 2021). A inoculação da FAMu não causou toxicidade significativa em larvas saudáveis de *T. molitor* nas concentrações 5xCIM, sendo semelhante à salina. No entanto, as larvas que receberam a dose 20xCIM (62,14 µg/mL) as larvas morreram dentro de 24 horas, e apenas 25 % das que receberam a dose 10xCIM sobreviveram até o final do experimento, uma diferença significativa para as que receberam salina (grupo controle) ou a dose de 5xCIM (Fig. 24).

Figura 24 - Avaliação da toxicidade da FAMu em larvas de *T. molitor* não infectadas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

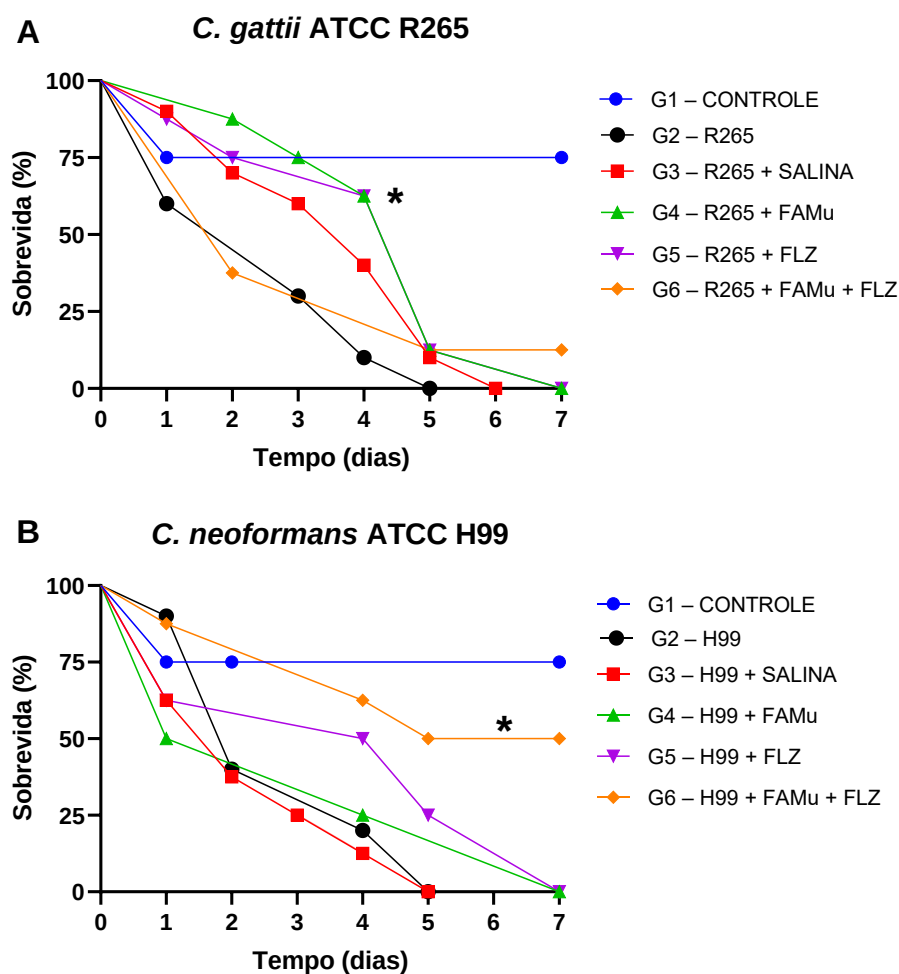
Nota: * $p < 0,05$

A Figura 25 mostra o efeito de diferentes tratamentos sobre a sobrevivência das larvas infectadas com *C. gattii* (Fig. 25A) e *C. neoformans* (Fig. 25B), ao longo de sete dias. Observamos que no grupo 2, composto por larvas que receberam inóculo e não foram tratadas, a sobrevivência caiu rapidamente, chegando a zero no 5º dia, média de sobrevivência semelhante à dos animais que receberam salina após infecção. Os animais que receberam a FAMu ou fluconazol tiveram a mesma média de sobrevivência, 5 dias, uma diferença significativa em relação aos animais não tratados ou que receberam somente salina ($p < 0,05$). A combinação de FAMU e fluconazol, mostrou um perfil de redução da sobrevivência semelhante ao de G5, sugerindo um efeito potencialmente sinérgico entre os dois compostos, porém, sem diferença significativa entre os grupos.

Quando observamos o comportamento das larvas infectadas com *C. neoformans* ATCC H99, no gráfico B, nota-se um padrão semelhante ao de *C. gattii*, mas com algumas diferenças notáveis. O grupo tratado com a combinação FAMU + fluconazol teve maior sobrevivência do que os demais grupos infectados, semelhante ao grupo controle, não infectado, (6,5 dias) ($p < 0,05$), reforçando a ideia de que a combinação dos compostos pode atuar sinergicamente para inibir o crescimento de *C. neoformans*. A sobrevivência deste grupo foi, inclusive, maior que a do grupo

que recebeu apenas a fração ($p<0,05$). Não houve diferença entre os grupos que receberam apenas FAMu ou fluconazol.

Figura 25 - Curvas de sobrevivência de larvas de *T. molitor* infectadas com 10^3 leveduras de *Cryptococcus*/larva e tratadas com FAMu e/ou FLZ na concentração inibitória mínima. (A) Larvas infectadas com *C. gattii* ATCC R265. (B) Larvas infectadas com *C. neoformans* ATCC H9.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: As larvas foram agrupadas em grupos de 15, infectadas com a concentração fúngica de 10^3 . O experimento foi repetido duas vezes, e as larvas foram agrupadas para formar curvas de sobrevivência com 30 animais. G1: Grupos de controle negativo, nos quais as larvas de *T. molitor* foram injetadas com salina; G2: Grupos de controle positivo, nos quais as larvas de *T. molitor* foram inoculadas apenas com fungos. * $p<0,05$

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a caracterização química e atividade antifúngica do extrato etanólico e frações produzidos partir das cascas de *Anacardium occidentale* e *Myracrodruon urundeuva*, duas plantas nativas do Brasil, pertencentes à família *Anacardiaceae*. A utilização de extratos vegetais é uma prática difundida na medicina tradicional, considerando que a fitoterapia é amplamente acessível e de baixo custo. Nesse contexto, *Anacardium occidentale* e *M. urundeuva* foram as escolhidas como duas representantes da flora brasileira, pois são amplamente reconhecidas por seu uso etnomedicinal, especialmente as cascas, utilizadas no tratamento de diversas infecções e neoplasias (Lucena *et al.*, 2012), além de propriedades antieméticas, diuréticas, antidiarreicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Coutinho; Travassos; Amaral, 2002; Castro *et al.*, 2011; Siracusa *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021).

Devido à complexidade envolvida na bioprospecção de plantas com atividade antifúngica, a literatura tem mostrado que o uso de plantas nativas que foram diretamente citadas para infecções e inflamações pode ser útil na busca por potenciais *Candidatos*, uma vez que as plantas medicinais sem essas indicações não demonstram boa atividade antimicrobiana (Silva *et al.*, 2020). Neste estudo, num primeiro momento, direcionamos nossa atenção para a investigação da atividade antifúngica do extrato etanólico e suas frações obtidas a partir das cascas de *Anacardium occidentale*.

Até onde sabemos, não há estudos sobre a caracterização química da FAAo das cascas de *A. occidentale* por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), embora existam alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana e a caracterização dos extratos brutos (Costa *et al.*, 2021; Encarnação *et al.*, 2024). Para selecionar uma fração para investigação mais detalhada, realizamos um ensaio de citotoxicidade com o objetivo de identificar frações eficazes contra microrganismos e seguras para uso em células hospedeiras. Notavelmente, a FAAo apresentou o maior índice de seletividade (IS) (16 a 32) contra as linhagens de *Candida* e *Cryptococcus*. Esses resultados são relevantes, pois um $IS > 10$ indica maior segurança da amostra testada e a torna uma boa *Candidata* para estudos *in vivo* (Bagla *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2013; Menezes; Campos, 2021).

Extratos com concentrações inferiores a 100 µg/mL apresentam grande potencial como novas fontes de agentes antimicrobianos para o combate a infecções fúngicas (Ríos; Recio, 2005). Em nosso estudo, a FAAo apresentou atividade antifúngica com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) contra as linhagens testadas que variaram entre 1,56 e 12,5

µg/mL. Esses resultados estão de acordo com os de Silva *et al.* (2020), que mostram que o extrato hidroetanólico de *A. occidentale* é eficaz contra *Candida* e *Cryptococcus*, com CIM abaixo de 1 µg/mL.

A atividade da FAAo contra linhagens de *Candida* e *Cryptococcus* pode estar relacionada à sua composição, que consiste principalmente em compostos fenólicos, sendo que estes podem atuar de forma sinérgica ou independente (Oliveira *et al.*, 2008; Gehrke *et al.*, 2013). É importante ressaltar que vários estudos indicam a presença abundante de polifenóis em todas as partes das plantas, estes que são os principais responsáveis pelos diversos efeitos antifúngicos dos extratos vegetais. Entre esses polifenóis, o ácido elágico e derivados do ácido cafeico têm sido consistentemente identificados (Freires *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2020). A fração acetato de etila extraída dos caules de *Myrcia hatschbachii* contém uma quantidade considerável de compostos fenólicos, sendo os mais importantes o ácido elágico e o ácido elágico 3-O-metil, e apresentou atividade fungistática ao inibir o crescimento de *C. albicans* a 15,6 µg/mL (Gatto *et al.*, 2021). A eficácia de produtos naturais contendo ácidos fenólicos contra *Candida* pode ser devido à sua capacidade de precipitar proteínas e às suas propriedades antioxidantes. Esses compostos provavelmente induzem alterações no metabolismo dos patógenos e, assim, contribuem para sua atividade anti-*Candida* (Araújo *et al.*, 2019).

