

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais**

**Graduação em Biotecnologia**

**WELLINTON JHON CUPOZAK PINHEIRO**

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger  
(Bixaceae) CONTRA *Cryptococcus gattii***

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Dourados/MS- Brasil**

**2017**

WELLINTON JHON CUPOZAK PINHEIRO

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae)  
CONTRA *Cryptococcus gattii*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado a Faculdade de Ciências  
Biológicas e Ambientais para a obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Msc. Adriana Araújo de  
Almeida Apolonio.

**Dourados/MS- Brasil**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

P654a Pinheiro, Wellinton Jhon Cupozak

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae)  
CONTRA *Cryptococcus gattii* / Wellinton Jhon Cupozak Pinheiro – Dourados:  
UFGD, 2017.

62f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Adriana Araújo de Almeida Apolonio

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e  
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Criptococose.. 2. Biofilme.. 3. Doenças Sistêmicas.. 4. Algodãozinho.. I.  
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

WELLINTON JHON CUPOZAK PINHEIRO

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) CONTRA  
*Cryptococcus gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:

---

Profa. Msc. Adriana Araújo de Almeida Apolonio  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Profa. Dra. Maricy Raquel Lindebah Bonfá  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Msc. Renata Pires de Araújo  
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 14 de Dezembro de 2016

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.*  
*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que mais este ciclo em minha vida se concretizasse!*

*Aos meus pais, Natalicio e Miguelina, minha base, amor incondicional. Obrigado pelos cuidados, ensinamentos a mim feitos. Pela paciência que tiveram comigo nos meus momentos mais difíceis, que mesmo longe sempre estiveram ao meu lado me apoiando, aconselhando, que mesmo em momentos difíceis lutaram para que eu permanecesse morando longe, pensando em um futuro melhor para mim. Obrigado por não serem só meus pais, mas também meus amigos! Vocês são meus maiores exemplos a ser seguido. Deus não podia ter me dado os melhores pais! Um dia vou retribuir tudo o que fizeram por mim. Amo muito vocês, eternamente.*

*Aos meus irmãos, Jhonatan e Grasielle, meus melhores amigos e irmãos que a vida me deu. Obrigado pelo incentivo, amizade, parceria, amor, por estarem sempre comigo nos meus momentos mais difíceis e alegres. Saibam que sempre podem contar comigo. E também a minha cunhada Bianca e minha sobrinha Quezia, obrigado. Amo vocês!*

*A toda a minha família paterna e materna, primos (as) e aos meus tios (as), obrigado por terem me apoiarem e ajudado! Melhor família que esta impossível! Em especial, a minha prima Caroline Cupozak, que não só como prima é também amiga, que desde criança esteve presente em minha vida. Obrigado por me ouvir, tanto nos momento de alegria, desabafos, tristeza, sempre esteve comigo, saiba que sempre estarei aqui!*

*A minha Orientadora, Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, muito obrigado pela oportunidade, pela orientação, apoio, incentivos e conselhos, a mim feitos para o meu crescimento profissional, que Deus lhe abençõe grandemente.*

*A minha também Orientadora, Profa. Msc. Adriana Araújo de Almeida Apolonio, que possuiu um papel importante durante todo o meu trabalho, estando presente desde as primeiras tentativas até a finalização deste. Não há palavras para agradecer, pela sua amizade, humildade, ensinamentos, companheirismo, conselhos, dedicação e paciência. Que Deus lhe retribua em dobro.*

*Aos meus amigos que a vida me deu, Flávia Fogaça, Fernando, Jhonatas, Felipe, Luciana, Jayne, Jefferson, Ana Sintra, Anna Xavier, Luis Recco, Paulo César e demais. Muito obrigado por estarem comigo, e pela parceria. Em especial a minha amiga Thaianne, obrigado pelo companheirismo, pela amizade, pelas conversas longas em tardes de tereré, onde em dúvida de que curso prestar no vestibular, me apresentou ao curso de Biotecnologia. Muito obrigado, e conte sempre comigo.*

*Aos meus melhores amigos/irmãos, Matheus, Carolina, Ana Claudia, Maysa e Lucas, "MC JAML", meus irmãos de pais diferentes. Que com as diferenças de cada um, transformamos o que era pra ser uma simples amizade em um grande laço inquebrável, onde quero manter por toda a vida. Muito obrigado por tudo, pela amizade, parceria de festas, trabalhos que sempre deixávamos para última hora, e sempre dava certo, pela paciência comigo em minhas mudanças repentinas de humor, pelas brigas, afinal que*

*irmão nunca brigou?! Obrigado por fazerem parte da minha vida e que possamos realizar as nossas tão sonhadas viagens. Contem sempre com o “Jhon”.*

*Aos meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Fabiana, Melina, Stephanie, Renata, Danny, Fernanda, Andressa, Nayara, Bianca Boni, Allan, Karina, Daiane, Suellen, e aos demais, pela ajuda, conhecimento compartilhado, união e a amizade, que com certeza estarão sempre presente em minha vida. Em especial aos meus amigos e “irmãos científicos” Pamella e Vagner, muito obrigado pelo companheirismo em sala, parceria, cumplicidade, brincadeiras e risadas, durante os experimentos, mostrando que mesmo em momentos de seriedade, estes podem ser encarados de outras formas. Saibam que podem sempre contar comigo.*

*A minha amiga/irmã Stephanie “Tety”, que de nutricionista passou a fazer parte também da biotecnologia, muito obrigado pela parceira, amizade, companheirismo, conselhos, parceira de festas, que sempre está disposta a ajudar quando preciso. Obrigado por fazer parte da minha vida, e saiba que sempre pode contar comigo.*

*Aos demais amigos que a V turma de Biotecnologia me deu, é uma imensa honra e orgulho dizer que faço parte desta turma maravilhosa que construímos, a final somos conhecidos pela turma que é unida e companheira. Espero que mesmo quando nos afastarmos nosso vínculo permaneça. Muito obrigado pela amizade, parceria, cumplicidade, por tudo. Sempre V turma!*

*Aos meus companheiros e amigos de Lar, Gleyce, Jean, Natan, Deborah, Hévila, Luiz. Que transformaram um simples apartamento com desconhecidos, que a PROAE uniu, em um lar com companheirismo, parceria e união, fora do comum. Muito obrigado por tudo, pela amizade, parceria, por me aguentarem nos meus momentos de tristeza, alegria, mudanças de humor, com paciência, pelos conselhos também. Em especial a Gleyce, considerada a mãe da casa, amiga, parceira, conselheira, que sempre esteve comigo, meu muito obrigado. Saiba que levarei vocês comigo sempre. Afinal, o que a PROAE uniu ela não separa! Desejo tudo de bom e melhor para vocês.*

*Aos professores e técnicos, da Universidade Federal da Grande Dourados, que contribuíram para minha formação. Muito obrigado pelos ensinamentos e incentivos ditos. Afinal “todo bom começo tem um bom professor!”. A PROAE/UGD, que por meio de auxílios ajuda aos estudantes, assim como eu, a permanecerem na universidade.*

*Agradeço a todos, mesmo até os que não foram citados aqui, saibam que direta ou indiretamente vocês contribuíram para minha formação e jornada acadêmica.*

*Meus mais sinceros agradecimentos...!*

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Criptococose	14
2.1.1 Breve Histórico	14
2.1.2 Patogênese	15
2.1.3 <i>Cryptococcus gattii</i>	16
2.2 Biofilme de <i>Cryptococcus</i> sp	17
2.2.1. Resistência de biofilmes fúngicos	20
2.3. Plantas medicinais	21
2.3.1. <i>Cochlospermum regium</i> (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae)	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral	23
3.2. Objetivo Específico	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. ANEXOS	33
5.1 Artigo	33
5.2 Normas da Revista- Industrial Crops and Products	48



## ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB - Anfotericina B

ANOVA - Análise de Variância

ATCC - *American Type Culture Collection*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPS - Substâncias poliméricas extracelulares

FCBA - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

FLU - Fluconazol

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

MIC – Minimum inhibitory concentration/ Concentração Inibitória Mínima (CIM)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - salina tamponada com fostato

RMPI 1640 - Roswell Park Memorial Institute

SNC - Sistema Nervoso Central

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados

V - volume

5-Flu - 5-Flucitosina

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Biofilme de *Cryptococcus neoformans* com uma conformação bem organizada.