Neste estudo, encontramos três classes de compostos fenólicos, principalmente catequinas, ácidos anacárdicos e cardanóis. Algumas catequinas importantes incluem o epigallocatequina galato, a epicatequina galato e a epicatequina. Outras catequinas como galato de catequina e o galato de galocatequina, também estão presentes na FAAo, em menor quantidade. A presença de catequinas foi associada à atividade anti-*Candida* do chá verde. As CIM de catequinas padrão (epigallocatequina galato) e purificadas foram semelhantes para *C. albicans* e *C. glabrata*, variando de 125 a 500 µg/mL (Anand; Rai, 2017). A eficácia de produtos naturais contendo ácidos fenólicos contra *Candida* pode ser atribuída à sua capacidade de precipitar proteínas e suas propriedades antioxidantes. Esses compostos provavelmente induzem alterações no metabolismo dos patógenos, contribuindo para sua atividade anti-*Candida* (Araújo *et al.*, 2019). Outro componente identificado é o ácido gálico (GA), um composto fenólico conhecido por seu potencial antimicrobiano e antiviral (Cordero *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2021). Testes *in vitro* mostraram as capacidades antifúngicas de amplo espectro do GA, sendo *C. albicans* o fungo mais sensível (CIM = 12,5 µg/mL). Além disso, experimentos

in vivo mostraram uma redução significativa na taxa de mortalidade no modelo de infecção por *C. albicans* em camundongos tratados com GA (Li *et al.*, 2017).

A composição dos metabólitos secundários varia de acordo com o órgão da planta. As catequinas, por exemplo, estão presentes apenas na casca do chá verde. Os extratos da casca podem ter um efeito mais forte do que os extratos das folhas devido às suas propriedades antifúngicas. As catequinas podem melhorar a eficácia de outros agentes antimicrobianos (Anand; Rai, 2017). Um estudo que investigou o potencial antifúngico do epigallocatequina galato contra 60 isolados de *Candida* e três linhagens ATCC encontrou valores baixos de CIM consistentes com nossa pesquisa (Behbehani *et al.*, 2019).

A FAAo atuou sinergicamente com o fluconazol contra *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. neoformans* ATCC H99. Um estudo anterior investigou a atividade antifúngica do epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) em combinação com fluconazol e com cetoconazol contra linhagens orais de *Candida*. A combinação de EGCG com esses azóis demonstrou uma atividade sinérgica (Behbehani *et al.*, 2019). No entanto, novos testes são considerados necessários para validar e confirmar esses resultados.

Os valores de CFM (Concentração Fungicida Mínima) da FAAo contra linhagens de *Candida* e *Cryptococcus* variaram de 3,12 a 50 µg/mL. Os ácidos anacárdicos também têm chamado a atenção por sua atividade antimicrobiana (Aslam *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021a). Silva *et al.* (2016) e Tscherner e Kuchler (2019) mostraram que o extrato etanólico de cascas, folhas e flores de *A. occidentale* apresentou atividade fungicida em uma concentração de 20 mg/mL contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, valores muito mais altos do que os encontrados neste estudo. Morais *et al.* (2017) relacionaram a composição e a estrutura dos ácidos anacárdicos à sua atividade antifúngica e mostraram que o ácido anacárdico monoeno apresenta uma CIM mais baixa do que os trienos e dienos. Os pesquisadores postularam que a atividade antifúngica está diretamente relacionada à lipofilicidade do agente antifúngico, uma propriedade essencial para penetrar nas membranas celulares de microorganismos lipofílicos (Morais *et al.*, 2017). Curiosamente, os ácidos anacárdicos monoinsaturados foram os mais abundantes entre os ácidos anacárdicos totais observados na FAAo, o que pode ser responsável pela atividade fungicida observada contra algumas espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

A FAAo inibiu a formação de biofilme em mais de 50% nas concentrações de 64 e 32 µg/mL para *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente. Foi demonstrado que os flavonoides estão envolvidos na ação antifúngica exibida pela fração acetato de etila de algumas plantas, conforme observado neste estudo (Fonseca *et al.*, 2022). Interessantemente, o cardanol de *A.*

occidentale demonstrou a capacidade de se ligar à quitina na parede celular de *C. albicans* (Mahata *et al.*, 2014). Os ácidos anacárdicos foram eficazes na redução do biofilme de *C. albicans*. Os resultados foram semelhantes aos da anfotericina B a 2 µg/mL (Araújo *et al.*, 2021). Alguns estudos mostram que o fluconazol pode agir *diretamente* nos biofilmes reduzindo a formação de hifas (Sudbery, 2011), e, uma vez que esta é a forma que tem capacidade de invadir tecidos, esta redução impacta na produção de novas células, diminuindo a quantidade desta nos biofilmes, também pode provocar alterações na matriz extracelular do biofilme (Panariello *et al.*, 2018). Estudos realizados com extratos hidroalcoólicos de *A. urundeuva* (Anacardiaceae) corroboram nossas descobertas sobre a ação de plantas dessa família na inibição da formação de biofilmes em linhagens de *Candida* (Bonifácio *et al.*, 2019).

Após a caracterização e análise da atividade antifúngica do extrato etanólico e das frações obtidas das cascas de *A. occidentale* contra as linhagens de *Candida* e *Cryptococcus* a investigação foi direcionada para o extrato e frações obtidos a partir das cascas de *M. urundeuva*. Nesta etapa, buscamos avaliar as propriedades antimicrobianas do extrato etanólico e suas frações, com o objetivo de compreender seu potencial antifúngico e citotóxico. Após a escolha da fração a ser trabalhada, a FAMu, realizamos uma série de experimentos. Isto posto, dado o impacto significativo de *Cryptococcus sp.* na saúde pública e os melhores resultados na triagem para esta levedura, decidimos investigar sua eficácia contra linhagens deste fungo e examinar possíveis mecanismos da FAMu.

Em um primeiro momento nós avaliamos a citotoxicidade e a ação anticriptocócica do extrato etanólico e frações obtidas das cascas desta planta. Os valores de CIM encontrados para as frações butanólica (6,25 µg/mL) e acetato de etila (3,12 µg/mL) colocaram estas duas frações como promissoras para o desenvolvimento de novos compostos. Um trabalho que avaliou a ação do extrato etanólico e/ou frações obtidos de cascas e folhas de *M. urundeuva*, contra isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com candidíase vaginal, observou que tanto o extrato quanto as frações acetato de etila e hidroalcoólicas derivadas das cascas apresentaram uma boa atividade contra os isolados, com CIM que variaram entre 4 e 512 µg/mL (Oliveira *et al.*, 2017). Esta ação pode ser creditada aos compostos presentes nos extratos das folhas e cascas de *M. urundeuva*, sendo que este apresenta uma composição ativa que inclui componentes como ácido gálico, taninos, ácido clorogênico e protocatecuico, saponinas e flavonoides (Mota *et al.*, 2015). Ao se testar o extrato etanólico das cascas, agora contra *Cryptococcus*, outro trabalho mostrou uma CIM de 12,5 µg/mL e, acredita-se que esta ação pode ser atribuída à presença de flavonoides e taninos (Jandú *et al.*, 2013). Esta grande variação nos ensaios biológicos pode ser

reflexo das mudanças provocadas pelas variações ambientais no desenvolvimento das plantas, que afetam a produção de uma ampla variedade de compostos químicos, especialmente os metabólitos secundários, além das características morfológicas de cada levedura testada. Como visto, na literatura, os relatos sobre ação anticriptocócica do extrato etanólico das cascas de *M. urundeuva* são escassos, mas o ensaio com a fração acetato de etila frente a linhagens de *Cryptococcus sp* é inédito.

A caracterização química da FAMu feita no presente estudo mostrou a presença de ácido gálico e derivados, ácido clorogênico, ácido elágico além das urundeuvinas (Castro *et al.*, 2020; Viana; Bandeira; Matos, 2003). Um estudo que avaliou a composição química do extrato metanólico das estruturas reprodutivas de *Octaviania asterosperma* revelou a presença de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, catequinas e ácido gálico, os quais, em testes *in vitro*, demonstraram atividade antifúngica contra espécies de *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, com valores de CIM variando entre 25 e 50 µg/mL (Sevindik *et al.*, 2021). Gehrke e colaboradores (2013) ao produzirem extrato metanólico, fração acetato e isolamento de composto das frações de *Schinus lentiscifolius* encontraram CIM de 100 µg/mL (ácido gálico) e 500 µg/mL (fração acetato de etila) contra *Cryptococcus neoformans*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que as células fúngicas tratadas com FAMu apresentaram o início do declínio da viabilidade celular a partir das 12 horas na concentração CIM e, essa redução foi progressiva, inibindo 100% das mesmas, a partir das 24 horas, uma eliminação de *Cryptococcus sp.* dose-dependente. Azam e colaboradores (2022) também encontraram uma redução dose-dependente em estudo *in vitro* com ácido elágico, composto presente na FAMu, contra *C. neoformans*.

Ao avaliarmos a capacidade da FAMu de alterar a composição da membrana fúngica, cuja estrutura lipídica é, predominantemente, composta por esteróis e representa o alvo mais comum de drogas anticriptocócica (Casadevall *et al.*, 2019), percebemos que ela foi capaz de reduzir o teor de ergosterol (Figura 20). Taninos e outros polifenóis naturais podem inibir o crescimento de leveduras, especialmente por alterar componentes da membrana celular. De forma semelhante ao nosso estudo, um trabalho mostrou que a punicalagina, um composto fenólico obtido da planta *Lafoensia pacari*, induz danos em *C. gattii* e *C. albicans* ao reduzir o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática da levedura, sem causar ruptura completa dessa membrana (Silva *et al.*, 2020). A oleuropeína, um composto fenólico, foi capaz de reduzir em 28% o conteúdo total de esteróis na membrana de *C. albicans* na maior concentração testada. E, a fisetina, um polifenol vegetal, diminuiu a quantidade de ergosterol em isolados do

complexo de espécies *C. neoformans* (Zoric *et al.* 2016; Reis *et al.* 2016). O ácido gálico, um precursor natural usado pelas plantas na síntese de taninos, mostrou atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Trichophyton rubrum*, atuando sobre o ergosterol e inibindo enzimas chave da sua biossíntese (Santos *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2018).

A seguir, foi observado que a FAMu provoca peroxidação lipídica nas células, com níveis elevados de TBARS após 24 horas de tratamento, para *C. gattii* ATCC R265 e *C. neoformans* ATCC H99 em comparação com o controle de crescimento, indicando dano nos lipídios, como visto noutro estudo utilizando a fração acetato de etila do extrato das folhas *X. prockia* (Folly *et al.*, 2020). Ao investigar a influência das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) na tolerância das linhagens de *Cryptococcus* à fração FAMu, realizamos experimentos com inibidores específicos dessas enzimas, 3-AT e DETC, respectivamente, ambos em combinação com a FAMu. Os resultados revelaram um efeito sinérgico entre a FAMu, 3-AT e DETC para *C. gattii* ATCC R265, enquanto nas linhagens de *C. neoformans*, a interação com DETC foi indiferente. Combinados, estes resultados sugerem que a FAMu pode estar intensificando o estresse oxidativo nas células de *C. gattii*, através da peroxidação lipídica, o que compromete a viabilidade das células fúngicas, aliado ao sinergismo com 3-AT sugerindo que, ao inibir essa via de defesa antioxidante, a fração FAMu se torna mais eficaz, reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no efeito antifúngico da FAMu. De modo semelhante, Ferreira e cols. (2013) observaram que o itraconazol gera estresse oxidativo significativo logo no início do tratamento contra *C. gattii*, contribuindo para seu efeito antifúngico. Porém, as células que conseguem sobreviver ao início do tratamento aumentam sua atividade antioxidante como uma adaptação para resistir ao itraconazol.

Estudos anteriores indicam que alguns compostos fenólicos, como os ácidos cinâmico, benzoico, gálico e cafeico; punicalagina, catequina e galato de epigallocatequina, podem potencializar a atividade antifúngica de azóis, especialmente fluconazol e itraconazol, contra *Candida spp.* (Lima *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2018). Esse efeito sinérgico pode ser explicado pela similaridade nos mecanismos de ação dos fenólicos e dos azóis contra *Candida*, ambos atuando na permeabilidade da membrana celular (Martins *et al.*, 2011).

O ácido gálico, em particular, aumenta a fluidez da membrana ao quelar cátions divalentes, devido à presença de grupos fenólicos hidroxila e carboxila em sua estrutura química, resultando em vazamento de citoplasma e outros componentes celulares. Esse aumento na fluidez torna a membrana mais suscetível à ação de espécies reativas de oxigênio

(EROs), favorecendo a peroxidação lipídica. Em ambientes ricos em EROs ou sob condições de estresse oxidativo, o ácido gálico pode, assim, agir como um pró-oxidante, potencializando a peroxidação lipídica e contribuindo para a desestabilização da membrana (Rocha *et al.*, 2019).

A cápsula de *Cryptococcus* protege contra o estresse oxidativo, sendo que seu aumento de tamanho reforça essa proteção (Zaragoza *et al.*, 2008). Além disso, a cápsula de *C. neoformans* contribui para a virulência por proteger as células de levedura contra a ação fagocítica. E, caso a levedura seja fagocitada, a cápsula também contribui para a resistência ao estresse oxidativo, um fator chave na degradação fagolisossomal (Casadeval *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, a análise morfométrica mostra que a FAMu, em concentração sub-inibitória, reduziu a razão cápsula/diâmetro celular em três das quatro linhagens de *Cryptococcus*, sugerindo interferência na produção ou manutenção da cápsula, diminuindo as defesas da célula fúngica. Um estudo, com modelo murino, mostrou que o fluconazol provoca alterações na cápsula polissacarídica de *C. gattii* como uma adaptação ao estresse celular causado por este agente antifúngico (Santos *et al.*, 2014). Qian e cols. (2024) mostraram que o tratamento com isobavachalcona (IBV), um flavonoide, presente em *Psoralea corylifolia* foi capaz de provocar uma diminuição notável na síntese de cápsulas em amostras tratadas com ½ CIM ou CIM, e, mais, no grupo tratado com ¼ CIM e ½ CIM de IBC, o diâmetro da cápsula de *C. neoformans* ATCC H99 foi reduzido em 64,77% e 82,56% em comparação ao grupo controle, respectivamente.

No potencial Zeta, a FAMu também altera a carga presente na superfície das células, exceto em *C. neoformans* ATCC WM626, com efeito dependente da concentração. A redução do potencial Zeta pode indicar mudanças na parede celular e na cápsula, comprometendo a defesa fúngica. Assim, a FAMu parece agir em múltiplos níveis, prejudicando a cápsula e carga na superfície da célula e, potencialmente, facilitando a ação imunológica do hospedeiro (Ferreira *et al.*, 2013; Folly *et al.*, 2020).

Para avaliação da toxicidade da FAMu, em modelo *in vivo*, foi utilizada o *T. molitor*. Este inseto holometabólico apresenta vantagens como modelo para estudo de patógenos fúngicos humanos, pois, em sua fase larval, suporta incubação a 37 °C, condição que estimula a expressão de fatores de virulência, como a formação de hifas invasivas em *C. albicans* e a adaptação de *Cryptococcus*. Outros modelos, como *D. melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, não toleram temperaturas tão elevadas (Souza *et al.*, 2015; Villis *et al.*, 2021). *T. molitor* foi utilizado como organismo modelo para avaliar a toxicidade de um extrato etanólico de *Caryocar brasiliense*, isoladamente e em combinação com fluconazol, que seriam testados

contra *Candida auris*. Os ensaios realizados incluíram a análise de atividade hemolítica e testes de toxicidade aguda, resultando na observação de ausência de toxicidade significativa (Retore *et al.*, 2024).

Nosso estudo demonstrou que a FAMu foi capaz de aumentar, significativamente, a sobrevida das larvas infectadas. No grupo infectado com *C. neoformans* ATCC H99, combinação de FAMu com fluconazol (2xCIM) aumentou a sobrevivência, com média de 6 dias, em comparação com os grupos não tratados ou tratados isoladamente. Enquanto isso, nos grupos de *C. gattii* ATCC R265, a sobrevida média foi de 5 dias. Esses achados sugerem que a combinação terapêutica (FAMu + fluconazol) apresenta uma eficácia diferenciada conforme a espécie de *Cryptococcus*, e, neste trabalho, a combinação foi mais efetiva para as larvas infectadas com *C. neoformans*. Esse resultado destaca a necessidade de investigações adicionais para entender os mecanismos que levam a essa variação na resposta entre as espécies.

De modo semelhante, um estudo que avaliou a eficácia da fração acetato do extrato etanólico de *Punica granatum* contra *Cryptococcus spp.* encontrou diferentes efeitos da combinação fração + fluconazol nas linhagens estudadas, mostrando uma efetiva ação antifúngica da fração (Villis *et al.*, 2021). Outro estudo mostrou que o tratamento com extrato hidroalcoólico de *Terminalia catappa* (TcHE), em diversas concentrações, resultou em 100% de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com *C. albicans*, o que indica a eficácia do TcHE contra o patógeno, inclusive em combinações sinérgicas com fluconazol (FLZ) (Mendonça *et al.*, 2020). Em um estudo que utilizou o extrato hexânico (HE) de *S. tuberosa*, observou que a maioria das larvas de *T. molitor* infectadas com *C. gattii* e tratadas com PBS morreu em 1 dia, com tempo médio de sobrevivência de 1,225 dias e, que das larvas infectadas com *C. neoformans*, cerca de 50% morreram após 5 dias, média de 5,334 dias. O tratamento com HE aumentou significativamente a sobrevida média das larvas infectadas com *C. gattii* para 3,882 dias. Entretanto, de modo diverso ao observado em nosso estudo, o extrato não foi eficaz contra *C. neoformans*, e as larvas tratadas com HE morreram significativamente mais rápido que as do grupo controle (Cordeiro *et al.*, 2020).

Finalmente, a continuidade dos estudos sobre o uso das frações de acetato de *M. urundeuva* e de *A. occidentale* no combate a infecções por *Candida* e *Cryptococcus* será essencial para identificar com maior precisão os mecanismos de ação e outros fatores que influenciam sua eficácia. A combinação de análises da caracterização química e microbiológicas, associada, futuramente, a dados clínicos, certamente contribuirá para o avanço do conhecimento sobre o potencial antifúngico dessas frações, permitindo identificar

indicadores promissores para o desenvolvimento de novas terapias que apoiem o controle eficaz dessas infecções e atendam às necessidades de saúde pública.

8 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a fração acetato dos extratos etanólico das cascas de *A. occidentale* (FAAo) e *M. urundeuva* (FAMu) possuem interessante atividade antifúngica. Neste trabalho, o IS destas duas frações foi o fator primordial para a escolha delas para a continuidade do estudo, e o baixo valor de concentração inibitória mínima encontrado nos testes de sensibilidade antifúngica mostrou que, de acordo com a literatura, pode ser considerado promissor.

Os compostos fenólicos encontrados no FAAo têm atividade *in vitro* contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. Nos ensaios de cinética de morte mostrou um comportamento tempo-dependente, além de apresentar sinergismo com fluconazol contra algumas espécies de *Candida*. E, ainda, mostrou ser capaz de inibir a formação do biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* em baixas concentrações.

De forma semelhante, compostos fenólicos presentes na FAMu apresentaram atividade *in vitro* contra *Candida* e *Cryptococcus*, e mostrou ser dose-dependente contra todas as linhagens testadas no ensaio de curva de morte. Nos experimentos sobre o mecanismo de ação, foi possível observar que a FAMu foi capaz de alterar o conteúdo de ergosterol, provocar peroxidação lipídica, induzir mudanças na cápsula do *Cryptococcus* e alterar o potencial Zeta das células fúngicas, deixando o fungo mais vulnerável, ajudando na erradicação da infecção. Nos ensaios *in vivo*, com *T. molitor*, a FAMu apresentou baixa toxicidade e foi eficaz no controle da doença, aumentando a sobrevivência das larvas infectadas com *Cryptococcus*.

Diante dos resultados obtidos, acreditamos que as frações acetato de *A. occidentale* (FAAo) e *M. urundeuva* (FAMu) demonstram grande potencial como fontes promissoras de moléculas bioativas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate a micoses, especialmente em infecções causadas por *Candida* e *Cryptococcus*. Essas frações podem contribuir para ampliar o arsenal antifúngico, oferecendo alternativas eficazes para o controle de patógenos resistentes e melhorando as opções de tratamento disponíveis, seja como terapias isoladas ou em combinação com antifúngicos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.
- ADEJUMO, T.; OTUONYE, A. The use of botanicals in the control of inflorescence blight disease of cashew, *Anacardium occidentale*. **Nigr. J. Sci.**, v.36, p.75–80, 2002.
- ADEWALE, B. *et al.* Genetic estimates and trend analysis of some growth parameters of cashew (*Anacardium occidentale* L.) as influenced by nine nutrient combinations. **J. Agric.Biotechnol. Sustain.**, v. 5, n. 1, p. 6, 2013.
- AGUSTINHO, D. P. *et al.* Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180040, 2018.
- AGWU, E. The idiosyncrasy of oropharyngeal yeast response to antifungal agents used as prophylaxis by HIV infected patients in South-Western Uganda. **Spec Fung Pathog J.**; v.1, p.1-22, 2021.
- AKINWALE, T.; OLUBAMIWA, O.; AJAV, E. Cottage processing of cashew apple juice in Nigeria: Physico-chemical and sensory evaluation of product. **J. Food Technol. Afr.**, v. 6, n. 2, p. 56-58, 2001
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *et al.* Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57, p. 57-64, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.
- ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. L. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: an emerging perspective. **J Fungi.**; v. 4, n. 4, p. 140, 2018.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**. v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015.
- ALMIRANTE, B. *et al.* Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- ALVES, G. S. *et al.* Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509-515, 2016.