**Figura 2.** Processos envolvidos na formação de biofilme.

**Figura 3.** *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) "algodãozinho-do-campo" ou "algodãozinho".

## RESUMO

Criptococose é uma micose sistêmica que acomete pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, sendo a segunda enfermidade neurológica mais fatal no Brasil. É ocasionado por leveduras do gênero *Cryptococcus*, prevalecendo às espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, que possuem potencial para formar biofilme, este considerado um importante fator de virulência. *Cochlospermum regium* (Bixaceae) é conhecida popularmente como “algodãozinho” ou “algodãozinho-do-campo” com atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, entre outras. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *C. regium* contra biofilmes de *Cryptococcus gattii*. O extrato etanólico das folhas de *C. regium* apresentou atividade inibitória na formação de biofilme e também na redução de biofilme formado frente a *C. gattii* ATCC 56990. As concentrações testadas apresentaram valores significativos ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA e o pós-teste de Tukey, em ambos os testes realizados, a concentração de  $10 \text{ mg/L}^{-1}$  apresentou uma atividade de destaque quando comparada com as demais concentrações e o controle não tratado. Desta forma, o extrato etanólico das folhas de *C. regium* pode ser uma importante fonte alternativa para o desenvolvimento de drogas antifúngicas no combate biofilmes de *C. gattii*, como também de doenças sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Cryptococcus*.

**Palavras- chave:** Criptococose. Biofilme. Doenças Sistêmicas. Algodãozinho.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis that affects immunocompromised and immunocompetent patients, being the second most fatal neurological disease in Brazil. It is caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, prevailing to the species *C. neoformans* and *C. gattii*, which have potential to form biofilm, this considered an important factor of virulence. *Cochlospermum regium* (Bixaceae) is popularly known as "Algodãozinho" or "Algodãozinho-do-Cerrado" with anti-inflammatory, antimicrobial, analgesic and other activities. The present study had as objective to evaluate the antibiofilm activity of the ethanolic extract of the leaves of *Cochlospermum regium* against biofilms of *Cryptococcus gattii*. The ethanolic extract of the leaves of *C. regium* presented inhibitory activity in the formation of biofilm and also in the reduction of biofilm formed against *C. gattii* ATCC 56990. The concentrations tested showed significant values ( $P < 0.05$ ) for ANOVA and Tukey's post-test, in both tests, the concentration of  $10 \text{ mg/L}^{-1}$  presented a prominent activity when compared to the other concentrations and the control not treated. Thus, the ethanolic extract of the leaves of *C. regium* can be an important alternative source for the development of antifungal drugs in the combat of biofilms of *C. gattii*, as well as of systemic diseases caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*.

**Keywords:** Cryptococcosis. Biofilm. Systemic Diseases. Algodãozinho.

## 1. INTRODUÇÃO

Criptococose é uma micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, com espécies predominantes *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre as micoses sistêmicas, esta acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, sendo comum em indivíduos com HIV/AIDS, e pacientes imunocompetentes (KON et al., 2008; GULLO et al., 2013; SLOAN; PARRIS 2014). Esta doença ocorre por meio de meningoencefalite, pneumonia criptocócica, podendo se disseminar por todo o sistema nervoso central (BRIZENDINE et al., 2011; SLOAN ; PARRIS 2014). No Brasil, foi classificada como a segunda doença neurológica mais fatal em pacientes com AIDS, mesmo após tratamento com antifúngicos (CHARLIER et al., 2008; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

*Cryptococcus gattii* foi descrito pela primeira vez em 1970, onde se apresentava em forma diferente do tipo *C. neoformans*, entretanto, em 2002, foi reconhecido como uma nova variedade do gênero *Cryptococcus*. A infecção ocorre por inalação de propágulos fúngicos, ocasionando doença clínica nos pulmões e no sistema nervoso central (TORTORANO et al., 2012; GULLO et al., 2013). A formação de biofilme é considerada como um importante fator de virulência para a levedura nos pulmões e posterior disseminação do *Cryptococcus* sp. (GULLO et al., 2013; MARTINEZ; CASADEVALL, 2016).

Biofilme pode ser definido como um complexo estruturado em comunidade de microrganismos, rodeado por uma matriz extracelular de polissacáridos, colados um ao outro numa superfície ou interface, no qual se integranaturalmente em qualquer superfície sólida em contato com a água não estéril (CHANDRA et al., 2001; STOODLEY et al., 2002; SARDI et al., 2013). É um problema em materiais de uso hospitalar, e a sua formação no hospedeiro pode levar a resistência aos agentes antimicrobianos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; MARTINEZ et al., 2010).

O uso de produtos à base de plantas medicinais é uma prática comum na terapêutica e tem aumentado cada vez mais. Devido ao surgimento de resistências aos antimicrobianos tradicionais, faz-se o uso de plantas com potencial medicinal para síntese de novos fármacos. Estas possuem em sua maioria uma tradição de uso por uma

população ou comunidade, sendo utilizado na prevenção, alívio ou cura de enfermidades, de forma que possa ser cultivado ou não (WHO, 2003; CARVALHO et al, 2007; BRASIL, 2014).

*Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) é conhecida popularmente como “algodãozinho” ou “algodãozinho-do-campo”. Esta espécie é encontrada no bioma Cerrado, Caatinga e Pantanal brasileiro. Suas folhas, raízes, cascas e xilopódios, são utilizadas na medicina popular para diversas doenças como artites, reumatismos, infecções geniturinário, infecções uterinas, entre outras (NUNES et al., 2000; NUNES et al., 2003; MACEDO et al., 2011). Além disso, possui diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (SIQUEIRA et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1996; NUNES et al., 2003), no entanto sua atividade frente a *Cryptococcus sp.* ainda não foi avaliado. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* contra biofilmes de *Cryptococcus gattii*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Criptococose

#### 2.1.1 Breve Histórico

A criptococose é uma micose sistêmica, ocasionada por *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii*. É predominantemente causada pela espécie *C. neoformans* na qual é chamada de oportunista. Quando esta doença é causada pela espécie *C. gattii* é denominada de micose primária, pois acomete indivíduos que possuem sistema imunocompetente (KON et al., 2008; GULLO et al., 2013).

O primeiro relato de criptococose foi realizado por Otto Busse e Abraham Buschke, em 1894, na cidade de Greifswald na Alemanha, onde acompanhavam uma paciente de 31 anos com lesão na tíbia, foi denominada a doença de saccharomycosis hominis com agente etiológico de *Saccharomyces hominis* (HEITMAN et al., 2011). No Brasil, o primeiro caso de criptococose foi relatado por Almeida e Lacaz (1941) na cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo considerado um marco histórico no país.

Após certo período na França, Ferdinand Curtis isolou de uma lesão de quadril uma levedura denominando-a de *S. subcutaneous tumefaciens*, na mesma época o mesmo isolou de um indivíduo com meningite uma levedura que a chamou de *Megelococcus myxoides*, o que viria a ser o primeiro relato de meningite ocasionada por *Cryptococcus* sp. No entanto, os termos *Cryptococcus* e criptococose ainda não eram consolidados, o que gerava uma divergência na denominação do fungo e da doença provocada (BARNETT, 2010).

Em 1980, um aumento considerável dos casos de criptococose ocorreu em todo o mundo, tal fato se deu com o surgimento da AIDS, que é uma das principais condições para a ocorrência da infecção, com isso a *Cryptococcus* sp. surgiu como um importante agente infeccioso acometendo de 5 a 10% de indivíduos com AIDS, onde nos anos seguintes o crescimento de pesquisas acerca do assunto aumentou (CHUCK; SAMDE, 1989; DORE et al., 1997; HAJJEH et al., 1999).

Em 1990, ocorreu o isolamento da variedade *gattii* a partir de troncos de eucalipto em de composição e em fezes de pombos e outras aves (ELLIS; PFEIFFER, 1990; LÁZERA et al., 1993; CHEE; LEE, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; PEDROSO et al., 2009).

### **2.1.2 Patogênese**

A infecção por criptococose ocorre pela inalação de células fúngicas, os quais se alocam nos alvéolos pulmonares, podendo ser provenientes de fontes ambientais como excremento de pombos e madeira em decomposição (KON et al., 2008; GULLO et al., 2013).

Além de infecções nos pulmões e sistema nervoso central (SNC), *C. neoformans* e *C. gattii* podem se alojar em outros locais do corpo menos frequentes como a pele, próstata, olhos, articulações ósseas, chegando a ocasionar síndrome de reconstituição aguda. Portanto, esta levedura tem a capacidade de disseminar em qualquer local do corpo humano (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Podendo ser autolimitada ou latente em imunocompetentes, se disseminando para locais secundários do corpo como pele, ossos, rins e o SNC. Neste último, o microrganismo é carregado no interior dos macrófagos, os quais irão conseguir ultrapassar a barreira hematoencefálica,

causando assim meningoencefalite, podendo ter uma evolução grave e se não tratada ser fatal (KON et al., 2008; GULLO et al., 2013).

Estudos demonstraram que infecções por *C. gattii* tiveram envolvimento mais frequente em local cerebral e meníngea, apresentando sequelas neurológicas. A formação de criptocomas envolvia a exigência de ressecção cirúrgica, e com longos períodos de tratamento. Quanto à terapia, esta é necessária quase que três vezes a mais para pacientes com infecção por *C. gattii* em comparação com *C. neoformans*, resultado da dificuldade na redução do tamanho de criptocomas e a incapacidade para controlar rapidamente a infecção em pacientes com *C.gattii* (SPEED; DUNT, 1995; MacDougall et al., 2011).