ALVES, R.R. *et al.* Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Manag. Sci.**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.

ANAND, J.; RAI, N. Anti*Candidal* synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. **J Mycol Med.**, v. 27, n. 1, p. 33-45, 2017.

ANDRADE JÚNIOR, F. P. *et al.*, Antibacterial and antifungal potential of extracts of *Anacardium occidentale*. **Periódico Tche Química**, v.8, n.15, p.313-320, 2018.

ANGULO, G. B; ESCORZA, C. A; GONZÁLEZ, N. F. M. Actualidades y tendencias en la etiología de las meningoencefalitis causadas por hongos y bacterias (1980-2004). **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, v. 52, n. 4, p. 240-245, 2005.

ARAÚJO, A. R. *et al.* Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. **J Ethnopharmacol.**; v. 240, p. 111941, 2019.

ARAÚJO, G. S. *et al.* Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus spp.* Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. **Plos One**, v. 7, n. 1, p.29561, 2012.

ARAÚJO, J. T. C. *et al.* Development of anacardic acid-loaded zein nanoparticles: Physical chemical characterization, stability and antimicrobial improvement. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, p. 115808, 2021.

ARECHAVALA A. I. *et al.* Fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. **Rev Iberoam Micol.**, v. 26, n. 3, p. 194-197, 2009.

ARENDROP, M.C., PATTERSON, T.F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J. Infect. Dis.** v. 216, n. suppl_3, p. S445-S451, 2017.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2081-2085, 2000.

ASLAM, N. *et al.* Exploring the potential of cashew waste for food and health applications - A review. **Future Foods**, p.100319, 2024.

AZAMBUJA, A. Z. *et al.* Cryptococcal meningitis: a retrospective cohort of a Brazilian reference hospital in the post-HAART era of universal access. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 2018, n. 1, p. 6512468, 2018.

BADDLEY J. W. *et al.* Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 937-943, 2008.

BADDLEY, J. W.; FORREST, G. N. Infectious diseases community of practice. cryptococcosis in solid organ transplantation-guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clin Transplant**; v. 33, n. 9, p. e13543, 2019.

BADDOUR, L. M.; PERFECT, J. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Successful use of amphotericinB lipid complex in the treatment of cryptococcosis. **Clin Infect Dis**; v. 40, n. Supplement_6, p. S409-S413, 2005.

BAGLA, V. P. *et al.* Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complement Altern Med.**, v. 14, p. 1-6, 2014.

BALTACI, N.; KALKANCI, A. Demonstration of mutation development and virulence change in reference *Candida* strainsexposed to caspofungin. **J Basic Clin Health Sci.**, v. 5, n. 2, p. 115-123, 2021.

BANERJEE, M. *et al.* Filamentation Is Associated with Reduced Pathogenicity of Multiple Non-*albicans* *Candida* species. **mSphere**, v.4, n.5, p.e00656-19, 2019.

BAPTISTA, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* l.), cajui (*Anacardium microcarpum*), and pequi (*Caryocar brasiliense* c.): A systematic review. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2018, n. 1, p. 3753562, 2018.

BARBOSA FILHO, V. M. *et al.* Phytocompounds and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajui) on antibiotic drugs used in clinical infections. **Drug Des Devel Ther.**, v.9, p.5965–72, 2015.

BAUMGARDNER, D. J. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. **J. Patient-Cent. Res. Rev.**, v. 6, n. 4, p. 252, 2019.

BEHBEHANI, J. M. *et al.* Synergistic effects of tea polyphenol epigallocatechin 3-O-gallate and azole drugs against oral *Candida* isolates. **J Mycol Med.**, v. 29, n. 2, p. 158-167, 2019.

BENADUCCI, T. *et al* Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an alternative model. **Front Microbiol**, v.7, n. 290, 2016.

BENEDICT, K.; WHITHAM H.K.; JACKSON B. R. Economic Burden of Fungal Diseases in the United States. **Open Forum Infect Dis.**, v.9, n.4, p.ofac097, 2022.

BERGMAN, A.; CASADEVALL, A. Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. **MBio.**; v. 1, n. 5, p.e00212–10, 2010.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res.**, v. 16, n. 1, p. fov106, 2016.

BILLMYRE, R. B. *et al.* 5-fluorocytosine resistance is associated with hypermutation and alterations in capsule biosynthesis in *Cryptococcus*. **Nat Commun.** v. 11, n. 1, p. 127, 2020.

BITU, V. D. C. N. *et al.* Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 172, p. 265-272, 2015.

BOEKHOUT, Teun *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891-907, 2001.

BONIFÁCIO, B. V. *et al.*, Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, p. 2642, 2019.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.*, Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn**; v. 19, p. 478-487, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 2ª edição. Brasília: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico>. Acesso em: ago. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/arquivos/2014/renisus.pdf>. Acesso em; ago. 2024

BRIMACOMBE, C. A.; SIEROCINSKI, T; DAHABIEH, M.S. A white-to-opaque-like phenotypic switch in the yeast *Torulaspora microellipsoides*. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 86, 2020.

BROCK, M. Fungal metabolism in host niches. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 12, n. 4, p. 371-376, 2009.

BROWN, A.J. *et al.* Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels, **Trends Microbiol.**, v. 22, n. 11, p. 614-622, 2014.

BRUNTON, L.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, 2011.

CÂMARA, C. R. S. *et al.* Histone acetylation increases in response to ferulic, gallic, and sinapic acids acting synergistically *in vitro* to inhibit *Candida albicans* yeast-to-hyphae transition. **Phytother Res.** v. 33, n. 2, p. 319-326, 2019.

CARMO, F. N. *et al.*, *Cryptococcus spp.* and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Braz J Microbiol.**, v. 53, n. 3, p. 1321-1337, 2022.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil,” **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicine. **J Ethnopharmacol**; v. 212, p. 29-35, 2018.

CARVALHO, R. S. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **S Afr J Bot** 114:181–187, 2018.

CASADEVALL, A. *et al* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822-831, 2019.

CASADEVALL, A. *et al.* Characterization of a Muring Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a *Candidate* for Human Therapeutic Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437–46, 1998.

CASADEVALL, A.; PERFECT J. R. *Cryptococcus neoformans*. **ASM Press**, Washington DC, 1998.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY antifungal surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 85, n. 2, p. 200-204, 2016.

CASTRO, C.B. *et al.* Metabolomics-Based Discovery of Biomarkers with Cytotoxic Potential in Extracts of *Myracrodruon urundeuva*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, n. 4, p. 775-787, 2020.

CASTRO, J. A. *et al.* Ethnobotanical study of traditional uses of medicinal plants: the flora of caatinga in the community of Cravo India-BA, **Brazil. J. Med. Plants Res.** v. 5, n. 10, p. 1905-1917, 2011.

CASTRO-JIMÉNEZ, M. A. *et al.* Diagnóstico de micosis oportunistas en pacientes con VIH/sida: un estudio de casos en Colombia. **Infectio**, v. 15, n. 2, p. 92-97, 2011.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Front. Med.**, v. 5, p. 28, 2018.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.**; v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: arole for polyenes. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 3, p. 457-465, 2011.

CHANG, W. C. *et al.* Pulmonary cryptococcosis: comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients. **Chest**, v. 129, n. 2, p. 333-340, 2006.

- CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol.**; v. 14, n. 7, p. 4912-4919, 1994.
- CHAYAKULKEEREE, M. *et al.* SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1088-1101, 2011.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.**, v.20, n.3, p.507-44, 2006.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014.
- CHERNIAK, R.; JONES, R. G.; REISS, E. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydr Res.**; v. 172, n. 1, p. 113-138, 1988.
- CHEW, S. Y.; CHEE, W. J. Y.; THAN, L. T. L. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: Perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biomed. Sci.**, v. 26, p. 1-10, 2019.
- CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research.**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2008.
- CNIP - Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Aroeira, BRASIL, 2014. Disponível em: <http://www.cnip.org.br/> . Acesso em: ago. de 2023.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Hindawi Publishing Corporation**, v.2013, p.1-24, 2013.
- CORDEIRO, B. M. P. C. *et al.* Anticryptococcal activity of hexane extract from *Spondias tuberosa* Arruda and associated cellular events. **J Mycol Med.**, v. 30, n. 2, p. 100965, 2020.
- CORDEIRO, B. M. P. *et al.* Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, p. 1-10, 2018.
- CORDERO, R. J. B, *et al.* Impact of yeast pigmentation on heat capture and latitudinal distribution. **Curr Biol.**, v. 28, n. 16, p. 2657-2664, 2018.
- CORTES, J. C. G. *et al.* The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnol. Adv.**, v. 37, n. 6, p. 107352, 2019.

COSTA, A. R. *et al.* *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 280-286, 2017.

COSTA, A. R. *et al.*, Phytochemical profile and anti-*Candida* and cytotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree), **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102192, 2021.

COSTA, A. R. *et al.*, Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts, **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 355-364, 2020.

COSTA, O. B., *et al.* Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. **International Journal of Forestry Research**, v. 2014, n. 1, p. 982576, 2014.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. *Candida albicans* anti-fungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 154, 2020

COTTIER, F.; HALL, R. A. Face/off: the interchangeable side of *Candida albicans*. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, p. 471, 2020.

COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; AMARAL, F. M. M. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Indian communities from maranhão-Brazil. **Visão Acadêmica**, v.3, p.7–12, 2002.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

CUOMO, C.A.; RHODES, J.; DESJARDINS, C. A. Advances in *Cryptococcus* genomics: insights into the evolution of pathogenesis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170473, 2018.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence factors of *Candida spp.* and host immune response important in the pathogenesis of Vulvovaginal candidiasis. **Int J Mol Sci.**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022.