Pacientes imunocompetentes com infecção por *C. gattii* foram significativamente mais propensos ao seu desenvolvimento, sendo moderada a grande sequelas ou morte, do que aqueles com infecção por *C. neoformans*. Tais resultados foram correlacionados com lesões de massa intracraniana por meio de varredura inicial, e imagens do cérebro normal de pacientes com os pacientes infectados, não se encontrou diferenças nos resultados por infectar espécies criptocócicas (SPEED; DUNT, 1995; MITCHELL et al., 1995; SAIJO et al., 2014). Tomados em conjunto, estes estudos sugeriram que a epidemiologia de *C. neoformans* e *C. gattii* foi diferente mesmo quando controlado para o estado imunológico do paciente (CHEN et al., 2000; MARR et al., 2012.).

### 2.1.3 *Cryptococcus gattii*

Em 1970, Gattii e Eeckels relataram um caso de meningoencefalite em uma criança de sete anos no Zaire, atual República Democrática do Congo, na África no qual relataram que o isolado se assemelhava com *C. neoformans*. No entanto, possuía morfologia atípica, pois se apresentava como leveduras alongadas, considerada assim uma nova variedade a qual foi denominada de *C. neoformans* variedade *gattii* (KNOW-CHUNG & BANNETT, 1978; HEITMAN et al., 2011).

Da-Silva-Lacaz e Conceição-Rodrigues (1983), demonstraram que das amostras biológicas analisadas, a maioria pertencia a *C. neoformans* var. *neoformans*. Em relato, LÁZERA et al., (1993), demonstrou que essa prevalência foi possível em



amostras ambientais, principalmente em árvores como as do gênero *Eucalyptus* sp. Por meio de filogenia foi provado que as leveduras isoladas dessa variedade se diferiam da variedade *neoformans*, e em 2002, a variedade *gattii* passou a ser conhecida como uma nova espécie do gênero *Cryptococcus* (CALVO et al., 1991; LÁZERA et al., 1996; LÁZERA et al., 1998; LÁZERA et al., 2000; HEITMAN et al., 2011).

Isolados ambientais de *C. gattii* são encontrados, em sua maioria, em locais onde as amostras ambientais são testadas e estas geralmente ocorrem em regiões com alta incidência de infecções, e as razões para isso são desconhecidas. Com tudo, podem se relacionar com nichos ecológicos preferidos para diferentes genótipos *C. gattii* ou tropismos específicos para diferentes populações de pacientes. A ampla gama de hospedeiro provavelmente contribuem para o êxito da *C. gattii* como um agente patogênico (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; MacDougall et al., 2011; HARRIS et al., 2012).

## 2.2 Biofilme de *Cryptococcus* sp

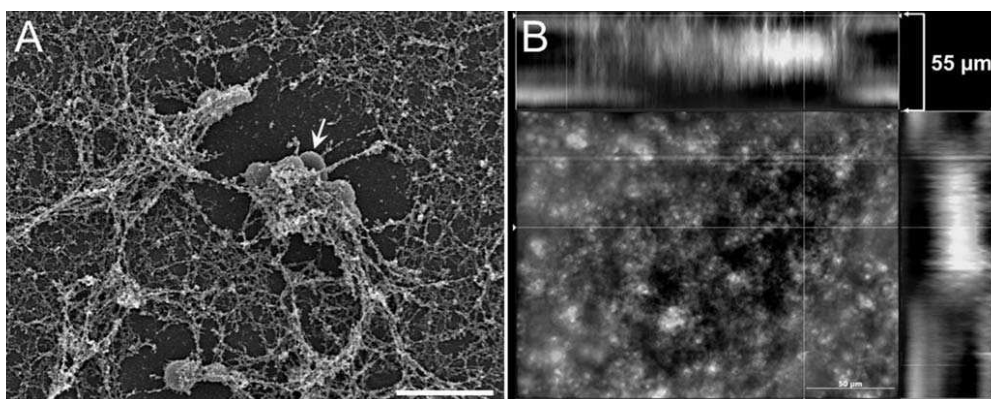
A formação de um biofilme por fungos é um processo bem organizado que consiste em uma sequência como adesão, fase intermediária e estágio de maturação, onde seu início se dá com a ligação de um microrganismo a uma superfície, seguido por uma cascata de expressão diferencial de genes, resultando na formação do biofilme (CHANDRA et al., 2001; STOODLEY et al., 2002; RAVI et al., 2009).

A formação de biofilme compreende uma sequência de passos, e os processos que envolvem na formação de biofilmes identificadas são (Figura 2): **A:** Pré-condicionamento da superfície a ser aderido com uma camada adsorvida de substâncias que irão propiciar a adesão. **B:** Transporte de células planctônicas de leveduras a partir do líquido para a superfície primária na superfície. **C.** Formação de microcolônias de leveduras, que servirão de base, estando cada microcolônia aderida à superfície com moléculas de sinalização célula-célula. **D.** Biofilme maduro, onde forma-se hifas, pseudo-hifas, envoltas pela matriz polimérica extracelular, e posterior transporte de produtos para fora do biofilme, processo este acompanhado por crescimento celular, replicação e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), com remoção

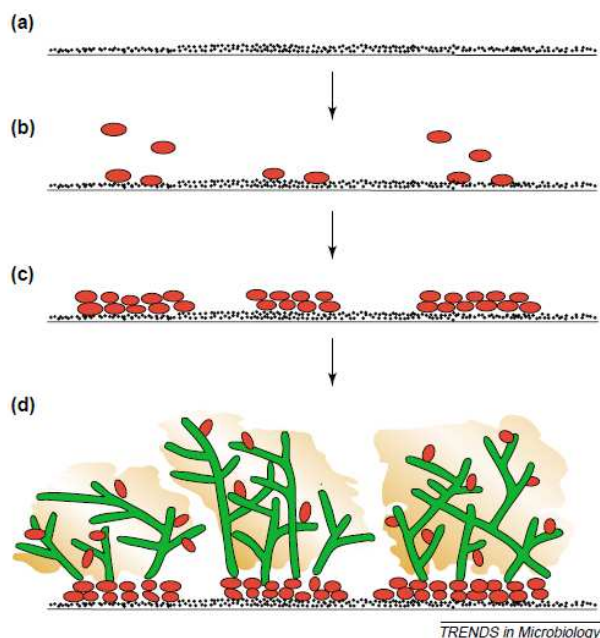
de parte do biofilme por destacamento ou descamação (DOUGLAS, 2003; BREYERS; RATNER, 2004).

A adesão de leveduras a uma superfície ou em estágios iniciais de formação se dá no período de 2 a 4 horas, consistindo principalmente por células de brotamento em seu crescimento. No hospedeiro, a adesão pode ser induzida pela formação de uma camada de condicionamento orgânico, incluindo compostos liberados devido à resposta inflamatória, a partir do soro, saliva, ou excreções vaginais. Podem afetar a taxa e a extensão da fixação, como por exemplo, fluido cerebrospinal que contém altas concentrações de cátions que promovem interações do microrganismo com a superfície de suporte, também o movimento constante deste em toda a superfície sólida pode influenciar a aderência à biomateriais (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; MUNDY; CORMACK, 2009).

A organização estrutural do biofilme e a presença de canais de água de que fluem pode contribuir na troca de nutrientes e gás, que proporciona as células fúngica com um nicho protegido para a proteção contra predadores ambientais, às forças de cisalhamento, principalmente as células do sistema imune e aos antimicrobianos. Isso pode ser observado por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal (Figura 1) (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; MARTINEZ et al., 2010; BANERJEE et al., 2013).



**Figura 1:** Biofilme de *C. neoformans* com uma conformação bem organizada. **(A):** Microscopia Eletrônica de Varredura imagem de um biofilme de *C. neoformans* mostra células fúngica (seta branca) cercado por grande quantidade de material polissacarídeo extracelular, com escala 10 µm. **(B):** Imagem de microscopia confocal de um biofilme criptocócica demonstra uma estrutura complexa, com regiões internas de células metabolicamente ativas envolvidas por EPM, com cerca de 55 µm de espessura quando maduro (MARTINEZ; CASADEVALL, 2016).



**Figura 2.** Processos envolvidos na formação de biofilme. Fonte: DOUGLAS, 2003

A matriz onde as células do biofilme são incorporadas pode corresponder cerca de 85% de seu volume total, e o material extracelular é produzido pelos próprios organismos, o qual é constituída por um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros conhecidos como EPS, que dão forma para a arquitetura tridimensional sendo responsável pela adesão a superfícies e para a coesão no biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; ALBULQUERQUE et al., 2014). Tal matriz possui papel de proteger as células fúngicas contra resposta imunológica e até mesmo a antifúngicos, pois sua constituição química complexa fornece uma barreira físico-química que impede o contato dos antifúngicos, o que leva a uma maior concentração destas drogas para exercer seu efeito (RAMAGE et al., 2012).