DADAR M. *et al.* *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. **Microb Pathog.**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DAVEL, G.; CANTEROS, C. E. Situación de las micosis en la República Argentina. **Rev Argent Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 28-33, 2007.

DEMING, M. *et al.* Cognitive biases and knowledge deficits leading to delayed recognition of cryptococcal meningitis. **IDCases**, v.18, p.e00588, 2019.

- D'ENFERT C. *et al.* The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev.** v. 45, n. 3, p.fuaa060, 2021.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.
- DEORUKHKAR, S. C.; ROUSHANI, S. Virulence traits contributing to pathogenicity of *Candida* species. **J. Microbiol. Exp**, v. 5, n. 1, p. 00140, 2017.
- DESAI, A. R. **Molecular diversity and phenotyping of selected cashew genotypes of Goa, and physiological response of cv. GOA-1 to in situ moisture conservation.** 2008. Thesis (PhD in Agricultural Sciences) – University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2008.
- DHINGRA, S.; CRAMER, R. A. Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. **Microbiol Frontal**, v. 8, p. 92, 2017.
- DIATTA, K. *et al.* Ethnobotanic survey of Aids opportunistic infections in the Ziguinchor District, Sénégal. **Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1-2, p. 1-10, 2019.
- DING, H. *et al.* Networks of fibers and factors: regulation of capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **F1000Res**, v.5, 2016.
- DOMINGUEZ, E. *et al.* Conservation and divergence in the *Candida* species biofilm matrix mannanglucan complex structure, function, and genetic control. **mBio**, v. 9, n. 2, p.e00451-18, 2018.
- DOMINGUEZ, E. *et al.* Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in *Candida auris* drug resistance. **mSphere**, v. 4, n. 1, p. e00680-18, 2019.
- DOUGLAS, L. M.; KONOPKA, J. B. Fungal membrane organization: the eisosome concept. **Annu Rev Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 377-393, 2014.
- DU, L. *et al.* Systemic review of published reports on primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent patients. **Mycopathologia**; v. 180, p. 19-25, 2015.
- DU, X. *et al.* Dynamic study of oral *Candida* infection and immune status in HIV infected patients during HAART. **Arch. Oral Biol.**, v. 115, p. 104741, 2020
- DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**; v. 112, p. 4-29, 2016.
- EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis.**; v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.
- ELLEPOLA, A. N. *et al.* The postantifungal effect of nystatin and its impact on adhesion attributes of oral *Candida dubliniensis* isolates. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 56-63, 2014.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J Antimicrob Chemother.**; v. 49, n. suppl_1, p. 7-10, 2002.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*) **Am. J. Hyg**, v.62, p.227–232, 1955.

ENCARNAÇÃO, S. *et al.* An Integrated Approach to the Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Genotoxic Potential of Portuguese Traditional Preparations from the Bark of *Anacardium occidentale* L. **Plants**, v. 13, n. 3, p. 420, 2024.

ENCARNAÇÃO, S. *et al.* *Anacardium occidentale* Bark as an Antidiabetic Agent. **Plants**, 11, 2637, 2022.

ENCARNAÇÃO, S. *et al.* Evaluation of the Safety of a Traditional Herbal Formulation with *Anacardium occidentale* Bark. **Planta Med.**, v. 78, n. 11, p. PI379, 2012.

ENCARNAÇÃO, S. *et al.* Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of an *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation, **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 171-178, 2016.

FAN, S. *et al.* Vaginal allergic response in women with vulvovaginal candidiasis. **Int J Gynecol Obstet**; v. 101, n. 1, p. 27-30, 2008.

FANOS, V.; CATALDI, L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. **J. Chemother.** v. 12, n. 6, p. 463-470, 2000.

FASCIANA, T. *et al.* *Candida auris*: An overview of how to screen, detect, test and control this emerging pathogen. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 11, p. 778, 2020.

FENG, W. *et al.* Cotreatment with aspirin and azole drugs increases sensitivity of *Candida albicans* *in vitro*. **Infect Drug Resist.**, v.14, p.2027-38, 2021.

FERREIRA, G. F *et al.* Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 59, n. 8, p. 4600-4609, 2015.

FERREIRA, G. F.; *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 8, p. 1801-1811, 2013.

FERREIRA, M. J. G. *et al.* Antimicrobial activity of the aqueous extract and fractions from the leaf of the aroeira-do-sertão. **Sci. Plena**, v. 17, n. 5, 2021.

FIDEL JUNIOR P. L. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **Am J Reprod Immunol**; v. 57, n. 1, p. 2-12, 2007.

FIRACATIVE, C. *et al.* Latin American Cryptococcal Study Group. The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.113, n.7, p.e170554, 2018.

- FOLLY, M. L. et al. Evaluation of *in vitro* Antifungal Activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) Leaves Against *Cryptococcus* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3114, 2020.
- FONSECA, S. T. D. et al. Flavonoid-rich fractions of *Bauhinia holophylla* leaves inhibit *Candida albicans* biofilm formation and hyphae growth. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1796, 2022.
- FRANZOT, S.P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.
- FRASER, J. A. et al Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360-1364, 2005.
- FRASES S. et al. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 4, p. 1228-1233, 2009.
- FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **J Mycol Med.**, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016.
- FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathog.**; v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.
- GAGO, S. et al. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. **Mycoses.**; v. 60, n. 1, p. 40-50, 2016.
- GALOCHA, M. Divergent Approaches to Virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two Sides of the Same Coin. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 9, p. 2345, 2019.
- GALVÃO, W. A. et al Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to Chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018.
- GAONA-FLORES, V. A. et al. The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: a 10-year retrospective review. **Med Mycol.**, v. 54, n. 6, p. 600-604, 2016.
- GARCIA, M. C. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PLoS One**; v. 6, n. 3, p. e17632, 2011.
- GARCIA-RUBIO, R. et al. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Front. Microbiol.** v. 10, p. 2993, 2020.
- GASSIEP, I. et al. Cryptococcal infections over a 15 year period at a tertiary facility & impact of guideline management. **Mycoses**, v. 61, n. 9, p. 633-638, 2018.
- GATTO, L. J. *Myrcia hatschbachii*: antifungal activity and structural elucidation of ellagic and 3-O-methyl ellagic acids. **Nat Prod Res.**, v.35, n.23, p.5540-5543, 2021.

GEHRKE, I. T. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **J Ethnopharmacol.**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GILBERT, N.M.; LODGE, J. K.; SPECHT, C. A. The cell wall of *Cryptococcus*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect J, Casadevall A, editors. *Cryptococcus From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington: **ASM Press**. p. 67–79, 2011.

GOLDBERG, D. E. *et al.* HIV-associated retinopathy in the HAART era. **Retina**; v. 25, n. 5, p. 633-649, 2005.

GOLDMAN, D. L. *et al.* Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e66-e66, 2001.

GÓMEZ-GAVIRIA M.; MORA-MONTES H. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infect Drug Resist.**, v.10, n.13, p. 1673-1689, 2020.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; RAMÍREZ-SOTELO, U.; MORA-MONTES, H. M. Non-*albicans* *Candida* species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies. **J Fungi (Basel)**., v. 9, n. 1, p. 11, 2022.

GONÇALVES, B. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbi-ology and risk factors. **Crit Rev Microbiol.**; v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GOW N. A. *et. al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 112-122, 2012.

GOW, N. A. R., LENARDON, M. D. Architecture of the dynamic fungal cell wall. **Nat Rev Microbiol.**, v. 21, n. 4, p. 248-259, 2023.

GRAY, K. C. *et al.* Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2234-2239, 2012.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York, 1994.

GRIMSHAW, A. *et. al.* Cryptococcal infections in children: retrospective study and review from Australia. **Future Microbiol**, v. 14, n. 18, p. 1531-1544, 2019.

GRUBB, S. E.W. *et al.* *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4370-4377, 2008.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5-10, 2014.

GUSA, A. *et al.* Transposon mobilization in the human fungal pathogen *Cryptococcus* is mutagenic during infection and promotes drug resistance *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 18, p. 9973-9980, 2020.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 35, n. 2, p. 493-514, 2021.

HACIOGLU, M.; OYARDI, O.; KIRINTI, A. Oregano essential oil inhibits *Candida* spp. biofilms. **Z Naturforsch C J Biosci.**, v. 76, n. 11-12, p. 443-450, 2021.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 2015.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569-8590, 2015.

HANAOKA, M.; DOMAE, E. IL-1- released from oral epithelial cells upon *Candida* lysin exposure initiates an early innate epithelial response. **Int. Immunol.** v. 33, n. 3, p. 161-170, 2021.

HANI, L. *et al.*, Candidiasis: a fungal infection-current hallenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 42-52, 2015.

HARLEY, B. K. *et al.* Antifungal Activities of Phytochemically Characterized Hydroethanolic Extracts of *Sclerocarya birrea* Leaves and Stem Bark against Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strains Benjamin. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 4261741, 2022.

HARRINGTON, R. *et al.* Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients. **Curr Med Res Opin.**, v. 33, n. 10, p. 1803-1812, 2017.

HARSINI, H. P. Extract Ethanolic Skin Young Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn) as a Softening Material against Daya Perlekatan *C. albicans* on Plate Resin Acrylic. **Majalah Kedokteran Gigi Indonesia**, v.18, p.137–40, 2016.

HASIM, S.; COLEMAN, J. J. Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. **Future Med Chem.**, v. 11, n. 8, p. 869-883, 2019.

HASSAN, Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. **J Fungi (Basel)**. v. 7, n. 8, p. 667, 2021.
HEISS, C. *et al.* The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid. **Carbohydr Res.**, v. 344, n. 7, p. 915-920, 2009.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol.**, v. 13, p. 25-32, 2019.

HERRERO, E. Evolutionary relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and other fungal species as determined from genome comparisons. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 22, n. 4, p. 217-222, 2005.

HOMMEL, B. *et al.* Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. **PLoS Pathog.**, v. 14, n. 5, p. e1006982, 2018.

HOWARD-JONES, A. R. *et al.* Pulmonary Cryptococcosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1156, 2022

JANDU, J. J. B. *et al.* *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agente. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 7, n. 8, p. 413-418, 2013.