Essas EPS já foram denominadas como “a matéria escura de biofilmes”, devido a grande variedade de biopolímeros da matriz e da dificuldade em analisá-los, podendo variar muito entre os biofilmes, dependendo dos microrganismos presentes, e mantendo as células do biofilme em estreita proximidade ocorrendo interações intensas como a comunicação célula-célula. Com a retenção de enzimas extracelulares, há formação de um sistema versátil para a captura de nutrientes dispersos para que sejam utilizados como fontes de nutrientes e de energia (FLEMMING et al., 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010; SIMÕES et al., 2010).

Para *C. neoformans/C. gattii*, a presença da cápsula polissacarídica afeta a capacidade das células para se aderirem, na qual a cápsula pode ser alterada pela mudança fenotípica, que também pode alterar a capacidade deste para gerar biofilmes, onde as condições que imitam o ambiente de hospedagem sugerem ser permissiva para a formação de biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005; LEPAK et al., 2006; MARTINEZ et al., 2008).

### **2.2.1. Resistência de biofilmes fúngicos**

Alguns mecanismos de resistência de biofilme a antimicrobianos vêm sendo propostos, como barreiras físicas que vão impedir a entrada destes compostos no biofilme. Como o crescimento lento ou controle da atividade metabólica do mesmo devido a limitação de nutrientes, resposta geral ao stress, a presença de uma subpopulação de células no biofilme que são conservadas devido a pressão antimicrobiana. Em relação a estrutura do biofilme, a presença de uma matriz protetora exopolimérica ajuda na redução da difusão do antifúngico, isso é relatado quando a produção dessa matriz é maior quando cultivadas sob condições de agitação do que de forma estática, também no aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bomba de efluxo (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; MAH ; O' TOOLE, 2001; RAMAGE et al., 2012).

Os biofilmes podem ser mais resistentes a drogas antifúngicas do que quando as células estão em fase planctônica. Isto se dá devido sua dificuldade de penetração no biofilme, levando a necessidade de concentrações elevadas dos antifúngicos como por exemplo, anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol, drogas utilizadas no tratamento de criptococose (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; MARTINEZ et al., 2006; MARTINEZ ; CASADEVALL, 2006; LAFLEUR et al., 2006; MARTINEZ; FRIES, 2010), tornando necessário a busca por novos meios para o tratamento de biofilme fúngico.

A busca por novos antifúngicos mais ativos com menos efeitos colaterais, toxicidade e baixo custo vem crescendo, com isso, medicamentos a partir de plantas medicinais e seus derivados têm sido estudados visando o tratamento de biofilme criptocócico (EL ASSAL et al., 2012; BRILHANTE et al., 2015; MACIEL et., 2016).

### 2.3. Plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que 80% da população de países em desenvolvimento fazem o uso de práticas tradicionais para atenção primária à saúde, no qual 85% utilizam plantas medicinais. Cerca de 50% dos medicamentos empregados na terapia provêm direta ou indiretamente de produtos naturais (MYERS et al, 2000; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

As plantas medicinais têm contribuído no desenvolvimento de novas estratégias para a terapêutica devido aos seus metabólitos secundários, os quais são conhecidos pela atuação de forma direta ou indireta no organismo por meio de inibição ou ativação de alvos celulares e moleculares. O Brasil possui em seus biomas uma grande diversidade de espécies medicinais, sendo importantes fontes de princípios bioativos. Com isso, o conhecimento empírico da população tradicional, indígena, raizeiros, quilombolas são de grande importância (CALIXTO, 2005; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2008).

Buscando ampliar os recursos tecnológicos nacionais, a identificação de novos compostos derivados de plantas medicinais vem crescendo, pois estes podem atuar em diversos setores como: diminuição dos efeitos indesejáveis de algumas substâncias químicas sintetizadas, minimização de custos para o desenvolvimento de medicamentos, na redução da resistência dos microrganismos patogênicos, os quais se tornam cada vez mais resistentes a medicamentos devido ao uso inadequado de antibióticos (AVANCINI et al., 2000; TAVARES, 2000; SOUZA et al., 2005;).

#### 2.3.1. *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae)

A espécie *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) (Figura 3), é conhecida popularmente como “algodãozinho-do-campo”, “algodãozinho”, sendo encontrado nos biomas Cerrado, Caatinga e Pantanal brasileiro, o qual pertence a umagama de plantas medicinais utilizadas no Brasil. O chá desta planta é utilizado principalmente na medicina tradicional pelas populações locais nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal e São Paulo. As raízes são as partes mais utilizadas pela comunidade tradicional, seguido das folhas, cascas e xilopódios (NUNES, 2000; NUNES et al., 2003; GUARIM-NETO, 2006; MACEDO et al., 2011).



**Figura 3.** *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) ou "algodãozinho-do-campo", "algodãozinho".

No Mato Grosso do Sul, o uso de raízes *Cochlospermum regium*, é indicado pela população para o tratamento de várias doenças como: artrite, reumatismo, acne, infecções geniturinárias, infecções uterinas, infecções na próstata, colesterol, feridas internas e externas, laxante e depurativo do sangue (NUNES et al., 2003; SOLON et al., 2012).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que os extratos das raízes desta planta possuem ações anti-inflamatórias, analgésica, antiedematogênica, antimicrobiana, antipirético, efeitos antinociceptivo e atividade citotóxica (SIQUEIRA et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1996; SOUZA; FELFILI, 2006; TRESVENZOL et al., 2006; CESCHINI; CAMPOS, 2006;). Estes efeitos podem estar relacionados devido à presença de compostos fenólicos, terpenóides, flavonóides, saponinas, taninos (RITTO, 1996; CARVALHO, 2004; SOLON et al., 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* contra biofilmes de *Cryptococcus gattii*.

#### **3.2. Objetivo Especifico**

- Avaliar a atividade do extrato de *Cochlospermum regium* na formação de biofilme de *Cryptococcus gattii*.
- Avaliar atividade do extrato de *Cochlospermum regium* sobre biofilme formado de *Cryptococcus gattii*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P. C.; RODRIGUES, M. L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. **Future Microbiol**, vol7, p. 319–329, 2012

ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A. M.; NIEVES, E.; PAES, H. C.; WILLIAMSON, P. R.; SILVA-PEREIRA, I.; CASADEVALL, A. Quorum Sensing-Mediated, Cell Density-Dependent Regulation of Growth and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, vol 5, n1, p. e00986–13, 2014.

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**, vol 55, p. 999–1008, 2006.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S. Micose pelo *Cryptococcus neoformans*. Primeiro caso observado em São Paulo. **An Paulistas de Med e Cir**, vol. 42, n. 385, 1941.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the Baccharistrimera (Less.) D.C. - Compositaedecocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol 52, p.230-234, 2000.

BAILLIE, G. S; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J Antimicrob Chemother**, vol 46, p. 397–403. 2000;

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. vol 78. p. 431-41. 2005.

BANERJEE, M.; UPPULURI, P.; ZHAO, X. R.; CARLISLE, P. L.; VIPULANANDAN, G.; VILLAR, C. C.; Expression of UME6, a key regulator of *Candida albicans* hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1- and Sun41-dependent mechanisms. **Eukaryot Cell**. vol 12, p. 224–32. 2013;

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeast part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, vol 27, p. 875-904, 2010.



BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. D.O.U. Brasília, 14 maio 2014.

BREYERS, J. D.; RATNER, J. P. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, vol 70, p. 232–237, 2004.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SOUZA, E. R. Y.; ALENCAR, L. P.; CORDEIRO, R. A.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **Braz J Infect Dis**. vol19, n 5, p. 459–465, 2015.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, p. 727-734, 2011.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personalview. **J. Ethnopharmacol**, vol 100, p. 131–134, 2005.

CALVO, B. M.; FISCHMAN, O.; CASTELO-FILHO, A. Detección de antígeno de polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en São Paulo, Brasil. **Rev Inst Med Trop**, vol 33, p. 485-490, 1991;

CARVALHO, A. R. Popular use, chemical composition and trade of Cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, vol 6, n. 3, p. 307-316, 2004.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart and Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **J. Ethnopharmacol**, vol 103, n 2, p. 302-305, 2006.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; ET AL. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**. vol183, p. 5385–5394, 2001.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *C. neoformans*. **Infect Immun.** vol 77, p. 120-7, 2008.

CHEE, H. Y.; LEE, B. K. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*(serotype A) from pigeon dropping in Seoul, Korea. **J Microbiol**, vol 43, p. 469-472, 2005.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, vol 31, p. 499–508. 2000;

CHUCK, S. L.; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, vol 321, p. 794-799, 1989.

DA SILVA LACAZ, C.; CONCEICAO RODRIGUES, M. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **RBM. Revista brasileira de medicina**, vol 40, n. 8, p. 297-300, 1983.

DORE, G. J.; HOY, F. J.; MALLAL, S. A.; LI, Y.; MIJCH, A. M.; FRENCH, M. A.; Trends in incidence of AIDS illnesses in Australia from 1983 to 1994: the Australian AIDS cohort. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, vol 16, p. 39-43, 1997.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol**, vol 11, p. 30-36, 2003.

EL ASSAL, F. E.; SILVA, M. D. R. R.; JOELMA, A. D.; PAULA, F. P. D. C.; ABRÃO, F. Y. Bioatividade in vitro da planta, Pimenta *Pseudocaryophyllus*(Gomes) LR Landrum (Myrtaceae) sobre *Candidasp. eCryptococcus neoformans*. 2012. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/doutorado/trabalhos-doutorado/doutorado-flavio-ezzeddine.pdf>> Acesso em 12 de Agosto de 2016.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, **J ClinMicrobiol**, vol 28, p. 1642-1644, 1990.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. **J. Bacteriol.** vol 189, p. 7945–7947. 2007;

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix- *Nature Reviews| Microbiology*, vol 8, p. 623-633, Set 2010.

GUARIM-NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental*, vol 17, 2006.

GULLO, F. P.; ROSSI, S. A.; SARDI, J. C. O.; TEODORO, V. L. I.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol 32, n. 11, p. 1377-1391, 2013.

HAJJEH, R. A.; CONN, L. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W.; HAMILL, R.; GRAVISS, E. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis*, vol 179, p. 449-454, 1999.

HARRIS, J.; LOCKHART, S.; CHILLER, T. *Cryptococcus gattii*: where do we go from here? *Medical Mycology*, vol 50, p. 113-129, 2012;

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, J. K.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. 2. ed. Washington: **ASM Press**, p. 620, 2011.

KOBAYASHI, C. C.; SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. B.; BRITO, S. C.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M.; R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Ver Inst Med Trop*, vol. 47, p. 203-207, 2005.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M. R.; SALMITO, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, M. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; ANDRADE, N. M. P.; TRABASSO, P.; MENDES, R. P.; MARTINEZ, R.; PONZIO, V. Consenso em criptococose: 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*, vol 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Am J Epidemiol**, vol 108, p. 337-340, 1978.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob Agents Chemother**, vol 50, p.3839–3846, 2006.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: evidence for a natural habitat related to decaying wood in pottery tree hollow. **Med Mycol**, vol 36, p. 119-122, 1998.

LÁZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in decaying wood forming hollows in living trees. **J Med Vet Mycol**, vol 34, p. 127-131, 1996.

LÁZERA, M. S.; SALMITO, C. M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, vol 38, p. 379-383, 2000.

LÁZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Vet Mycol**, vol 31, p. 449-454, 1993.

LEPAK, A.; NETT, J.; LINCOLN, L.; Time course of microbiologic outcome and gene expression in *Candida albicans* during and following in vitro and in vivo exposure to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, vol 50, p.1311–1319, 2006.

MacDougall, L.; FYFE, M.; ROMNEY, M. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis**, vol 17, n 2, p. 193–9. 2011;

MACEDO, M.; PEREIRA, M. L. S.; SILVA, F. H. B. Plantas com provável ação antifúngica utilizadas pelos moradores do bairro Cidade Verde, Cuiabá, Mato Grosso. **Flovet**, vol 1, n. 3,2011.

MACIEL, D. S. A.; FREITAS, V. P.; CONSERVA, G. A. A.; ALEXANDRE, T. R.; PURISCO, S. U.; TEMPONE, A. G.; MALHEM, M. S. C.; KATO, M. J.;

GUIMARÃES, E. F.; LAGO, J. H. G.; Bioactivity-guided isolation of laevicarpin, an antitrypanosomal and anticryptococcal lactam from *Piper laevicarpu* (Piperaceae). **Fitoterapia**, vol 111, p. 24–28. 2016.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, vol 9, p. 34–39. 2001;

MARR, K.; DATTA, K.; PIROFSKI, L. *Cryptococcus gattii* Infection in healthy Hosts: A Sentinel for Subclinical Immunodeficiency? **Clin Infect Dis**, vol 54, n 1, p.153–4, 2012;

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Spectrum**, vol 17, p. 31:03, 2016.

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

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Curr Fungal Infect Rep**, vol 4, n 4, p. 266-275, 2010.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**. vol, 31, p. 669-679, 2010.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; TAR, M.; CORDERO, R. J.; HAN, G.; FRIEDMAN A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against candidal biofilms, using an *in vivo* central venous catheter model. **J Infect Dis**. vol 201, p. 1436–1440, 2010.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**. vol 73, p. 6350–62. 2005;

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**, vol 73, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infect Immun**, vol 74, p. 6118-23, 2006.

MARTINEZ, L.R.; CHRISTAKI, E.; CASADEVALL, A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronylmannan antagonizes antifungal drug action against cryptococcal biofilms in vitro. **J Infect Dis**.vol 194, p. 261–6. 2006;

MARTINEZ, L.R.; IBOM, D. C.; CASADEVALL, A.; FRIES, B. C. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Mycopathologia**, vol 166, p. 175–180, 2008.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin**, vol 30, n 1, p. 179–206. 2008.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. **Revista da FAE**. Curitiba, vol 11, n.1, p.19-32, 2008.

MITCHELL, D.H.; SORRELL, T. C.; ALLWORTH, A. M. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clin Infect Dis**, vol 20, p. 611–616. 1995;

MUNDY, R. D.; CORMACK, B. Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. **J Infect Dis**. vol 199, p. 1891–1898, 2009.

MYERS, N.R.A.; MITTERMEIER, C.G.; MITTERMEIER, G.B. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n.403, p.853-858, 2000.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; REZENDE, U. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Ver. Bras. Farmacogn**, vol 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

NUNES, W. B. **Avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho do campo em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiás. p. 112, 2000.

OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M.; SOUZA, K. C. B.; RESENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, vol. 67, n. 2, p. 176-177. 1996.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* sp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol Res**, vol 164, p. 221-227, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C.; Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**. 2012;

RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; WORMLEY, F.L. Jr. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. **Mycopathologia**, vol 167, p. 307–314, 2009.

RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (MART et SCHR.) PILGER**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

SAIJO, T.; CHEN, J.; CHEN, S. Anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, vol 5, n 2, p. 00912–4, 2014;

SARDI, J. C. O; PITANGUI, N. S; ARELLANES, G. R; TAYLOS, M. L; ALMEIDA, A. M. F; GIANNINI, M. J .S; Highlights in pathogenic fungal biofilms- **Revista Iberoamericana de Micología**, Set 2013.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J.; A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Sci Technol Int**, vol 43, p. 573–583, 2010.

SIQUEIRA, J. M.; CASTRO, M. S. A.; MELLO, J. C. P.; KASSAB, N. M.; VIEIRA, I. C. P.; AMORIM, L. W. K.; GUERRA, M. C.; RESENDE, U. M. Flavanona do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (MART. and SCH.) Pilger (algodãozinho-do-campo). **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Fortaleza. 1994

SLOAN, D. J.; PARRIS, Victoria. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clin Epidemiol**, vol 6, n. 6, p. 169-182, 2014.

SÓLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G.; MACEDO, C. S.; KLEIN, A.; DIASJUNIOR, C. A.; SIQUEIRA, C. M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Quím. Nova**, vol 35, n. 6, p. 1169-1172, 2012.

SOUZA, C.D.; FELFILI J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil, **Acta Botanica Brasilica**, vol 20, n.1, p.135-142, 2006.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, vol 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Infect Dis**. vol 21, p.: 28-35.1995;

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**. Vol 56,p.187–209, 2002.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TORTORANO, A.M.; DHO,G.; PRIGITANO, A.; BREDA, G.; GRANCINI, A.; EMMI, V.; ECMM-FIMU A StudyGroup. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). **Mycoses**, vol 55, p. 73–79, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneve. vol 1, 2003.



## **5. ANEXOS**

### **5.1 Artigo**

O artigo científico a seguir será submetido à revista *Industrial Crops and Products* e as normas para a submissão neste periódico encontram-se no item 5.2.

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*Cochlospermum regium*(Mart &Schrank) Pilger(Bixaceae)CONTRA  
*Cryptococcusgattii***

**XXX<sup>1\*</sup>; XXX<sup>1</sup>;XXX; XXX<sup>1</sup>**

Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD. Rodovia Dourados – Itaum Km 12. 798000-000 Dourados MS.  
\*E-mail: aaraujo.a@hotmail.com

**Resumo**

Criptococose é uma micose sistêmica que acomete pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, sendo a segunda enfermidade neurológica mais fatal no Brasil. Esta doença é ocasionada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, prevalecendo às espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Estes microrganismos possuem potencial de formar biofilme, este considerado um importante fator de virulência. *Cochlospermum regium* (Bixaceae) é conhecida popularmente como “algodãozinho” ou “algodãozinho-do-campo” com atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, entre outras. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* contra biofilmes de *Cryptococcus gattii*.O extrato etanólico das folhas de *C. regium* apresentou atividade inibitória na formação de biofilme, e também redução de biofilme formado frente a *C. gattii* ATCC 56990, cuja as concentrações testadas apresentaram valores significativos ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA e o pós-teste de Tukey. Em ambos os testes realizados, a concentração de 10 mg/L<sup>-1</sup> apresentou uma atividade destacada quando comparada com as demais concentrações e o controle não tratado. Portanto, estes resultados demonstram que o extrato etanólico das folhas de *C. regium* pode ser considerado uma fonte promissora e importante alternativa para o desenvolvimento de drogas antifúngicas no combate de biofilmes de *C. gattii*, como também de doenças sistêmicascausadas por leveduras do gênero *Cryptococcus*.