JOTHI, R. *et al.* Catechol thwarts virulent dimorphism in *Candida albicans* and potentiates the antifungal effi-cacy of azoles and polyenes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21049, 2021.

JOVIĆ, Z. *et al.* Clinical pharmacokinetics of second-generation triazoles for the treatment of invasive aspergillosis and candidiasis. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet.**, v. 44, p. 139-157, 2019.

KADOSH, D. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 73, p. 4265-4278, 2016.

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* species. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.

KARYGIANNI, L. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends Microbiol.**, v. 28, n. 8, p. 668-681, 2020.

KASPER, L. *et al.* The fungal peptide toxin *Candidalysin* activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. **Nat. Commun.** v. 9, n. 1, p. 4260, 2018.

KAWAI, A.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. *In vitro* efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole Against non-albicans *Candida* species biofilms. **J. Infect. Chemother.**, v. 21, n. 9, p. 647-653, 2015.

KHAN, M. S. *et al.* Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-15, 2020.
KHODAVANDI, A. *et al.* *In vitro* Investigation of Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Azoles Against *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 169, p. 287-295, 2010.

KHYRIEM, A. B.; SUJATHA, S.; PARIJA, S. C. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 49, n. 2, p. 307-308, 2006.

KIILL, L. H. P., MARTINS, C. T. V. D., SILVA, P. R. Reproductive biology of two species of *Anacardiaceae* from the caatinga threatened with extinction. **J. Appl. Oral Sci.**, v.6, p.538, 2010.

KON, A. S. *et al.* Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008

KOSELNY, K. *et al.* A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. **mBio**, v. 9, n. 4, p. 10.1128/mbio.01204-18, 2018.

KULLBERG B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **N Engl J Med**. v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

KUMAR, S. *et al.* Overview on the Infections Related to Rare *Candida* species. **Pathogens**. v. 11, n. 9, p. 963, 2022.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **MSphere**, v.2, n.01, p.:2, 2017.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 821-833, 1976.

LABBÉ, A. C. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 20, n. 2, p. 45-50, 2009.

LANTERNIER, F. *et al.* Cellulitis revealing a cryptococcosis-related immune reconstitution inflammatory syndrome in a renal allograft recipient. **Am J Transplant**; v. 7, n. 12, p. 2826-2828, 2007.

LARA-AGUILAR, V. *et al.* Adaptation of the emerging pathogenic yeast *Candida auris* to high caspofungin concentrations correlates with cell wall changes. **Virulence**.; v. 12, n. 1, p. 1400-1417, 2021.

LEIMANN, B. C.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994–2004. **Cad Saude Publica**, v.24, n.11, p.2582–2592, 2008.

LEMA, V. M. Recurrent Vulvo-Vaginal Candidiasis: Diagnostic and Management Challenges in a Developing Country Context. **Obstet. Gynecol. Int. J.**, v. 7, n. 5, p. 260, 2017.

LENARDON, M. D. *et al.* Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. **Cell Surf.**, v.6, p.100047, 2020.

LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D.W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Br. Dent. J.**, v. 223, n. 9, p. 675-681, 2017.

LI, H, *et al.* Interactions between *Candida albicans* and the resident microbiota. **Front Microbiol.**, v. 13, p. 930495, 2022.

- LI, Z. J. *et al.* Antifungal Activity of Gallic Acid *In vitro* and *In Vivo*. **Phytother Res.**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017.
- LIU, J. *et al.* Molecular typing and genetic relatedness of 72 clinical *Candida albicans* isolates from poultry. **Vet. Microbiol.**, v. 214, p. 36-43, 2018.
- LIU, X. Z. *et al.* Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v. 81, n. 1, p. 85-147, 2015.
- LIZARAZO, J. *et al.* Infecciones oportunistas del sistema nervioso central en pacientes con VIH atendidos en el Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta (1995-2005). **Infectio**, v. 10, n. 4, p. 226-231, 2006.
- LO, H. J. *et al.* Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939-949, 1997.
- LOHSE, M. B. *et al.* A screenfor small molecules to target *Candida albicans* biofilms. **J Fungi (Basel)**. v. 7, n. 1, p. 9, 2020.
- LOHSE, M. B. *et al.* Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.
- LOMES, N. R. *et al.* Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: a Brazilian case series. **Med Mycol.**, v. 54, n. 7, p. 669-676, 2016.
- LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Ed. Nova odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**, 2ª ed.; Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, Brasil, 2002.
- LOZANO, G. A; MANRIQUE, G. G. Algunas manifestaciones neurológicas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en pacientes del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2001-200. **Acta Neurol Colomb**, v. 23, n. 2, p. 90-94, 2007.
- LOZANO-CHIU, M. *et al.* Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J Clin Microbiol.**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, 1998.
- LU, H. *et al.* Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 199, p. 114960, 2023..
- LUCENA, R. F. P. D. *et al.* The ecological apparency hypothesis and the importance of useful plants in rural communities from Northeastern Brazil: An assessment based on use value. **J. Environ. Manage.**, v. 96, n. 1, p. 106-115, 2012.
- LUPETTI, A. *et al.* Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol. Med.**, v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.

MACEDO, J. G. *et al.* Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2018, n. 1, p. 6769193, 2018.

MACHADO, A. C. *et al.* Extrato metanólico de “Aroeira” (*Myracrodruon urundeuva*): relação entre compostos químicos e efeitos celulares. **Farmacêutico. Biol.**, v.54, p.2737–2741, 2016.

MACIAS-PAZ, I. U. *et al.* *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. **Rev Argent Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 189-198, 2023.

MAGALHÃES, T.F.F. *et al.*, Hydroxyaldimines as potent *in vitro* anticryptococcal agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 137-143, 2013.

MAGILL, S. S. *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N. Engl. J. Med.** v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MAHATA, D. Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 5-11, 2014.

MAHESHWARI, M.; K AUR, R.; CHADHA, S. *Candida* species prevalence profile in HIV seropositive patients; from a Major Tertiary Care Hospital, in New Delhi, India. **J Pathog.**; v.2016, p.6204804, 2016.

MALLICK, E.M. *et al.* Phenotypic Plasticity Regulates *Candida albicans* Interactions and Virulence in the Vertebrate Host. **Front. Microbiol.**, v.7, p.780, 2016.

MANTILLA, J. C.; CÁRDENAS, N. Hallazgos neuropatológicos de la infección por VIH-SIDA: estudio de autopsias en el Hospital Universitario de Santander, Bucaramanga, Colombia. **Colomb Med**, v. 40, n. 4, p. 422-431, 2009.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4592-4601, 2007.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

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

MAY, R. C. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**; v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCMANUS, B. A. *et al.* Ser29Leu substitution in the cytosine deaminase Fca1p is responsible for clade-specific flucytosine resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 53, n. 11, p. 4678-4685, 2009.

MEDARIS, L. A. *et al.* Cryptococcal osteomyelitis: a report of 5 cases and a review of the recent literature. **Mycoses**, v. 59, n. 6, p. 334-342, 2016.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect Immun.**; v. 73, n. 4, p. 2012-2019, 2005.

MENDONÇA, A. M. S. *et al.* Synergism between Fluconazole and *Terminalia catappa* Extract and its Use in the Treatment of *Candida*-infected *Tenebrio molitor* Larvae. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 78929–78950, 2020.

MENEZES, J. C; CAMPOS, V. R. Natural biflavonoids as potential therapeutic agents against microbial diseases. **Science of The Total Environment**, v. 769, p. 145168, 2021.

MENEZES, R. C. *et al.* Metabolic profiling of rhizobacteria *Serratia plymuthica* and *Bacillus subtilis* revealed intra-and interspecific differences and elicitation of plipastatins and short peptides due to co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 685224, 2021.

MIANA, G. A. *et al.* Prostratin: An overview. **Mini Review in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 13, p. 1122-1130, 2015.

MIGUEL, C. B. *et al.* *In vitro* antifungal activity of *Morinda citrifolia* (noni) extract against *Candida albicans*. **J Infect Dev Ctries**; v. 16, n. 7, p. 1206-1217, 2022.

MIKULSKA, M. *et al.* Sensitivity of Serum Beta-D-Glucan in Candidemia According to *Candida* species Epidemiology in Critically Ill Patients Admitted to the Intensive Care Unit, **J. Fungi. (Basel)**, v. 8, n. 9, p. 921, 2022.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clin. Dermatol.**, v. 34, n. 4, p. 487-494, 2016.

MITCHELL, K. F. *et al.*, Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 112, n. 13, p. 4092-4097, 2015.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MOLLOY, S. F. *et al.* Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. **N. Engl. J. Med.**, v. 378, n. 11, p. 1004-1017, 2018.

MOORE C. B. *et al.* Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. **J Infect.**, v. 41, n. 3, p. 203-220, 2000.

MORAIS, S. M. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

MOTA, B. C. F. *et al.* Comparative studies between the chemical constituents and biological properties of the extracts from the leaves and barks of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 6, p. 159-168, 2015.

MURCIANO C. *et al.* Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS One**; v. 7, n. 3, p. e33362, 2012.

NAVARRO-ARIAS, M. J. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infect Drug Resist.**;12:783–794, 2019.

NDHLALA AR. *et al.* Antimicrobial, anthelmintic activities and characterisation of functional phenolic acids of *Achyranthes aspera* Linn.: a medicinal plant used for the treatment of wounds and ringworm in East Africa. **Front Pharmacol.**, v. 6, p. 274, 2015.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. **J Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.** v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGA, N.T.H. *et al.*, Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells, **Analytical Biochemistry**, v. 610, p. 113937, 2020.

NICAULT, M. *et al.* Elicitation of antimicrobial active compounds by *Streptomyces*-fungus co-cultures. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 178, 2021.

NIMRICHTER, L. *et al.* Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 1034, 2016

NOGUCHI, H. *et al.* Cutaneous cryptococcosis. **Med Mycol J**; v. 60, n. 4, p. 101-107, 2019.

NONATO, C. F. A. *et al.* Chemical analysis and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of fruit fractions of *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) **PeerJ**, v. 6, p. e5991, 2018.

NOSANCHUK, J. D., STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? **Front.Microbiol.**, v. 6, p. 1463, 2015.

- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006.
- NOSANCHUK, J. D.; et al. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 233-239, 1999.
- NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.** v. 41, n. 4, p. 521-526, 2005
- NUNES, J. O. *et al* Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, p. 485-492, 2018.
- O'DONNELL, L. E. *et al*. Polymicrobial *Candida* biofilms: Friends and foe in the oral cavity. **FEMS Yeast Res.**, v. 15, n. 7, p. fov077, 2015.
- OJEZELE, M.O.; AGUNBIADE, S. Phytochemical Constituents and Medicinal Properties of Different Extracts of *Anacardium occidentale* and *Psidium guajava*. **Asian J. Biomed. Pharm.**, v.3, p.20–23, 2013.
- OLIVEIRA, F. A. *et al*. *In vitro* antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida* species. **An Acad Bras Cienc.**; v. 89, n. 3 Suppl, p. 2423-2432, 2017.
- OLIVEIRA, I. S. *et al*. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 587–593, 2008.
- OLSZEWSKI, M. A. *et al*. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.
- OSTERHOLZER, J. J. *et al*. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. A. *et al*. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 9, p. 719-727, 2010
- OURA, M.; STERNBERG, T. H.; WRIGHT, E. T. A new antifungal antibiotic, amphotericin B. **Antibiot Annu.**; v.3, p.566–73, 1955.
- PAI, M. B. H. *et al*. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Indian J Dent Res**; v. 21, n. 3, p. 334-336, 2010.
- PANARIELLO, B. H. D. *et al*. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **J Oral Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 1476644, 2018.

PAOLA, R. *et al.* The antioxidant activity of pistachios reduces cardiac tissue injury of acute ischemia/reperfusion (I/R) in diabetic streptozotocin (STZ)-Induced hyperglycaemic rats. **Front. Pharmacol**, v. 9, p. 51, 2018.

PAPON, N. *et al.* Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 51, n. 1, p. 369-371, 2007.

PAPPAS, P. G *et al.* Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PAPPAS, P. G. *et al.* Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 690-699, 2001.

PASKO, M. T.; PISCITELLI, S. C.; VAN SLOOTEN, A. D. Fluconazole: a new triazole antifungal agent. **DICP.**; v. 24, n. 9, p. 860-867, 1990.

PASQUIER, E. *et al.* Long-term mortality and disability in cryptococcal meningitis: a systematic literature review. **Clin Infect Dis**; v. 66, n. 7, p. 1122-1132, 2018.

PELILLO, M. *et al* An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 465-470, 2004.

PERFECT, J. R.; BICANIC T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 49-54, 2015

PERFECT, J.R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infection Diseases of Clinics of North America**, v.16, p.837-874, 2002.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PETERS, B. A. *et al.* The oral fungal mycobiome: Characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. **BMC Microbiol.**, v. 17, p. 1-11, 2017.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs Today**, v. 51, n. 12, p. 705-718, 2015.

PFALLER, M. A. *et al.* Activities of Manogepix and Comparators against 1,435 Recent Fungal Isolates Collected during an International Surveillance Program (2020). **Antimicrob Agents Chemother**. v. 66, n. 11, p. e01028-22, 2022.

PFALLER, M. A. *et al.* Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from

the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **J Clin Microbiol.** v. 49, n. 1, p. 396-399, 2011.

PFALLER, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, n. 12, p. 5848-5859, 2005.

PFALLER, M. A. *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species From 1997–2016 Open Forum Infectious Diseases; **J Open Forum Infectious Diseases**, v.6, n. Supplement_1, p. S79-S94, 2019.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev.**; v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007

PHAN Q. T. *et al.* Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biol**; v. 5, n. 3, p. e64, 2007.

PHARKJAKSU, S. *et al.* Immunopathogenesis of emerging *Candida auris* and *Candida haemulonii* strains. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 9, p. 725, 2021

PHUONG, N. N. M. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extracts. **Int J Food Microbiol.**, v. 321, p. 108539, 2020.

PIERCE, C. G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc.**; v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PINTO JUNIOR, V. L. *et al.* *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 746–748, 2010.

PIRES, J. G. *et al.* Effect of hydroalcoholic extract of *Myracrodruon urundeuva* All. and *Qualea grandiflora* Mart. leaves on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization. **J Appl Oral Sci.**, v. 27, p. e20180514, 2019.

PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? **BMC Immunol.** v. 16, p. 1-6, 2015.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2015.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect.**; v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019

PUKKILA-WORLEY, R. *et al.* Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 190-201, 2005.

QIAN, W. *et al.* Deciphering antifungal and antibiofilm mechanisms of isobavachalcone against *Cryptococcus neoformans* through RNA-seq and functional analyses. **Microb Cell Fact.**, v. 23, n. 1, p. 107, 2024.

RAGUPATHI, L.; REYNA, M. Case report of *Cryptococcus albidus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient and a review of the literature. **Peritoneal Dialysis International**, v.35, n. 4, p. 421–427, 2015.

RAJASINGHAM, R. *et al* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAMAGE, G. *et al.*, Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, n. 4, p. 163-170, 2001.

RAMAGE, G.; WILLIAMS, C. The clinical importance of fungal biofilms. **Adv Appl Microbiol**, v. 84, p. 27-83, 2013.

REGIDOR, P. A. *et al.* Miconazole for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *In vitro*, in vivo and clinical results. Review of the literature. **J Obstet Gynaecol.**, v. 43, n. 1, p. 2195001, 2023.

REIS, M. P. C. *et al.* Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococcus neoformans* species complex. **J Appl Microbiol**, v. 121, n. 2, p. 373-379, 2016.

RESENDE, F. A. *et al.* Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 72, n. 3, p. 506-513, 2015.

RETORE, Y. I. *et al.* Antifungal activity of *Caryocar brasiliense* camb. Alone or along with antifungal agents against multidrug-resistant *Candida auris*. **J Ethnopharmacol.** v. 330, p. 118240, 2024.

REVIÁKINA, V. *et al.* Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006. **Rev Soc Ven Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 112-119, 2007.

REX J. H. *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin Microbiol Rev.**; v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

RHODES, J. *et al* Tracing genetic exchange and biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the global population level. **Genetics**, v. 207, n. 1, p. 327-346, 2017.

RICHARDSON, J. P. *et al.* *Candidalysin* drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa. **Infect Immun.**; v. 86, n. 2, p. 645-717, 2018.

RÍOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, M. L. The Multifunctional Fungal Ergosterol. **mBio**, v. 9, n.5, p.e01755-18, 2018.

ROSAS, A. L. *et al.* Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. **Clin Diagn Lab Immunol.**; v. 9, n. 1, p. 144-148, 2002.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SÁ, R. A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.

SAAG, M. S. *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**; v. 30, n. 4, p. 710-718, 2000.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Vet World**, v. 14, n. 6, p. 1608, 2021.

SAIDYKHAN, L.; ONYISHI, C. U.; MAY, R.C. The *Cryptococcus gattii* species complex: Unique pathogenic yeasts with under studied virulence mechanisms. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 16, n. 12, p. e0010916, 2022.

SALEHI, B. *et al.* Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Effects of *Anacardium* Plants: An Ethnopharmacological Perspective. **Front Endocrinol**, v. 11, p. 295, 2020.

SANGALLI, J. *et al.* Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Clin Oral Investig.**, v. 22, p. 2273-2279, 2018.

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

SANGHVI, R. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis: A rare diagnosis in paediatric dentistry. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 6, p. 708-710, 2020.

SANTOS, G. C. O. *et al.* *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1351, 2018.

SANTOS, J. R. A. *et al.* Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2553-2558, 2012.

SANTOS, J. R. *et al.*, Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014.

SANTOS, W. R. *et al.* Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 813-818, 2008.

SARRIA, A. L. F. *et al.* Dimeric chalcones derivatives from *Myracrodruon urundeuva* act as cathepsin V inhibitors. **Phytochemistry**, v. 154, p. 31-38, 2018.

SCHELENZ S. *et al.*, First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 5, p. 1-7, 2016.

SCHWARTZ, S. *et al.* Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. **Lancet Neurol.**, v. 17, n. 4, p. 362-372, 2018.

SCHWARZ, P. *et al.* Combination of amphotericin B with flucytosine is active *in vitro* against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 51, n. 1, p. 383-385, 2007.

SCHWARZMÜLLER, T. *et al.* Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 6, p. e1004211, 2014.

SEGARRA, I., MOVSHIN, D. A.; ZARIF, L. Pharmacokinetics and tissue distribution after intravenous administration of a single dose of amphotericin B cochleates, a new lipid-based delivery system. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 8, p. 1827-1837, 2002

SERRANO, L. A. L.; VIDAL NETO, F. C.; MELO, D. S. Revista C&N-Ano IX-Nº 116. **Revista C&N HF-Ano VII-Nº 88 | Revista C&N Florestas-Ano I-Nº 2**, 2015.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: a review of pathobiology and clinical aspects. **Med Mycol**; v. 57, n. 2, p. 133-150, 2019.

SEVERO, C. B. *et al.* Cryptococcosis in children. **Paediatr Respir Rev**, v. 10, n. 4, p. 166-171, 2009.

SEVINDIK, M. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and neuroprotective effects of *Octaviania asterosperma* *in vitro*. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 128-138, 2021.

SHAFIEI, M. *et al.* History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action, **Bioorganic Chemistry**, v.104, p.104240, 2020.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SHARMA M.; CHAKRABARTI, A. Candidiasis and Other Emerging Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep.** 2023; v.17, n.1, p.15-24.

SHELBURNE III, S. A., *et al.* The role of immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS-related *Cryptococcus neoformans* disease in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis**; v. 40, n. 7, p. 1049-1052, 2005.

SHOHAM, S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* meningitis at 2 hospitals in Washington, D.C.: adherence of health care providers to published practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin Infect Dis**; v. 40, n. 3, p. 477-479, 2005.

SHUKLA, P. K. *et al.* Past, present, and future of antifungal drug development. In: Saxena A, editor. Communicable diseases of the developing world. **Topics in medicinal Chemistry**, vol. 29. Cham: Springer; 2016.

SIDDIQUI, T. J.; ZAMANI, T.; PARADA, J. P. Primary cryptococcal prostatitis and correlation with serum prostate specific antigen in a renal transplant recipient. **J Infect**; v. 51, n. 3, p. e153-e157, 2005.

SIKA, K. C. *et al.* Indigenous Knowledge and Traditional Management of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Genetic Resources in Benin. **J. Exp. Biol. Agric. Sci.**, v.1, p.375–382, 2013.

SILVA F. *et al.*, Antifungal activity of selected plant extracts based on an ethnodirected study. **Acta Bot Bras.**, v. 34, p. 442-448, 2020.