**Palavras- chave:** Criptococose. Biofilme. Doenças Sistêmicas. *Cochlospermum*.

## 1. INTRODUÇÃO

*Cryptococcus* sp. são fungos leveduriformes basidiomicetos, que possuem mais de 30 espécies, mas apenas as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são conhecidas por causar criptococose, micose sistêmica e oportunista, que se inicia nos pulmões e se dissemina para o sistema nervoso central até outros lugares do corpo humano como pele, próstata, olhos e articulações ósseas (Marr et al., 2012; Rosen et al., 2013; Maziarz & Perfect, 2016).

*C. gattii* é considerado como um agente patogênico de pacientes imunocompetentes, assim como em imunocomprometidos, incluindo defeitos imunes subclínicos pré-existentes que são relatados como fatores de risco para a infecção desta espécie (MacDougall et al., 2011; Rosen et al., 2013; Saijo et al., 2014). No Brasil, pode ser isolado de fontes ambientais, clínicas e através de secreções de aves (Abegg et al., 2006; Alvarez et al., 2008). Uma forma de patogenia de *C. gattii* ocorre por meio de biofilmes, que são comunidades microbianas dinâmicas, com estrutura tridimensional que se adere a uma superfície, cujas células encontram-se circundadas por uma matriz extracelular polimérica as quais se comunicam entre si por meio de moléculas químicas, denominado *quorum sensing*. O biofilme confere resistência aos antifúngicos, o que torna alvo para o desenvolvimento de novas estratégias para seu combate (Martinez & Casadevall, 2006; Martinez & Casadevall, 2010; Ramage et al., 2012; Albuquerque & Casadevall, 2012; Martinez & Casadevall, 2016).

Uma dessas estratégias pode se dar ao uso de plantas com potencial medicinal, pois tal interesse vem aumentando a cada dia. Isso ocorre devido à presença de compostos que são capazes de atuarem como antimicrobiano, sendo um grande potencial no combate de biofilmes (Calixto, 2005; Milward-de-Azevedo, 2008; Tiwari et al., 2009; Roundset et al., 2012).

*Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae), é uma planta nativa do cerrado brasileiro, utilizada na medicina popular no Brasil. No Brasil, o seu uso é indicado para o tratamento de doenças como inflamações articulares, infecções geniturinárias, infecções uterinas, infecções na próstata, entre outras infecções internas e externas (Siqueira et al., 1994; Oliveira et al., 1996; Nunes et al., 2003; Solon et al., 2012). Considerando que os extratos vegetais podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de agentes antifúngicos, o objetivo deste estudo foi avaliar a

atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* contra biofilmes de *Cryptococcus gattii*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e extração

As folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) foram coletadas na fazenda “Mata dos Macacos”, nos pontos S 22° 08' 47.2" / W 054° 54' 54.1" na cidade de Dourados, MS - Brasil. Com identificação da espécie realizada pela Prof. Dra. Zefa Valdivia Pereira, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e depositadas no herbário sob o número de registro DDMS 5001.

As folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) foram tratadas, higienizadas e secas em estufa de ar circulante à uma temperatura de 45°C por sete dias. Após a secagem as folhas foram trituradas em moinho de facas. O material vegetal foi solubilizado em 1000 mL de etanol absoluto PA e deixados à temperatura ambiente, com agitação uma vez por dia a cada 24 h. Após 72 h foi filtrado em papel filtro e o extrato vegetal foi concentrado em rota-evaporador (Rotaevapor R – 215) à 35 °C, para completa eliminação do solvente orgânico. Finalmente, foi liofilizado (ValuPump VLP80 Savan) para obter um extrato livre de solvente e puro. O extrato etanólico pronto foi armazenado sob refrigeração de 4°C até sua utilização para os testes biológicos.

### 2.2. Atividade na formação de Biofilme de *C. gattii*

Foi utilizada uma cepa padrão de *C. gattii* proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC) sob o número 56990, cultivada em caldo Sabouraud dextrose durante 48 h a 35 °C em estufa de agitação orbital a 80 rpm. As células foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fostato (PBS) e centrifugadas a 1500 rpm. Após a lavagem, foram ressuspensas em meio RMPI 1640 e ajustada a densidade celular de  $1 \times 10^8$  UFC/mL utilizando câmara de Neubauer (Martinez & Casadevall, 2006).

O efeito do extrato etanólico das folhas de *C. regium* sobre a formação de biofilme foi avaliada de acordo com Nostro et al., (2007), em triplicata com adaptações. A partir de estudos prévios realizados no laboratório que determinaram a atividade antifúngica frente a *C. gattii* ATCC 56990 de vida planctônica, foram utilizadas três concentrações do extrato de *C. regium*, sendo de: 2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL, as quais foram adicionados 100 µL em placas de microdiluição com 96 poços estéreis. Além disso, foi adicionado 100 µL da suspensão de inóculo em cada poço. Poços de controle positivo (células + caldo) e controle negativo (apenas caldo) foram utilizados. Por fim, as placas foram incubadas em estufa de agitação orbital a 70 rpm à 35 °C por 72 h. Após o meio foi aspirado. As células não aderentes foram removidas por lavagem duas vezes com PBS para a quantificação das células viáveis.

### **2.3. Atividade sobre biofilme formado de *Cryptococcus gattii***

#### **2.3.1. Formação do biofilme**

A formação de biofilme foi realizada de acordo com Martinez & Casadevall (2006), em triplicata com adaptações. Foi utilizada a cepa padrão de *C. gattii* ATCC 56990, cultivada em caldo Sabouraud dextrose por 48 h a 35 °C em estufa de agitação orbital a 80 rpm. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e recolhidas por centrifugação a 1500rpm. Após a lavagem, foram ressuspensas em PBS e ajustada a densidade celular utilizando câmara de Neubauer de forma a se obter uma concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, estas foram adicionada em meio RPMI 1640 (Martinez & Casadevall, 2006).

Em placas de microdiluição de 96 poços adicionou-se inicialmente 100 µL de meio RMPI, e 100 µL da suspensão de leveduras na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Incubou-se a 35 °C sem agitação por 2 h, para fase de adesão inicial e em seguida colocou-se em estufa de agitação orbital a 70 rpm à 35 °C por 72 h. Posteriormente lavou-se três vezes os poços com PBS, para remoção das células não aderidas (Martinez & Casadevall, 2006).

#### **2.3.2. Tratamento do biofilme com *C. regium***

Foram utilizadas as concentrações de 2,5 mg/L<sup>-1</sup>, 5 mg/L<sup>-1</sup> e 10 mg/L<sup>-1</sup> extrato etanólico das folhas de *C. regium*. Foram adicionados 200 µL de cada concentração do

extrato em triplicata em cada poço da microplaca. Incubou-se a 35 °C por 48 h em estufa de agitação orbital a 70 rpm (Martinez & Casadevall, 2006).

## **Quantificação**

### **Das células viáveis**

Para avaliar a atividade do extrato na formação de biofilme e no biofilme maduro, realizou-se a quantificação das células viáveis, por meio do número de unidades formadoras de colônias dos biofilmes resultantes ( $\log_{10}$  CFU). Após a formação e tratamento dos biofilmes, foi retirado o meio e adicionado 100  $\mu$ L de solução salina aos poços, e com o auxílio de uma ponteira removeu-se os mesmos dos poços (Monteiro et al., 2013).

Retirou-se 100  $\mu$ L de cada poço e foi realizado diluições em série até  $10^{-8}$  em salina. Posteriormente por meio da técnica *Drop plate*, 3 alíquotas de 10  $\mu$ L foi plaqueado em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas durante 48 horas a 35 °C (Monteiro et al., 2013). Foi determinado a porcentagem de viabilidade de UFC dos biofilmes tratados com extrato e os não tratados.

### **2.5. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados por meio da ANOVA e as médias foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo para todas as avaliações. As análises estatísticas e gráficos foram realizadas por meio do *software* GraphPadPrism® 7.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

## **3. RESULTADOS**

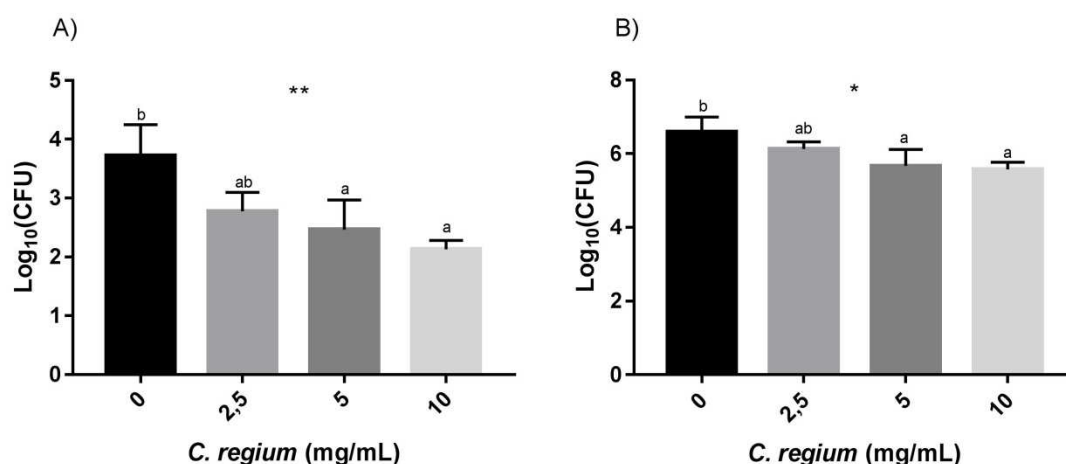
### **3.1. Atividade na formação de biofilme**

*C. gattii* mostrou capacidade de formar biofilme em microplaca de 96 poços, e o extrato etanólico das folhas de *C. regium* mostrou atividade na formação de biofilme de *C. gattii*, o qual pode ser observado na figura 1A, por meio do número das células viáveis (em  $\log_{10}$ CFU). Pode-se observar que, o extrato utilizado na menor concentração houve uma redução das células capazes de formar biofilme (2,8  $\log_{10}$  CFU), mas não

apresentou diferença significativa do controle, no entanto nas concentrações de 5 mg/L<sup>-1</sup> (2,6 log<sub>10</sub> CFU) e 10 mg/L<sup>-1</sup> (2,1 log<sub>10</sub> CFU), foi possível observar uma redução significativa (P<0,05), em relação ao controle (3,7 log<sub>10</sub> CFU).

### 3.2. Atividade sobre biofilme formado de *C. gattii*

A atividade de *C. regium* sobre biofilme formado de *C. gattii* pode ser observada na figura 1B, por meio do número das células viáveis após o tratamento. Pode-se observar que a partir da menor concentração de extrato utilizada, houve uma redução das células de biofilme (6 log<sub>10</sub> CFU), e na concentração de 5 mg/L<sup>-1</sup> (5,9 log<sub>10</sub> CFU) e 10mg/L<sup>-1</sup> (5,5 log<sub>10</sub> CFU) houve uma redução significativa (P<0,05) das células de biofilme de *C. gattii* em relação ao controle sem tratamento (6,5 log<sub>10</sub> CFU).



**Figura 1.** Atividade do extrato etanólico das folhas de *C. regium* sobre *C. gattii* ATCC 56990. **A:** Avaliação da atividade de *C. regium* na formação de biofilme por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\* (P<0,05) indica diferença significativa. As letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre estas pelo teste de média (P<0,05). **B:** Avaliação da atividade de *C. regium* em biofilme formado por meio da ANOVA e pós-teste de Tukey. \* (P<0,05) indica diferença significativa. As letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre estas pelo teste de média (P<0,05).

## 4. DISCUSSÃO

A criptococose é uma importante micose sistêmica que acarreta pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, sendo a terceira doença com maior prevalência em pacientes portadores do vírus HIV (Prado et al., 2009; Lanjewar, 2011; Nyazika et al., 2016). *Cryptococcus gattii* tem a capacidade de se manifestar tanto em

imunocomprometidos quanto em imunocompetentes (Saijo et al., 2014; MacDougall et al., 2011), o que torna um importante objeto de estudo.

O tratamento para a criptococose é limitado, sendo realizado pela administração em combinação de agentes antifúngicos, como anfotericina B (AMB), análogos de pirimidina como 5-flucitosina (5-flu), derivados de azóis como fluconazol (FLU) (Jarvis et al., 2008; Sloan et al., 2008; Sanglard et al., 2009). Sendo AMB o antifúngico de amplo espectro mais utilizado para o tratamento, entretanto, possui alta toxicidade apresentando nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, seguido com a administração em conjunto de FLU ou 5-flu ao paciente (Jarvis et al., 2008; Sloan et al., 2008; Sanglard et al., 2009). Quando relacionado aos biofilmes, são necessárias doses maiores destas drogas, pois este é considerado como fator de virulência e resistência para *Cryptococcus* sp., o que pode elevar sua toxicidade (Martinez & Casadevall, 2006; Ramage et al., 2012).

Devido os antifúngicos convencionais apresentar reações adversas ao organismo ou até o aumento de sua resistência, vê-se a necessidade de novas drogas como alternativa para o tratamento de criptococose, atividade em biofilmes e anti-*Cryptococcus* (Macielet al., 2016). A bioprospecção de produtos derivados de plantas vem sendo um importante meio de controle fúngico (Nascimento et al., 2000), o que pode ser um meio alternativo no combate de doenças sistêmicas, como também podendo apresentar menor toxicidade que os antifúngicos convencionais.

Os produtos naturais vêm sendo muito utilizados como protótipos para a obtenção de medicamentos inovadores, que podem ser úteis contra doenças infecciosas. A presença de metabólitos de diversos padrões estruturais mostrou ter ação contra leveduras oportunistas, bem como o rastreamento de extratos de plantas é uma estratégia válida a ser explorada para descobrir novos agentes antifúngicos (Abubacker & Devi, 2014; Butler et al., 2014; Abiodun et al., 2015).

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) apresentou atividade contra biofilmes de *C. gattii* e o que torna um promissor agente antifúngico. Na formação este pode atuar na prevenção de novas adesões desta levedura e novos focos, e quando formado o extrato pode desestabilizar o biofilme facilitando a ação do antifúngico. *C. regium* possui diversos metabólitos em



seus constituintes como compostos fenólicos, flavonoides, taninos e saponinas sendo que alguns derivados de fenol como ácido gálico, e flavonoides foram comprovados com ação antimicrobiana (Siqueira et al., 1994; Nunes et al., 2003; Hong et al., 2011; Solon et al., 2012; Rangkadilok et al., 2012; Gehrke et al., 2013; Manayi et al., 2013). Tal ação foi comprovada quando o extrato etanólico das folhas de *C. regium*, foi avaliado por Santos et al., (2012) frente a diferentes espécies de *Candida*, evidenciando o potencial antifúngico de compostos secundários desta planta.

Lima et al. (2016), avaliaram 15 compostos não alcaloides, flavonoides e ácidos fenólicos isolados de uma planta medicinal *Pterogynenitens*, que possui compostos como alcalóides guanidina, flavonóides, ácidos fenólicos, triterpenos e esteróis, com potencial antimicrobiano frente a células planctônicas *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* e neste estudo somente um composto, flavona pertencente aos flavonóides apresentou resultados de interesse para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas (Regasini et al., 2008.; Ferreira et al., 2009; Regasini et al., 2009).

O extrato bruto e frações de *Pimenta pseudocaryophyllu* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) foi avaliado em células sésseis e em biofilme de *C. neoformans* e *Candida sp.*, e este mostrou eficiência em ambos os testes, no qual a presença de terpenos, fenilpropanóides, hidrocarbonetos, álcoois eugenol, metil-eugenol, taninos, flavonoides e traços de heterosideosantraquinônicos, podem conferir a potencial ação antifúngica deste (Paula et al., 2012; ElAssal et al., 2012).

Amirrajabet al., (2009) avaliaram a atividade antifúngica de *Satureja khuzestanica* Jamzad frente a *C. neoformans*, e obtiveram a inibição do crescimento destas, considerando este ser um possível agente antifúngico. Existem poucos relatos que utilizam extratos vegetais para avaliar a atividade em biofilmes da espécie *C. gattii*, o que torna necessário a realização de novos estudos utilizando plantas para esta espécie, devido ao alcance do número de pessoas que este microrganismo possa acometer e também o local onde pode ser encontrado. Com isso, os resultados demonstrados neste estudo são de suma importância para o auxílio no controle de *C. gattii*.

O presente estudo corrobora com a hipótese de que o uso de plantas medicinais possui uma importante fonte alternativa para o tratamento de patologias fúngicas,

evidenciando a importância de um estudo aprofundado sobre o uso de plantas medicinais.

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou o potencial do extrato etanólico das folhas de *C. regium* na redução de biofilme maduro e em inibir a formação de biofilme de *C. gattii*. O extrato etanólico das folhas pode ser uma alternativa para utilizar em associação com antifúngicos já utilizados nas infecções causadas por *Cryptococcus*. Vale ressaltar que, o tratamento de criptococose é limitado a poucos antifúngicos, o que torna relevante estudos que avaliam a atividade de novas moléculas frente a leveduras do gênero *Cryptococcus* em forma planctônica ou em biofilme. Adicionalmente, outros estudos devem ser realizados para a elucidação do seu mecanismo de ação em biofilme maduro ou na sua formação.