SILVA, R. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. flowers in comparison to bark and leaves extracts. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 4, n. 4, p. 87-99, 2016.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, T. C. *et al.* Punicalagin triggers ergosterol biosynthesis disruption and cell cycle arrest in *Cryptococcus gattii* and *Candida albicans*: Action mechanisms of punicalagin against yeasts. **Braz J Microbiol.**, v. 51, p. 1719-1727, 2020.

SILVA, V. C. *et al.* Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- flight mass spectrometry. **Eur J Mass Spectrom (Chichester)**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.

SINGH, A. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.

SINGH, R.; PARIJA, S. *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. **Indian J. Med. Res.**, v. 136, n. 4, p. 671-673, 2012.

SIONOV, E. *et al.* *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 4, p. e1000848, 2010.

SIONOV, E. *et al.* Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 53, n. 7, p. 2804-2815, 2009.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 57, n. 10, p. 5127-5130, 2013.

- SIRACUSA, R. *et al.* The Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* L. Cashew Nuts in a Mouse Model of Colitis. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 834, 2020.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 2007.
- SOKÓŁ, I.; GAWEL, A.; BOBREK, K. The prevalence of yeast and characteristics of the isolates from the digestive tract of clinically healthy turkeys. **Avian Dis.**, v. 62, n. 3, p. 286-290, 2018.
- SOUTO, A. C. *et al* Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rain forest to the semi-arid desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.8, p.e0004885, 2016.
- SOUZA P. *et al.* Promising Medicinal Plants with Diuretic Potential Used in Brazil: State of the Art, Challenges, and Prospects. **Planta Med**, v. 87, n. 01/02, p. 24-37, 2021b.
- SOUZA P.C. *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods**, v. 118, p. 182-186, 2015.
- SOUZA, L. M. *et al.* Does the type of substrate influence growth and antioxidant systems? Case study of *Myracrodruon urundeuva* under water deficit. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 841-851, 2022.
- SOUZA, N. Physicochemical and microbiological assessment of a dental adhesive doped with cashew nut shell liquid. **Odontology**, v.110, n.3, p.434-443, 2021a.
- SPALANZANI, R. N. *et al.* Clinical and laboratorial features of oral candidiasis in HIV-positive patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 03, p. 352-356, 2018.
- SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Infect Dis**; v. 21, n. 1, p. 28-34, 1995.
- SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. **J Clin Microbiol.**, v. 56, n. 2, p.01588–e01517, 2018.
- STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazonia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002.
- STONE, N. R. H. *et al.* Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. **J Clin Investig.**; v. 129, n. 3, p. 999-1014, 2019.
- SUDBERY P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat. Rev Microbiol.**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.

- SUGINO, R. P.; INNAN, H. Estimating the time to the whole-genome duplication and the duration of concerted evolution via gene conversion in yeast. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 63-69, 2005.
- SUN, H. Y. *et al* Cryptococcal Collaborative Transplant Study Group. Cutaneous cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Med Mycol**; v. 48, n. 6, p. 785-791, 2010.
- SWERDLOW, J. L. Nature's medicine: Plants that heal. Washington, DC: **National Geographic Society**, 2000.
- TAIWO B. J. *et al*. Identification of compounds with cytotoxic activity from the leaf of the Nigerian medicinal plant, *Anacardium occidentale* L. (*Anacardiaceae*). **Bioorg Med Chem.**, v. 25, n. 8, p. 2327-2335, 2017.
- TALAPKO, J. *et al*. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **J Fungi (Basel)**. v. 7, n. 2, p. 79, 2021.
- TALAPKO, J.; ŠKRLEC, I. The Principles, Mechanisms, and Benefits of Unconventional Agents in the Treatment of Biofilm Infection. **Pharmaceuticals**. v. 13, n. 10, p. 299, 2020.
- TAMUNO, E.; ONYEDIKACHI, E. Proximate, mineral and functional properties of defatted and undefatted cashew (*Anacardium occidentale* linn.) kernel flour. **Eur. J. Food Sci. Technol.**, v. 3, n. 4, p. 11-19, 2015.
- TAN, J. *et al*. Antifungal activity of minocycline and azoles against fluconazole-resistant *Candida* species. **Front Microbiol.**; v.12, p.649026, 2021.
- THE PLANT LIST. Version 1. 2013. Disponível em: <http://www.Theplantlist.Org/>. Acesso em: 06 ago. 2022.
- TIANLU, M.; BARFOD, A. *Anacardiaceae*. In Flora of China; Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y., Eds.; **Science Press and Missouri Botanical Garden Press**: Beijing, China; St. Louis, MO, USA; v.11, p. 335–357, 2008.
- TIMMERMANS, B. *et al*. Adhesins in *Candida glabrata*. **J Fungi (Basel)**., v. 4, n. 2, p. 60, 2018.
- TOPLIS, B. *et al*. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res.** v. 20, n. 4, p. foaa031, 2020.
- TRENTIN, D. S. *et al*. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.
- TSCHERNER, M.; KUCHLER, K. A histone acetyltransferase inhibitor with antifungal activity against CTG clade *Candida* species. **Microorganisms**, v. 7, n. 7, p. 201, 2019.
- TSUI, C.; KONG, E.F.; JABRA-RIZK, M.A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathog. Dis**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

- VAN ENDE, M.; WIJNANTS, S.; VAN DIJCK, P. Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 99, 2019.
- VENTURA, G. *et al* Uncovering heterogeneity of anacardic acids from pistachio shells: A novel approach for structural characterization. **Food Chemistry**, v. 426, p. 136636, 2023.
- VERMES, A.; GUCHELAAR, H.-J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J Antimicrob Chemother.**; v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.
- VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: Leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 253-262, 2000.
- VIANA, G. S.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* *allemão*. **Phytomedicine**. v. 10, n. 2-3, p. 189-195, 2003.
- VIANA, R. Genome-Scale Metabolic Model of the Human Pathogen *Candida albicans*: A Promising Platform for Drug Target Prediction. **J. Fungi**, v. 6, n. 3, p. 171, 2020.
- VIDERES, L. C. C. A. *et al.* *Myracrodruon urundeuva* lectins present anticancer and anticryptococcal activities with low cytotoxic or genotoxic effects, **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 614-621, 2023.
- VIEIRA, D. R. *et al.* Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1441-1449, 2014.
- VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L.; Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. **MMA**, v.1, p.160, 2018.
- VILLIS P. C. M. *et al.* A Study of the Disruptive Effect of the Acetate Fraction of *Punica granatum* Extract on *Cryptococcus* Biofilms. **Front Microbio l**, v. 11, p. 568258, 2021.
- WADA, R. *et al.* Granulomatous prostatitis due to *Cryptococcus neoformans*: diagnostic usefulness of special stains and molecular analysis of 18S rDNA. **Prostate Cancer Prostatic Dis**; v. 11, n. 2, p. 203-206, 2008.
- WAJDAN N. *et al.* Anti-fungal efficacy of *Miswak Extract* (*Salvadora Persica*) and commercial cleaner against *Candida albicans* on heat cured polymethylmethacrylate denture base. **J Appl Biomater Funct Mater**. v21, 2023.
- WAMBAUGH, M. A. *et al.* Synergistic and antagonistic drug interactions in the treatment of systemic fungal infections. **Elife**, v. 9, p. e54160, 2020.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WANG, S. *et al.* 18F-FDG PET/CT and contrast-enhanced CT findings of pulmonary cryptococcosis. **Eur J Radiol**; v. 89, p. 140-148, 2017.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 38, n. 11, p. 2648-2650, 1994

WANG, Z. A.; LI, L. X.; DOERING, T. L. Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. **Glycobiology**, v. 28, n. 10, p. 719-730, 2018.

WATKINS, R. *et al.* Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.6055–6074, 2015.

WHO. World Health Organization. Guidelines for diagnosing, preventing and managing cryptococcal disease among adults, adolescents and children living with HIV 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240052178>. Acesso em 20 fev. 2023.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550277>. Acesso em 20 fev. 2023.

WIBAWA, T. The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. **J. Med. Sci.**, v. 48, p. 58-68, 2016.

WILLIAMSON, P. R. *et al.* Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 13, n. 1, p. 13-24, 2017.

WILSON, D. F. *et al.* Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions, **Eukaryot. Cell**, v. 13, n. 8, p. 977-989, 2014.

YAMASHITA, K. The Novel Arylamidine T-2307 Selectively Disrupts Yeast Mitochondrial Function by Inhibiting Respiratory Chain Complexes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n.8, p.e00374-19, 2019.

YOKOYAMA, Y. *et al* Synthesis of bisphenol compounds from non-edible cashew nut shell liquid. **Tetrahedron Letters**, v. 118, p. 154384, 2023.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**. v.10, n.1, p. 490-501, 2019.

ZARAGOZA, O. *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol.**; v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with agiant impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409-413, 2013.

ZAVALA, S.; BADDLEY, J.W. Cryptococcosis. **Semin Respir Crit Care Med.**, v. 41, n.1, p. 69-79, 2020.

ZEEB, D. J. *et al* Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

ZENG, X. *et al*. Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. **Biomed Res. Int.**, v.2018, p.9703754, 2018.

ZHAI, B. *et al*. High-resolutionmycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. **Nat Med**, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2020.

ZHANG, Y. Q., *et al*. Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS Pathog.** v. 6, n. 6, p.e1000939, 2010.

ZHAO, X. R.; LIN, Q.; BROOKES, P. C. A concentração de ergosterol no solo fornece uma estimativa confiável da biomassa fúngica do solo? **Biol do solo. Bioquímica.** v. 37, n. 2, p. 311-317, 2005.

ZHAO, Y. *et al*. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infect Dis Poverty.**, v. 12, n. 02, p. 1-18, 2023.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. **Infect. Genet Evol.**, v. 89, p. 104731, 2021.

ZIDA, A. *et al*. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **J Mycol Med.** v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

ZORIĆ, N. *et al*. Antifungal activity of Oleuropein against *Candida albicans* - the *in vitro* study. **Molecules**, v.21, n. 12, p. 1631, 2016.

ZUZA-ALVES, D.L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G.M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Front Microbiol.**, v. 8, p. 1927, 2017.

ZYREK, D. *et al*. The antimicrobial activity of omiganan alone and in combination against *Candida* isolated from vulvovaginal candidiasis and bloodstream infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1001, 2021