## 6. AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abegg, M. A., Cella, F. L., Faganello, J., 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *Psittaci* forms in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*. 161, 83 – 91.

Abiodun, O.O., Sood, S., Osiyemi, O.A., Agnihotri, V.K., Gulati, A., Ajaiyeoba, E.O., Singh, B., 2015. *In vitro* antimicrobial activity of crude ethanol extracts and fractions of *Terminalia catapa* and *Vitex doniana*. *Afr. J. Med. Sci.* 44 (1), 21-6.

Abubacker, M.N., Devi, P.K., 2014. *In vitro* antifungal potentials of bioactive compound oleic acid, (octadecyloxy) propyl ester isolated from *Lepidagathis cristata* Willd. (Acanthaceae) inflorescence. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 7, S190-3.

- Albuquerque, P., Casadevall, A., 2012. Quorum sensing in fungi: a review. *Med. Mycol.* 50, 337–45.
- Alvarez, M., Saylor, C., Casadevall, A., 2008. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. *Cell. Microbiol.* 10, 1622–1633.
- Amirrajab, N., Zarrin, M., Sadeghinejad, B., 2009. P89 In vitro antifungal activity of *Satureja khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 34 (2), S55.
- Butler, M.S., Robertson, A.A., Cooper, M.A., 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31 (11), 1612-61.
- Calixto, J. B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *J. Ethnopharmacol.* 100, 131 –134.
- El-Assal, F. E., Silva, M. D. R. R., Joelma, A. D., Paula, F. P. D. C., Abrão, F. Y., 2012. Bioatividade in vitro da planta, Pimenta *Pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum (Myrtaceae) sobre *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans*. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/doutorado/trabalhos-doutorado/doutorado-flavio-ezzeddine.pdf>> Acesso em 12 de Agosto de 2016.
- Ferreira, F.G., Regasini, L.O., De Oliveira, A.M., Campos, J.A.D., Silva, D.H.S., Cavalheiro, A.J., Dos Santos, R.A., Bassi, C.L., Bolzani, V.S., Soares, C. P., 2009. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of different fractions of *Pterogyne nitens* (Leguminosae), using *Tradescantia pallid* micronuclei assay. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 61-7.
- Gehrke, I. T., Neto, A. T., Pedroso, M., Mostardeiro, C. P., Da Cruz, I. B., Silva, U. F., Ilha, V., Dalcol, I. I., Morel, A. F., 2013. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 148 (2), 486–491.
- Hong, L. S., Ibrahim, D., Kassim, J., Sulaiman, S., 2011. Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume. *J. Appl. Pharm. Sci.* 1 (6), 75-79.

Jarvis, J.N., Dromer, F., Harrison, T. S., Lortholary, O., 2008. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21 (6), 596-603.

Lanjewar, D.N., 2011. The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of 236 autopsied cases in Mumbai, India. *Pathol. Res. Int.* 2011, 547-618.

Lima, C.S., Polaquini, C.R., Dos Santos, M.B., Gullo, F.P., Leite, F.S., Scorzoni, L., Da-Silva-Bolzani, V., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M., Rezende, A.A., Regasini, L.O., 2016. Anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 6(10), 841-845.

MacDougall, L.; Fyfe, M., Romney, M., 2011. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2), 193–9.

Maciel, D. S. A., Freitas, V. P., Conserva, G. A. A., Alexandre, T. R., Purisco, S. U., Tempone, A. G., Malhem, M. S. C., Kato, M. J., Guimarães, E. F., Lago, J. H. G., 2016. Bioactivity-guided isolation of laevicarpin, an antitrypanosomal and anticryptococcal lactam from *Piper laevicarpu* (Piperaceae). *Fitoterapia.* 111, 24–28.

Manayi, A. Saeidnia, S., Faramarzi, M. A., Samadi, N., Jafari, S., Vazirian, M., Ghaderi, A., Mirnezami, T., Hadjiakhoondi, A., Ardekani, M. R., Khanavi, M., 2013. A comparative study of anti-*candida* activity and phenolic contents of the calluses from *Lythrum salicaria* L. in different treatments. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (1), 176–184.

Marr, K., Datta, K., Pirofski, L., 2012. *Cryptococcus gattii* Infection in healthy Hosts: A Sentinel for Subclinical Immunodeficiency? *Clin. Infect. Dis.* 54 (1), 153–4.

Martinez, L. R., Casadevall, A., 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50(3), 1021–1033.

Martinez, L. R., Casadevall, A., 2016. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Spectrum.* 17, 31:03.

Martinez, L. R., Fries, B. C., 2010. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr. Fungal. Infect. Rep.* 4 (4), 266-275.

Maziarz, E. K., Perfect, J. R., 2016. Cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 30 (1), 179–206.

Milward-De-Azevedo, M. A., Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. *Revista da FAE.* 11 (1), 19-32.

Monteiro, D. R., Silva, S., Negri, M., Gorup, L. F., Camargo, E. R., Oliveira, R., Barbosa, D. B., Henriques, M., 2013. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses.* 56, 672–680.

Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L., 2000. Atividade de extratos Vegetais e fitofármacos Sobre Bactérias Resistentes a Antibióticos. *Braz. J. Microbiol.* 31 (4), 247-256.

Nostro, A., Roccaro A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56, 519-23.

Nunes, G. P., Silva, M. F., Rezende, U. M., Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* 13 (2), 83-92.

Nyazika, T.K., Hagen, F., Meis, J.F., Robertson, V.J., 2016. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. *J. Infect.* 72, p.745-752

Oliveira, C. C., Siqueira, J. M., Souza, K. C. B., Resende, U. M., 1996. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. *Fitoterapia.* 67 (2), 176-177.

Paula, J. A. M., Silva, M. R. R., Costa, M.P., Diniz, D.G.A., Sá, F.A.S., Alves, S.F., Costa, E.A., Lino, R.C., Paula J.R., 2012. Phytochemical analysis and antimicrobial,

antinociceptive, and anti-inflammatory of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). Evidence-based Complement Alternat Med. 2012, 1-15.

Prado, M., Silva, M.B., Laurenti, R., Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2009. A Mortalidade por micoses sistêmicas como a principal causa de morte ou em associação com Aids no Brasil: uma revisão de 1996 a 2006. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104 (3 ), 513-521.

Ramage, G., Rajendran R., Sherry, L., Williams, C., 2012. Fungal biofilm resistance. Int. J. Microbiol. 2012.

Rangkadilok, N. Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S. C., Junyaprasert, V. B., Buajeeb, W., Akanimanee, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T., Satayavivad, J., 2012. *In vitro* antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. Fitoterapia. 83 (3), 545-553.

Regasini, L.O., Fernandes, D.C., Castro-Gamboa, I., Siqueira-Silva, D.H., Furlan, M., Da Silva Bolzani, V., Barreiro, E.J., Cardoso-Lopes, E.M., Young, M.C.M., Torres, L.B., Velloso, J.C.R., De Oliveira, O.M.M., 2008. Chemical constituents of the flowers of *Pterogynenitens* (Caesalpinioideae). Quim. Nova. 31 (4), 802-6.

Regasini, L.O., Vieira-Júnior, G.M., Fernandes, D.C., Da-Silva-Bolzani, V.S., Cavalheiro, A.J., Siqueira Silva, D.H., 2009. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogynenitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. J. Chil. Chem. Soc. 54 (3), 218-21.

Rosen, L., Freeman, A., Yang, L., 2013. Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. J. Immunol. 190, 3959–66.

Rounds, L., Havens, C. M., Feinstein, Y., Friedman, M., Ravishankar, S., 2012. Plant extracts, spices, and essential oils inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties. J. Agr. Food. Chem. 60 (14), 3792-3799.

Saijo, T., Chen, J., Chen, S., 2014. Anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. MBio. 5 (2), 00912–4.

Sanglard, D., Coste, A., Ferrari, S., 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS. Yeast. Res.* 9 (7), 1029-1050.

Siqueira, J. M., Castro, M. S. A., Mello, J. C. P., Kassab, N. M., Vieira, I. C. P., Amorim, L. W. K., Guerra, M. C., Resende, U. M., 1994. Flavanona do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (MART. and SCH.) Pilger (algodãozinho-do-campo). Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil.

Sloan, D., Dlamini, S., Paul, N., Dedicoat, M., 2008. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. *Cochrane Database Syst Rev.* 4, CD005647.

Sólon, S., Carollo, C. A., Brandão, L. F. G., Macedo, C. S., Klein, A., Diasjunior, C. A., Siqueira, C. M., 2012. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. *Quím. Nova.* 35 (6), 1169-1172.

Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarapan, K., Bourke, P., Cullen, P. J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agr. Food. Chem.* 57 (14), 5987-6000.

## **5.2 Normas da Revista- Industrial Crops and Products**